

U n i v e r z i t a P a l a c k é h o v O l o m o u c i

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



Interakce nanostrukturních materiálů s živými buňkami

Disertační práce

Autor:

Mgr. Lucie Hochvaldová

Školitel:

doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

Studijní program:

N 1407 Chemie

Studijní obor:

Fyzikální chemie

Forma studia:

Prezenční

Olomouc 2023

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

V Olomouci dne

.....

Tímto bych ráda poděkovala doc. RNDr. Aleši Panáčkoví, Ph.D. za cenné rady a věnovaný čas, jenž mi poskytl během zpracovávání disertační práce. Ráda bych také poděkovala Mgr. Renatě Večeřové, Ph.D., za zaškolení v Mikrobiologické laboratoři a všeobecně za pomoc a zázemí, jež mi poskytla při testování biologických účinků nanočástic. Dále bych ráda poděkovala za veškerou finanční podporu z grantových projektů, která mi pomohla financovat moje doktorské studium, stáže a konference, jež mi umožnily prezentovat dosažené výsledky a rozvíjet mé schopnosti a dovednosti. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem svým kolegům, jež se jakýmkoli způsobem podíleli na kterémkoli z mých článků, nebo mě přizvali ke spolupráci na jejich výzkumu a dovolili tak vzniku zajímavých vědeckých prací, jež jsou citovány a dále popisovány v rámci této disertační práce.

Autorka této disertační práce během svého doktorského studia prováděla vlastní výzkum, opakovaně absolvovala zahraniční stáž, řešila či se podílela na řešení grantových projektů a jako autor a spoluautor výsledky publikovala v řadě vědeckých publikací a prezentovala je na mezinárodních konferencích.

Odborné vědecké publikace:

1. **Hochvaldová L**, Večeřová R, Kolář M, Pucek R, Kvítek L, Lapčík L, et al. Antibacterial nanomaterials: Upcoming hope to overcome antibiotic resistance crisis. *Nanotechnol Rev* 2022;11:1115–42.
2. **Hochvaldová L**, Panáček D, Válková L, Pucek R, Kohlová V, Večeřová R, et al. Restoration of antibacterial activity of inactive antibiotics via combined treatment with a cyanographene/Ag nanohybrid. *Sci Rep* 2022;12.
3. Mistrik M, Skrott Z, Muller P, Panacek A, **Hochvaldova L**, Chroma K, et al. Microthermal-induced subcellular-targeted protein damage in cells on plasmonic nanosilver-modified surfaces evokes a two-phase HSP-p97/VCP response. *Nat Commun* 2021;12.
4. Panáček D, **Hochvaldová L**, Bakandritsos A, Malina T, Langer M, Belza J, et al. Silver Covalently Bound to Cyanographene Overcomes Bacterial Resistance to Silver Nanoparticles and Antibiotics. *Advanced Science* 2021;2003090:3–10.
5. Svoboda L, Bednar J, Dvorsky R, Panacek A, **Hochvaldova L**, Kvítek L, et al. Crucial cytotoxic and antimicrobial activity changes driven by amount of doped silver in biocompatible carbon nitride nanosheets. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2021;202.
6. Bazhina ES, Bovkunova AA, Shmelev MA, Korlyukov AA, Pavlov AA, **Hochvaldová L**, et al. Zinc(II) and copper(II) complexes with N-substituted imines derived from 4-amino-1,2,4-triazole: Synthesis, crystal structure, and biological activity. *Inorganica Chim Acta* 2023;547.
7. Loubalová I, Zahradníková E, Masaryk L, Nemec I, **Hochvaldová L**, Panáček A, et al. Antibacterial study on nickel and copper dicarboxylate complexes. *Inorganica Chim Acta* 2023;545.

Účast na grantových projektech:

- 2019-2021 GAČR 19-22720S „Nové nanostrukturní materiály pro eliminaci vysoce rezistentních a multirezistentních bakterií a pro překonání antibiotické rezistence“
- 2020-2023, MZ0/NU NU20-05-00165 Možnosti nanočásticemi stříbra potencionované antibioterapie v léčbě závažných bakteriálních infekcí – studie in vitro a in vivo
- 2021, MŠMT, Podpora mobility na UP II., Pracovní pobyty výzkumných pracovníků – juniorů v zahraničí (Paris Lodron Univerzita Salzburg, září-prosinec 2021)
- 2022, DSGC-2021-0120 Light-assisted in vitro therapy using plasmonic materials (IGRÁČEK, UP)
- 2023, AKTION – Česko-Rakouská spolupráce, „Enhancing the effect of antibiotic therapy using innovative nanostructured materials based on silver nanoparticles to eliminate infections and inflammatory reactions caused by gastrointestinal pathogens“ (únor 2023)

Účast na konferencích a seminářích

- Konference „Antibiotics, Antimicrobials & Resistance“ (poster) - „Bacterial resistance to silver nanoparticles“ (10/2019, Řím, IT)
- Kurz infračervené spektroskopie „Měření vibračních spekter“ (01/2020, Praha)
- Kurz „Základy FT-IR spektroskopie a práce s programem Omnic“ (03/2020, Praha)
- Konference a letní škola „Nanotextology 2020“ (poster) – „Potential of silver nanoparticles in biological applications“ (07/2020, Soluň, GR)
- XXIX International Materials Research Congress (prezentace) – „Silver nanoparticles in antibacterial therapy and other medical applications“ (08/2021, Cancun, MEX)
- NanoBioTech konference (poster, snap prezentace) – „Plasmonic nanosilver-modified surfaces for microthermal-induced protein damage in cells (11/2021, Montreux, CH)
- NanoInBio konference a letní škola (poster) – „Silver modified surfaces as a platform for basic research and other medical applications“ (05/2022, Guadeloupe, FR)
- IUVSTA workshop (poster) – „Synthesis of silver and gold nanoparticles with tunable plasmonic properties and their deposition on cultivation plates“ (06/2022, Guimaraes, PT)
- Mezinárodní Sjezd chemiků (poster) – „Plasmonic nanosilver-modified surfaces for photothermal therapy“ (09/2022, Olomouc, ČR)
- NanoMed (poster) – „Nanofabrication of tuneable plasmonic noble metal nanoparticles and their subsequent formation onto cultivation plates used in photothermal therapy“ (10/2022, Atény, GR)
- NanoBioMed (poster) – „Silver modified surfaces for photothermal therapy“ (11/2022, Barcelona, ES)

Bibliografická identifikace

Autor	Lucie Hochvaldová
Název práce	Interakce nanostrukturních materiálů s živými buňkami
Typ práce	Disertační
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	Cílem této disertační práce byla syntéza nanostrukturních materiálů s potenciálním využitím v biologických aplikacích. Pozornost byla zaměřena převážně na nanočástice stříbra, kompozity s různými nanostrukturními materiály na bázi stříbra a sledování jejich interakce s bakteriálními a savčími buňkami. S ohledem na narůstající problém vzniku bakteriální rezistence vůči běžně využívaným antibiotikům byla studována antibakteriální aktivita nanomateriálů a jejich mechanismy účinku, a to i v kombinaci s antibiotiky, jež vůči daným bakteriálním kmenům ztrácejí schopnost léčit jimi způsobené bakteriální infekce. Jelikož jsou si bakterie schopny vytvořit různé mechanismy obrany vůči široké škále antibiotik, byla tato schopnost studována i u některých vybraných nanomateriálů. S ohledem na další využití nanočástic stříbra byly rovněž studovány i jejich cytotoxické účinky vůči zvířecím i lidským buňkám, díky kterým byly získány další poznatky o možném použití nanočástic stříbra v antibakteriální terapii.
Klíčová slova	nanočástice stříbra, antibiotika, rezistence, bakteriální infekce
Počet stran	197
Jazyk	Český

Bibliographic identification

Author	Lucie Hochvaldová
Title	Interaction of nanomaterials with biological systems
Type of thesis	Dissertation
Department	Department of Physical Chemistry
Supervisor	doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
The year of presentation	2023
Abstract	The main objective of this work was the synthesis of nanostructured materials with potential use in biological applications. The work is mainly focused on silver nanoparticles, silver-based composites and monitoring their interaction with bacterial cells. In the light of the growing problem of bacterial resistance to commonly used antibiotics, the antibacterial activity of nanomaterials and their mechanisms of action were studied alone and in combination with antibiotics that are currently losing their ability to treat bacterial infections related to resistant bacterial strains. Bacteria are known for the development of different defense mechanisms against a wide range of antibiotics, therefore the ability to build up resistance towards selected nanomaterials was also tested. Considering further use of silver nanoparticles, their negative effects against animal and human cells were studied to provide information about their toxicity and possible use of silver nanoparticles in antibacterial therapy.
Keywords	silver nanoparticles, antibiotics, resistance, bacteria
Number of pages	197
Language	Czech

TEORETICKÁ ČÁST	11
1. Nanomateriály	11
1.1 Příprava nanočástic	12
1.2 Stabilizace nanočástic	15
2. Nanočástice stříbra pro bio-medicínské aplikace.....	18
3.1 Antibakteriální účinky nanočástic.....	21
3.1.1 Antibakteriální terapie dnes	21
3.1.2 Antibakteriální terapie budoucnosti	25
3.1.2.1 Antibakteriální aktivita nanočástic stříbra.....	27
3.1.2.2 Synergické účinky nanočástic a antibiotik	32
3.1.2.3 Bakteriální rezistence vůči účinkům stříbra	34
3.2 Cytotoxické účinky nanočástic	37
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	50
4. Chemikálie & Bakteriální kmeny.....	50
5. Příprava nanočástic	52
5.1 Příprava nanočástic stříbra	52
5.2 Příprava anizotropních částic stříbra	52
5.3 Příprava grafenového derivátu GCN/Ag.....	53
5.4 Příprava kompozitu nitridu uhlíku se stříbrem (g-C ₃ N ₄ /Ag).....	54
5.5 Příprava stříbrných vrstev	54
6. Charakterizace nanočástic & přístrojové vybavení.....	54
7. Stabilizace nanočástic	56
8. Antibakteriální aktivita testovaných nanočástic.....	57
9. Indukce rezistence	59
10. Testování cytotoxicity.....	60
VÝSLEDKY A DISKUSE	62
11. Příprava a stabilizace nanočástic.....	62
12 Antibakteriální aktivita testovaných nanočástic.....	67
13. Indukce rezistence a její mechanismy	70
14. Testování společného účinku	79
15. Nanočástice stříbra ve fototermální terapii	87
16. Cytotoxicita nanočástic	90
ZÁVĚR	93
SUMMARY	96
LITERATURA	99
SEZNAM PŘÍLOH.....	132

ÚVOD

V současné době je výzkum v oblasti přípravy nanomateriálů, studia jejich vlastností a jejich následné aplikaci v široké škále vědních disciplín i každodenních produktů na vzestupu. Vlastnosti připravených nanočástic nezávisí pouze na typu částic či jejich velikosti, ale na spoustě dalších charakteristik, které lze v rámci syntézy řídit změnou řady parametrů. Díky své malé velikosti a s tím související velké ploše povrchu tyto nanomateriály získávají unikátní fyzikálně-chemické a tím i biologické vlastnosti, jichž lze následně využít v široké škále aplikací.

V rámci této práce bude pozornost zaměřena převážně na využití nanočástic v biologických a medicínských aplikacích. S ohledem na obrovské množství nanomateriálů, a tedy velmi širokou paletu nástrojů využívaných v této oblasti, budou dále podrobněji diskutovány pouze nanočástice stříbra (AgNPs) a nanokompozity na bázi stříbra. V teoretické části disertační práce je zmíněna řada aplikací, jež využívá unikátních vlastností nanočástic stříbra, avšak nejvíce prostoru je věnováno využití biologických účinků nanočástic stříbra v antibakteriální a ve fototermální terapii.

V současné době představuje nárůst počtu bakteriálních infekcí vyvolaných bakteriemi rezistentními vůči běžně využívaným antibiotikům velký terapeutický problém. Pokud bude vznik a šíření bakteriální rezistence narůstat stejnou rychlostí jako doposud, tak se mohou tyto obtížně léčitelné infekce v budoucnu celosvětově stát jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Do té doby je tedy zapotřebí přijít s novými alternativami antimikrobiálních látek či s novými léčebnými postupy, které by pokud možno na bakteriální buňku působily jiným mechanismem, než dosavadní terapeutika a nebyly tak náchylné ke vzniku bakteriální rezistence. Jednou z možných alternativních antimikrobiálních látek jsou nanočástice stříbra, které při nízkých koncentracích, jež nejsou toxické pro savčí buňky, efektivně usmrcují bakterie. Kromě vysoké, a navíc nespecifické antibakteriální účinnosti (víceúrovňový mechanismus účinku) mají nanočástice stříbra také schopnost posilovat účinek antibiotik vůči bakteriím včetně vysoce rezistentních kmenů vůči antibiotikům. Na druhou stranu musí být také souběžně věnována dostatečná pozornost možnosti tvorby rezistence bakterií k novým antibakteriálním látkám včetně nanočástic stříbra, a to s ohledem na vysokou míru přizpůsobivosti bakterií k pro ně nepříznivým podmínkám.

Vedle přímého biologického efektu nanočástic stříbra lze také využít jejich biologické aktivity prostřednictvím fototermálního efektu, tedy za využití absorbované světelné energie a následné transformace na tepelnou, která v důsledku zvýšení teploty vede k usmrcení např. nádorových buněk.

Cílem disertační práce je tedy příprava nanočástic stříbra požadovaných velikostí a tvarů, studium jejich biologických účinků a jejich využití jak v antibakteriální, tak fototermální terapii. Částice byly připravovány řízenou chemickou redukcí z roztoku stříbrných solí na základě změny koncentrace a typu reakčních komponent. Největší pozornost byla zaměřena na testování antibakteriální aktivity připravených nanočástic stříbra a jejich společného účinku s vybranými antibiotiky vůči rezistentním kmenům. Nakonec byla studována schopnost bakterií vytvořit si rezistenci vůči těmto nanomateriálům a také jejich toxicita k jiným než k bakteriálním buňkám, což jsou nezbytné informace k případné preklinické studii a následné translaci tohoto léčebného přístupu bakteriálních infekcí do medicínské praxe.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Nanomateriály

Nanomateriály jsou v posledních desetiletích intenzivně studovanou oblastí a uvádí se, že jsou "materiálem 21. století". Spousta vědeckých týmů z různých vědeckých odvětví, včetně biologie, chemie a materiálových věd se v současnosti věnuje výzkumu, který se soustřeďuje ať už přímo na syntézu nanomateriálů, tedy materiálů s alespoň jedním rozměrem v rozmezí 1 nm až 100 nm, nebo na následné studium jejich různorodých fyzikálně-chemických vlastností a jejich aplikaci v široké škále výzkumných oblastí. [1] Takovéto nanomateriály jsou ve srovnání s běžnými, makroskopickými materiály, velmi odlišné, a to díky svým unikátním fyzikálně-chemickým vlastnostem vycházejícím z velké plochy povrchu částic a z velkého poměru povrchových ku objemovým atomům. Velká plocha povrchu částic souvisí mimo jiné i s velkým počtem aktivních míst na jejich povrchu, jež zvyšují interakce částic s okolními chemickými individui a biologickými systémy. [2,3] Ve srovnání s jinými materiály tedy nanočástice představují velký potenciál v oblasti povrchové chemie, v rámci níž, mohou být na jejich povrch navázány různé funkční skupiny, které mohou cílit na další molekuly, jež jsou předmětem zájmu. [4] V případě interakcí s dalšími látkami částice tedy vynikají svou velkou reaktivitou a katalytickou aktivitou, přičemž velká plocha povrchu při interakci s buňkami vede k vyšším, a někdy často k neočekávaným, biologickým účinkům, ať už vůči prokaryotním, tak eukaryotním buňkám, což může být v některých případech žádoucí, v některých naopak ne. [5] Pro další aplikace pak tedy musí být zajištěné potřebné podmínky a musí být naleznut takový materiál, jehož toxické účinky budou vyšší při mnohem nižších koncentracích v případě patogenních organismů či nádorových buněk než v případě zdravých eukaryotních buněk.

V současné době existuje spousta různých nanomateriálů, které se dělí podle jejich chemického složení, tvarů a požadovaných aplikačních účinků. Velká pozornost se zaměřuje na uhlíkové nanomateriály (grafeny, nanotrubičky, deriváty fullerenu), kovové nanočástice připravované z kovů jako jsou stříbro, železo, měď, zinek, titan, oxid křemičitý a hlinitý, a také přípravu velkého množství nanokompozitů. [6] Poměrně velká pozornost je v současnosti v oblasti elektroniky, [7] katalýzy, [8] superkondenzátorů, [9], baterií [10,11], senzorů [12,13] a nanomedicíny [14,15] ubírána právě ke dvourozměrným nanomateriálům, jako jsou například grafen, oxid grafenu (GO),

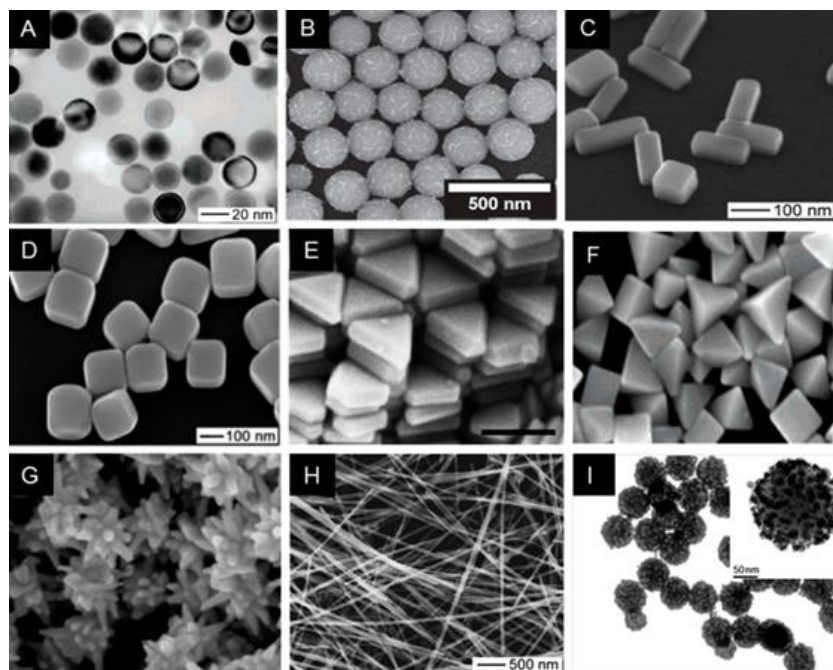
redukovaný oxid grafenu (rGO), nitrit grafitu ($g-C_3N_4$) a spousta dalších vrstevnatých materiálů. Jako jedny z nejtenčích materiálů mají 2D nanomateriály ze všech známých materiálů největší specifický povrch, čímž disponují velkým množstvím reaktivních míst na jejich povrchu. [16] Tenkost těchto materiálů navíc umožňuje rychle reagovat na vnější signály, jako je například světlo, což vede k jejich využití v optických aplikacích všeho druhu, včetně zobrazování, fototermální (PTT) a fotodynamické terapie (PDT). [17,18] Uhlíkaté nanomateriály a kovové, především stříbrné, nanočástice, se pro své zajímavé vlastnosti a slibné použití v řadě aplikací staly jedněmi z nejvíce zkoumaných a prozkoumaných nanostruktur, a krom výše zmíněných aplikací je lze využít i v široké škále lékařských aplikací a biomedicínských oborech, které jsou našemu výzkumu nejbližší, a proto budou v následujících odstavcích a kapitolách podrobněji diskutovány.

1.1 Příprava nanočástic

Metody syntézy nanomateriálů se obecně dělí na metody „top-down“ a „bottom up“, kde v případě „top-down“ metod dochází k rozrušování objemového materiálu do požadovaných nanostruktur, zatímco častěji využívaná „bottom-up“ technika sestavuje jednotlivé atomy a molekuly do větších struktur v nano rozměrech, čímž lze snadněji ovlivňovat velikost, morfologii, polydisperzitu, povrchový náboj a stabilitu připravených nanočástic. Tyto charakteristiky lze ovlivňovat koncentrací jednotlivých reakčních složek, iontovou silou roztoku, hodnotou pH, teplotou, a v případě redukčních metod syntézy hlavně volbou redukčního činidla. [19] V závislosti na jejich aplikaci lze změnou reakčních podmínek optimalizovat syntézu nanočástic tak, aby byly částice připraveny s požadovanou velikostí, morfologií, povrchovou chemií a elektrickými či optickými vlastnostmi, a tím tak získaly požadované fyzikálně-chemické či biologické vlastnosti a funkčnost.

Metody přípravy nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra jsou využívány v široké škále aplikací, jež mají různé nároky na fyzikální, chemické a optické vlastnosti, a proto je potřeba metodu přípravy optimalizovat tak, aby vznikl, pokud možno nízko polydisperzní systém o požadovaném složení a morfologii částic (Obrázek 1).



Obrázek 1. Reprezentativní snímky nanočástic stříbra z elektronové mikroskopie zobrazující různou velikost a morfologii připravených nanočástic. [20]

Nejčastěji jsou nanočástice stříbra připravovány redukcí stříbrné soli vhodným redukčním činidlem, při níž dochází k tvorbě nové fáze ve formě zárodků, které po dosažení kritické velikosti dorůstají do stabilních koloidních částic. [21,22] Redoxní potenciál a molekulární struktura redukčního činidla ovlivňují rychlost tvorby zárodků nové fáze, schopnost a rychlost adsorpce na povrch rostoucí částice, která v tomto případě katalyzuje přenos elektronu mezi redukčním činidlem a stříbrným iontem. Tímto způsobem redukční látka ovlivňuje rychlost redukce stříbrného iontu a tím i výslednou velikost částic. Silné redukční činidlo (např. tetrahydridoboritan sodný) má vysokou redukční rychlost, čímž dochází k velkému stupni přesycení a tvorbě velkého množství zárodků a tvorbě menších částic. [23] Při využití slabého redukčního činidla (např. citronan sodný) jsou pak získávány poněkud větší nanočástice s širší velikostní distribucí. [24] Kromě výše zmíněných redukčních látek jsou využívány například kyselina askorbová, hydrazin, a redukující cukry. [25–28] Panáček a kol. k přípravě nanočástic využívali Tollensovu metodu, jež je založena na přípravě amoniakálního komplexu a jeho redukci za pomoci redukujících cukrů. Ve zmíněné práci syntetizovali širokou škálu stříbrných nanočástic s různou velikostí, a to redukcí pomocí různých monosacharidů (glukóza, galaktóza) a disacharidů (maltóza, laktóza), přičemž mimo jiné výběr redukčního činidla výrazně ovlivňoval velikost částic a s tím související antibakteriální účinky. [29]

Dále lze k přípravě nanočástic využívat dvou-krokovou syntézu, za použití dvou různých redukčních činidel. Nejčastěji je za pomoci tetrahydridoboritanu sodného nejprve připraveno určité množství malých zárodečných částic, které jsou následně v druhém kroku zvětšovány redukcí přebytku stříbrných kationtů slabším redukčním činidlem, které zde nemusí sloužit pouze jako redukční, ale i stabilizační činidlo. V druhém kroku syntézy musí být vždy použito slabé redukční činidlo (citronan sodný, hydrazin nebo například kyselina askorbová), které z hlediska reakční kinetiky upřednostňuje redukcí kovových iontů na již vzniklém povrchu (heterogenní nukleaci) nad tvorbou nových zárodků z roztoku (homogenní nukleaci), což je dáno výškou energetické bariéry, která má pro tvorbu nové fáze dlouhé reakční časy. [30–33] V případě použití silného redukčního činidla s nízkou energetickou bariérou by pak docházelo k paralelní nukleaci a k tvorbě polydisperzního systému. [34,35] Kromě výběru redukčních činidel je pak kinetika nukleace, a tedy výsledná velikost částic, ovlivňována koncentrací stříbrných iontů, přičemž se vzrůstající koncentrací částic jsou připravovány větší částice s absorpčním maximem posunutým k vyšším vlnovým délkám. Množství připravených částic v prvním kroku pak koreluje s výslednou velikostí částic, přičemž větší množství zárodečných částic vede k přípravě menších částic. [36] K dosažení co nejúžší velikostní distribuce je zapotřebí používat velmi zředěné roztoky, protože při využití vyšších koncentrací redukce trvá příliš dlouho a nedochází tak k ukončení nukleace. [37] Příkladem dvoukrokové syntézy částic a přípravy nanočástic trojúhelníkového tvaru může být redukce stříbrných iontů kyselinou askorbovou v přítomnosti zárodečných částic a polyvinylpyrolidonu (PVP). [38] Parnklang a kol. pak jako zárodečné částice využívali jak stabilizované (PVP, citrát), tak nestabilizované nanočástice stříbra připravené redukcí ledovým tetrahydridoboritanem sodným. Tvarová změna pak byla provedena přidáním předem určeného objemu roztoku peroxidu vodíku (979 mM, 0–379 μ l), přičemž v závislosti na množství přidaného peroxidu byla vizuálně pozorována řada barevných změn od žluté přes červenou, růžovou, fialovou, modrou a purpurovou, ke kterým došlo už po zhruba 2 minutách od přidavku peroxidu a reprezentovali tím tak výslednou morfologii a tvar připravených nanočástic. [39] Nanočástice různých velikostí a tvarů absorbující v oblasti 393–738 nm byly připraveny také jednoduchou jednokrokovou syntézou, kde dusičnan stříbrný sloužil jako zdroj stříbra, citrát jako stabilizační činidlo a polyvinylpyrolidon pak ovlivňoval růst a výsledný tvar nanočástic. V závislosti na množství redukčního činidla (tetrahydridoboritanu

sodného) byly připraveny částice o různých morfologiích, a tedy různých plasmonických vlastnostech. [40]

V posledních letech narůstá množství metod, jež jsou přívětivější k životnímu prostředí a během přípravy nevyužívají žádné toxické látky. Takzvané „green-syntézy“ využívají například rostlin, bakterií a hub, které v rámci svého organismu obsahují řadu metabolitů a redukčních biomolekul. Rostliny obecně obsahují sacharidy, tuky, bílkoviny, nukleové kyseliny a pigmenty, které mohou působit jednak jako účinná redukční činidla pro ionty stříbra tak i jako stabilizátory výsledných nanočástic. [41] Zejména polysacharidy (chitosan, celulóza, škrob, heparin kyselina hyaluronová) obsahují mnoho funkčních skupin, jako jsou hydroxylové a hemiacetalové funkční skupiny, které hrají klíčovou roli jak při redukci, tak při stabilizaci kovových nanočástic. [42] Příkladem zelené syntézy pak může být redukce dusičnanu stříbrného pomocí zeleného a černého čaje [43], různých druhů bakterií [28] a biomolekul jako flavonoidy, terpenoidy, aldehydy, ketony, amidy, bílkoviny, polysacharidy a vitaminy [28,42,44,45].

Nanočástice stříbra lze také mimo jiné dále kombinovat s dalšími materiály a nanomateriály. Může se jednat například o biokompatibilní materiály na bázi uhlíku, jež disponují velkou plochou povrchu, na níž mohou být ukotveny nanočástice, které pak tomuto materiálu propůjčují svoje vlastnosti a tím ho tak vylepšují. [46–49] Poměrně častým využitím v praxi je pak funkcionalizace různých medicínálních povrchů antibakteriálními povlaky stříbra. [50] Příprava a antibakteriální účinky těchto materiálů budou diskutovány v dalších kapitolách.

1.2 Stabilizace nanočástic

Jak je známo, koloidní částice mají tendenci se v důsledku přitažlivých Van der Waalsových sil vzájemně přibližovat nebo se spojovat do větších útvarů a vytvářet tak agregáty. Nanočástice stříbra patří mezi lyofobní koloidy, které obecně nejsou příliš agregátně stabilní, a při změně pH, polarity, nebo iontové síly roztoku se z disperze snadno vylučují ve formě agregovaného sedimentu. Ke stabilizaci částic se obecně využívají dva různé přístupy, které jsou založeny na elektrostatickém odpuzování částic nebo sterických překážkách, které působí proti van der Waalsovým silám přítomným mezi koloidními částicemi. [51] Agregaci koloidních částic lze zabránit přidávkou stabilizačních činidel, které nejen že zaručují stabilitu částic v disperzi, ale v rámci procesu přípravy také zároveň pomáhají regulovat velikost, distribuci velikosti a tvar připravených částic. [52]

Částice jsou velmi často stabilizovány elektrostaticky, kde po adsorpci iontů látek rozpuštěných v kapalině dochází ke vzniku rovnoměrně rozloženého náboje na povrchu částice. Zbylé ionty v roztoku jsou pak následně k částici přitahovány a dochází ke vzniku elektrické dvojvrstvy. [53] Původem elektrostatické stabilizace je tedy odpuzivá elektrostatická síla (jež převažuje nad přitažlivou), kterou na sebe jednotlivé nanočástice působí poté, co jsou obklopeny elektrickou dvojvrstvou. Ionty kompaktně navázané u povrchu nanočástice jsou nazývány takzvanou Sternovou vrstvou, na kterou navazuje difúzní část elektrické dvojvrstvy, jež je tvořena ionty, které se s částicí nepohybují a jsou distribuovány na základě tepelného pohybu a velikosti elektrostatických sil mezi částicemi. Na rozhraní těchto dvou vrstev se ustanovuje elektrokinetický (zeta-potenciál), odpovídající nevykompenzovanému náboji na povrchu rozhraní mezi difúzní a Sternovou vrstvou. [54] O velikosti zeta-potenciálu pak rozhoduje typ iontů naadsorbovaných na fázovém rozhraní a iontová síla roztoku, přičemž se vzrůstající koncentrací elektrolytu tvořícího disperzní prostředí dochází ke stlačení elektrické dvojvrstvy, snížení elektrostatického odpuzování, snížení zeta-potenciálu a v konečném důsledku i ke snížení stability částic. Výsledný náboj na povrchu nanočástice ovlivňuje nejen naadsorbovaná látka, ale i pH okolního prostředí, kde může být povrchový náboj ovlivněn disociací funkčních skupin a adsorpcí oxoniových a hydroxylových iontů na povrchu částic, přičemž stabilizační účinek dané látky se zvyšuje s rostoucím nábojem koagulačního iontu. [55] Elektrostatické stabilizace může být dosaženo za využití povrchově aktivních látek (cetrimoniumbromid, polyetherimid, kvartérní amoniové soli, dodecylsírán sodný), proteinů (albumin, želatina), aminokyselin (glycin, arginin) a dalších nabitých ligandů, jež mají vysokou afinitu ke kovovým povrchům nanočástic a ovlivňují tak jejich interakci s okolím a jejich stabilitu. Silnou interakci mezi ligandem a nanočásticí v tomto případě zajišťují reaktivní skupiny, jež přednostně reagují s konkrétním materiálem a zajišťují zvýšenou stabilitu nanočástic. Pro nanočástice stříbra jsou to například thiolové, nebo amino skupiny. [56–59]

Dalším typem stabilizace je stabilizace za použití látek na bázi polymerů jako jsou polyoly (polyvinylalkohol, polyvinylpyrolidon, polyakrylamid, polyethylenglykol), [60–62] polysacharidy a neionické povrchově aktivní látky Brij, Tween a Triton X-100. [63,64] Tyto látky tedy v tomto případě nemění povrchový náboj částice, ale vzhledem k jejich objemné struktuře dochází k lokálnímu zvýšení koncentrace molekul stabilizátoru naadsorbovaného na povrchu částic a tím pádem ke zvýšení odpuzivých sil,

jež zabráňují těsnému přiblížení částic (stérická stabilizace). Zároveň může být využito jejich hydrofilní povahy, jež vede k tvorbě odpudivé hydratační vrstvy kolem povrchu nanočástic, přičemž jejich stabilizační schopnost je přímo úměrná jeho hydrofilicitě. Kvalitu stérické stabilizace pak ovlivňuje velikost (délka, rozvětvení řetězce) a chemická povaha stabilizátoru. Pokud je však koncentrace příliš vysoká, dochází spíše k agregaci částic než k jejímu potlačení. [60,63,65]

Výběr vhodných stabilizačních činidel je pak důležitý zejména v *in vivo* aplikacích, kde si nanočástice musí v chemicky komplexní biologické matici zachovat své vlastnosti, dokud nedorazí na místo působení a nevykonají požadovanou funkci. Částice by si tedy v tomto případě měla zachovat svou velikost a aktivitu, vykazovat co nejmenší cytotoxicitu a snažit se tak co nejvíce vyhýbat imunitnímu systému. [55,66] Poměrně velká část aplikačního potenciálu nanočástic stříbra je spojena s intravenózním podáním do těla, a proto je potřeba přemýšlet i nad stabilitou částic a jejich interakcí s krevní plazmou a dalšími krevními komponenty po aplikaci nanočástic do krevního řečiště. [67,68] Připravené nanočástice musí být v krvi koloidně stabilní, biokompatibilní a funkční, což je s ohledem na vysokou iontovou sílu, kterou krev zajisté má, obtížné a může tak způsobovat destabilizaci a cytotoxicitu částic. [69–71] Interakce nanočástic s okolními biologickými entitami je tedy pro využití nanočástic v medicíně výrazným limitujícím faktorem. Po této interakci se na nano-bio rozhraní vytváří takzvaná proteinová korona, která významně ovlivňuje účinky nanočástic a jejich chování v biologických systémech. Nabité a hydrofobní povrchy nanočástic jsou ihned po kontaktu s fyziologickým prostředím pokryty bílkoviny a dochází k tvorbě „proteinové korony“ a to v důsledku toho, že velká plocha povrchu a vysoká povrchová energie nanočástic vede k pozoruhodné adsorpci proteinů, jež je tedy v tomto případě podporována jak entropií (hydrofobní efekt), tak entalpií (nábojová interakce). [72] Nespecifická adsorpce bílkovin je závislá na náboji nanočástic, jejich hydrofilicitě/hydrofobicitě, funkčních skupinách nebo ligandech na povrchu nanočástic, na celkové koloidní stabilitě, ale také na vlastnostech proteinu (koncentrace, jeho afinita) a média (pH, iontová síla, teplota). [73–77] Navíc bylo prokázáno, že dochází k druhově specifické adsorpci bílkovin, a proto nelze očekávat stejné výsledky u různých testovaných organismů a pak jednoduše získané výsledky aplikovat na lidech. [78] V důsledku adsorpce pak může dojít ke změně náboje částice, přičemž velmi často převažuje záporný náboj proteinu. V případě přesunu z *in vitro* do *in vivo* testování je

potřeba sledovat interakci nanočástic se sérovými proteiny a krví (imunoglobuliny, lipoproteiny, komplementové a koagulační faktory, fosfolipidy, nukleové kyseliny, sacharidy) a interakci a chování nanočástic na buněčné linie. Výsledná tvorba proteinové korony tedy výrazně ovlivňuje charakteristiky nanočástic a je tedy možné, že výsledky získané *in vitro* se pak mohou od aktivity *in vivo* výrazně lišit. [79] K tomu, aby bylo možné určit, zda si nanočástice v systému udržují požadované vlastnosti a zda nedochází k nežádoucím účinkům je potřeba mimo jiné sledovat průchod nanočástic přes biologické bariéry, jejich farmakokinetiku, biodistribuci a eliminaci částic z organismu. Velmi oblíbeným mechanismem stabilizace je PEGylace nanočástic, která nejen zvyšuje hydrodynamickou velikost, snižuje povrchový náboj a zvyšuje koloidní stabilitu, ale zároveň snižuje agregaci krevních destiček, minimalizuje interakci se sérovými proteiny (částečně zabraňuje opsonizaci a nespecifické adsorpci proteinů), což částicím poskytuje delší dobu cirkulace v těle, zabraňuje vychytávání částic mononukleárním fagocytárním systémem a zvyšuje tak úspěšnost zacílení. [80–84]

2. Nanočástice stříbra pro bio-medicínské aplikace

V posledních několika desetiletích se kovové nanočástice o průměru menším než 100 nm díky svým unikátním fyzikálním, chemickým, optickým a biologickým vlastnostem významně uplatnily v různých biologických a biomedicínských aplikacích. Biologické vlastnosti nanočástic obecně závisí na typu nanočástice, jejich složení, velikosti, tvaru, s tím související ploše povrchu a také na jejich povrchových vlastnostech, jež jsou ovlivněny molekulami navázanými na povrchu částic a mají tak vliv nejen na jejich stabilitu, ale také na jejich následné aplikace. Velkou proměnou, jež zásadně ovlivňuje vlastnosti nanomateriálů, je také chemické složení okolního prostředí, protože nejen jeho polárnost, pH, ale i přítomnosti proteinů a dalších látek má výrazný vliv na rozpustnost částic, jejich pronikání do buněk, biokompatibilitu, toxicitu a v konečném důsledku i na jejich celý aplikační potenciál. [85] Nejen samotné vlastnosti nanočástic a prostředí, ale i způsob vstupu nanočástic do těla (vdechnutí, požití, vstup kůží, nebo injekční aplikace) má zásadní vliv na interakce s okolním prostředím, stabilitu, biorekognici a následnou biodistribuci a odbourávání nanočástic a jejich odstranění ze systému. [86]

Antimikrobiálních účinků nanočástic je v současnosti využíváno jak v kosmetickém [87], tak například i v potravinářském průmyslu, a to v obalových fóliích, lahvích a kontejnerech, jež mají za úkol zabránit kažení potravin a prodloužit tak dobu jejich trvanlivosti. [88–90] Příkladem může být použití polyethylenových filmů s nanočásticemi stříbra, jež zabraňují vzniku plísní a kolonizaci bakteriemi. Jejich použití by tak mohlo vést k prodloužení doby skladování a kvality ořechů [91] nebo zachování trvanlivosti vepřového masa. [92] Obecně mají nanočástice stříbra silné antifungální vlastnosti a lze tak bojovat proti široké škále druhů plísní jako je například *Trichophyton*, *Candida* kmeny [93,94]. Dalším odvětvím, kde jsou nanočástice stříbra hojně využívány je textilní průmysl, kde jsou textilie v těsném kontaktu s pokožkou a vytvářejí tak teplé a vlhké prostředí pro mikroorganismy, přičemž zpocená textilie jsou pro bakterie ideální živnou půdou. [95] Pokud jsou však tkaniny potaženy nanočásticemi stříbra, adheze a bakteriální růst jsou inhibovány a textilie tak získává antibakteriální účinky vůči široké škále bakterií, plísní a těchto vlastností lze využít v mnoha medicínských aplikacích. [96,97]

Nanomedicína je poměrně mladým oborem, jež vznikl spojením vědeckého bádání a technologií s informacemi o interakci nanomateriálů s biologickými systémy a lidskými buňkami, jež tak obor nanotechnologií výrazně rozšířil v oblasti analýzy a použití částic v lékařství. Díky svým unikátním mechanickým, chemickým, optickým, elektrickým vlastnostem, biokompatibilitě a rozložitelnosti jsou zejména 2D nanomateriály široce využívány v oblasti cílené dopravy léčiv [98,99], biosenzorice [97,100,101], zobrazování [102,103], tkáňovém inženýrství [104,105], antimikrobiální [106,107] a protirakovinné terapii. [108,109] Stejně tak jsou v současné době taktéž za slibné materiály v lékařských a biotechnologických aplikacích pro svou vysokou antibakteriální účinnost a optické vlastnosti považovány nanočástice stříbra. Ty jsou pak často využívány tam, kde je zapotřebí zajistit sterilní prostředí, a to například v povrchové úpravě nástrojů a inkorporaci nanočástic do katétrů. V nedávných studiích pak byla prezentována úloha katétrů modifikovaných nanočásticemi jako netoxických zařízení schopných trvale uvolňovat baktericidní stříbro, které vykazuje preventivní účinky proti vzniku infekcí a s tím souvisejícími komplikacemi. [110–112]

Nejen antibakteriálních účinků nanočástic stříbra, ale i jejich hojivých vlastností vedoucích k rychlejší regeneraci kůže a okolních tkání je využíváno v obvazových materiálech a náplastech ke sterilnímu krytí chirurgických ran, [113,114] léčbě

popálenin, [115,116] diabetické nohy, [117,118] a v prevenci lokálních infekcí. Obvazové materiály musí propouštět plyny a vodní páry, a to proto, aby se na ráně vytvořilo vlhké prostředí a nedocházelo tak k dehydrataci. Zároveň by měly tyto materiály vykazovat vysokou schopnost absorpce tekutin pro odstranění exsudátu a nadměrného množství bakteriálních živin z rány, což obvazové materiály na bázi nanočástic stříbra zajišťují. Nanočástice stříbra navíc obvazovému materiálu zajišťují potřebné antibakteriální účinky, čímž potlačují bakteriální růst, ale zároveň nevykazují cytotoxicitu pro okolní tkáň. [119] Obvazové materiály, popřípadě biomateriály přírodního původu (tkaniny, celulóza, chitosan, alginát) jsou tedy v současnosti modifikovány nanočásticemi stříbra, jež mimo samotný antibakteriální účinek urychlují proces obnovy tkáň, její funkčnosti a minimalizují tvorbu jizev. [120] Na zvířecích modelech bylo pak popsáno zlepšení stavu poraněných tkání v důsledku syntézy nového kolagenu, infiltrace zánětlivých buněk, překrvení a proliferace fibroblastů. [121]

Poměrně velká část aplikačního potenciálu nanočástic stříbra se v dnešní době ubírá směrem k dentálním aplikacím, kde se pro své antimikrobiální účinky využívá k ochraně proti vzniku zubního kazu, přípravě biocidních povlaků na zubní implantáty a jako výplňový materiál do ortodontických cementů. Přídavkem nanočástic stříbra dochází k zajištění baktericidních účinků, a tedy zlepšení procesu remineralizace, kontroly tvorby biofilmu a eliminaci vzniku zubního kazu. [122–125]

Se vzrůstající dobou dožití narůstá také zátěž na klouby a počet artritických onemocnění, jehož základní metodou léčby je umělá náhrada kloubu za použití kostních cementů jako je polymethylmetakrylát nebo polyethylen s ultravysokou molekulovou hmotností. Po zabudování do kosti však velmi často dochází ke komplikacím souvisejícím s bakteriální kolonizací ortopedických implantátů a tvorbě úlomků vlivem opotřebení materiálu a s tím souvisejícím vznikem zánětů a infekcí. [126,127] Kostní cementy a titanové implantáty jsou tedy potahovány nanočásticemi stříbra, jež snižují tvorbu úlomků a vykazují antibakteriální aktivitu vůči široké škále bakterií, včetně meticilin rezistentního kmene *S. aureus* a zároveň nejsou toxické vůči okolním tkáním. [128–130]

Velká afinita stříbrných nanočástic k biologickým látkám, jako jsou například proteiny, usnadňuje výrobu biosenzorů s vysokým detekčním limitem ve srovnání s klasickými metodami používanými v biologických aplikacích, a lze je tak využít jak v diagnostice, tak k léčbě široké škály rakovinových a infekčních onemocnění. [129–131] Nanočástice krom toho mají také široké využití v buněčném biologickém zobrazování a biologickém snímání. [132,133] Kromě výše zmíněného jsou nanočástice stříbra aktivní i vůči virům a dalším organismům. Jeden z nejnovějších objevů v oblasti využití nanočástic stříbra jako biocidů zahrnuje jeho účinnost jako antivirové látky proti virovým infekčním onemocněním, jako je SARS-Cov, HIV, žloutenky typu B a virus chřipky H5N1, H1N1 a Dengue. [134,135]

V současné době se výzkum nanočástic stříbra prohlubuje, a to hlavně s ohledem na rozvoj a rozšíření bakteriální rezistence vůči antibiotikům, jež omezuje účinnost antibiotické léčby infekčních onemocnění. O nanočásticích stříbra se v tuto chvíli uvažuje jako o možné alternativě, která by mohla antibiotika úplně nahradit, nebo alespoň doplnit v léčbě proti bakteriím, jež si vůči antibiotikům vytvořily rezistenci. [136]

3.1 Antibakteriální účinky nanočástic

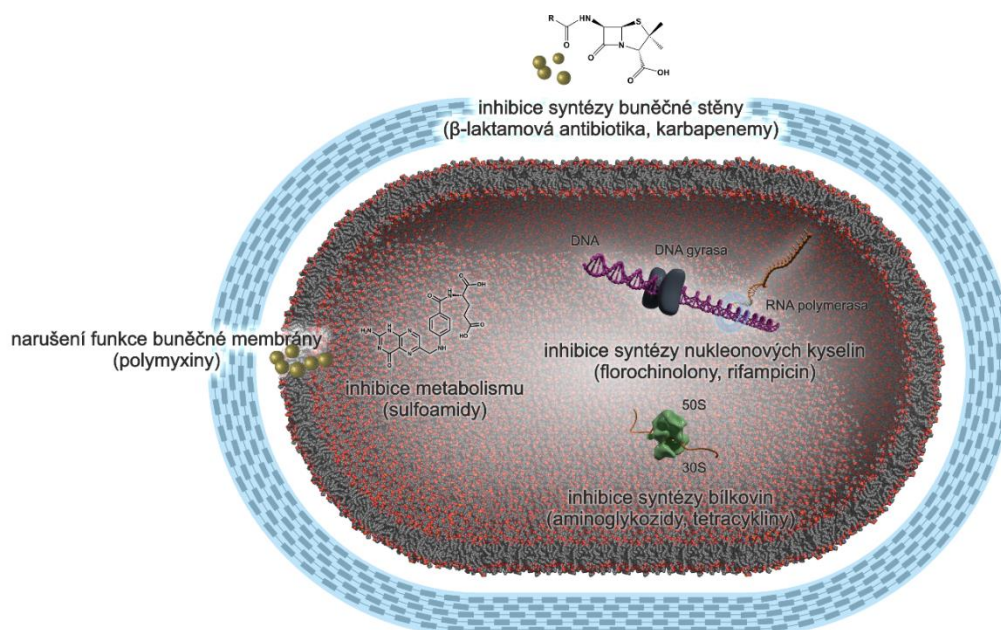
3.1.1 Antibakteriální terapie dnes

I přes rostoucí znalosti ve všech oblastech medicíny a značném pokroku v diagnostice a terapii představují bakteriální infekce vážný terapeutický problém. Hlavními důvody narůstajícího počtu infekcí je endogenní charakter velké části bakteriálních infekcí (patogeny pocházející z lidské mikroflóry), narůstající rezistence vůči účinku antimikrobiálních léčiv, rostoucí počet pacientů s oslabenou imunitou a osob s umělým materiálem v těle (kloubní náhrady), popřípadě pacientů hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče. [137,138] V současné době je velmi komplikovaná například léčba intraabdominálních infekcí, ventilátorové pneumonie a sepse, kde k eradikaci bakteriálního patogena nejsou použitelná žádná antibiotika, nebo je jejich výběr značně limitován. [139]

V současné době jsou bakteriální infekce léčeny za použití antibiotik s bakteriostatickými, nebo baktericidními účinky, tedy antibiotiky potlačujícími bakteriální růst, nebo antibiotiky, jež bakterie zabíjí. Antibiotika jsou rozdělena do několika skupin na základě způsobu účinku, chemické struktury nebo spektra aktivity a obecně působí na jedno konkrétní cílové místo bakteriální buňky. Na základě způsobu

účinku (Obrázek 2) rozeznáváme antibiotika inhibující syntézu bakteriální buněčné stěny (např. β -laktamy nebo glykopeptidy), narušující buněčnou membránu (polymyxiny), inhibující syntézu nukleových kyselin (fluorochinolony), proteosyntézu (tetracykliny, aminoglykosidy nebo makrolidy) a syntézu kyseliny listové (sulfonamidy). [140] Aby mohlo antibiotikum působit antimikrobiálně, musí nejprve vstoupit do bakteriální buňky (influx), vydržet zde stabilní, nebo být aktivováno a akumulováno do inhibiční koncentrace, jež je potřebná k dosažení jejich antimikrobiálních účinků a až poté může antibiotikum vyhledat a interagovat se svým cílovým místem. Změna v kterémkoli z těchto kroků vede k vzniku bakteriální rezistence vůči antibiotiku bez ohledu na jejich způsob účinku, chemickou strukturu nebo spektrum účinku. [141]

Dnes využívané antibakteriální látky (antibiotika) se používají již už od 60. let 20. století. V současné době však medicína čelí reálné hrozbě, že antimikrobiální látky vůči bakteriím brzy ztratí svou účinnost, a tím i schopnost léčit bakteriální infekce. Podle prohlášení Valného shromáždění OSN ze září 2016 lze odhadovat, že pokud bude rezistence bakterií nadále narůstat stejným tempem jako dosud, budou neléčitelné infekce způsobené multirezistentními bakteriemi do roku 2050 nejčastější příčinou úmrtí. [142] V současné době se jen v USA každoročně rezistentními bakteriemi (tedy schopnými odolávat působení antimikrobiální látky, antibiotika) nakazí zhruba 2,8 milionu lidí a přibližně 35 000 z nich v důsledku toho zemře. [143] Rostoucí rezistence bakteriálních patogenů vůči antibakteriálním látkám tak zvyšuje možnost návratu do éry bez antibiotik, kdy nebudou k dispozici adekvátní léky k léčbě bakteriálních infekcí, což by při léčbě invazivních bakteriálních infekcí mohlo mít fatální následky.



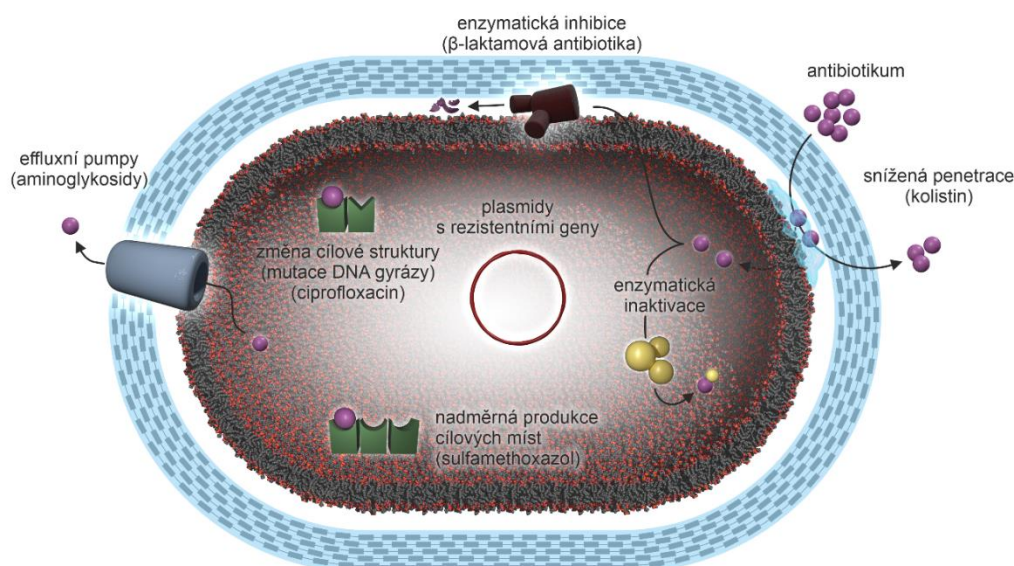
Obrázek 2. Mechanismy účinku antibiotik. [136]

V důsledku vzniku a šíření bakteriální rezistence mechanismem založeným na přebírání genetického materiálu z rezistentních bakteriálních buněk prostřednictvím rekombinačních procesů dochází k nezadržitelnému šíření rezistence vůči antibiotikům bez ohledu na jejich spotřebu [144] a rezistence vůči antibiotikům se objevuje poměrně rychle od jejich zavedení. [145] Typickým příkladem může být rezistence kmene *Staphylococcus aureus* vůči β-laktamovým antibiotikům. Na počátku 40. let 20. století bylo v anglických nemocnicích méně než 1 % kmenu *S. aureus* rezistentních vůči penicilinu, avšak do roku 1948 se tento podíl zvýšil až na 59 %. [146]

Obavy z blížícího se konce téměř 80leté éry klasických antibiotik způsobené rostoucí bakteriální rezistencí jsou více než oprávněné a je nejvyšší čas se tímto problémem adekvátně zabývat na všech možných úrovních, včetně vývoje nových antimikrobiálních léčiv účinných proti multirezistentním bakteriálním patogenům. FDA každoročně schvaluje zhruba 51 nových léčiv, z toho bylo v posledních pěti letech schváleno osm nových molekul antibiotik, přičemž většina z nich má strukturu odvozenou od již známého antibiotika a působí tedy stejným mechanismem. [139,147] Z tohoto faktu je patrné, že navzdory vážným hrozbám způsobeným bakteriemi (multirezistentní kmeny, nově se objevující patogeny) v současné době není vývoj nových antibakteriálních léčiv příliš populární a většina velkých farmaceutických společností od vývoje antibakteriálních léčiv zcela upustila. Důvodem jsou mimo jiné

především ekonomické faktory, protože vyšší zisky lze získat vývojem léků proti jiným typům nemocí (hypertenze, rakovina, AIDS atd.). [148]

Bakteriální rezistenci vůči antibakteriálním látkám lze chápat jako schopnost bakteriální populace přežít účinek definované koncentrace určitého antibakteriálního přípravku. Je však třeba rozlišovat přirozenou (primární) rezistenci, tedy rezistenci bakteriálních druhů, které jsou mimo rozsah účinku daného antibakteriálního činidla (absence cílového místa) a získanou (sekundární) rezistenci, tj. změnu původně citlivé bakterie na rezistentní. Bakterie se může bránit účinkům antibakteriálních látek tvorbou bakteriálních enzymů, které narušují nebo modifikují strukturu antibakteriálních látek, změnou propustnosti bakteriální stěny a cytoplazmatické membrány, modifikací cílových míst antibakteriálních látek a zvýšenou eliminací antimikrobiální látky z bakteriálních buněk (bakteriální eflux). [149,150] (Obrázek 3).



Obrázek 3. Mechanismy bakteriální rezistence vůči antibiotikům. [136]

Bylo publikováno mnoho studií, které dokládají vyšší úmrtnost a kratší přežití pacientů s infekcemi způsobenými multirezistentními bakteriemi ve srovnání s infekcemi způsobenými citlivými kmeny stejného druhu. Například Rello a kol. uvádějí 86% mortalitu pacientů s ventilátorovou pneumonií způsobenou meticilin-rezistentními kmeny *S. aureus* ve srovnání s 12 % v případě izolátů kmene *S. aureus* citlivých na meticilin/oxacilin. Tumbarello a kol. zjistili, že mortalita pacientů s infekcemi krevního řečiště způsobenými enterobakteriemi s pozitivní produkcí širokospektrých β-laktamáz dosahovala 60 % v případě nedostatečné antibiotické terapie, ale pouze 19 %, pokud byla antibiotická terapie účinná. Kang a kol. dokumentovali rozdíl v 30denní

mortalitě na infekce způsobené *Pseudomonas aeruginosa* mezi adekvátní počáteční antibiotickou terapií (28 %) a opožděným zahájením účinné léčby (43 %). Herkel et al. prokázali statisticky významný rozdíl v mortalitě mezi adekvátní a neadekvátní antibiotickou terapií ventilátorové pneumonie. Mortalita byla 27 % u pacientů, kteří dostávali adekvátní terapii, a 45 % u pacientů, kteří dostávali neadekvátní terapii, což znamená, že bakteriální patogeny byly rezistentní vůči počáteční antibiotické léčbě. [151–153]

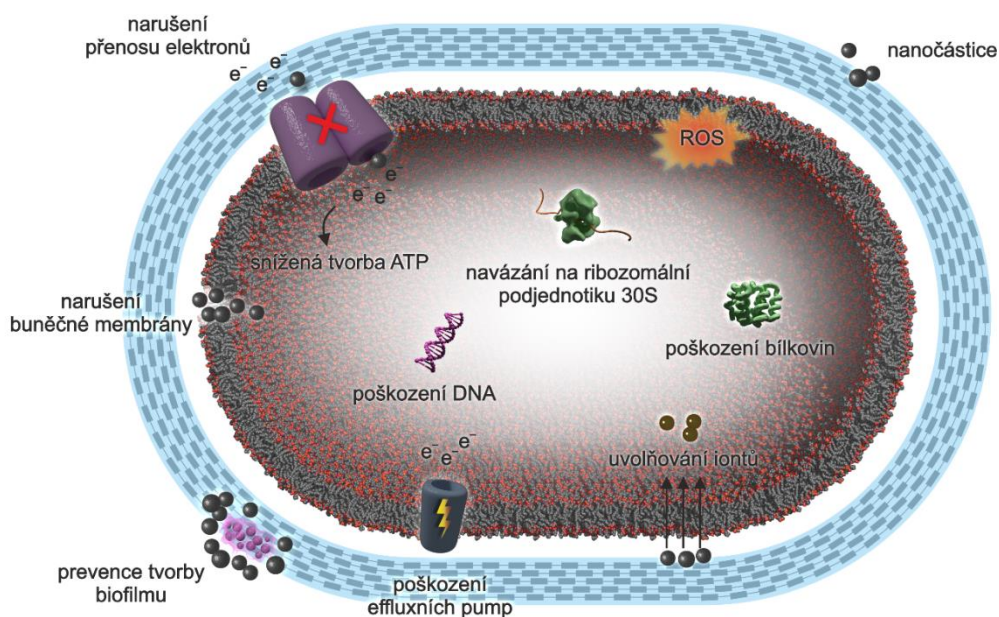
Protože se zdá nepravděpodobné, že by nová antibiotika v blízké budoucnosti poskytla způsob, jak rychle překonat bakteriální rezistenci, potřebujeme alternativní způsoby překonání bakteriální rezistence. Velmi slibnou možností je kombinovaná léčba, při níž se tradiční antibiotika kombinují s dalšími látkami, které zvyšují jejich účinnost. Bakterie si mohou vůči určitým antibiotikům vytvářet rezistenci různými způsoby, proto by antibiotika měla být v ideálním případě aplikována ve spojení s látkou, která dokáže zablokovat příslušný mechanismus rezistence. Protože například rezistence vůči penicilínům je způsobena produkcí enzymů (β -laktamáz), mohla by být účinnost těchto antibiotik obnovena jejich aplikací společně s inhibitory β -laktamáz, jako jsou kyselina klavulanová, tazobaktam a sulbaktam. [154]

3.1.2 Antibakteriální terapie budoucnosti

Kombinace antibiotik s látkami inhibujícími daný mechanismus rezistence se zdála být správnou volbou v boji vůči narůstajícímu problému v oblasti bakteriální rezistence, avšak bakterie si poměrně rychle stihly vyvinout rezistenci i na tyto kombinované léčby. V současnosti je tedy zapotřebí hledat jiné možnosti, nejlépe zahrnující doplňkovou antibakteriální látku schopnou působit na více buněčných úrovních současně, což by mohli být například nanočástice. Nejčastěji uplatňovanými způsoby, jakými nanočástice bojují proti široké škále patogenů, jsou narušení buněčné stěny, cytoplazmatické membrány a produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) vedoucí k oxidačnímu stresu, v menší míře pak enzymatická inhibice, změny genové exprese a deaktivace proteinů. [155,156] Pro tento účel by tedy mohli být použity anorganické nanočástice materiálů, jako je stříbro, oxid titaničitý, zinečnatý nebo grafenové materiály, které vykazují silnou antibakteriální aktivitu při velmi nízkých koncentracích (v rozmezí ppm) a zároveň nevykazují cytotoxicitu vůči savcím buňkám (BJ, NIH, buněčné linie 3T3). [93,157,158] Vzhledem k tomu, že antibiotika a nanočástice mají odlišný způsob antibakteriálního účinku, mohla by být využita

i kombinovaná léčba s použitím nízkých dávek obou typů látek. V doposud publikovaných pracích bylo například prokázáno, že léčba nanočásticemi stříbra (někdy i v koncentracích nižších než 1 mg/L) může obnovit citlivost rezistentních kmenů na antibiotika, která jsou jinak neúčinná. [157–161]

Způsob účinku nanočástic kovů a oxidů kovů není dosud zcela popsán a jasný, ale pro příslušné kovy bylo navrženo několik možných způsobů mechanismu účinku (Obrázek 4). Každá z nanočástic, bez ohledu na chemické složení, je schopna bojovat proti bakteriím různými mechanismy a takový víceúrovňový způsob účinku značně ztěžuje vývoj bakteriální rezistence. Kromě toho jsou nanočástice schopny doručit antibiotikum k bakteriím a fungovat tak jako nosič léčiva, což vede ke zvýšení účinnosti léčiva a omezuje celkovou expozici léčiva. Nejčastěji uplatňované způsoby, jakými nanočástice bojují proti široké škále patogenů, jsou narušení buněčné stěny, cytoplazmatické membrány a produkce ROS vedoucí k oxidačnímu stresu, v menší míře pak enzymatická inhibice, změna genové exprese a deaktivace proteinů. [155,156,162]



Obrázek 4. Mechanismy účinků nanostrukturních materiálů. [136]

Nanočástice se velmi často hromadí na povrchu a vytvářejí v bakteriální stěně jamky "pits", pronikají buněčnou stěnou, narušují buněčnou membránu, způsobují strukturální poškození a buněčnou smrt. [163] Baktericidní účinek kladně nabitých iontů uvolněných nanočásticemi se zvyšuje vazbou na záporně nabitý povrch bakterií (karboxylové, fosfátové skupiny) v procesu známém jako biosorpce. [155,156] Kromě

toho elektrostatická vazba na buněčnou stěnu vede k depolarizaci membrány, změně membránového potenciálu a ztrátě jeho integrity, což má za následek přerušení přenosu energie a buněčnou smrt. [164] Díky silné peptidoglykanové vrstvě Gram-pozitivních bakterií je obecně průnik nanočástic do bakterií obtížnější, a proto často interagují pouze s bakteriálním povrchem. [165,166] Samotné nanočástice, nebo narušení dýchacího řetězce může způsobovat vznik reaktivních kyslíkových radikálů, jež se vyznačují silným pozitivním redoxním potenciálem a vedou ke vzniku oxidačního stresu v buňce. [167] Mezi ROS patří peroxid vodíku (H_2O_2), singletový kyslík (O_2), hydroxylový radikál ($-\text{OH}$) a superoxidový radikál (O^{2-}). Různé typy nanočástic produkují různé kombinace ROS, a to vede k různým antimikrobiálním vlastnostem. Za normálních okolností je produkce a odstraňování ROS vyvážené, při vysokém stresu však dochází k nadměrné produkci ROS, což mění propustnost buněčné membrány a způsobuje poškození bakterií. [156,168,169] Kromě oxidačního stresu mohou ROS způsobit poškození makromolekul buňky, což vede k peroxidaci lipidů, změně proteinů, inhibici enzymů a poškození RNA nebo DNA. Významné antimikrobiální účinky prostřednictvím produkce ROS lze pozorovat v případě nanočástic stříbra, [170–172] oxidu zinečnatého, [173,174] titaničitého, [175,176] a železitého. [177]

3.1.2.1 Antibakteriální aktivita nanočástic stříbra

Stříbro bylo pro své antibakteriální účinky používáno již od starověku, kde bylo pro dlouhodobé uchování potravin a prodloužení tak jejich trvanlivosti využíváno stříbrných nádob. Na stejném principu pak byly do nádob s vodou, nebo vínem přidávány stříbrné mince, čímž se tak zabránilo kažení jejich obsahu. Toho, že stříbro zabraňuje hnilobě a rozkladu pak bylo využíváno u bohatších vrstev, a to zejména při využití stříbrného nádobí, příborů, a dokonce i slánky pomocí níž si šlechta do svých pokrmů přidávala namleté stříbro. [178] Na počátku 19. století začali chirurgové k sešívání ran využívat stříbrné drátky a během druhé světové války využívali stříbrných plátů, jež byly přikládány na rány vojáků, čímž se tak zabraňovalo infekcím a urychlovalo se hojení ran. Nejrozšířenější používanou solí stříbra byl dusičnan stříbrný, který byl hojně využíván k léčbě zánětu spojivek u novorozenců, léčbě popálenin, a eradikaci kožních bradavic. [179,180] Na začátku 20. století byly sloučeniny stříbra nahrazeny koloidním stříbrem, které se stalo rozšířeným a účinným léčivem systémových a lokálních infekcí, tedy i léčbě popálenin a plísňových nákaz. [181] Koloidní stříbro se v nemocnicích využívalo jako germicid a v minulosti bylo popsáno úspěšné využití pro léčbu infekcí kůže, ucha, zánětu

mandlí a dutiny ústní. Po nástupu antibiotik se však od jeho používání upustilo a dále se koloidní stříbro používalo jen v malém množství k léčbě očních infekcí.[180,182]

Antimikrobní aktivita nanočástic stříbra byla laboratorně potvrzena množstvím publikací [29,57,183–186] a k této problematice byl sepsán nejeden souhrnný článek. [42,187,188] Baktericidní účinek nanočástic stříbra závisí na několika faktorech, jako je tvar, velikost, krystalinita, pH, dávka, doba kontaktu, povrchová úprava a povrchový náboj. [66] Jednou z nejdůležitějších fyzikálně-chemických vlastností, která ovlivňuje antimikrobiální aktivitu, je velikost. Menší částice jsou obecně aktivnější, což je způsobeno větším povrchem částic, jež poskytuje větší interakční plochu a zvýšení množství baktericidních interakcí. Navíc, částice mnohem lépe pronikají bakteriální stěnou a dostávají se dovnitř, ovlivňují DNA a enzymy, a vedou tak k buněčné smrti. [189–191] V již zmíněné práci Panáčka a kol. bylo prokázáno, že za použití disacharidů byly připravovány menší částice, než v případě monosacharidů a nejmenší připravené částice redukcí maltózou tak měli mnohem vyšší antimikrobiální účinky, než 50 nm částice připravené redukcí galaktózou. [29] To, že jsou menší částice mnohem více aktivní jak vůči Gram-pozitivním, tak Gram-negativním bakteriím bylo potvrzeno i v dalších pracích, a lze tedy konstatovat, že antibakteriální aktivita s rostoucí velikostí klesá. [192]

Velký vliv na antimikrobiální aktivitu má také morfologie částic. Chemickými metodami byly připraveny různé tvary nanočástic stříbra, přičemž bylo prokázáno, že anizotropní nanočástice mají lepší baktericidní účinky než sférické nanočástice, což souvisí s větším počtem ostrých hran a rohů, které jsou ve srovnání se zaoblenými hranami mnohem více biocidnější. [193,194]

Jak již bylo zmíněno v kapitole o stabilizaci částic, výsledný náboj částice nemá vliv jen na jejich stabilitu, ale i na výslednou interakci částice s buněčnou membránou, jež je založená na elektrostatické adhezi. [189,195] Karboxylové, fosfátové, hydroxylové a aminové skupiny spojené s tlustou peptidoglykanovou vrstvou buněčné stěny Gram-pozitivních bakterií jim dodávají záporný náboj. Podobně tyto funkční skupiny spojené s lipopolysacharidem ve vnější membráně propůjčují celkový negativní náboj Gram-negativní buněčné stěně. [196] Kladně nabitě nanočástice, nebo samotný kladný náboj stříbrných iontů je tak velmi přínosný pro elektrostatickou přitažlivost mezi

záporně nabitou buněčnou stěnou a kladně nabitými částicemi, a tedy jejich výslednou baktericidní aktivitu. [156]

V práci publikované Badawy a kol. byly zkoumány nanočástice stabilizované různými stabilizačními činidly, a tedy s různým výsledným zeta-potenciálem. Zkoumány byly například částice stabilizované citrátem, jež mají díky karboxylové části velmi záporný zetapotenciál (-38 mV), v důsledku čehož může docházet k elektrostatickému odpuzování mezi záporně nabitými částicím a bakteriální buněčnou stěnou. Oproti tomu zeta potenciál PVP stabilizovaných částic je méně negativní (-10 mV), což podporuje vyšší interakci než v případě citrátu a tím pádem i vyšší toxicitu. Posledním stabilizátorem použitým v této studii byl polyethylenimin, v němž aminoskupiny nanočásticím udělují kladný náboj a stabilitu proti aglomeraci. V tomto případě kladně nabitě částice (+40 mV) silně interagují se záporně nabitými částmi v membráně bakterií (např. proteiny) a vyvolávaly změny ve strukturální integritě buněčné stěny bakterií, což vedlo k úniku cytoplazmatického obsahu a buněčné smrti. [197] Role elektrostatického náboje pak byla zkoumána i v dalších pracích a na různých ať už Gram-pozitivních, tak Gram-negativních bakteriálních kmenech. Ve všech případech byla vůči testovaným mikroorganismům zaznamenána vyšší baktericidní aktivita u kladně nabitých nanočástic. Nižší antibakteriální aktivita negativně nabitých částic pak byla vysvětlena odpuzováním mezi záporně nabitých biomolekul na povrchu bakterie a záporně nabitým povrchem částic. [198–200] V řadě prací však bohužel nebyl testován samotný účinek stabilizátoru, a jelikož je známo, že kladně nabitě stabilizační látky, jako je například polyethylenimin jsou sami o sobě silně antibakteriální nelze antibakteriální účinky přisuzovat pouze kladnému náboji nanočástic stříbra. [201–203]

Samotný povrchový náboj může být u některých nanočástic přepínán v závislosti na pH. Jedním z příkladů může být nanokompozit s anhydridem kyseliny lipové, jež měl zvýšenou antibakteriální účinnost při nižších hodnotách pH, což lze přičíst kladnému povrchovému náboji připravených částic v kyselém roztoku. [204,205] Stejný výsledek, tedy to, že se zvyšujícím se pH klesá baktericidní aktivita bylo prokázáno pro nanokompozit stříbra s redukováným oxidem grafenu. Ze tří různých pH prostředí tu nejlepší baktericidní aktivitu vykazovalo to nejnižší testované pH (5,6), což bylo vysvětleno zvýšeným obsahem vodíkových iontů a rozpustného kyslíku v kyselém prostředí, jež přispělo k oxidaci nanočástic a k rychlému uvolňování stříbrných iontů a zvýšení antibakteriální aktivity. [206]

Nanočástice stříbra jsou schopny rychle a efektivně likvidovat celou řadu mikroorganismů a jsou efektivní jak vůči běžným Gram-pozitivním a Gram-negativním kmenům, tak i vůči multirezistentním bakteriálním kmenům jako jsou *S. aureus*, *P. aeruginosa* a celé řadě enterobakterií. [207,208] Bakteriální růst nemusí být potlačován pouze samotnými stříbrnými nanočásticemi, ale i pomocí různých nanokompozitů se stříbrem, jež mají také velmi zajímavé antibakteriální účinky. [209–211] Například derivát grafenoxidu se stříbrem tvoří stabilní systém, jež díky své velké ploše povrchu s širokou škálou navázaných funkčních skupin zvyšuje interakční plochu s bakteriálním povrchem a dovolují jim tak interagovat s buněčnou membránou prostřednictvím vodíkových vazeb, nebo elektrostatických interakcí. Kromě působení samotných kladně nabitých stříbrných iontů, jež interagují se záporně nabitým fosfolipidem na buněčné membráně, tak v tomhle případě dochází i k narušování integrity ostrými hranami samotného grafen oxidu. Tak i tak v obou případech dochází ke změnám propustnosti membrány, což může vést jak k úniku intracelulárních látek, tak ke vstupu stříbrných iontů do buňky, kde pak dále mohou vytvářet ROS, interagovat s DNA, nebo thiolovými skupinami, jež může bránit procesu syntézy bílkovin a dalším procesům, jež mohou sloužit k inhibici bakteriálního růstu, nebo dokonce k buněčné smrti. [212,213]

Dalším poměrně palčivým problémem v antibakteriální terapii je tvorba biofilmů, což jsou shluky bakterií uzavřených v extracelulární polymerní látce (EPS), která se skládá převážně z proteinů, extracelulárních polysacharidů a nukleových kyselin. Struktura biofilmu propůjčuje bakteriím schopnost tolerovat náročné podmínky prostředí, odolnost vůči antibiotikům a imunitnímu systému hostitele a poskytuje optimální prostředí pro výměnu extracelulární DNA (plasmidů). [214,215] I v tomto případě byl testován antibakteriální účinek nanočástic stříbra a ukázalo se, že částice snižují biomasu vzniklých biofilmů a redukují produkci proteinů a exopolysacharidů. [216] Příkladem mohou být nanočástice syntetizované z metabolitů *Rhizopus arrhizus*, které inhibují produkci alginátu, což je důležitá složka EPS, která bakteriím umožňuje přilnout k povrchu a chrání je před imunitní odpovědí. [217] Sanyasi a kol. zkoumali účinek nanočástic obalených karboxymethyltamarindem na biofilm tvořený bakteriemi *E. coli* a *B. subtilis*, přičemž tvorba biofilmu byla zcela potlačena a buňky po ošetření nanočásticemi vykazovaly zmačkanou morfologii povrchu, relativně protáhlou velikost a nebylo viditelné zřetelné septum, což naznačuje, že nanočástice zabraňují dělení

bakteriálních buněk, způsobují destrukci membrán a zabraňují jejich sdružování za účelem tvorby biofilmů. [218] V dalších článcích pak byla popsána také snížená exprese genů s motilitou a tvorbou biofilmu. [219,220] Výhodou malých částic je, že EPS tak malé částice nezachytí a mohou tak pronikat tlustou vrstvou biofilmu a zničit až 98 % biofilmu. [221] Spousta dalších příkladů je uvedena v souhrnném článku [66], jehož výsledky potvrzují, že nanočástice stříbra mohou být použity jako slibná antibakteriální látka potlačující tvorbu biofilmu.

Mechanismus účinku nanočástic stříbra

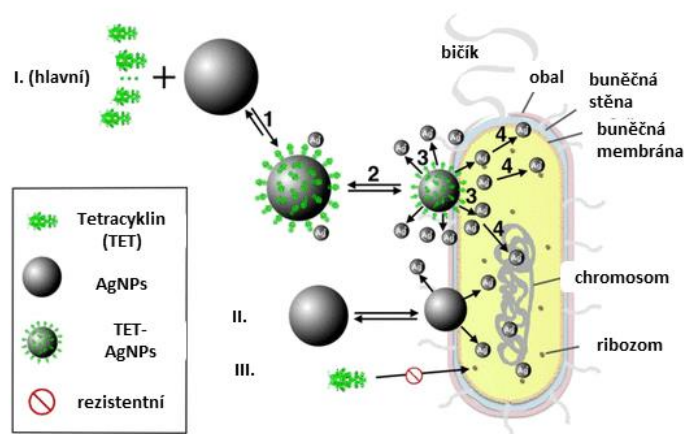
Přesný mechanismus účinku nanočástic stříbra není doposud zcela objasněn, což komplikuje pochopení interakcí mezi nanočásticemi a bakteriálními buňkami. Všechny existující údaje však naznačují, že stříbrné nanočástice vykazují paralelně různé antibakteriální mechanismy a nespecificky se vážou na širokou škálu cílů a tím narušují mnoho aspektů buněčného metabolismu, což bakteriím značně ztěžuje schopnost odolávat účinkům těchto nanočástic a také si vůči nim vytvořit rezistenci. [222,223] Zároveň se předpokládá, že stříbrné nanočástice slouží jako zásobárna stříbrných iontů, jež se v důsledku oxidativního rozpouštění uvolňují. [224,225] Nanočástice jsou pak schopny přilnout k negativně nabitým buněčným stěnám bakterií a vytvořit v ní "jamky" (otvory), což vede k depolarizaci a zhroucení potenciálu plazmatické membrány. [163,226] V důsledku toho dochází k odtoku cytoplazmatického obsahu a buněčná membrána se stává propustnější, což výrazně usnadňuje průnik nanočástic do buněk a jejich interakci s mezibuněčnými složkami (ribozomů, mitochondrií, vakuol) [68,227,228] Uvolněné stříbrné ionty inhibují místo mezi cytochromem α_2 a cytochromem b v dýchacím řetězci a nanočástice tím tak mohou přerušit proces buněčného dýchání, inhibovat cytochrom v elektronovém transportním řetězci nebo denaturovat ribozomální podjednotku 30S (zabránit translaci proteinů). [156,229] Druhý, poměrně často zastoupený mechanismus navrhuje produkci ROS na buněčné membráně, jejichž formace může vést k poškození replikace DNA, destrukci biomolekul a přispívá k oxidačnímu stresu. Kromě toho se nanočástice snadno vážou na thiolové, amino a fosfátové skupiny, které jsou důležitými součástmi DNA, peptidů a enzymů, což může vést k inaktivaci enzymů, měnit expresi proteinů a narušovat tak metabolické procesy, jež vede k poškození nebo inhibici replikace DNA/RNA a způsobuje nevratné poškození bakterií a smrt buněk. [226,230–232]

3.1.2.2 Synergické účinky nanočástic a antibiotik

Několik studií v poslední době naznačilo, že nanostrukturní materiály, zejména stříbro, zlato, nanočástice oxidu titaničitého a další nanočástice mohou při nízkých dávkách posílit antibakteriální účinky konvenčních antibiotik a tím tak obnovit citlivost rezistentních bakteriálních kmenů k antibiotikům. [233–239] Jinými slovy, antibiotika, která byla původně zcela neúčinná, vykazují v kombinaci s nanočásticemi kovů a oxidů kovů baktericidní účinky proti multirezistentním bakteriálním kmenům. Toto zjištění jasně naznačuje, že je možné nalézt účinnou kombinaci antibiotika se sloučeninami na bázi nanomateriálů, jež vede k synergickému antimikrobiálnímu účinku umožňujícímu účinnou inhibici bakteriálních patogenů při použití výrazně nižších dávek než ve srovnání se samotným antibiotikem. [240,241] V případě nanočástic stříbra byly při kombinaci s antibiotiky zaznamenány vysoké synergické antibakteriální účinky i při koncentraci nižší než 1 mg/L [160,242–244], což jsou koncentrace s dobrou hemokompatibilitou a netoxické pro lidské buňky. [157,158,245] Díky tomu se nanostrukturní materiály jeví jako velmi perspektivní antibakteriální látky a kombinace antibiotik s nanomateriály představuje jeden z možných přístupů k účinnému boji proti problému rostoucí rezistence patogenních bakterií vůči tradičním antibiotikům. Většina doposud publikovaných experimentů byla bohužel provedena na bakteriích citlivých k účinkům antibiotik, tedy vhodné k prokázání funkčnosti metody, avšak bez jakéhokoli využití v praxi. Mnohem důležitější jsou výsledky testované na rezistentních bakteriích, jež způsobují nejproblematictější a nejhůře léčitelné infekce.

V přehledových člancích [246,247] byl sledován vliv mechanismu účinku antibiotika na výsledný synergický účinek a zda lze účinek antibiotik obnovit, či nikoliv. Zvýšení antibakteriálních vlastností antibiotik v kombinaci s nanočásticemi stříbra bylo pozorováno u všech testovaných kombinací s antibiotiky narušujícími buněčné membrány (kolistin). Obecně lze říci že rezistenci bakterií vůči antibiotikům působícím na syntézu buněčné membrány/bílkovin/buněčné stěny (β -laktamy) bylo možné zvrátit a antibiotika v kombinaci s nanočásticemi stříbra získaly zpět své antibakteriální vlastnosti i v nižších koncentracích než dříve. Nanočástice stříbra v tomhle případě pravděpodobně interagují s porinovými kanály a peptidoglykanem na povrchu bakterií, narušují a pronikají buněčnou stěnou, což umožňuje antibiotiku dostat se dovnitř a být opět účinné. V případě β -laktamových antibiotik může narušení buněčné stěny a vnější membrány vést k úniku karbapenemázy z bakteriální buňky a snížení její aktivity uvnitř

periplazmatického prostoru, a tedy ke zvrácení mechanismu jejich rezistence. Naopak antimikrobiální aktivita glykopeptidových antibiotik (vankomycin) působících na syntézu buněčné stěny nemohla být ve všech případech zvýšena. Mechanismy rezistence ve většině případů zahrnují chemické změny cílové strany (např. přeměna D-alanyl-D-alaninu na D-alanyl-D-laktát) a ty jsou obtížně překonatelné. Pokud však mechanismus rezistence souvisí s buněčnou stěnou, nanočástice pomáhají antibiotikům proniknout stěnou a zároveň v ní vytvářejí otvory, [248] což umožňuje antibiotiku dostat se dovnitř bakterie a navázat se na své obvyklé vazebné místo. Zvýšení antibakteriální aktivity nebylo pozorováno u antibiotik inhibujících syntézu kyseliny listové (trimetoprim) a téměř ve všech testovaných případech u antibiotik inhibujících syntézu nukleových kyselin (ciprofloxacin). Rezistence k těmto antibiotikům je většinou získána nevratnou chromozomální mutací, kterou nanočástice nemohou tak snadno zvrátit. Obecně lze říci, že konečný účinek závisí na mechanismech rezistence bakteriálních kmenů, přičemž některé z nich, jako je například snížená adsorpce a buněčná propustnost, lze překonat narušením vnější membrány a buněčné stěny prostřednictvím nanočástic stříbra, jiné, jako je například změna cílového místa, nebo nenávratné genetické mutace pravděpodobně překonat nelze. [136] Synergický účinek mezi nanočásticemi stříbra a antibiotiky (Obrázek 5) lze vysvětlit i vazebnou interakcí mezi nimi. [233,249] Konkrétně amino a hydroxy skupiny antibiotika se navážou na nanočástici prostřednictvím chelatace, což vede k vytvoření konjugátu, v němž je stříbrné jádro nanočástice obklopeno molekulami antibiotika. [250] Nanočástice jsou pak selektivně přitahovány k cytoplazmatické membráně tvořené glykoproteiny a fosfolipidy, takže nanočástice fungují jako nosiče léčiva transportující antibiotikum do blízkosti cytoplazmatické membrány (2), což vede k lepšímu kontaktu s buněčnou stěnou a ke zvýšení koncentrace antibiotika a stříbra v blízkosti buněčné membrány (3). Lokální zvýšení koncentrace stříbrných iontů v blízkosti bakteriálního povrchu způsobuje bakteriální toxicitu tím, že váže stříbrné ionty na proteiny a molekuly DNA buněčné stěny i uvnitř buňky (4), což vede k bakteriální smrti. Membránová propustnost by se mohla zvýšit také vazbou nanočástic stříbra na bílkoviny obsahující síru, čímž se zlepší průnik antibiotika do buňky [251] Dalšími mechanismy účinku, který se podílí na výsledném synergickém účinku, by mohla být produkce ROS, změna ochranné funkce buňky a narušení DNA vedoucí k baktericidním účinkům. [159,252]



Obrázek 5. Schéma synergického antibakteriálního účinku nanočástic stříbra s tetracyklinem. [233]

3.1.2.3 Bakteriální rezistence vůči účinkům stříbra

Je třeba zdůraznit, že vývoj a šíření bakteriální rezistence je přirozený proces, kterému nelze zcela zabránit. Většina mechanismů rezistence se u bakterií vyvinula dávno předtím, než byly k léčbě použity první moderní antibakteriální látky. Mechanismy rezistence obvykle nevznikají náhodně a náhle, ale čekají na podmínky, které jim umožní v bakteriální populaci uspět. Díky tomu, spolu s neustálými změnami bakteriálního genomu a jejich schopností přizpůsobit se negativním podmínkám, je zřejmé a předvídatelné, že bakterie budou schopny čelit antibakteriálním účinkům nanočástic kovů a oxidů kovů. V případě nespecifického působení nanočástic lze očekávat nespecifický mechanismus vzniku bakteriální rezistence.

Graves a kol. nedávno uvedli, že si bakterie mohou snadno vyvinout rezistenci vůči nanočásticím stříbra v důsledku relativně jednoduchých genomických změn. [253] Naopak Panáček a kol. a Gunawan a kol. zaznamenali rezistenci vůči stříbru u kmenů *Escherichia coli*, která není způsobena změnami v bakteriální DNA. Gunawan a kol. zjistili, že *Bacillus subtilis* má přirozenou schopnost přizpůsobit se buněčnému oxidačnímu stresu vyvolanému uvolňováním Ag^+ při dlouhodobé expozici nanočásticím stříbra z povrchu krystalického TiO_2 . [254] Panáček a kol. uvedli, že Gram-negativní bakterie *E. coli* a *P. aeruginosa* si po opakované expozici nanočásticím stříbra mohou vyvinout rezistenci produkcí adhezivního proteinu flagelinu, který vyvolává agregaci a destabilizaci nanočástic, což snižuje jejich stabilitu, a tím eliminuje jejich antibakteriální aktivitu. [255] Zhang a kol. uvedli, že *E. coli* si po několikadenní expozici vůči ZnO nanočásticím vytváří adaptivní rezistenci, která spočívá ve změnách tvaru bakterií a expresi membránových proteinů. [256] Graves, Gunawan, Zhang a Panáček

uvádějí vývoj bakteriální rezistence vůči nanočásticím pouze u Gram-negativních bakterií. Indukce bakteriální rezistence opakovaným působením subinhibičních koncentrací u Gram-pozitivních bakterií byla zatím popsána jen málo. [257]

Bakterie jsou schopny odolávat antibakteriálnímu působení těžkých kovů různými mechanismy, včetně efluxu, extracelulární bariéry, redukce kovových iontů, extracelulární a intracelulární sekvestrace. Nejčastějším mechanismem rezistence je eflux toxických iontů mimo bakterie nebo vytvoření extracelulární bariéry (např. extracelulární polymerní látky biofilmu), která zabraňuje vstupu iontů do buňky a brání jim před stresem vyvolaným toxickými kovy. [258–260] Kromě toho jsou bakterie schopny zvýšit regulaci genů, které jsou zodpovědné za eliminaci ROS, reparaci poškození DNA a hydrolýzu abnormálně sestavených proteinů, které mohou opravovat poškození způsobená toxickými ionty, [261–263] rezistence vůči nanomateriálům však v takovém rozsahu prozatím popsána nebyla.

Rezistence vůči stříbru a jeho sloučeninám představuje jednu z nejvíce studovaných rezistencí bakterií vůči kovům. Bakterie rezistentní vůči stříbru byly poprvé izolovány v roce 1960 z popálenin ošetřených dusičnanem stříbrným. [264] Příklady bakteriálních kmenů rezistentních vůči stříbru zahrnují *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. [265] Bakterie mohou odolávat stříbru několika mechanismy, jako je redukce stříbrných iontů na méně toxické oxidační stavy a snížená propustnost cytoplazmatické membrány. Nicméně aktivní eflux je nejvíce uplatňovaným mechanismem, jak bakterie odolávají a eliminují toxické účinky kationtů stříbra. Mechanismus rezistence vůči iontovému stříbru zahrnuje aktivní eflux stříbrných iontů z buňky pomocí adenosintrifosfatáz typu P nebo chemiosmotických antiporterů Ag^+/H^+ . [266–269] Silver a kol. uvedli stanovení rezistence vůči sloučeninám stříbra pomocí bakteriálních plazmidů a genů u kmenů *Salmonella* spp. Rezistence vůči stříbru propůjčená plazmidem *Salmonella* pMGH100 zahrnuje devět genů ve třech transkripčních jednotkách. Dvoukomponentní transkripční regulační systém senzor/responder (SilRS) řídí syntézu periplazmatického proteinu vázajícího Ag(I) (SilE) a dvou efluxních pump (ATPáza typu P (SilP) plus tříproteinový chemiosmotický RND systém výměny $\text{Ag(I)}/\text{H}^+$ (SilCBA)).[268]

Díky schopnosti odolávat iontům stříbra spolu s neustálými změnami bakteriálního genomu a jejich schopnosti přizpůsobit se negativním podmínkám se očekávalo, že si bakterie vyvinou rezistenci i vůči nanočásticím stříbra. Některé bakterie, alespoň pokud mají tuto schopnost, mohou být částečně odolné vůči nanočásticím kovů a oxidů kovů tím, že eliminují toxické účinky kationtů nebo oxyaniontů kovů. Tímto způsobem mohou bakterie eliminovat jeden z mechanismů antibakteriální aktivity nanočástic spočívající v toxických účincích kovových iontů uvolňovaných z nanočástic, a proto mohou do určité míry tolerovat toxický účinek kovových nanočástic. Valentin a kol. popsali u kmene *S. aureus* rezistenci jak k iontovému stříbru, tak k nanočásticím stříbra, která byla spojena s mutacemi genů zapojených do syntézy nukleotidů, obrany proti oxidačnímu stresu a změnami v metabolismu cysteinu. [270] Rezistenci u kmenu *S. aureus* popsali také Elbehiry a kol. kteří vyvolali rezistenci jak k nanočásticím stříbra, tak zlata, přičemž nebyla pozorována žádná zkřížená rezistence. [257]

Bakterie mohou působení antibakteriálních látek odolávat obecně dvěma hlavními způsoby. V případě nanočástic stříbra buď zabrání vstupu nanočástic stříbra nebo iontů stříbra do buňky, nebo když už se tam dostanou, snížením množství antibakteriální látky v buňce. Například *Pseudomonas putida* dokáže snížit propustnost bakteriální membrány prostřednictvím cis-trans izomerizace nenasycených mastných kyselin. [271] Ve většině případů však bakterie produkují extracelulární látky, které nanočástice imobilizují a neumožňují jim kontakt s bakterií. [272] Yang a kol. popsali zvýšenou stimulaci vývoje biofilmu po delším působení nanočástic stříbra a zvýšenou regulaci quorum sensing a biosyntézu liposacharidů jako hlavní mechanismy rezistence u *Pseudomonas aeruginosa*. [273] Khan a kol. zaznamenali bakteriální rezistenci u kmene *Bacillus pumilus* a naznačují, že nanočástice stříbra obalené exopolysacharidy vykazují pro různé bakteriální kmeny menší toxicitu. [274] Tvorba proteinových obalů byla rovněž zaznamenána po chronické expozici nanočásticím v kontinuálním bakteriálním médiu v bioreaktorech u bakterie *E. coli*. [275] Kromě extracelulárních polymerních látek mohou bakterie, aby odolaly negativním účinkům antimikrobiálních látek, produkovat i další sloučeniny. Například, Ellis a kol. popsali mechanismus rezistence u *P. aeruginosa* založený na zvýšené produkci fenazinového pigmentu, který omezuje expozici bakterií účinkům nanočástic stříbra. [276]

Jakmile se nanočástice stříbra dostanou do buňky, musí být dosaženo minimální inhibiční koncentrace (MIC), aby se projevil jejich antibakteriální účinek. Přítomnost efluxní sítě, která zde funguje jako mechanismus rezistence vůči nanočásticím stříbra, byla popsána u *Bacillus subtilis*, [254] *Salmonella seftenberg*, [277] *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* [278] a *Escherichia coli*. [253,275,278] V tomto případě jsou antimikrobiální látky odčerpávány z buňky ven, proto nemůže být dosaženo minimální inhibiční koncentrace (MIC) a částice nemohou působit tak, jak by měly, a dosahovat tak dostatečného antibakteriálního účinku.

Dle dostupných informací, Panáček a kol. byli jediní, kteří se nově vybudovaný mechanismus rezistence pokoušeli překonat. Dodatečná stabilizace pomocí různých povrchově aktivních látek a polymerů nebyla v tomto případě úspěšná, ale tvorbu flagelinu (zapříčiňujícího bakteriální rezistenci) se jim nakonec podařilo potlačit přidavkem extraktu z kůry granátového jablka, který zabránil agregaci nanočástic a nanočástice si tak dokázaly zachovat své antibakteriální vlastnosti. [255] Jak bylo zmíněno v této kapitole, bakterie jsou schopny vybudovat si rezistenci i vůči nanočásticím stříbra, proto by se mechanismy rezistence měly podrobněji studovat, a v blízké budoucnosti by se měly nastínit nové způsoby, jak tyto nově formované mechanismy rezistence překonat.

3.2 Cytotoxické účinky nanočástic

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, nanočástice stříbra i grafenové kompozity vykazují ve velmi nízkých koncentracích silné baktericidní účinky vůči multirezistentním bakteriím. Zda bude nanočástice stříbra do budoucna možné používat v medicíně je prozatím nemožné předpovídat, protože kromě testování cytotoxicity vůči široké škále zvířecích, lidských buněk *in vitro* prozatím nebyl publikován dostatek dat popisující chování nanočástic *in vivo*, a jejich farmakokinetiku a distribuci v organismu, jehož výsledky budou mít velký vliv na to, zda nanočástice antibiotika při léčbě lokálních a systémových infekcí plně nahradí, zda je bude možno využít alespoň ke zvýšení účinnosti současně využívaných antibiotik, nebo zda se projeví nežádoucí toxické účinky, které by mohly ohrozit jejich aplikaci.

Nanočástice mohou obecně pronikat do buněk procesem difúze, fagocytózy nebo endocytózy [168]. Jakmile se částice dostanou do buňky, tak mohou denaturovat různé antiapoptotické proteiny a iniciovat expresi proapoptotických proteinů, které následně iniciují signální dráhu apoptózy. [79] Po interakci s buňkou pak mohou vyvolávat

cytotoxicitu hned několika způsoby, přičemž mezi hlavní mechanismy patří vznik reaktivních kyslíkových radikálů a uvolňování iontů stříbra. [279,280] Nanočástice jsou po vstupu do buňky nejprve rozpoznány membránovými receptory, poté jsou internalizovány, translokovány a nakonec eliminovány. Buňka částice akumuluje a transportuje je přes buněčné membrány a hromadí je v mitochondriích, což po nějaké době vede k mitochondriální dysfunkci, která se projevuje poklesem mitochondriálního membránového potenciálu, destrukcí mitochondriálního dýchacího řetězce a stupňující se produkcí ROS. [66,281–283] Většina buněčných a biochemických změn v buňkách je způsobena toxicitou zprostředkovanou ROS, což bylo potvrzeno několika modely *in vitro* [284,285]. V případě nanočástic stříbra dochází ke snížení hladiny glutathionu (GSH) prostřednictvím inhibice enzymu syntetizujícího GSH a tím pádem zvýšení intracelulární ROS. Jelikož dojde k narušení jednoho z hlavních endogenních antioxidantů, který je schopen vázat a redukovat ROS, GSH je považován za kritický obranný systém pro přežití buněk [286,287] Nadprodukce ROS, vede k přerušení syntézy ATP, poškození buněčné membrány uvolněním laktátdehydrogenázy, denaturaci proteinů, destrukci DNA v jádře a aktivaci signální dráhy, jež vede k zabránění proliferace buněk, a nakonec k buněčné smrti. [288,289] Tvorba kyslíkových radikálů a následný oxidační stres jsou tedy považovány za pravděpodobný mechanismus toxicity vyvolaný nanočásticemi stříbra. Agregace částic a oxidace jejich povrchu za vzniku oxidu stříbrného vede k uvolňování iontového stříbra do média, což vede k jeho akumulaci a může dojít ke vstupu do buňky prostřednictvím difuze nebo endocytózy, což následně způsobuje mitochondriální dysfunkci [159]. Toxicita nanočástic stříbra je pak mimo jiné tedy přisuzována i stříbrným iontům, jež se uvolňují oxidací povrchu a pak následně reagují s biologickými molekulami. [290–292]

Na výslednou cytotoxicitu částic má vliv hned několik faktorů jako jsou velikost, tvar, koncentrace neboli dávka nanočástic, jejich povrchová úprava (využití stabilizačního činidla, formace proteinové korony), doba expozice a pak samotný typ buňky vůči níž je cytotoxicita testována. [79,294] Malé nanočástice jsou se svou velkou plochou povrchu aktivnější a snadněji se rozpouští, pronikají do buňky a katalyzují vznik ROS. Z dostupných dat je patrné, že menší částice vyvolávají vyšší toxicitu, přičemž toto tvrzení testovalo hned několik autorů, kteří potvrdili, že menší testované částice jsou vždy toxicitější než stejné nanočástice s o něco větší velikostí. [295–297] Tvar částic také ovlivňuje cytotoxicitu a mechanismus buněčného příjmu, přičemž například v práci

Stoehr a kol., sférické nanočástice na rozdíl od nanodrátků nevykazovali vůči buňkám A549 žádné toxické účinky. [298] Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím toxicitu je koncentrace nanočástic. V rámci experimentů je vždy velmi důležité zjistit minimální koncentraci, která vyvolává toxicitu a tuto informaci pak lze dále použít k porovnání toxicity mezi jednotlivými částicemi, popřípadě buněčnými kulturami. [299–301] Kromě samotné dávky nanočástic je pak také důležitá doba expozice, která má značný vliv na to, zda se toxické účinky stihnou projevit, nebo ne. [302] Jak už bylo v textu popsáno dříve, nanočástice musí být dodatečně stabilizovány, aby bylo zabráněno agregaci v různých prostředích a aby byla zajištěna ochrana před cytotoxicitou. [303,304] Například citrátová stabilizace, nebo stabilizace polyvinylpyrrolidonem se u epitelálních buněk HT29 ukázala být taktéž méně toxická, než v případě samotných nanočástic [305–307] V neposlední řadě je potřeba zmínit, že cytotoxicita nezávisí pouze na vlastnostech nanočástic, ale zásadní roli hraje variabilita organismu a tím pádem pro každou buněčnou linii získáváme jedinečné výsledky. [308–310]

V případě biologických aplikací se v současné době jedná nejčastěji o aplikaci částic intravenózně, intraperitoneálně, perorálně, nebo topicky na kůži. Nanočástice se tak tedy dostávají do krevního řečiště a celé řady orgánů, jejichž buňky by měly být otestovány v interakci s nanočásticemi nejprve *in vitro* a následně by na něj měli navázat *in vivo* experimenty, které přinesou informace o cytotoxických koncentracích a negativních účincích nanočástic. Z *in vitro* testování bylo zjištěno, že nanočástice stříbra jsou v závislosti na dávce, jejich velikosti, a čase působení toxické vůči široké škále buněčných liniích, jako jsou kožní buňky a keratinocyty, (NHDF, NHEK, HaCaT, CRL-2310) [301,311,312] plicní buňky alveolárního a bronchiálního bazálního epitelu (A549) [313–316], buňkám trávicího traktu (HT-29, Caco-2) [317–319] a ihned po vpravení do krevního řečiště interagují s krví a krevními elementy a vytvářejí proteinovou korunu. V několika pracích pak bylo popsáno, že vyvolávají významnou hemolýzu závislou na dávce [70,320,321] a vykazují toxický účinek na makrofágy (fagocytující buňky imunitního systému, jež slouží jako první linie obrany vůči patogenům, jež se vyskytují téměř ve všech savčích tkáních a podílejí se na hojení ran, zabíjení bakterií, regulaci imunitní odpovědi a obnově tkáňové homeostázy. Toxické jsou převážně částice s nejmenšími velikostmi a po interakci nanočástic s lidskou monocytární buněčnou linií (THP-1) při koncentraci 5 mg/L monocyty mohou uvolňovat zánětlivé cytokiny TNF- α a IL-6. [322–325]

Z dosud publikované literatury je možné usuzovat, že i nanočástic stříbra o nižší koncentraci a s prodlouženým intervalem expozice by se mohly hromadit v cílových orgánech a způsobovat tak chronickou toxicitu. [326] Toxický vliv nanočástic *in vivo* závisí na různých faktorech včetně dávky, velikosti nanočástic, doby expozice, způsobu podání a taktéž typu zvířecího modelu. Pokusy se obvykle provádějí na hlodavcích (potkanech, myších) prostřednictvím perorálního podání, intraperitoneální, intravenózní, subkutánní injekce nebo intratracheální instilace. [327] Po intravenózní aplikaci nanočástic do krevního oběhu samců potkanů se nanočástice z krevního oběhu dostaly do jater, ledvin, sleziny, mozku a plic, přičemž hlavními cílovými orgány byly játra a slezina. [328] Po orálním podání docházelo k větší akumulaci částic v ledvinách, slezině, játrech a reprodukčních orgánech léčených potkanů, přičemž všechny tyto orgány hráli klíčovou roli při odstranění exogenních látek z organismu [307,329,330] Obecně lze říci, že játra a slezina jsou pro různé způsoby podání jedním z hlavních cílových orgánů. Nanočástice se zde hromadí a pokud nejsou závčas vyloučeny, nebo odstraněny (nejčastěji Kupfferovými fagocytujícími buňkami), tak mohou začít vytvářet ROS, způsobovat patologické změny v morfologii jater a aktivitě enzymů a způsobovat další toxické účinky, jako je poškození DNA, vyvolání zánětu, a nakonec může dojít i ke smrti zvířat. [331–333] Studie založené na testování cytotoxicity *in vivo* mimo jiné prokázaly i schopnost nanočástic stříbra procházet krevní mozkovou bariérou, pronikat do mozku a způsobit tak smrt neuronů. [334,335] Dále byl popsán vliv nanočástic stříbra na zdraví plodu a postnatální období u březích myší, kde byl jejich vliv sledován prostřednictvím epigenetických změn v embryu a abnormálního vývoje placenty. [336]

V kapitole cytotoxicita bylo popsáno několik případů souvisejících s toxickými účinky nanočástic stříbra na savčí buňky. V některých případech však nanočástice nevykazovaly žádnou cytotoxicitu vůči savcím buňkám, ale měly vysokou baktericidní aktivitu, čehož lze využít v antibakteriální terapii. [337] Pallavicini a kol. například prokázali, že nanočástice stříbra potažené peptinem vykazují baktericidní aktivitu proti *S. epidermidis* a *E. coli* a také usnadňují proliferaci kožních buněk a usnadňují léčbu ran na modelových kulturách. [338]

Nanomateriály v protinádorové terapii

Rakovinové onemocnění v současnosti patří k jedné z největších hrozeb pro lidské zdraví, přičemž každoročně je diagnostikováno zhruba 19,3 milionů pacientů a zároveň dochází asi k 10 milionům úmrtí ročně. [339] Léčba rakoviny je celosvětově vzhledem k velkému počtu recidiv a závažným vedlejším účinkům, jež jsou spojeny v současnosti používanými chirurgickými, chemoterapeutickými nebo radioterapeutickými léčebnými metodami velkou výzvou.

Některé studie uvádějí, že nanočástice stříbra vykazují dobrou protinádorovou aktivitu u různých typů rakoviny, jako je rakovina prsu, [340,341] děložního čípku, [342,343] tlustého střeva, [344,345] vaječníků, [346,347] kůže [348,349] a plic. [350,351] přičemž cytotoxicita vůči nenádorovým buňkám byla vždy mnohem nižší než vůči těm nádorovým. [352] Protinádorová terapie je obecně založena na faktu, že nádorové cévy jsou netěsné a jsou mnohem více propustné než zdravé tkáně, v důsledku čehož může být akumulace nanočástic v nádorové tkáni až několikanásobně vyšší než ve zdravých tkáních a tento jev je známý jako "efekt zvýšené permeability a retence (EPR)". [353] Čím menší velikost částice, tím hlouběji je schopna pronikat do nádorové tkáně. Větší částice (nad 100 nm) se pak obvykle nedostanou daleko za cévu, protože zůstávají uvězněny v extracelulární matrix mezi buňkami.

Nanočástice mohou být na postižené místo dopravovány dvěma různými způsoby, a to pasivním cílením, které je založeno na farmakokinetice a velikosti nanočástic v rámci něž jsou nanočástice k nádoru dopraveny díky EPR efektu. Druhým způsobem je pak využití aktivního cílení, které závisí na přítomnosti receptorů na nádorových buňkách a k uvolňování léčiva dochází prostřednictvím specifických buněčných spouštěčů, jako jsou změny pH, specifické enzymatické profily nebo například zvýšením teploty. [354–356] V tomto případě dochází u nanočástic k funkcionalizaci povrchu nanočástic různými biomolekulami, jako jsou DNA sondy, peptidy, protilátky a lze je tak využít jako cíl pro specifické buňky a buněčné komponenty. [20,357] Jako účinný nosič protinádorového léčiva například sloužily nanočástice stříbra funkcionalizované doxorubicinem. [358] V případě využití cílené dopravy léčiv je účinná látka nahromaděna pouze v postižené oblasti a dochází ke snížení množství aktivní látky a tím i ke snížení vedlejších účinků na okolní tkáň a zlepšení odpovědi pacientů na danou léčbu. Léčba nádorových onemocněních se v současné době ubírá směrem personalizované terapie,

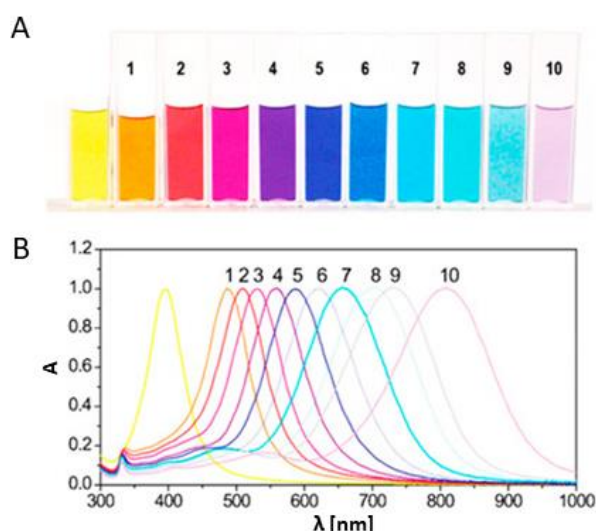
přičemž do popředí se dostává teranostika, což je kombinace jak samotné diagnostiky nádorového onemocnění, tak následná terapie. [359]

Nanočástice stříbra jsou plazmonické struktury, které jsou schopny rozptylovat a pohlcovat světlo dopadající na částici, a proto lze po jejich selektivním pohlcení do rakovinných buněk rozptýlené světlo získané z nanočástic využít pro zobrazovací účely, zatímco pohlcené světlo lze využít pro selektivní hypertermii. [360]

Optické vlastnosti nanočástic

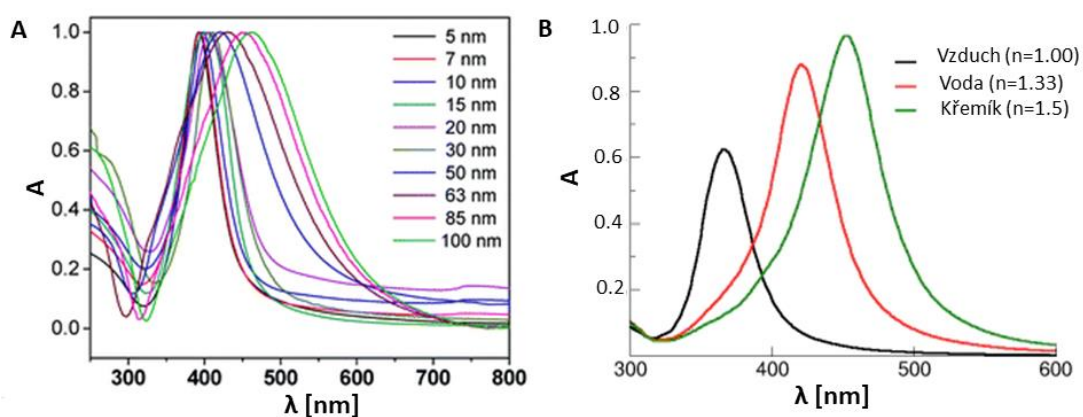
Nanočástice stříbra absorbují a rozptylují světlo s mimořádnou účinností, a to v širokém rozsahu vlnových délek. K jejich silné interakci se světlem dochází proto, že volné elektrony ve vodivostním pásu v blízkosti povrchu částic podléhají po excitaci světlem o specifických vlnových délkách koherentním oscilacím, jev známý jako povrchový plasmon. V okamžiku, kdy se elektrony pohybují ve stejné fázi s budící vlnou (zářením) a pokud je frekvence tohoto elektromagnetického pole v rezonanci s koherentním pohybem elektronů, nastává jev zvaný povrchová plasmonová rezonance. V tomto případě pak dochází k mnohem silnější absorpci záření, než je tomu u stejně velkých neplasmonických nanočástic. Přítomnost nanočástic tedy vede k zesílení intenzity lokálního elektromagnetického pole, přičemž část energie může být vyzářena ve formě tepla. [361,362]

K lokalizované plasmonové rezonanci dochází například u nanočástic, jejichž malý rozměr je srovnatelný s vlnovou délkou dopadajícího světla a závisí na velikosti, tvaru, složení nanočástic a na dalších vnějších faktorech, které lze měnit v závislosti na konkrétní aplikaci. [363–365] V současnosti lze přípravu vyladit tak, aby částice absorbovaly světlo v celé viditelné a blízké infračervené oblasti (v rozmezí 300 až 1200 nm). Pokud částice absorbují elektromagnetické záření v oblasti viditelného spektra, pak se v kapalných disperzích jeví jako barevné (Obrázek 6). [20]



Obrázek 6. Vodné disperze nanočástic stříbra (A) a jejich absorpční spektra (B). [20]

Optické vlastnosti sférických nanočástic stříbra jsou silně závislé na jejich velikosti. Na obrázku (Obrázek 7A) jsou zobrazena spektra různě velkých nanočástic o stejné koncentraci. Malé nanočástice světlo primárně absorbují, takže mají silnou absorbanci v blízkosti 400 nm. Jak se velikost částic zvětšuje, dochází částečně i k rozptylu, intenzita píku slábne, píky se rozšiřují a posunují k delším vlnovým délkám, dochází k takzvanému červenému posunu. [33]

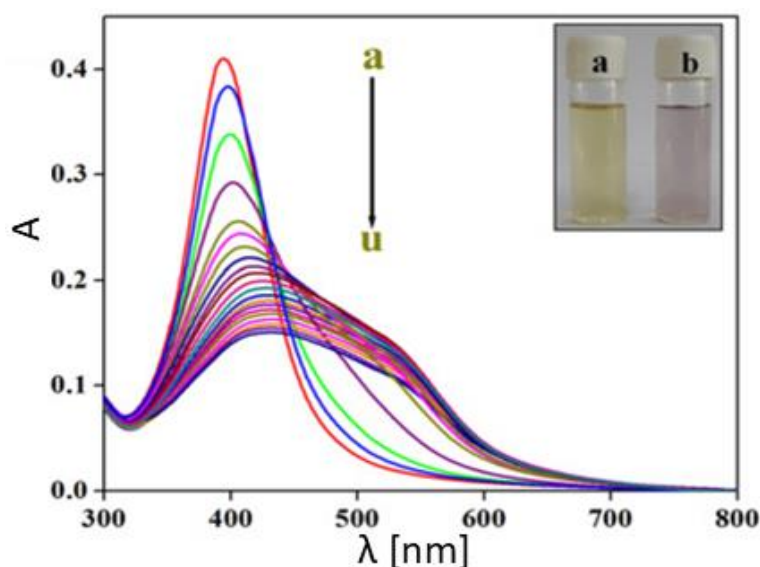


Obrázek 7. Absorpční spektra nanočástic stříbra různých velikostí (A), [33]
spektra nanočástic v prostředí s různým indexem lomu (B). [366]

Nanočástice stříbra mohou být dispergovány v řadě rozpouštědel, přičemž jejich elektronová struktura a vlastnosti jsou velmi citlivé na prostředí. Index lomu okolních materiálů v blízkosti povrchu částice má tedy velký vliv na výsledné optické vlastnosti nanočástic (Obrázek 7B). V případě přenesení částic z vody ($n=1,33$) do vzduchu ($1,00$) dochází k modrému posunu, v prostředí s mnohem vyšším indexem lomu (olej $n=1,5$) pak dojde k posunu k delším vlnovým délkám. Polohu absorpčního maxima tak lze

vyladit funkcionalizací jejich povrchu, nebo obalením částic nevodivými obaly včetně oxidu křemičitého ($n=1,5$), biomolekul ($n=1,4-1,45$) nebo oxidu hlinitého ($n=1,58-1,68$). [366,367]

Optické vlastnosti nanočástic stříbra se také mění, když dochází k agregaci částic a vodivé elektrony v blízkosti povrchu každé částice se delokalizují a jsou sdíleny mezi sousedními částicemi. Pokud dojde k agregaci, dojde ke snížení absorpčního píku a pík se často rozšíří, nebo se vytvoří další pík na delších vlnových délkách (v důsledku vzniku agregátů). Díky této vlastnosti tak lze pomocí UV-Vis spektroskopie jednoduše sledovat stabilitu částic v čase (Obrázek 8). [368]



Obrázek 8. Absorpční spektrum nanočástic stříbra se vzrůstajícím množstvím cysteinaminu (a-u), jež způsoboval agregaci částic. [368]

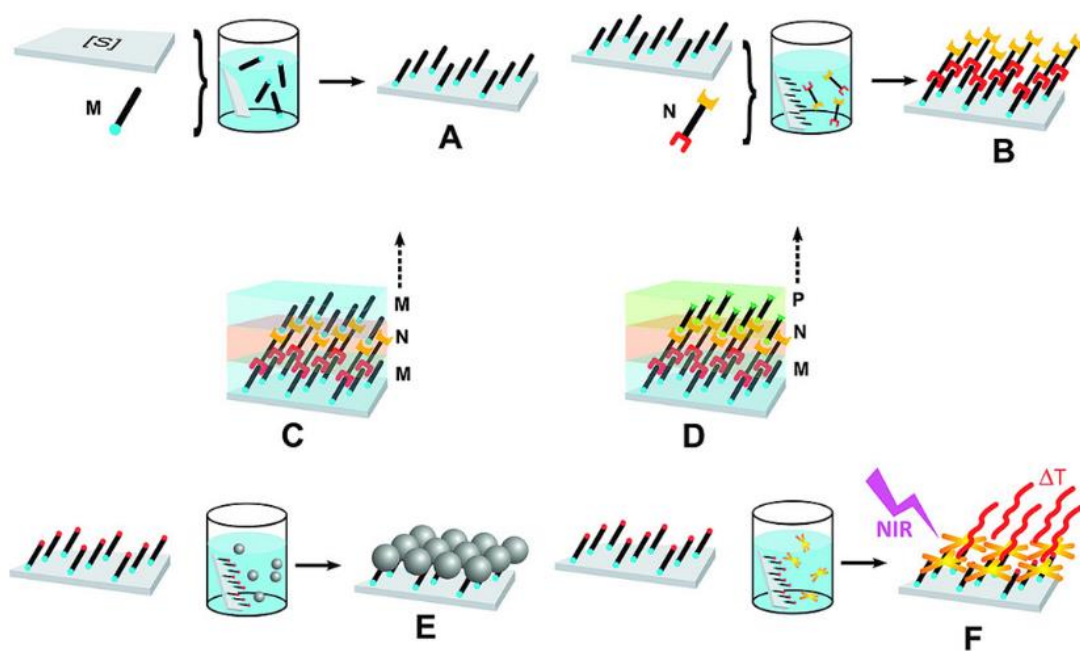
Příprava materiálů pro fototermální terapii

Příprava nanočástic stříbra s laditelnými optickými vlastnostmi a s tím souvisejícími fototermálními účinky otevřela mimo jiné i cestu k lokalizované tepelné terapii. Jak již bylo zmíněno dříve, po osvětlení nanočástic vhodným zářením dochází k excitaci volných elektronů lokalizovaných na povrchu nanočástic a jejich kolektivní oscilaci (vznik lokalizovaného povrchového plasmonu). Pokud frekvence dopadajícího světla odpovídá frekvenci oscilace plasmonu, dochází k rezonanci a zesílení intenzity elektrického pole v důsledku čehož je světlo absorbováno mnohem účinněji. [363,365] Plasmonické nanočástice pak okamžitě po ozáření účinně přeměňují energii světla na teplo, což umožňuje lokalizovaný ohřev okolního prostředí, a to z kovových nanočástic činí vynikajícího materiál ve fototermální terapii, jež může být využit například pro

destrukci nádorové nebo bakteriální buňky prostřednictvím denaturace enzymů/proteinů a k indukci heat-shock proteinů a dalších aplikacích. [369,370] Nárůst teploty obvykle závisí na intenzitě záření zdroje, délce ozařování, na koncentraci nanočástic v ozařované oblasti a obecně na typu nanočástic a jejich absorbanci při zvolené vlnové délce. [371–373]

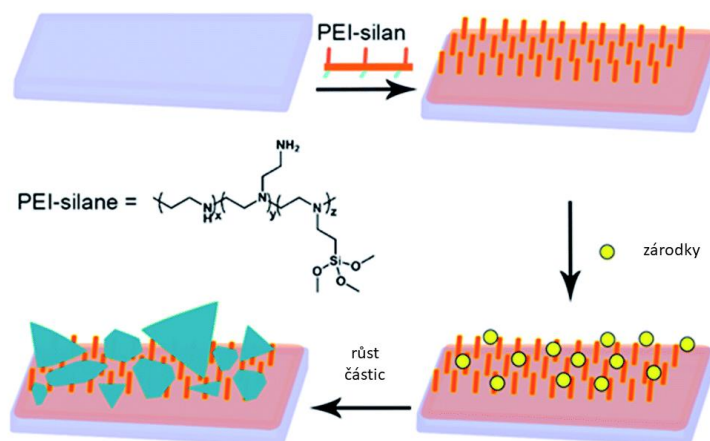
Modifikace povrchu vrstvami stříbrných nanočástic může být odpovědí nejen na problém mikrobiálních infekcí a vzniku bakteriálních biofilmů na povrchu stříbrem funkcionalizovaných zdravotnických prostředků, jako jsou protézy a katetry ale mohou zvýšit stabilitu částic, zabránit cytotoxicitě vůči živým buňkám a takové povrchy lze také pro jejich optické vlastnosti použít i v široké škále dalších aplikací. [374–376] Modifikace povrchů má pak také výrazný vliv na interakci částic s okolím, smáčení povrchu částic, vodivost a ovlivňuje chování materiálu v biologickém prostředí a jeho interakci s buňkami a tkáněmi, včetně adheze, biokompatibility, cytotoxicity a stimulace buněčného růstu. [377]

Tyto materiály lze připravit jednoduchou technikou samouspořádání podle přístupu vrstva po vrstvě (layer-by-layer, LbL technika) a to s různými molekulárními monovrstvami, které jsou nejprve navázány na objemový materiál a poté použity k připojení další monovrstvy nanočástic. [378] Jelikož je většina připravených nanočástic stabilizovaná iontovými povrchově aktivními látkami (např. citrátem), [80] tak LbL technika nejčastěji spoléhá na elektrostatickou interakci mezi povrchem nesoucím protonované aminy a záporně nabitými nanočásticemi a tím lze pak nanočástice navázat jen pouhým ponořením do koloidní disperze. (Obrázek 9). Kromě fyzikální adsorpce může také docházet k navázání na povrch za pomoci vodíkových vazeb, nebo elektrostatických sil. Příkladem může být elektrostatická vazba kladných aminových skupin na povrchu polymeru se záporně nabitými nanočásticemi stabilizovanými polyvinyl sulfonátem. [374,379] Jako objemový materiál, jehož povrch chceme upravit, se nejčastěji používá sklo, či materiál se srovnatelným chemickým složením povrchu (např. ITO, polydimetylsiloxan), nebo implantáty (např. Ti/TiO₂. [374,380,381] V rámci tohoto přístupu tedy nejprve dochází k modifikaci povrchu pomocí polymerních látek a následné adsorpci nanostříbrných kompozitních povlaků.



Obrázek 9. Schéma Layer-by-Layer metody. [374]

Příkladem využití této metody může být postup publikován D'Agostino a kol. [382] Ten v prvním kroku funkcionalizoval skleněný substrát molekulami polyethyleniminu (PEI), které jsou díky jejich alkokysilanovým funkčním skupinám snadno navázány na aktivovaný (hydrofilní) povrch oxidu křemičitého a zároveň poskytují aminové funkční skupiny, pomocí níž lze pak na povrch navázat stříbrné nanočástice. (Obrázek 10) Doba kontaktu sklíčka se zárodečnými nanočásticemi byla eliminována na 15 minut, aby došlo k vytvoření monovrstvy a nedocházelo k nekontrolovatelnému růstu nanočástic. Nanočástice rostly až v dalším kroku, ve kterém bylo sklíčko připravené v předchozím kroku ponořeno do růstového roztoku, jež obsahoval dusičnan stříbrný jako zdroj stříbra, kyselinu askorbovou jako redukční činidlo a citrát, který má významný vliv na navazování stříbra na zárodečné krystaly a tím tak významně ovlivňují výslednou velikost částic. Přičemž výsledný tvar částic závisel na době ponoření v růstovém roztoku. [382]



Obrázek 10. Růst nanočástic stříbra na skleněném substrátu. [382]

Technika LbL umožňuje implementaci vrstev nanočástic, které nejsou samy o sobě pouze antimikrobiální, ale jsou schopny působit fototermálně, tj. přeměňovat záření na teplo. To vede k přípravě antibakteriálních a antibiofilmových nanomateriálů, u nichž lze laserovým zářením zapnout hypertermické rozrušení biofilmu nebo planktonních bakterií. Při použití vhodných fototermických nanočástic a laserových zdrojů v takzvaném blízkém infračerveném "biotransparentním okně" (750-900 nm) lze zařízení s fototermickým povrchem po implantaci aktivovat ozařováním skrz tkáň. Takový zdravotnický prostředek je v zásadě možné zapnout a narušit biofilm na jeho povrchu bez nutnosti chirurgického odstranění. [370,383,384]

V literatuře byla na sklíčkách nesoucích PEI-silanovou vrstvu popsána adsorpce monovrstvy nanočástic s intenzivní absorpcí v NIR oblasti. Laserové ozáření sklíček při vlnové délce 808 nm poskytlo intenzivní fototermickou odezvu ($\Delta T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$) což vedlo k inhibici bakteriálního růstu, která v tomto případě byla vysvětlována synergickým účinkem mezi uvolňováním stříbrných iontů, nanomechanickým kontaktem bakterií s povrchem a lokální hypertermií. [382,385] Mimo to bylo využito i trojúhelníkových nanočástic stříbra absorbujících v blízké infračervené oblasti, jež díky své silné absorbanci v této oblasti vyvolaly silný fototermální efekt, jehož účinků bylo využito vůči multi-rezistentním bakteriálním kmenům, a to jak *in vitro*, tak *in vivo*. [205]

Optických vlastností připravených nanočástic lze mimo jiné použít i v cílené antimikrobiální fotodynamické terapii, využívající světlocitlivé netoxické barvivo (fotosenzitizér (PS)) k přeměně světelné energie na chemickou. Po osvětlení laserem se PS aktivuje viditelným světlem vhodné vlnové délky a excituje se do dlouho žijícího

tripletového stavu, který interaguje s kyslíkem v okolním prostředí a vytváří reaktivní formy kyslíku, jež jsou cytotoxické a jsou schopny napadat buněčné složky, což vede ke ztrátě propustnosti membrán, a nakonec ke snížení životaschopnosti, aniž by byla ovlivněna hostitelská buňka. [386] Fotosensitivní látka navázána na povrch částice je vystavena účinkům záření a už například po 10sekundové expozici multirezistentních kmenů *S. aureus* bylo zaznamenáno 99% snížení počtu kolonií, a to už při koncentraci 4 mg/L. [387] V jiném případě byly nanočástice stříbra funkcionalizovány fotosensitivní látkou chlorin e6 a modifikovány polyethyleniminem, přičemž povrchová plasmonová rezonance stříbra podporuje fotodynamický účinek za vzniku singletového kyslíku, jež dále stimuluje oxidační rozpouštění baktericidního stříbrného iontu. Synergický účinek mezi fotosensitizerem a nanočásticemi byl potvrzen jak v rámci testování antibakteriální aktivity *in vitro*, tak i v rámci terapii na myších s infekcí epidermální rány. [387,388] Fotodynamický účinek nanočástic stříbra byl testován v kombinaci s různými porfyriny (zinkový porfyrin, [389] hematoporfyrin, [390] i neporfyriny (riboflavin, [391], toluidinová modř, [392] přičemž přítomnost nanočástic stříbra spolu s fotosensitizerem výrazně zlepšila výsledky fotodynamické terapie. [393,394]

Dosavadní studie *in vitro* a *in vivo* potvrzují, že fototermální terapie je mimo jiné účinná i při léčbě řady nádorových buněčných linií. [395,396] Příkladem můžou být nanočástice stříbra, jež v tomto případě slouží jednak jako nosič léčiva, tak k jeho světlem aktivovaném uvolnění pro léčbu buněk rakoviny prsu. [397] Nanočástice stříbra různých tvarů byly využívány nejen k léčbě rakoviny prsu, [398], ale i vaječníků [399] buněčných linií karcinomu kůže [400] a likvidaci nádorových buněk plic [401] a prostaty, kde fototermální terapie zvýšila antioxidační aktivitu, indukovala apoptózu, inhibovala angiogenezi, snížila histologické změny v prostatě potkanů a zlepšila biokompatibilitu životně důležitých orgánů. [402]

Kromě výše uvedených aplikací bylo využito principu plazmonové rezonance a fototermálního účinku stříbrných nanočástic stříbra k cílenému tepelnému poškození proteinů a jeho využití k objasnění drah buněčné odpovědi na buněčný stres. Tato nová metoda umožňuje přesné a rychlé dodání tepla do cílové struktury, což za použití běžně používaných metod nelze. V současnosti tak není možné zacílit pouze na jednotlivé buňky nebo subcelulární kompartmenty, což omezuje studium proteotoxického stresu a tepelného šoku, jež se podílejí na různých patologických stavech. Na buněčné úrovni tepelné poškození primárně poškozuje proteiny a způsobuje jejich rozkládání, agregaci,

amyloidogenezi a denaturaci, což jsou jevy, které se uplatňují zejména v patobiologii Alzheimerovy choroby (AD), Huntingtonovy choroby, Parkinsonovy choroby, amyotrofické laterální sklerózy a amyloidózy, [403] a patří mezi charakteristické znaky rakoviny. Tato metoda tedy využívá plasmonických vlastností stříbrných nanočástic a poskytuje vhled do časoprostorové odpovědi na tepelné poškození důležité pro degenerativní onemocnění s širokou použitelností v biomedicině. [369]

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. Chemikálie & Bakteriální kmeny

Nanočástice stříbra byly připraveny za použití následujících chemikálií v analytické čistotě. Dusičnan stříbrný (Fagron), hydroxid amonný (28-30 %, Sigma-Aldrich), hydroxid sodný (Lach-Ner), D-maltóza (Sigma-Aldrich), tetrahydridoboritan sodný (Sigma-Aldrich) a hydrazin (Sigma-Aldrich). Na přípravu kompozitů se stříbrem byl využit melamine (≥ 99 %), fluorovaný grafit (rozsah značení: >61 % hm. F) od firmy Sigma Aldrich a disperze oxidu grafenu (GO) ve vodě jež byla zakoupena od společnosti Graphenea. Ke stabilizaci částic pak sloužili dihydrát citranu draselného (Lachema), sodná sůl kyseliny polyakrylové (molekulová hmotnost 1200), želatina, arabská guma, sérový albumin, vše od společnosti Sigma-Aldrich. Na úpravu destiček byla od firmy Sigma Aldrich použita kyselina polyakrylová (Mr 100 000, 35%), poly(diallyldimethylamonium chlorid) (20%) a 96 jamkové destičky Greiner CELLSTAR®.

Pro stanovení antimikrobiální aktivity byly použity následující standardní referenční bakteriální kmeny z České sbírky mikroorganismů, Masarykovy univerzity v Brně (Česká republika): *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Escherichia coli* CCM 3954, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Staphylococcus aureus* CCM 4223, *Enterococcus faecalis* CCM 4224 a kmeny ze sbírky mikroorganismů Ústavu mikrobiologie (Lékařská a Stomatologická fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Česká Republika): *Staphylococcus aureus* 008, meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) 4591/A/2005, *Enterococcus faecium* 419 (VRE) a ESBL-pozitivní *Escherichia coli*. Všechny kmeny byly standardně uloženy v kryozkumavkách (ITEST plus, Česká republika) při teplotě -80 °C.

Synergický účinek nanočástic a antibiotiky byl testován na multirezistentních kmenech *Escherichia coli* CE5556 u nichž byly popsány mechanismy resistance, např. cefotaximáza-mnichovský typ CTX-M-15 β -laktamázy s rozšířeným spektrem, mutace genu *gyrA* [Ser (83) Leu; Asp (87) Asn], *parC* [Ser (80) Ile; Glu (84) Val], PMQR [cr] vedoucí ke změnám cílového enzymu DNA gyrázy způsobující rezistenci k β -laktamovým antibiotikům, respektive fluorochinolonům. [404] *P. aeruginosa* 21425 vykazovala podobnou rezistenci k antibiotikům jako *E. coli* CE 5556, jak bylo potvrzeno

fenotypovými metodami podle EUCAST. [405] Stejným způsobem byla rezistence potvrzena i u *Enterobactera kobei* 3683/C/2017.

Jako kultivační médium byl použit Mueller-Hintonův bujón (MH, Becton, Dickson and Company) a brain hart infusion bujon (BHI). V případě testování synergických účinků vůči multirezistentním bakteriím byla v kombinaci s antimikrobiálním materiálem použita antibiotika s různými mechanismy účinku. Jednalo se o antibiotika inhibující syntézu buněčné stěny (ceftazidim, CTZ), působící na buněčnou membránu (kolistin, COL), inhibující syntézu proteinu (gentamicin, GEN) a narušující syntézu nukleonových kyselin (ciprofloxacin, CIP).

Pro studie buněčné toxicity byly použity adherentní lidské plicní fibroblasty HEL 12469 (ECACC 94101201), lidské kožní fibroblasty BJ (ATCC), buněčné linie lidského adenokarcinomu děložního hrdla HeLa (ATCC), buňky lidského plicního adenokarcinomu (A549), lidské embryonální plicní buňky (A549) leukemické buňky (CCRF-CEMt, THP-) a buňky adenokarcinomu žaludku AGS a NCI_N87. Jako buněčné médium byl v případě buněk adenokarcinomu žaludku využit RPMI-1640 obsahující 10% FCS sérum s 1% glutaminem (Sigma-Aldrich). HeLa buňky byly kultivovány v Dulbeccově modifikovaném Eagleově médiu (DMEM, Invitrogen, USA) doplněném L-Glutaminem, 10% FBS a 1% PenStrep (10000 U penicilinu, 10 mg streptomycinu ml⁻¹). Zbylé buňky byly kultivovány v Eagle's Minimum Essential Medium (Sigma-Aldrich) obohaceném o L-Glutamin, neesenciální aminokyseliny (NEAA), fetální hovězí sérum (FBS), PenStrep (5000 U penicilinu, 5 mg streptomycinu ml⁻¹) a hydrogenuhličitan sodný (7,5 %). K testování životaschopnosti buněk byl využit 3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid (Thermo Scientific), dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich). V případě průtokové cytometrie pak byly použity fluorescenční sondy trypsin (0,25 % v kyselině ethylendiamintetraoctové), propidiumjodid (PI) a kalcein-AM od firmy Sigma Aldrich. Na promytí buněk byl použit Dulbeccův fosfátový pufovaný roztok (Sigma Aldrich) a mechanismy účinku a rezistence byly stanoveny za použití ROS sondy CM-H₂DCFDA (Invitrogen, C6827), peroxidu vodíku, krystalové violeti vše od firmy Sigma Aldrich.

5. Příprava nanočástic

5.1 Příprava nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra o průměrné velikosti 28 nm (Ag28) s koncentrací 108 mg/L byly syntetizovány modifikovanou Tollensovou metodou v alkalickém prostředí, a to za neustálého míchání, pokojové teploty a za využití maltózy jako redukčního činidla. [406] Diamin stříbrný komplex $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ vzniklý smícháním roztoku dusičnanu stříbrného a hydroxidu amonného a s upraveným pH pomocí hydroxidu sodného byl v rámci této metody přípravy redukován maltózou. Koncentrace všech reakčních složek byly následující: dusičnan stříbrný $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L, amoniak $5 \cdot 10^{-3}$ mol/L, hydroxid sodný $9,6 \cdot 10^{-3}$ mol/L a D-maltóza 10^{-2} mol/L. Reakční systém byl nepřetržitě míchán magnetickým míchadlem a redukce byla zahájena přidáním redukčního činidla a dokončena zhruba po 5 minutách, což se projevilo vznikem medově žluté barvy charakteristické pro disperze nanočástic stříbra.

Menší částice, o velikosti 8 nm (Ag8), se stejnou koncentrací byly syntetizovány podobnou metodou jako předchozí částice, avšak diamin stříbrný komplex nebyl alkalizován a byl redukován za použití silnějšího redukčního činidla (tetrahydridoboritanu sodného). Nanočástice byly v tomto případě stabilizovány 1% roztokem polyakrylové kyseliny s molekulovou hmotností 15000 a připraveny redukcí $2 \cdot 10^{-3}$ mol/L tetrahydridoboritanem sodným. Ostatní reakční komponenty, tedy dusičnan stříbrný a amoniak byly použity ve stejných koncentracích jako v případě přípravy větších částic, tedy $1 \cdot 10^{-3}$ a $5 \cdot 10^{-3}$ mol/L.

5.2 Příprava anizotropních částic stříbra

Vodná disperze anizotropních stříbrných nanočástic (108 mg/L) byla na rozdíl od předchozích syntéz nanočástic stříbra syntetizována dvoustupňovým redukčním procesem, který zahrnoval částečnou redukci komplexního kationtu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ tetrahydridoboritanem sodným v prvním kroku, což vedlo ke vzniku stříbrných částic, které byly ve druhém redukčním kroku (redukce hydrazinem) využity jako zárodky pro následnou tvorbu a růst částic. Zpočátku bylo do kádinky o objemu 50 ml přidáno 5 ml vodného roztoku dusičnanu stříbrného (0,005 mol/L), 1,25 ml roztoku amoniaku (0,1 mol/L), 1,25 ml citrátu sodného (1 % hm.) a 13,425 ml destilované vody a mícháno za současného přidávání redukčních činidel. Redukce byla zahájena přidáním 0,075 ml tetrahydridoboritanu sodného (0,001 mol/L), což vedlo k redukci komplexního kationtu stříbra, tvorbě malých nanočástic (jader) a změně barvy disperze na světle žlutou.

Nakonec byly do disperze stříbrných zárodků za intenzivního míchání rychle přidány 4 ml roztoku hydrazinu (0,05 mol/L), což vedlo k růstu zárodků do konečných rozměrů a změně barvy disperze ze světle žluté na typickou fialovou. Reakce probíhala při pokojové teplotě za neustálého míchání a za přítomnosti dihydrátu citranu draselného, který sloužil jak ke stabilizaci částic, tak k ovlivňování výsledného tvaru nanočástic. V závislosti na množství redukčního činidla (hydrazinu) a množství stabilizátoru v roztoku (0,25 do 4 ml (1 % w/w)) a s úpravou celkového objemu na 25 ml, lze tedy připravit i další plasmonické nanočástice s různými tvary a optickými vlastnostmi.

5.3 Příprava grafenového derivátu GCN/Ag

Grafenový derivát byl za neustálého míchání připraven při pokojové teplotě kolegou Mgr. Davidem Panáčkem, Ph.D., a to z kyanografenu (GCN) na jehož povrchu byly redukovány stříbrné ionty, dle postupu popsáném v jeho publikaci. [48] Příprava kyanografenu vycházela z postupu Bakandritsose a spol [407] kde byly 4 g fluorografenu, míchány ve 240 ml dimethylformamidu po dobu tří dní. Poté byla směs 4 hodiny sonikována (Bandelin Sonorex, typ DT 255H, frekvence 35 kHz, výkon 640 W, efektivní výkon 160 W) v dusíkové atmosféře a nakonec bylo k disperzi přidáno 5,1 g NaCN a směs byla míchána a zahřívána při 130 °C po dobu 48 hodin a poté byla přečištěna několika promývacími kroky, odstředěna a dialyzována.

1,5 ml suspenze obsahující 5 mg GCN byla při pokojové teplotě intenzivně míchána po dobu 24 h s 10 ml roztokem AgNO_3 ($2,2 \cdot 10^{-3}$ mol/L). Stříbrné ionty, které nebyly pevně ukotveny na plátech kyanografenu byly odstraněny odstředěním při 15 000 otáčkách a promytím destilovanou vodou (3x). Po přečištění byl GCN modifikovaný stříbrnými ionty rozdispergován v 10 ml destilované vody a bylo k němu přidáno 10 ml $3,2 \cdot 10^{-3}$ mol/L hydroxidu amonného a 10 ml $6,9 \cdot 10^{-3}$ mol/L citrátu sodného, jež sloužil ke stabilizaci částic a tvorbě diamoniové soli, která byla následně redukována přidáním 2 ml $2,2 \cdot 10^{-3}$ mol/L roztoku tetrahydridoboritanu sodného a poté, po dobu jedné hodiny ponechána ve tmě. Konečný produkt GCN/Ag s navázanými nanočásticemi stříbra byl třikrát promyt destilovanou vodou, odstředěn při 10 000 otáčkách za minutu a vysušen. Vysušený GCN/Ag byl suspendován v příslušném objemu vody, aby se získala konečná koncentrace 2 g/L hybridu.

5.4 Příprava kompozitu nitridu uhlíku se stříbrem (g-C₃N₄/Ag)

Nitrid uhlíku byl syntetizován kolegou Ing. Ladislavem Svobodou, Ph.D., a to tepelnou polykondenzací melaminu popsanou v publikaci Svoboda a kol. [49] 5 g melaminu bylo umístěno do keramického kelímku, který byl na vzduchu zahříván po dobu 4 h při teplotě 550 °C a rychlosti zahřívání 3 °C min⁻¹. Po ochlazení na pokojovou teplotu byl další tepelnou exfoliací na vzduchu po dobu 2 h při 500 °C připraven exfoliovaný g-C₃N₄. Nanokompozity se stříbrem pak byly připraveny fotoasistovanou depozicí stříbrných částic na povrch g-C₃N₄. [408] Přičemž 99 mg exfoliovaného g-C₃N₄ bylo umístěno do 25 ml deionizované vody a ve tmě sonikováno po dobu 5 min a následně k němu byl (v závislosti na výsledném obsahu stříbra v kompozitu, 1 a 5%) přidán dusičnan stříbrný a disperze byla intenzivně míchána ve tmě po dobu 1 hodiny. Nakonec byla směs po dobu 10 min ozařována 10 W LED diodou o vlnové délce 416 nm. Původní světle žlutou barvu v disperzi po ozáření nahradila mírně šedá barva, což ukazuje na vznik nanočástic. Vzniklý nanokompozit byl čtyřikrát promyt v deionizované vodě, centrifugován a lyofilizován, čímž vznikl konečný produkt s označením Xag/ g-C₃N₄, kde X = 1 a 5 % udává množství stříbra.

5.5 Příprava stříbrných vrstev

Anizotropní částice připravené výše uvedenou metodou byly po přípravě naneseny na dno mikrotitračních destiček funkcionalizovaných nejprve 1% roztokem kyseliny polyakrylové (PAA, Mr 100 000) a následně 1% roztokem poly(diallyldimethylamonium chloridu) (PDDA), přičemž každé z nich bylo ponecháno k adsorpci na povrchu destičky po dobu 2 h. Povrch destičky byl tak potažen tenkým polymerním filmem sestávajícím ze dvou opačně nabitých vrstev polyelektrolytů (PAA a PDDA). Po 4 h byly jamky promyty destilovanou vodou, což vedlo k odstranění nenavázaných polymerů, a následně byly naplněny disperzí stříbrných nanočástic, které se během 45 min navázaly na předchozí vrstvu. Nakonec byly jamky opět promyty destilovanou vodou, a vysušeny na vzduchu.

6. Charakterizace nanočástic & přístrojové vybavení

Fyzikálně chemické vlastnosti připravených nanočástic byly studovány za využití následujících technik. Na určení velikosti částic a jejich polydisperzity byl použit přístroj Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK), jež velikost částic stanovuje na základě dynamického rozptylu světla (Dynamic Light Scattering – DLS) a byly potvrzeny za pomoci transmisní elektronové mikroskopie (TEM) na přístroji JEM 2010 TEM (Jeol, Japonsko)

s urychlovacím napětím 160 kV a snímky HRTEM (TEM s vysokým rozlišením) pomocí mikroskopu TITAN 60–300 (FEI, USA) pracující při napětí 300 kV, jež je opatřen HAADF (detektorem elektronů difraktovaných pod velkými úhly). Biologické vzorky pak byly pozorovány i skenovacím elektronovým mikroskopem (Hitachi SU6600) s urychlovacím napětím 1,5 kV. Na velikost částic, jejich optické vlastnosti a stabilitu bylo nahlédnuto v závislosti na UV-VIS absorpčních spektrech zaznamenaných na spektrofotometru Specord S 600 (Analytic Jena, Německo) pracujícím v jednopaprskovém uspořádání.

Zeta potenciál, tedy náboj připravených částic byl získán měřením elektroforetické pohyblivosti pomocí přístroje Zetasizer NanoZS (Malvern, Velká Británie). Koncentrace stříbra v připravených koloidech, popřípadě množství stříbra imobilizovaného na GCN/povrch destiček, byly měřeny pomocí atomové absorpční spektroskopie (AAS) na přístroji ContrAA 600 s grafitovou pecí (Analytik Jena AG, Německo) vybaveném dvojitým Echelleho monochromátorem s vysokým rozlišením (šířka spektrálního pásu 2 pm při 200 nm) a Xenonovou lampou jako zdrojem kontinuálního záření.

FTIR spektra byla zaznamenána na FTIR spektrometru iS5 (Thermo Nicolet) s použitím příslušenství Smart Orbit ZnSe ATR. Ramanova spektra byla zaznamenána na Ramanově mikroskopu DXR s použitím diodového laseru o vlnové délce 633 nm. Rentgenová fotoelektronová spektroskopie s vysokým rozlišením (HR-XPS) byla provedena na spektrometru PHI VersaProbe II (Physical Electronics) s použitím zdroje Al K α (15 kV, 50 W). Získaná data byla vyhodnocena a dekonvolutována pomocí softwarového balíku MultiPak (Ulvac – PHI, Inc.). Proces spektrální analýzy zahrnoval Shirleyho odečítání pozadí a dekonvoluci píků pomocí smíšených Gaussových-Lorentzových funkcí. Chemické mapování prvků bylo získáno pomocí energeticky disperzní rentgenové spektroskopie EDS s dobou akvizice 20 min na mikroskopu FEI Titan HR-TEM pracujícího při 80 kV.

Pro vizualizaci a zobrazení mikrotermálního poškození byla použita platforma Zeiss Axioimager Z.1 vybavená modulem LSM780 pro konfokální laserovou skenovací mikroskopii (CLSM) spolu s argonovými lasery 488 nm a 355 nm sloužícími k vizualizaci a laser o vlnové délce 561 nm a výkonu 20 mW sloužícímu k aktivaci

plasmonické vrstvy. Detailnější popis samotného experimentu je uveden v práci Mistrik a kol. [369]

Optická hustota bakteriálního inokula byla měřena denzitometrem (Densi-Lameter, LACHEMA, Česká republika), bakteriální růst byl monitorován pomocí čtečky mikrotitračních destiček (Spektrometr, BioTek Elx808), jež byla schopna měřit absorbanci při 570 nm a sledovat tak bakteriální růst v čase. Pro měření fluorescence byla použita čtečka Infinite 200 Pro (Tecan). Životaschopnost buněk byla hodnocena pomocí průtokového cytometru BD FACSVerse (BD Biosciences, USA).

7. Stabilizace nanočástic

Částice jako takové jsou ve vodné disperzi stabilní. V rámci *in vitro* testování antibakteriální aktivity a cytotoxicity však nanočástice přicházejí do styku s velkým množstvím iontů a proteinů obsažených v kultivačních médiích, které mají vliv na iontovou sílu roztoku, která negativně ovlivňuje stabilitu částic stříbra a tím i jejich biologické účinky. V průběhu experimentální práce bylo vyzorováno, že v některých případech nejsou částice stříbra ve směsi s kultivačním médiem agregátně a sedimentačně stabilní, a proto musely být dodatečně stabilizovány. V případě větších částic připravených redukcí maltózou byl stabilizátor přidán až po přípravě nanočástic, v případě menších nanočástic připravených redukcí borohydridem byl stabilizátor přidán těsně před přidavkem redukční látky. Ke stabilizaci byla použita želatina, hovězí sérový albumin (BSA), arabská guma a kyselina polyakrylová o různých molekulových hmotnostech a koncentracích. Stabilita částic stabilizovaných různými látkami byla v čase sledována spektrofotometricky jak ve vodě, tak po interakci částic s bakteriálním médiem (1:1), což odpovídá nejvyššímu obsahu média při samotných mikrobiologických experimentech.

Mimo výše zmíněný způsob stabilizace byly nanočástice stříbra stabilizovány za využití extraktu z kůry granátového jablka (PGRE), který byl připraven dle publikace Asadishada a kol. [409] Kůra granátového jablka byla nakrájena na malé kousky a sušena po dobu 24 h při teplotě 50 °C. Suchá kůra (15 g) byla přidána do 200 ml destilované vody a umístěna do třepačky (80 rpm) při laboratorní teplotě po dobu 24 h. Surový extrakt byl poté sterilizován na filtračním papíře Whatman č. 1. Následně byl vzorek PGRE byl vysušen mrazem za účelem stanovení obsahu sušiny (20 g/L).

8. Antibakteriální aktivita testovaných nanočástic

8.1 Příprava bakteriálních vzorků & testování antibakteriální aktivity

Antimikrobiální aktivita byla vyhodnocena na základě minimální inhibiční koncentrace (MIC) testovaného materiálu pro dosažení viditelné celkové inhibice růstu testovaného bakteriálního kmene po 18 ± 2 hodinové inkubaci při 35 ± 1 °C a byla stanovena na základě standardní mikrodiluční metody dle metodiky CLSI (Ústav pro klinické a laboratorní standardy) a EUCAST (Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti). [405] Testování se provádělo v 96 jamkových mikrotitračních destičkách, kde se v geometrickém postupu testované vzorky ředily kultivačním médiem (Mueller Hinton Broth, BD Difco, Francie). Pro každý antimikrobiální test byla připravena čerstvá bakteriální suspenze z bakterií, které byly při 35 ± 1 °C po dobu 24 h kultivovány na krevním agaru. Optická hustota bakteriálního inokula byla na základě McFarlandova standardu stanovena na hodnotu 1 pomocí denzitometru (Densi-La-Meter, LACHEMA, Česká republika); po příslušném zředění tak byla pro mikrobiální testování získána výchozí koncentrace 10^6 CFU/ml.

8.2 Minimální doba pro usmrcení

Doba potřebná pro letální účinek nanočástic byla stanovena za pomoci standardní mikrodiluční metody. Mikrotitrační destičky spolu s bakteriemi a nanočásticemi byly připraveny jako obvykle a byly ponechány inkubovat po dobu 16 hodin, kde bylo každou hodinu z jamek obsahující různé koncentrace nanočástic stříbra odebráno 10 μ l a naočkováno/rozetřeno definovaným způsobem na povrch destiček krevního agaru (Trios s.r.o., ČR). Bakterie byly pak následně inkubovány při 35 ± 1 °C po dobu 18 ± 2 hodin a narostlé kolonie byly spočítány a přepočteny na počet CFU/ml.

8.3 Testování synergického účinku

Společný účinek antibiotik a antibakteriální aktivita jednotlivých antibakteriálních látek byly stanoveny za využití šachovnicové mikrodiluční metody. Na základě výsledků testování minimální antibakteriální aktivity nanomateriálů a breakpointů (je hodnota stanovena EUCAST, která definuje koncentraci, při které je daná bakterie na dané antibiotikum rezistentní, či nikoli) pro jednotlivé kombinace antibiotikum-bakterie byly stanoveny počáteční (maximální) koncentrace jednotlivých antibakteriálních látek a ty pak byly následně ředěny geometrickou řadou MH bujonem. 96 jamkové mikrotitrační destičky byly naplněny vertikálně zředěnými antibiotiky a horizontálně zředěnými

nanomateriály, každá kombinace byla tedy testována právě jednou. Inokulace čerstvou suspenzí bakterií pak proběhla stejným způsobem jako v případě mikrodiluční metody.

$$\overline{FIC} = \frac{MIC_{Ag} \text{ in combination}}{MIC_{Ag} \text{ alone}} + \frac{MIC_{ATB} \text{ in combination}}{MIC_{ATB} \text{ alone}} \quad (1)$$

Míra synergického (společného) účinku byla pak vyhodnocena na základě FIC indexu, který byl vypočítán z MIC pro jednotlivé antibakteriální látky (Vzorec 1). Na základě hodnoty pak byl účinek vyhodnocen jako synergický, ($FIC \leq 0,5$), aditivní ($0,5 < FIC \leq 1$), indiferentní ($1 < FIC \leq 2$) a antagonistický ($FIC > 2$). [161]

V rámci testování synergického účinku byly testovány nanočástice stříbra navázané na plát kyanografenu a to v kombinaci s antibiotiky mající různé mechanismy účinku vůči bakteriím s různými mechanismy rezistence. Všechny experimenty v rámci tohoto testování byly provedeny na rezistentních bakteriích a s antibiotiky lišící se mechanismy účinku. Ceftazidim byl vybrán jako zástupce antibiotik inhibující syntézu buněčné stěny, kolistin jako antibiotikum působící na bakteriální membránu a gentamicin a ciprofloxacin jako antibiotika inhibující syntézu proteinu, respektive syntézu DNA. Citlivost/rezistence bakterií pak byla hodnocena na základě jejich minimálních inhibičních koncentrací a jejich porovnání s „break pointy“ dle EUCAST. [405]

8.4 Testování mechanismu účinku

8.4.1 Stanovení reaktivních forem kyslíku (ROS)

Bakterie byly v MH bujonu kultivovány při teplotě 35 ± 1 °C do mid-log fáze, poté byla část bakteriální suspence dána stranou (pozitivní kontrola), do zbytku byl přidán grafenový derivát o koncentraci shodné s minimální inhibiční koncentrací a byly inkubovány po dobu 3 hodin při 35 ± 1 °C. Bakterie spolu s grafenovým derivátem byly centrifugovány (3500 rpm, 5 min) a usazený supernatant byl 3x promyt v PBS a následně byly vzorky přeneseny do 96 jamkové destičky, kde byla přidána ROS sonda CM-H₂DCFDA (Invitrogen, C6827) na konečnou koncentraci 1 μmol/L. V případě pozitivní kontroly byl přidán peroxid vodíku (2 mmol/L). Vzorky byly ve tmě inkubovány při 37 °C po dobu dalších 2 hodin a poté byla na čtečce Infinite 200 Pro (Tecan) při vlnových délkách ex./em. 492 nm/527 nm zaznamenána fluorescence. Stejný experiment byl prováděn i pro delší dobu inkubace nanočástic s bakteriemi, kde byl grafenový derivát přidán do bakteriální suspence ihned po přípravě a byl spolu s bakteriemi kultivován po dobu 8 hodin při teplotě 35 ± 1 °C.

8.4.2 Narušení bakteriální membrány

Bakterie byly po dobu 24 h inkubovány v 96 jamkových mikrotitračních destičkách v MH bujonu a také MH bujonu obsahujícím geometricky naředěný grafenový derivát. Subinhibiční koncentrace GCN/Ag byla použita za účelem pozorování bakterií před jejich smrtí. Nejprve byly bakterie promyty od zbytků bujónu centrifugací, redispergovány v PBS, opakovaně centrifugovány a následně opět znovu rozptýleny ve vodě. Nakonec byly bakterie fixovány plamenem na pozlacených mikroskopických sklíčkách/titanových terčích a byly pozorovány za pomoci skenovací elektronové mikroskopie.

9. Indukce rezistence

Zda jsou bakterie schopny vytvořit rezistenci vůči nanomateriálům bylo zkoumáno po dlouhodobém a opakovaném vystavování bakteriím účinkům nanočástic stříbra. Bakteriální rezistence byla indukována opakovanou kultivací bakterií se subinhibičními koncentracemi nanočástic. V průběhu experimentu byla stanovována hodnota MIC výše zmíněným způsobem (mikrodiluční metodou), přičemž navýšení MIC signalizovalo rozvoj bakteriální rezistence. Po 24hodinové kultivaci se subinhibičními koncentracemi nanočástic (tj. nižší než MIC) bylo z jamek odebráno 10 µl Muellerova-Hintonova bujónu obsahujícího přežívající bakterie, které byly subkultivovány na krevním agar (TRIOS) při 37 °C po dobu 24 hodin. Bakterie narostlé na krevním agaru pak byly následně použity pro přípravu inokula o hustotě 10^6 CFU/ml pro další kultivační krok. Celý výše popsáný postup od počáteční inokulace až po přípravu nového inokula byl považován za jeden kultivační krok pro vývoj bakteriální rezistence. Po každém kroku byly zaznamenány minimální inhibiční koncentrace a sledovány v čase, přičemž nárůst MIC indikoval vznik bakteriální rezistence.

9.1 SEM snímky bakterií

Samotná bakteriální suspenze kultivovaná po dobu 24 h a suspenze kultivovaná v přítomnosti subinhibiční koncentrace nanočástic byla po inkubaci pročištěna centrifugací, nanесena na pozlacené sklíčko, popřípadě titanový terčik a fixována plamenem. V případě experimentu prokazujícího tvorbu bakteriálního biofilmu bylo sklíčko/terčik vloženo do bakteriální suspenze a sloužilo tak jako hlavní povrch pro tvorbu biofilmu. Po 24hodinové inkubaci bylo sklo promyto v PBS a ve vodě, vysušeno na vzduchu a charakterizováno skenovací elektronovou mikroskopií. Stejným způsobem se hodnotila i inhibice biofilmu, kde byl zaveden stejný postup, ale kromě

nanočástic byla přidána i látka zabraňující tvorbu biofilmu (př. PGRE) v různých koncentracích.

9.2 Tvorba bakteriálního biofilmu – Modifikovaná Christensenova metoda

Bakteriální biofilm byl pěstován v 96jamkové jamce předem modifikované vrstvou PDDA, která pomohla pokrýt povrch destičky nanočásticemi stříbra. [410] V důsledku modifikace jamky se biofilm tvořil převážně na funkcionalizovaném povrchu, a proto bylo snazší provést jeho analýzu pomocí barvení krystalovou violetí (1%). Jamky mikrotitrační destičky s plochým dnem byly naplněny 0,5% roztokem PDDA. Po dvou hodinách byly jamky propláchnuty destilovanou vodou a poté naplněny nanočásticemi stříbra o koncentraci 108 mg/L, které byly naadsorbovány na povrch jamek. Následně byl v jamkách kultivován *S. aureus* v Muller-Hiltonově bujónu, a to v přítomnosti nanočástic stříbra a bez nich. Po 24hodinové inkubaci (37 °C) byly jamky propláchnuty, aby se odstranil bujón s planktonními buňkami. Zbylý biofilm byl fixován methanolem (99 %) a obarven pomocí CV (1 %). Následně byla stanovena optická hustota OD₅₇₀ každé jamky (Spektrometr, BioTek Elx808). Pro každou koncentraci byla provedena i negativní kontrola, kde byla stanovena optická hustota jamky bez přítomnosti bakterií. V rámci experimentu byla porovnávána tvorba biofilmu v přítomnosti různě koncentrovaných nanočástic stříbra, a to jak u citlivých, tak u rezistentních kmenů.

10. Testování cytotoxicity

Pro stanovení buněčné toxicity byly buňky kultivovány při 37 °C v atmosféře 5 % CO₂ v bujónu obohaceném o potřebné látky viz kapitola chemikálie, v závislosti na použité linii buněk.

10.1 Průtoková cytometrie

Životaschopnost buněk za pomoci průtokového cytometru BD FACSVerse (BD Biosciences, USA) byla otestována Mgr. Tomášem Malinou, Ph.D. Do každé jamky v 96jamkové destičce bylo nasazeno deset tisíc buněk a byly inkubovány s nanomateriálem o různých koncentracích po dobu 24 h. Po 24 h byl odebrán supernatant a buňky byly jemně promyty roztokem PBS (0,1 M, 7,4 pH). Poté byly buňky odděleny trypsinem (0,25 % v EDTA, Sigma-Aldrich), resuspendovány ve 100 µl kultivačního média a přidány do supernatantu. Životaschopnost buněk byla stanovena pomocí propidiumjodidu (PI) a kalcein-AM fluorescenčních sond. Buňky byly inkubovány s 1 µl PI (1 µg ml⁻¹) a 2 µl kalceinu-AM zředěného v DMSO (50 µM) po dobu 20 minut

a fluorescenční signál byl měřen průtokovým cytometrem pomocí červeného kanálu (exc. 488/em. 586) pro PI a zeleného kanálu (exc. 488/em. 527) pro kalcein. Červený signál PI odhalil mrtvé buňky, které ztratily membránovou integritu, zatímco zelený signál představovaly buňky s aktivními intracelulárními esterázami, které katalyzovaly nefluoreskující kalcein-AM na vysoce fluoreskující zelený kalcein. Byla stanovena životaschopnost a normalizována na kontrolní buňky se 100% životaschopností.

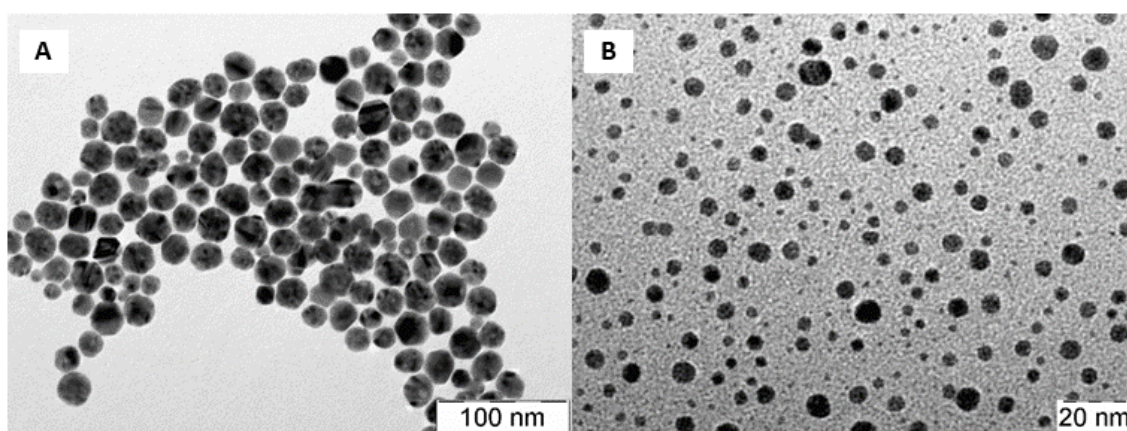
10.2 MTT test

Buňky byly kultivovány ve 100 μL RPMI s 1% FCS v 96jamkové destičce s plochým dnem a to v koncentraci $2,5 \cdot 10^4$ buněk/jamku při teplotě 37 °C a v atmosféře 5 % CO_2 po dobu 24 h. Na druhý den bylo odsáto médium, jamky byly promyty roztokem PBS a poté bylo přidáno čerstvé médium spolu s nanočásticemi o různých koncentracích, které byly spolu s buňkami po dobu 24 h ponechány ke kultivaci při 37 °C v 5 % CO_2 . Následující den bylo médium odsáto, jamky promyty a naplněny 100 μL PBS, do kterých bylo přidáno 10 μL MTT sondy (5 mg/ml v PBS). Destička byla následně ponechána po dobu 1 h k inkubaci ve tmě při 37 °C. Na dně jamek se objevily fialové krystalky, které byly rozpuštěny působením lyzačního roztoku, se kterým byl obsah jamek důkladně promíchán. Nakonec byla změřena absorbance při vlnové délce 570 nm pomocí čtečky destiček Infinite PRO M200 (Tecan, Rakousko). Počet přeživších buněk byl vypočítán jako podíl absorbance vzorku a absorbance kontroly násobený 100krát a vyjádřen v procentech životaschopnosti.

VÝSLEDKY A DISKUSE

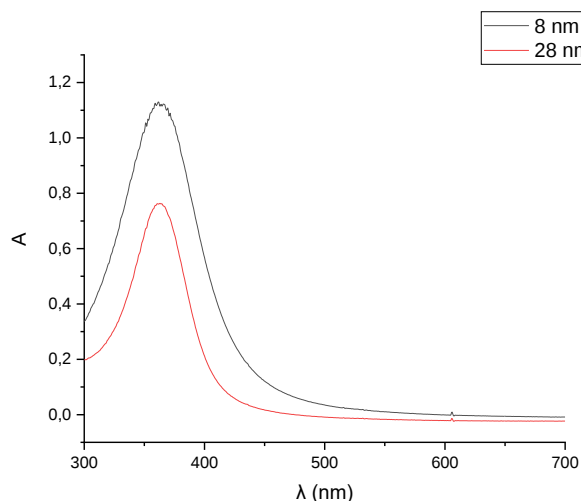
11. Příprava a stabilizace nanočástic

V rámci disertační práce byly připraveny nanočástice stříbra a jejich kompozity, jež byly následně charakterizovány a testovány pro jejich možné využití v antibakteriální a fototermální terapii. Základními nanočásticemi používanými v rámci výzkumné práce byly nanočástice stříbra připravené redukcí maltózou a tetrahydridoboritanem sodným (borohydridem). Z pohledu řízení konečné velikosti se lišily pouze v typu použitého redukčního činidla a jeho síle, tedy redoxním potenciálu. Nanočástice připravené redukcí maltózou tvořily poměrně monodisperzní koloidní systémem s průměrnou velikostí částic 28 nm, jež byla stanovena na základě měření dynamického rozptylu světla a byla potvrzena na základě snímků z transmisní elektronové mikroskopie (Obrázek 11A). Tetrahydridoboritan sodný je silné redukční činidlo a v jeho přítomnosti dochází k tvorbě více zárodků, a tedy menších částic (8 nm), což bylo taktéž potvrzeno na základě TEM snímků (Obrázek 11B). Větší nanočástice stříbra připravené redukcí maltózou budou po zbytek práce označovány jako Ag28 a menší částice připravené redukcí tetrahydridoboritanem sodným budou označovány jako Ag8.



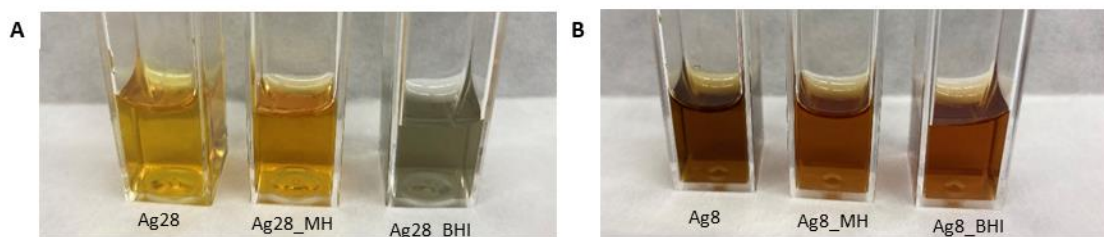
Obrázek 11. Snímky nanočástic stříbra z transmisního elektronového mikroskopu připravené redukcí maltózou (A), tetrahydridoboritanem sodným (B).

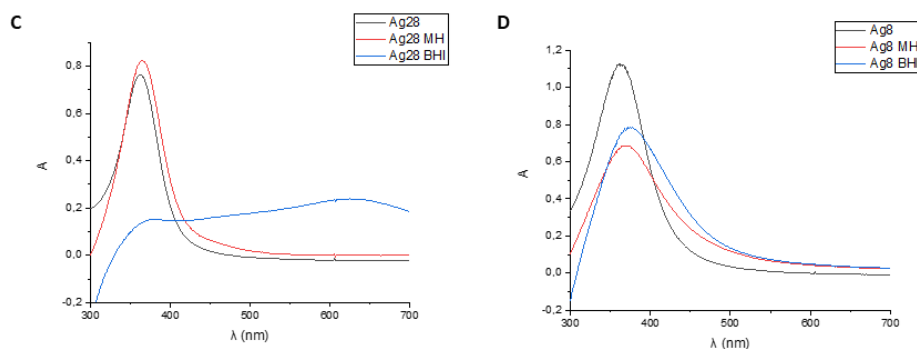
V rámci charakterizace nanočástic byla změřena jejich absorpční spektra v UV/VIS oblasti, na nichž byl pozorován výrazný pík v oblasti 400 nm, což je lokalizovaná plazmonová rezonance (LSPR) charakteristická pro stříbrné nanočástice. (Obrázek 12) Poměrně úzká šířka píků pak naznačuje úzkou distribuci velikosti částic, tedy syntézu poměrně úzce polydisperzního systému.



Obrázek 12. Absorpční spektra připravených nanočástic stříbra lišících se svou velikostí.

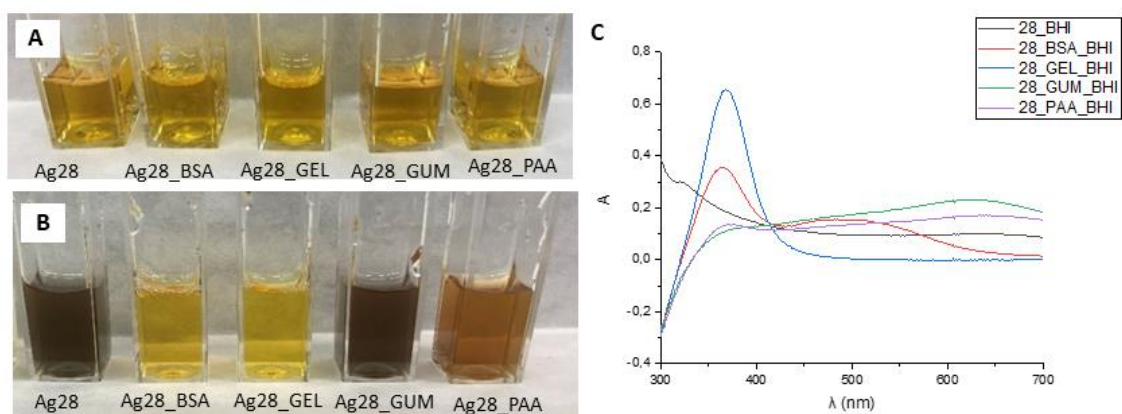
Částice mají vysokou hodnotu zeta potenciálu (-29 mV) a jsou ve vodné disperzi dlouhodobě stabilní. Pokud ale dále přemýšlíme o využití v antibakteriální terapii, popřípadě o translaci do medicínální praxe, je potřeba dále sledovat i interakci s bakteriálními a buněčnými médii *in vitro*, tedy stabilitu nanočástic v prostředí s médii a celkově pozorovat osud částic po podání do těla a jeho následnou farmakokinetiku a biodistribuci *in vivo*. Pro prvotní experimenty byly v úvahu brány jen základní *in vitro* experimenty, a tedy interakce nanočástic s bakteriálním bujonem, v důsledku čehož může docházet ke změně iontové síly roztoku a následné destabilizaci systému. Po naředění částic 1:1 vodou, popřípadě kultivačním bujonem MH (MH_Ag) nedošlo po 24 h k žádné okem pozorovatelné změně (Obrázek 13A, B), a ke změně nedošlo ani v rámci měření absorpčních spekter, v nichž nedošlo k žádné změně intenzity absorpčního maxima či jeho polohy. V případě nutričně bohatšího BHI kultivačního bujonu u větších částic bohužel po jejich interakci s bujonem došlo k agregaci, kterou bylo možné detekovat jak pozorováním na základě barevné změny, tak na UV-VIS absorpčních spektrech (Obrázek 13).





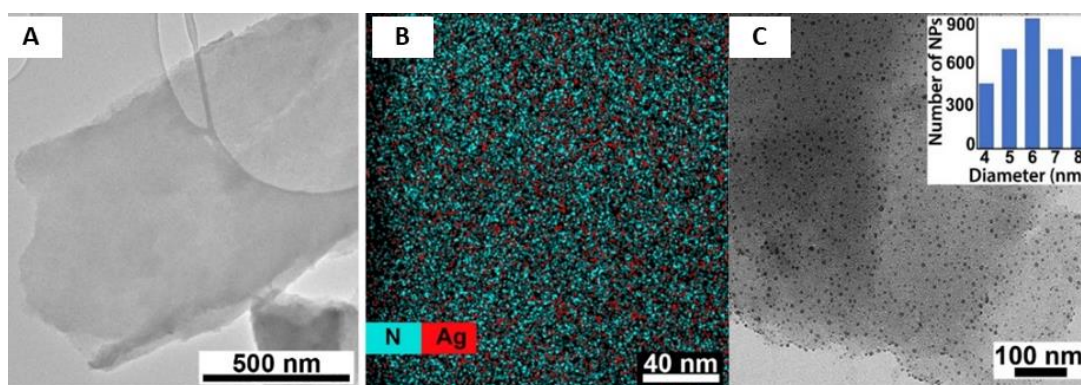
Obrázek 13. Fotografie a absorpční spektra vodných disperzí stříbrných nanočástic o velikosti 28 (A, C) a 8 nm (B, D) ihned po přípravě a nanočástic po interakci s bakteriálním bujónem (MH, BHI).

Agregační nestabilita se v případě větších částic (redukce maltózou) projevila ihned po interakci nanočástic s BHI bujónem (1:1) a to změnou zbarvení a snížením absorpce v rámci UV/VIS spekter (Obrázek 13). Během 24 hodin pak došlo k úplné agregaci částic a k sedimentaci na dně kyvety. Po smíchání kultivačního média s menšími částicemi (redukce tetrahydridoboritanem) došlo jen k drobné změně zbarvení disperze částic, jež se projevilo mírným snížením intenzity a lehkým posunem k vyšším vlnovým délkám (Obrázek 13). Obecně se elektricky nabitě částice stříbra vlivem elektrostatických odpuzivých sil odpuzují a nedochází tak k jejich agregaci. Je-li však k nanočásticím přidán elektrolyt obsahující kladně nabitě ionty, v tomto případě kultivační bujón obsahující kationty Mg^{2+} , Ca^{2+} a další, vlivem stlačení elektrické dvojvrstvy nebo vlivem zrušením celkového povrchového náboje v důsledku specifické adsorpce iontů dochází ke koagulaci částic. Agregaci nanočástic za vzniku rozměrných útvarů dochází ke ztrátě jejich antimikrobiální aktivity, a proto je nutné takové destabilizaci nanočástic stříbra předcházet a nízkou polydisperzitu nanočástic tak zachovávat po celou dobu inkubace s bakteriální suspenzí. Na základě těchto zjištění byly v tomto případě částice stabilizovány za použití různých stabilizátorů, jež mají za úkol povrch částice stéricky nebo elektrostaticky stabilizovat. Za účelem potlačení agregace nanočástic stříbra a zvýšení jejich stability v bujónu byly v rámci této práce částice stabilizovány látkami jako jsou želatina (GEL), hovězí sérový albumin (BSA), arabská guma (GUM) a kyselina polyakrylová (PAA). V rámci experimentu byla naměřena UV/VIS spektra (Obrázek 14C), jak stabilizovaných, tak nestabilizovaných částic, ze kterých je patrné, že stabilizace pomocí arabské gumy a polyakrylové kyseliny nebyla vůbec úspěšná, naopak želatina se ze všech testovaných látek jeví jako nejvhodnější stabilizační činidlo částic v BHI bujónu.



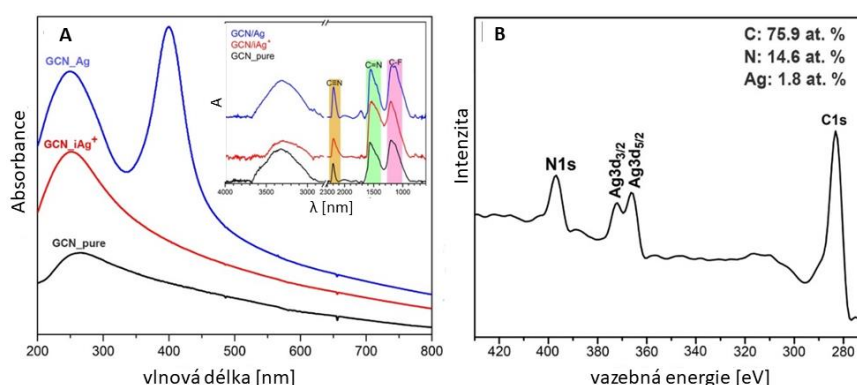
Obrázek 14. Fotografie vodných disperzí různě stabilizovaných nanočástic stříbra Ag28 (A), a fotografie těchto nanočástic po interakci s BHI bujonom (B). Absorpční spektra stabilizovaných částic v BHI bujonu (C).

Aby byla zaručena dostatečná agregátní stabilita částic stříbra, kromě běžně užívaných stabilizátorů byla využita i kovalentní imobilizace stříbrných nanočástic na povrch grafenového derivátu a na vrstvy nitridu uhlíku, jež mělo za úkol částice pevně navázat a znemožnit jim pak následnou agregaci. Kyanografenový derivát (GCN/Ag) byl syntetizován dle již dříve publikované metody Panáčkem a kol., jež je založená na redukci stříbrných iontů navázaných na povrch kyanografenu modifikovaného nitrilovými skupinami GCN/Ag⁺. [48] Snímky GCN/Ag⁺ prekursoru z transmisní elektronové mikroskopie s vysokým rozlišením (Obrázek 15A) potvrdily nepřítomnost stříbrných nanočástic před aplikací redukčního činidla. Chemické prvkové mapování navíc odhalilo husté a homogenní pokrytí grafenových vloček atomy dusíku i stříbra (Obrázek 15B). Po odstranění nenavázaných iontů stříbra důkladným promytím byl po redukci tetrahydridoboritanem sodným získán konečný produkt GCN/Ag sestávající se z malých nanočástic stříbra (Obrázek 15C, D) o průměru 4 až 8 nm (distribuce částic (Obrázek 15C)).



Obrázek 15. (A) HRTEM snímek prekursoru GCN/Ag⁺. (B) Chemické mapování dusíku a stříbra na povrchu grafenu. (C) TEM snímky GCN/Ag a distribuce velikosti částic. [411]

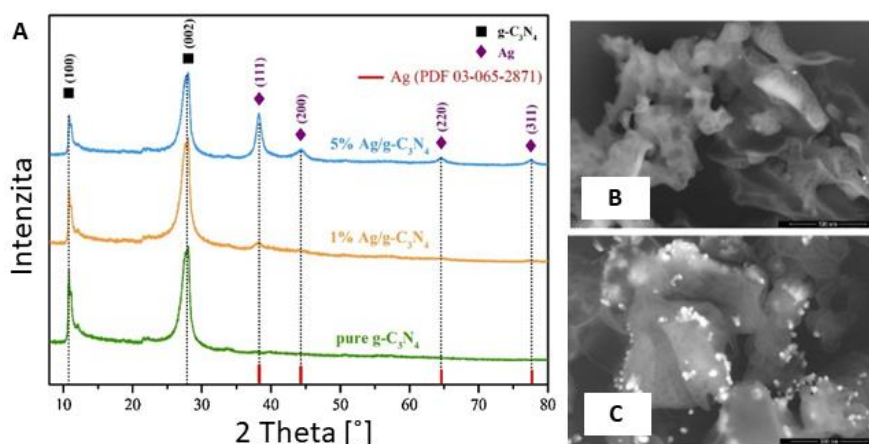
Absorpční spektrofotometrie prekurzorů GCN/Ag^+ a vodných disperzí GCN/Ag potvrdila, že nanočástice vznikly až po přidavku redukčního činidla (Obrázek 16A) a to na základě výskytu charakteristické povrchové plazmonové rezonance stříbrných nanočástic při vlnové délce 400 nm. [33] Nitrilové skupiny byly rovněž pozorovány pomocí FT-IR před a po imobilizaci stříbrných nanočástic, což zároveň potvrzuje i jejich stabilitu po navázání. Infračervené spektrum (Obrázek 16A) ukazuje, že nitrilový pík při cca 1500 cm^{-1} je přítomen ve spektrech prekurzoru i redukovaného produktu. Obsah stříbra v hybridu GCN/Ag byl podle rentgenové fotoelektronové spektroskopie 1,8 % (atomární obsah) (Obrázek 16B). Přesné množství stříbra ve vodných disperzích GCN/Ag po přečištění před antibakteriálními testy bylo pomocí AAS stanoveno na 330 mg/L, což odpovídá 125 mg Ag na 1 g nanohybridu GCN/Ag . Díky silné kovalentní imobilizaci a hustému pokrytí povrchu grafenu nanočásticemi stříbra vznikl stabilní materiál se silnými antibakteriálními vlastnostmi, které budou popsány v následujících kapitolách.



Obrázek 16. A) UV-Vis absorpční spektra samotného GCN_{pure} (černá čára), $\text{GCN}_{\text{iAg}^+}$ s imobilizovaným iontovým stříbrem (červená čára) a GCN/Ag s imobilizovanými AgNPs (modrá čára); odpovídající FT-IR spektra jsou znázorněna ve vloženém panelu (A). (B) XPS spektrum nanohybridu GCN/Ag , které ukazuje obsah atomů v materiálu.

Další vrstevnatý materiál, na jehož povrch byly imobilizovány stříbrné nanočástice, byl nitrid uhlíku. Příprava tohoto materiálu vycházela z nanovrstvy $\text{g-C}_3\text{N}_4$ jež byla připravena sonikací bulkového materiálu, k němuž byl poté bez přístupu světla (z důvodu zabránění fotoredukce) přidán dusičnan stříbrný, který se vlivem elektrostatických sil adsorboval na povrch záporně nabitého povrchu $\text{g-C}_3\text{N}_4$. [49] Druhá fáze přípravy zahrnovala 10minutové ozáření (416 nm, 10 W LED) $\text{g-C}_3\text{N}_4$ s již adsorbovanými Ag^+ ionty, které byly vlivem záření redukovány na stříbrné nanočástice a mohl tak vzniknout nanokompozit $\text{Ag}/\text{g-C}_3\text{N}_4$. Takto připravené nanočástice stříbra jsou pevně vázány na povrch, netvoří agregáty a zůstávají tak stabilní.

Na obrázku (Obrázek 17A) jsou znázorněny XRD spektra, které zobrazují dva hlavní píky $\text{g-C}_3\text{N}_4$ umístěné na 2θ přibližně pod úhlem $10,9^\circ$ a $27,8^\circ$, jež odpovídají mřížkovým rovinám rovnoběžným s osou c (100) a vrstevnatou strukturou konjugovaných aromatických systémů ve (002) [412]. Píky nacházející se přibližně na 2θ $38,1^\circ$, $44,3^\circ$, $64,4^\circ$ a $77,4^\circ$ odpovídají krystalovým rovinám kubické struktury kovového stříbra. Vzorky XRD tedy potvrzují nezměněnou krystalovou strukturu $\text{g-C}_3\text{N}_4$ a také to, že se na povrch $\text{g-C}_3\text{N}_4$ podařilo deponovat různá množství nanočástic. Navázání nanočástic na $\text{g-C}_3\text{N}_4$ nanolistu byl taktéž potvrzeno snímky ze skenovací elektronové mikroskopie (Obrázek 17B, C), jež se také liší množstvím navázaných nanočástic. Velikost částic pak byla na základě těchto snímků a snímků z TEM stanovena na 2-6 nm pro 1%Ag/ $\text{g-C}_3\text{N}_4$ a 3-21 nm pro 5%Ag/ $\text{g-C}_3\text{N}_4$.



Obrázek 17. A) XRD spektra čistého $\text{g-C}_3\text{N}_4$ a $\text{Ag/g-C}_3\text{N}_4$ nanokompozitů s různým obsahem stříbra, B) SEM snímky nanokompozitů 1% $\text{Ag/g-C}_3\text{N}_4$ a C) 5% $\text{Ag/g-C}_3\text{N}_4$. Měřítka 500 nm. [49]

12 Antibakteriální aktivita testovaných nanočástic

Antibakteriální účinky nanočástic stříbra byly testovány jak vůči sbírkovým referenčním kmenům bakterií, tak vůči rezistentním kmenům ze sbírky Ústavu Mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Minimální inhibiční koncentrace různých nanočástic stříbra určené mikrodiluční metodou (Tabulka 1) jsou uvedeny v závislosti na testovaném kmeni, ale také na velikosti a typu nanočástic. Částice obecně vykazovaly vysokou antibakteriální aktivitu, jež je charakteristická velmi nízkými hodnotami MIC (jednotky mg/L).

Tabulka 1. Minimální inhibiční koncentrace nanomateriálů vůči vybraným bakteriálním kmenům

MIC [mg/L]	Ag8	Ag28	GCN/Ag	1%Ag/ g-C ₃ N ₄	5%Ag/ g-C ₃ N ₄	AgNO ₃
<i>E. coli</i> CCM3954	0,84	3,38	0,2	0,95	3,2	3,38
<i>P. aeruginosa</i> CCM3955	1,69	3,38	1,69	0,95	0,81	1,69
<i>S. aureus</i> CCM4223	1,69	13,5	1,69	1,9	3,2	3,38
<i>E. faecalis</i> CCM4224	3,38	13,5	1,69	1,9	3,2	6,75
ESBL- <i>E. coli</i>	1,69	6,75	0,5	3,8	3,2	6,75
MRSA	1,69	13,5	1,9	1,9	1,62	6,75
VRE	3,38	13,5	1,9	1,9	1,62	6,75

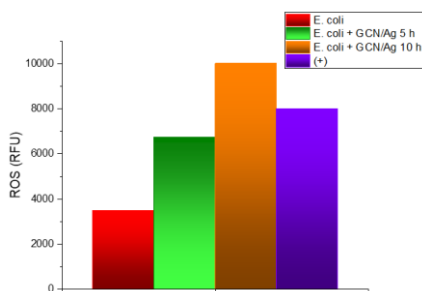
Vysoká antibakteriální aktivita nanočástic stříbra různých velikostí, tvarů a povrchových modifikací byla v minulosti široce studována a byla popsána v celé řadě vědeckých publikací, jež jsou v krátkosti popsány v rámci teoretické části této práce. Námi získané výsledky pro různě velké nanočástice (Ag8, Ag28) pak odpovídají známému trendu, kdy antibakteriální aktivita vzrůstá s klesající velikostí částic a je s velkou pravděpodobností zapříčiněna vzrůstající plochou povrchu u menších nanočástic, která vede k silnějším chemickým a biologickým interakcím s biomolekulami na jedné straně a k vyššímu uvolňování toxického kationtu Ag⁺ na straně druhé. [189–191] Zároveň lze také konstatovat, že nanočástice stříbra jsou o něco málo aktivnější v případě Gram-negativních bakterií, což z dostupných informací v literatuře nejspíše souvisí s tloušťkou peptidoglykanové vrstvy, která je u Gram-pozitivních bakterií mnohem větší, a proto je průnik nanočástic do bakterie obtížnější a nanočástice tak často v tomto případě interagují pouze s bakteriálním povrchem. [165,166]

Minimální inhibiční koncentrace nanočástic stříbra imobilizovaných na plátu kyanografenu, nebo nitridu uhlíku jsou obecně výrazně nižší než hodnoty pro samotné nanočástice. Vyšší antimikrobiální aktivita částic nanosených na povrchu některého z nosičů ve srovnání s volnými, nevázanými nanočásticemi stříbra může souviset jednak s velikostí připravených částic, tak se stabilitou navázaných částic, jež je díky kovalentnímu navázání částic na povrch uhlíkového substrátu zvýšena a nedochází tak k agregaci částic, přičemž obě tyto charakteristiky jsou známy jako významný faktor, jež ovlivňuje výslednou antimikrobiální aktivitu částic. Zajímavým výsledkem je pak také fakt, že tyto nanočástice mají vyšší antibakteriální účinky než dusičnan stříbrný, jež je

sám o sobě rezervoárem pro stříbrné ionty, jejichž uvolňování je jedním ze základních mechanismů účinku nanočástic stříbra. [224,225] Velice přínosné je, že nanočástice vykazovaly vysokou účinnost i proti silně rezistentním kmenům, jako jsou *E. coli* produkující β -laktamázy (ESBL) a *S. aureus* rezistentní vůči meticilinu a vankomicin rezistentním bakteriím (MRSA, VRE), jež jsou poměrně naléhavým problémem v léčbě bakteriálních infekcí. [413–416]

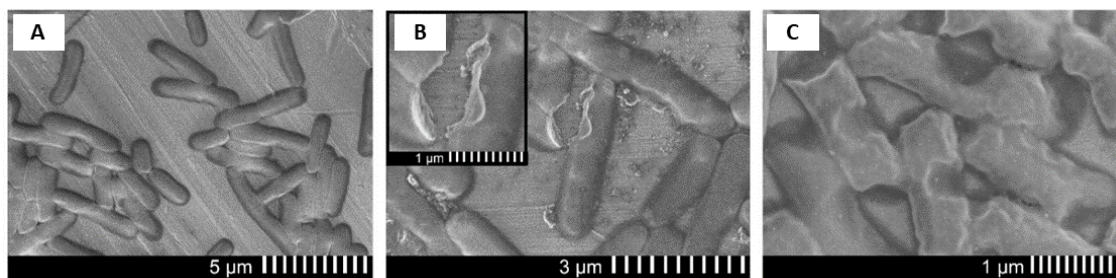
Mechanismus antibakteriálního účinku

Jak již bylo popsáno v teoretické části práce, velkou devízou stříbrných nanočástic je jejich víceúrovňový (multimodální) mechanismus účinku, kdy nanočástice stříbra působí na bakteriální buňku hned několika mechanismy současně, čímž je tvorba odolnosti bakterií v porovnání s tvorbou rezistence vůči běžně užívaným antibiotikům daleko obtížnější. S ohledem na to, že v odborné literatuře byl mechanismus účinku nanočástic stříbra několikrát popsán a potvrzen, v rámci naší práce již nebyl dále experimentálně ověřován a naše pozornost byla zaměřena na studium mechanismu účinku grafenového derivátu se stříbrem, který je svým způsobem nový materiál, do jehož účinků může krom nanočástic stříbra promlouvat i samotný grafen a jehož mechanismus doposud nebyl popsán. Jelikož k nejčastějším mechanismům účinku nanočástic stříbra patří tvorba reaktivních forem kyslíku a narušení bakteriální membrány, byly oba tyto mechanismy zkoumány i v případě grafenového derivátu se stříbrem. Z literatury je známo, že se nanočástice stříbra vážou na -SH skupiny buněčných membránových proteinů, čímž mění jejich strukturu a funkci. [417] Po navázání na buněčnou membránu způsobí kaskádu dějů, která vrcholí degradací buňky a produkcí reaktivních forem kyslíku, [418,419] což se také potvrdilo i v našem případě (Obrázek 18), kde částice vystavené působení účinku grafenového derivátu se stříbrem produkují mnohem větší množství kyslíkových radikálů, než samotné bakterie (*E. coli*).



Obrázek 18. Tvorba ROS u *E. coli* bez přítomnosti GCN/Ag (untreated) nebo bakterií vystavených GCN/Ag v koncentraci odpovídající MIC100 po dobu 5 a 10 hodin. Jako pozitivní kontrola byl použit peroxid vodíku (2 mM, 2 h inkubace). [48]

Mimo mechanismu účinku založený na produkci ROS bylo předpokládáno i poškození stěny a membrány v důsledku vazby stříbrných nanočástic na jejich povrch, což bylo potvrzeno na základě snímků ze skenovací elektronové mikroskopie (Obrázek 19), jež poukázala na tvorbu děr, takzvaných „pits“ na bakteriální stěně, které byly již dříve publikovány v práci Kwan a kol. [420]



Obrázek 19. A) SEM snímek bakterie *E. coli* a snímky bakterií (B, C) vystavených účinkům GCN/Ag v subinhibiční koncentraci (0,2 mg/L). [48]

13. Indukce rezistence a její mechanismy

S ohledem na dosavadní vývoj vzniku a šíření bakteriální rezistence vůči antibiotikům a fakt, že bakteriální rezistence se pomalu objevuje vůči všem antibiotikům, je velmi pravděpodobné, že si bakterie vytvoří rezistenci i vůči nanomateriálům. Rezistence vůči nanočásticím stříbra již byla v literatuře popsána u řady bakteriálních kmenů (viz teoretická část). [253–255] Nabízí se tedy připravené částice otestovat a zjistit, zda se podaří bakteriální rezistenci indukovat i vůči těmto částicím, a pokud ano, navrhnout možné způsoby potlačení nebo překonání nově vzniklého mechanismu rezistence.

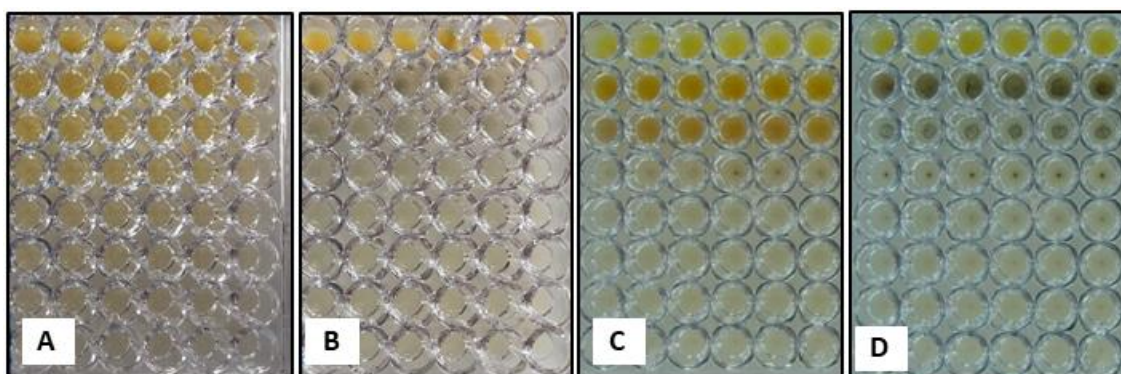
Rezistence vůči nanočásticím stříbra byla už dříve v rámci naší skupiny indukována u Gram-negativní bakterie *E. coli* a *P. aeruginosa*. V rámci tohoto výzkumu pak bylo cílem prokázat možnost tvorby rezistence vůči stříbrným nanočásticím i u Gram-pozitivního kmene *S. aureus*. Minimální inhibiční koncentrace po opakované kultivaci se subinhibičními koncentracemi nanomateriálů jsou uvedeny níže (Tabulka 2) a je z nich patrné, že si obě bakterie vůči nanočásticím stříbra byly schopny vytvořit rezistenci (nárůst MIC). Zároveň je v tabulce uvedena i MIC kontrolních kmenů nevystavených účinkům nanočástic, a to po každém desátém cyklu.

Tabulka 2. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) AgNPs u bakterií u nichž se pokoušela indukovat bakteriální rezistence. MIC je uvedena po každém kultivačním kroku (1-20) a je uvedena ve srovnání s MIC AgNPs vůči referenčním kmenům po prvním, desátém a dvacátém kroku (1*, 10*, 20*).

	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	10*	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	20*
<i>S. aureus</i> CCM 3953	13.5	13.5	6.75	13.5	6.75	13.5	6.75	6.75	13.5	13.5	13.5	27	54	27	54	54	54	27	27	54	54	13.5
<i>S. aureus</i> 008	3.38	6.75	1.69	3.38	1.69	1.69	1.69	1.69	3.38	6.75	1.69	3.38	6.75	13.5	6.75	13.5	13.5	27	54	54	54	3.38
<i>E. coli</i> CCM 3954 ⁹	3.38	6.75	3.38	6.75	6.75	13.5	13.5	54	54	54	3.38	54	54	108	108	54	54	108	108	108	108	6.75

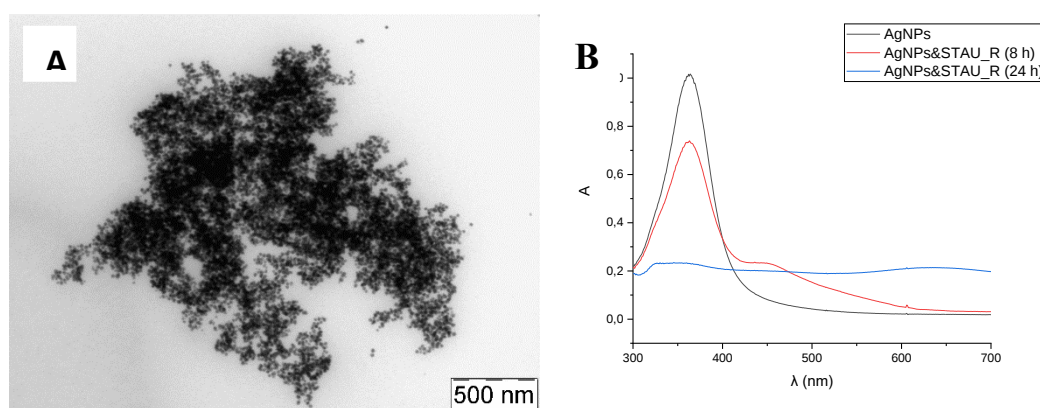
* MIC je vždy vztažena na množství stříbra v disperzi. Maximální hodnota MIC je omezena koncentrací nanočástic, přičemž nejvyšší testovaná koncentrace může být maximálně poloviční. U nanočástic stříbra o koncentraci 108 mg/L, je tedy max stanovená MIC 54 mg/L, respektive MIC >54 mg/L.

Rychlost tvorby rezistence bakterií u Gram-pozitivního kmene *S. aureus* byla o něco pomalejší a ve srovnání s Gram-negativní *E. coli* se vyvíjela v pozdějších kultivačních krocích. *S. aureus* 3953 se stal rezistentním vůči nanočásticím stříbra od dvanáctého kultivačního kroku, kde se MIC zvýšila z 13,5 na 54 mg/L. *S. aureus* 008 s nižší počáteční MIC 3,38 mg/L se mezi 13. a 18. kultivačním krokem stával postupně odolnějším, ale i tak v 18. kroku dosáhla MIC stříbrných nanočástic 54 mg/L. Panáček a kol., u *E. coli* publikoval rychlejší vývoj rezistence, kde byla výrazně vyšší MIC (13,5 mg/L) ve srovnání s referenčním kmenem *E. coli* (3,38 mg/L) pozorována již v šestém kultivačním kroku a od osmého kroku se MIC zvýšila až na 54 mg/L. Ve dvacátém kultivačním kroku se MIC stříbrných nanočástic zvýšily na 54 mg/L u všech testovaných Gram-negativních i Gram-pozitivních bakteriálních kmenů, což znamená, že všechny bakteriální kmeny si vůči nanočásticím stříbra do té doby byly schopny vytvořit rezistenci.



Obrázek 20. Fotografie mikrotitrační destičky po kultivaci bakteriálního kmene *S. aureus* (A, B), *E. coli* (C, D) spolu s nanočásticemi stříbra v každém řádku geometricky nařazenými v Muellerově-Hintonově bujónu na koncentrace od 54 mg/l do 0,42 mg/l po prvním (A, C) a dvacátém (B, D) kultivačním kroku.

Spolu se zvyšováním MIC docházelo u obou bakterií ke změně zbarvení a vzniku sraženiny na dně jamky mikrotitrační destičky (Obrázek 20B, D). Naopak, pokud nedocházelo k nárustu MIC, tedy v přítomnosti citlivých bakteriálních kmenů, disperze stříbrných nanočástic zředěná v Muellerově-Hintonově bujónu si zachovala žlutou barvu danou povrchovým plasmonem (Obrázek 20A, C), která je typická pro stabilní stříbrné nanočástice vykazující vysoký antibakteriální účinek. Agregací nestabilita byla prokázána jak viditelným zbarvením a tvorbou agregátů v případě rezistentních bakterie, tak posunem k delším vlnovým délkám a následně vymizením absorpčního maxima (větší částice) (Obrázek 21B), tak snímky z transmisního elektronového mikroskopu, na kterých jsou jasně rozlišitelné agregáty o velikostech několik stovek nm (Obrázek 21A). Agregace a precipitace částic je tedy hlavním průvodním jevem bakteriální rezistence vůči nanočásticím stříbra. Částice se shlukují na dně destičky a vytváří šedo-černé agregáty a narušením koloidní stability tak ztrácí své antimikrobiální vlastnosti. [29,57,184] Z těchto výsledků i z výsledků publikovaných Panáčkem a kol. [255] je zřejmé, že si jak Gram-negativní, tak i Gram-pozitivní bakterie po opakovaném působení nanočástic vytvoří schopnost vyvolat agregační nestabilitu, což vede k eliminaci jejich antibakteriálního účinku. Podle získaných výsledků je zřejmé, že vznik a mechanismus bakteriální rezistence vůči nanočásticím stříbra je tedy u obou skupin bakterií shodný a spočívá v agregaci nanočástic stříbra a ztrátě jejich antibakteriální aktivity.



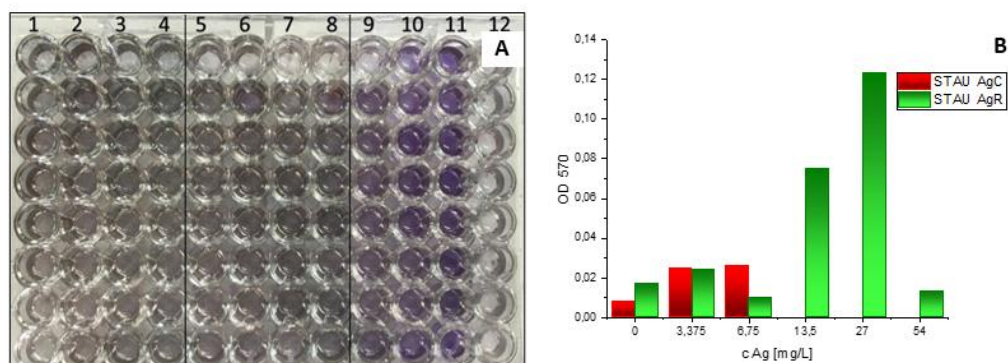
Obrázek 21. A) TEM snímek agregovaných částic po 24 h kultivaci s rezistentním *S. aureus*. B) absorpční spektra stříbrných nanočástic zředěných v Muellerově-Hintonově bujónu v poměru 1:1 před (původní disperze) a po kultivaci citlivého a rezistentního *S. aureus* CCM 3953.

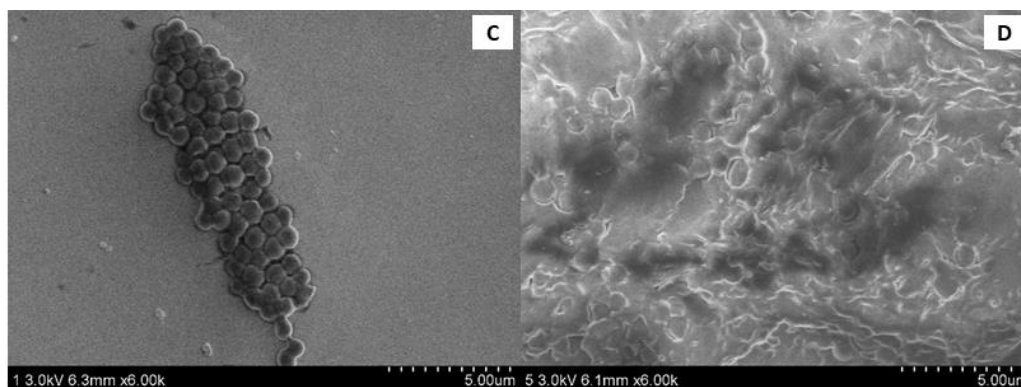
V případě *E. coli* byl mechanismus rezistence již dříve popsán Panáčkem a kol., kteří uvádí, že za tvorbou agregátů nanočástic stříbra stojí produkce bakteriálního proteinu flagelinu. Flagelum a flagelin jsou výsadou Gram-negativních bakterií, a nelze

tak stejným způsobem vysvětlit mechanismus rezistence i u Gram-pozitivních bakterií (*S. aureus*), které nemají bakteriální flagela. Flagelinem indukovaná agregace nanočástic stříbra v případě Gram-negativních bakterií tedy nemůže být příčinou agregace částic a rezistence bakterií v případě Gram-pozitivních bakterií. Průběh vzniku bakteriální rezistence a její mechanismus je u Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií shodný, ale tento společný mechanismus rezistence je zajímavě iniciován dvěma zcela odlišnými způsoby charakteristickými zejména pro obě skupiny bakterií. Gram-pozitivní a Gram-negativní bakterie tedy našly stejné „slabé místo“ nanočástic stříbra v koloidní disperzi, a to jejich agregační stabilitu. Používají ale dva různé způsoby, jak ji narušit, přičemž v případě Gram-pozitivních bakterií je prozatím neznámý, a proto budou v rámci této kapitoly zkoumány možné příčiny, které by u Gram-pozitivní bakterie mohly vést k agregaci částic a následnému vzniku rezistence. Jedním v literatuře poměrně často popisovaným obecným mechanismem obrany bakterií vůči antibakteriálním látkám je tvorba bakteriálního biofilmu. [273,421,422] Je známo, že bakterie raději žijí v bakteriálních koloniích a vytvářejí biofilm, než aby žily jednotlivě v planktonním stavu. Tato bakteriální společenstva způsobují 60-80 % všech bakteriálních infekcí, a ještě více komplikují bakteriální rezistenci. [423] Biofilm vzniká nevratným navázáním planktonních bakterií na jakýkoli povrch, dozráváním, rozptýlením v okolí místa a tvorbou exopolymerní matrice. V důsledku toho pak biofilm působí jako štít proti imunitnímu systému hostitele a brání tak difuzi antimikrobiálních látek na bakteriální povrch. [424,425] Kmeny stafylokoků jsou známy svou schopností tvořit biofilm, a proto by tvorba biofilmu v důsledku zvýšené bakteriální rezistence mohla být také jednou z možností bakteriální rezistence vůči nanočásticím stříbra. Proto jsme se v prvním kroku zaměřili právě na detekci biofilmu u bakterií rezistentních vůči nanočásticím stříbra a jeho možné nadprodukci.

Tvorba biofilmu byla analyzována a kvantifikována několika metodami zahrnujícími skenovací elektronovou mikroskopii a Christensenovu [426] metodu. V rámci našeho výzkumu byla ke kvantifikaci a porovnání množství biofilmu vytvořeného *S. aureus* 008 citlivým a rezistentním k účinkům nanočástic stříbra použita modifikovaná Christensenova metoda (viz metody). Již z obrázku zobrazujícího mikrotitrační destičku po obarvení krystalovou violetí (CV) (Obrázek 22A), je zřejmý rozdíl v množství produkce biofilmu mezi bakteriemi citlivými a rezistentními ke stříbru, přičemž rezistentní kmen produkuje mnohem více biofilmu

(obarveného fialovou barvou CV) než citlivý. Vyšší produkce biofilmu u kmene *S. aureus* rezistentního ke stříbrným nanočásticím byla potvrzena také měřením optické hustoty biofilmu obarveného pomocí CV (Obrázek 22B), který produkoval *S. aureus* citlivý, respektive rezistentní k nanočásticím stříbra, vystavený různým koncentracím nanočástic stříbra. V přítomnosti nanočástic stříbra v nižších koncentracích (pod jejich příslušnou MIC) produkují citlivé i rezistentní kmeny nízké a přibližně stejné množství biofilmu. Takto malé množství nanočástic stříbra neinhibuje růst bakterií, proto nejsou bakterie nuceny zvláště bránit účinkům nanočástic a následně přijít s určitým mechanismem rezistence. Ukazuje se však (Obrázek 22B), že při dosažení koncentrace 13,5 mg/L se množství biofilmu vytvořeného citlivými a rezistentními kmeny výrazně liší, což je v dobré shodě se stanovenou MIC pro citlivé (13,5 mg/L) a rezistentní bakterie (54 mg/L). Pokud je bakterie vystavena stejné nebo vyšší koncentraci antimikrobiální látky, než je její hodnota MIC, bakterie odumírá, a proto není schopna biofilm dále tvořit (platí pro citlivý kmen *S. aureus*). Při koncentracích vyšších v intervalu 13,5 až 27 mg/L se bakterie ve snaze eliminovat vysokou koncentraci nanočástic stříbra, musí bránit svým nově vyvinutým mechanismem rezistence, kterým je zvýšená produkce bakteriálního biofilmu, která výrazně roste s rostoucí koncentrací nanočástic v systému. Největší množství biofilmu produkuje rezistentní *S. aureus* vystavený nejvyššímu testovanému množství nanočástic stříbra pod hodnotou MIC (27 mg/L), kterému se ještě dokáže bránit. Při koncentraci 54 mg/L stříbra již mechanismy rezistence bakterie nestačí pro potlačení účinku nanočástic a je to pro bakterie inhibiční koncentrace. Tato metoda tedy jasně potvrdila vyšší produkci bakteriálního biofilmu produkovaného rezistentními kmeny oproti bakteriím citlivým vůči účinkům nanočástic, což potvrzuje produkci biofilmu jako mechanismus rezistence stafylokoků vůči nanočásticím stříbra.





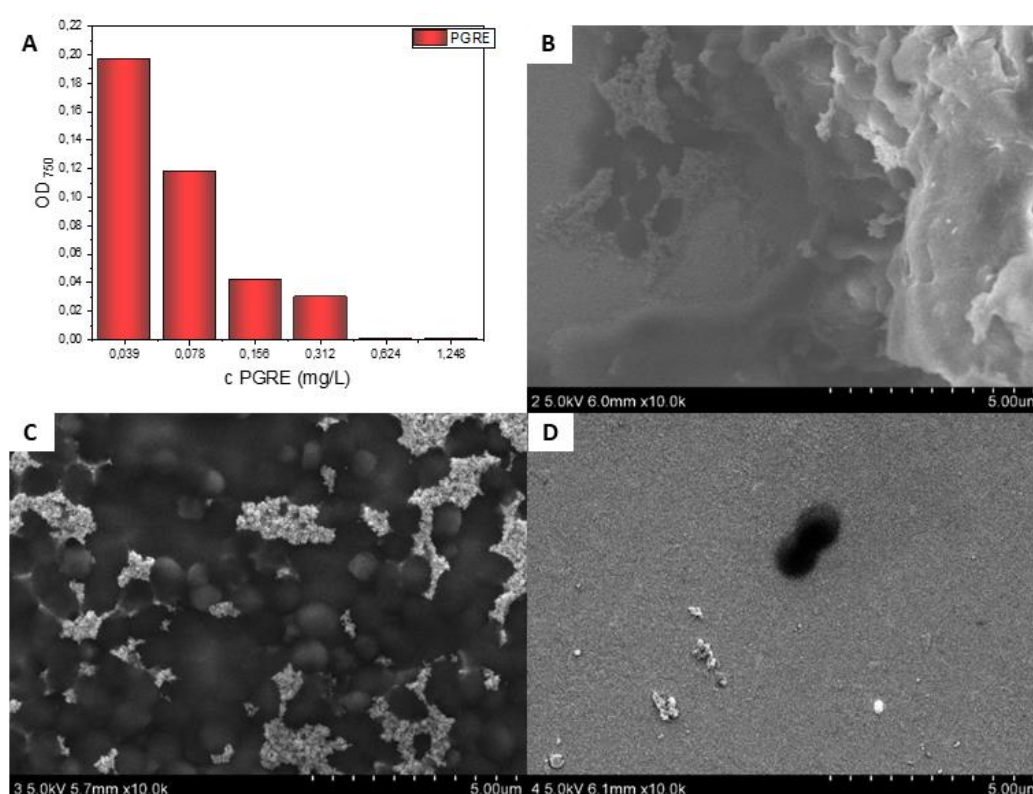
Obrázek 22. A) 96jamková destička inkubovaná bez bakterií (sloupec 1-4, reference), inkubovaná s citlivým (5-8) nebo rezistentním kmenem (9-11) *S. aureus*. Biofilm na dně jamek byl po 24 h kultivaci obarven krystalovou violetí (viz. Christensenova metoda) a následně byla změřena jejich optická hustota při 570 nm, a to v závislosti na množství nanočástic stříbra přítomných při kultivaci (B). SEM snímky citlivého (C) a rezistentního (D) *S. aureus* vystaveného účinkům stříbra.

Vzhledem k tomu, že zvýšená tvorba biofilmu byla prokázána jako možný mechanismus rezistence u kmene *S. aureus* a k eradikaci bakterií je nyní zapotřebí 54 mg/L AgNPs, je třeba vyvinout nové způsoby, jak tento nově vytvořený mechanismus rezistence překonat. Jedním z možných přístupů, jak bojovat proti tvorbě bakteriálního biofilmu, je kombinace nanočástic stříbra s látkou s prokázaným pozitivním účinkem inhibovat tvorbu bakteriálního biofilmu. Nejprve byl vůči planktonním bakteriím a tvorbě biofilmu aplikován extrakt z kůry granátového jablka (PGRE), a to s ohledem na jeho dlouhodobě známý antimikrobiální účinek [410,427,428], a také vzhledem k tomu, že PGRE byl použit k potlačení rezistence bakterií vůči nanočásticím stříbra u *E. coli*. [255] Díky tomuto přístupu by mohl být extrakt z kůry granátového jablka použit k inhibici jak produkce flagelinu u *E. coli*, tak tvorby biofilmu u kmene *S. aureus*, a to vše jen při použití jediné látky k překonání oběma typům mechanismů bakteriální rezistence. Z počátku byl nejprve studován samotný účinek extraktu (PGRE) a poté jeho synergický účinek nanočástic stříbra a jejich příslušné MIC vůči ke stříbru rezistentní bakterii *S. aureus*. Obrázek 23 ukazuje schéma mikrotitrační destičky prezentující různé kombinace obou antimikrobiálních látek proti rezistentní bakterii *S. aureus*. Tyto kombinace nevykázaly silný synergický účinek (potvrzen byl pouze aditivní efekt), ale i přesto PGRE v subinhibiční koncentraci pomohl snížit MIC nanočástic stříbra z více než 54 mg/L na 13,5 mg/L, což je stejné jako MIC pro citlivý kmen.

AgNPs & PGRE (S. aureus)													AgNPs [mg/L]
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	FIC _{AVR}	0,71				0,75							54
B	Effect	ADD			0,75								27
C					0,62								13,5
D													6,75
E													3,375
F													1,688
G													0,844
H				MIC PGRE									0
2,5 1,25 0,625 0,313 0,156 0,078 0,039 0,020 0,010 0,005 0,002 0													
PRGE [mg/L]													

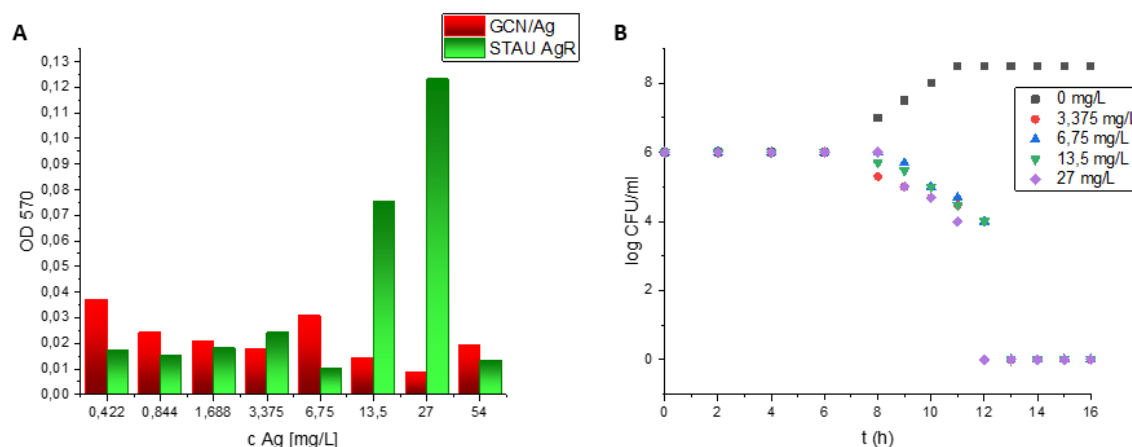
Obrázek 23. Schéma znázorňující růst bakteriálního kmene *S. aureus* rezistentního k AgNPs (šedě) na mikrotitračních destičkách při testování synergického účinku AgNPs spolu s PGRE. V rámci tabulky jsou vypočtené FIC pro jednotlivé kombinace PGRE-AgNPs a modře je zobrazena minimální inhibiční koncentrace samotných antibakteriálních látek.

Inhibice tvorby biofilmu byla v tomto případě hodnocena také modifikovanou Christensenovou metodou a naměřené optické hustoty obarveného biofilmu pro testovaná koncentrace roztoku PGRE v rozmezí od 0,039 % do 1,25 % (MIC 0,156 % PGRE) jsou uvedeny na obrázku níže (Obrázek 24). Z obrázku je patrné, že množství vytvořeného biofilmu klesá s rostoucí koncentrací PGRE.



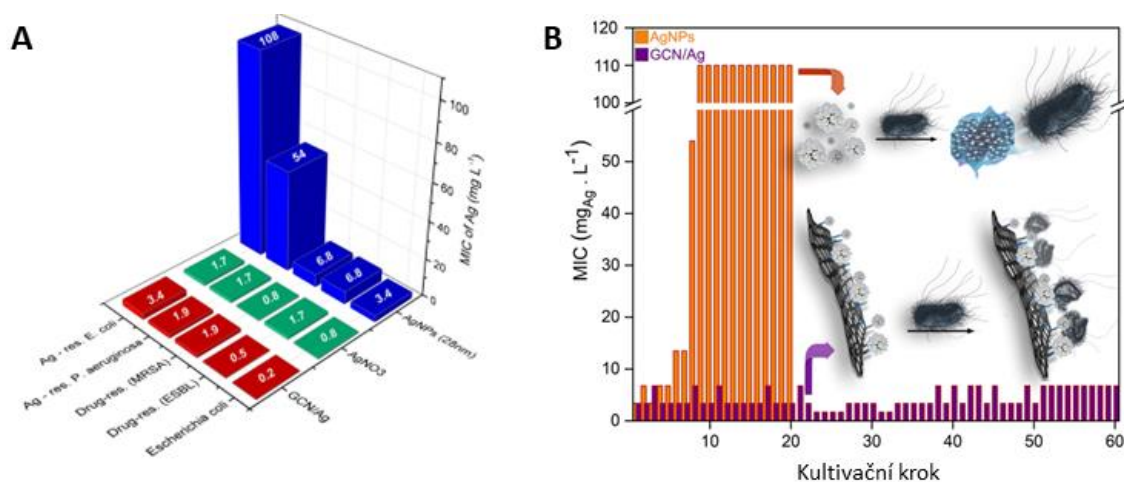
Obrázek 24. (A) Graf znázorňující optickou hustotu biofilmu vytvořeného v kultivačním médiu obsahujícím různá množství PGRE v přítomnosti rezistentního kmene *S. aureus*. (B) SEM snímky biofilmu vytvořeného v přítomnosti 27 mg/l AgNPs bez PGRE, (C) s 0,039% PGRE, (D) s 0,624% PGRE.

Dalším způsobem, jak překonat rezistenci bakterií vůči nanočásticím stříbra, by mohlo být zvýšení stability nanočástic stříbra, a tedy zabránění jejich agregaci. Vedle tradičních metod, jako je stabilizace pomocí polymerů nebo povrchově aktivních látek, které v případě překonání rezistence u *E. coli* nebyly úspěšné, [255] se nabízí možnost stabilizace částic pevným navázáním na povrch nanostrukturního substrátu. Jednou z možností by mohlo být využití kyanografen-stříbrného (GCN/Ag) nanokompozitu, kde jsou nanočástice stříbra pevně vázány na povrchu grafenu, a proto nemají tendenci agregovat. Produkce tvorby biofilmu byla hodnocena stejně jako u PGRE, a to pro koncentrace nanočástic stříbra v rozmezí 0,422 až 54 mg/L. Optické hustoty naměřeny při vlnové délce 570 nm jsou uvedeny na obrázku níže (Obrázek 25A) a jsou porovnány s hodnotami pro nanočástice stříbra. Jak je vidět, množství biofilmu vytvořeného v přítomnosti GCN/Ag je výrazně nižší než pro nanočástice stříbra, u kterých se hlavně při vyšších koncentracích stříbra (od 13,5 mg/L) množství formovaného biofilmu výrazně navyšuje. Je však důležité zmínit, že pro všechny koncentrace GCN/Ag byla vždy zjištěna produkce alespoň nějakého množství biofilmu, což vysvětluje obrázek B (Obrázek 25B) a na něm zobrazená křivka minimální doby trvání usmrcení, která udává, že i pro největší koncentraci nanokompozitu (a tedy i stříbra) nebyly bakterie usmrceny minimálně po dobu 13 hodin od začátku inkubace, bakterie tedy měly dostatek času na vytvoření alespoň malého množství biofilmu.



Obrázek 25. (A) Graf znázorňující optickou hustotu biofilmu vytvořeného v kultivačním médiu obsahujícím různá množství nanočástic stříbra, respektive nanokompozitu GCN/Ag u rezistentního kmene *S. aureus*. (B) Graf zobrazující minimální dobu usmrcení bakterie, tedy fakt, že bakterie umírají až po 13ti hodinách.

Grafenový derivát je tedy možné využít jako antibakteriální materiál překonávající rezistenci bakterie *S. aureus* vůči účinkům nanočásticím stříbra. Otázkou zůstává, zda je tento účinek specifický vůči tomuto vybranému Gram-pozitivnímu kmeni, nebo i vůči dalším bakteriím rezistentním vůči účinkům nanočástic stříbra. K prokázání nesespecifického účinku byly testovány minimální inhibiční koncentrace vůči kmenům *E. coli* a *P. aeruginosa*, u nichž Panáček a kol. indukovali rezistenci ke stříbru. [255] Z tabulky na počátku této kapitoly (Tabulka 1) a níže uvedeného obrázku (Obrázek 26) je patrné, že grafenový derivát je mnohem účinnější, než samotné stříbrné nanočástice, vůči nimž se bakterie vytvořily rezistenci a že ho lze tedy používat vůči řadě Gram-pozitivních a Gram-negativních bakteriálních kmenů, jež jsou rezistentní vůči účinkům antibiotik, ale i vůči kmenům rezistentním vůči samotným nanočásticím stříbra.



Obrázek 26. A) Graf srovnávající hodnoty MIC pro GCN/Ag, koloidní nanočástice stříbra (Ag28) a iontové stříbro (AgNO₃) pro různé bakteriální kmeny. B) *E. coli* vystavená po několik generací (sériových pasáží) subinhibičním koncentracím GCN/Ag a Ag28 (AgNPs).

Aby se jednoznačně prokázala stálost vysoké antibakteriální aktivity grafenového kompozitu se stříbrem, tak i v případě tohoto materiálu byla ověřována možnost indukce a tvorby rezistence bakterií vůči tomuto typu nanokompozitu. Bakterie byly opět opakovaně kultivovány se subinhibičními koncentracemi GCN/Ag jako tomu bylo v případě disperzí samotných nanočástic stříbra. Celkem bylo provedeno šedesát kultivačních opakování, přičemž hodnota MIC se změnila jen nepatrně (jedno ředění), což nepoukazuje na vývoj bakteriální rezistence bakterie *S. aureus*, který tak zůstává vůči činku kompozitu GCN/Ag stále citlivý. V případě srovnání průběhu indukce rezistence u stříbrných nanočástic je patrné, že si bakterie *S. aureus* za naprosto stejných podmínek vyvinuly rezistenci už při dvacátém kroku (Obrázek 26. A) Graf srovnávající hodnoty MIC pro GCN/Ag, koloidní nanočástice stříbra (Ag28) a iontové stříbro (AgNO₃) pro

různé bakteriální kmeny. B) *E. coli* vystavená po několik generací (sériových pasáží) subinhibičním koncentracím GCN/Ag a Ag28 (AgNPs). Obrázek 26B), kdy se hodnoty MIC nanočástic stříbra zvýšily na 108 mg/L. Tyto výsledky potvrdily naši hypotézu, že velmi silná vazba stříbra na GCN dostatečně stabilizuje nanočástice stříbra a může překonat klíčový mechanismus rezistence (vyvolání agregace) těchto bakterií vůči stříbrným nanočásticím.

14. Testování společného účinku

Společný antimikrobiální účinek byl hodnocen na základě porovnání minimálních inhibičních koncentrací samotných antimikrobiálních látek, MIC látek v kombinaci a výpočty frakčního inhibičního koeficientu (FIC), který odrážel právě tyto charakteristiky. Všechny experimenty byly provedeny na rezistentních bakteriích, tedy bakteriích mající MIC větší, než jejich „breakpoint“ (termín označující hraniční koncentrace MIC antibiotika, která definuje mikroorganismus jako citlivý nebo rezistentní) stanovený EUCAST. [405] Bylo prokázáno, že již nízké koncentrace nanočástic stříbra v jednotkách mg/L v kombinaci s antibiotiky zvyšují jejich účinek proti multirezistentním bakteriím, vůči nimž jsou samotná antibiotika zcela bezradná. [136]

Vzhledem k vysoké antibakteriální aktivitě GCN/Ag a faktu, že se vůči tomuto materiálu nepodařilo vyvolat rezistenci, byly testovány i jeho společné účinky s antibiotiky mající různé mechanismy účinku. V níže uvedené tabulce (Tabulka 3) jsou shrnuty minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibiotik (ATB) ciprofloxacinu (CIP), ceftazidimu (CTZ), gentamicinu (GEN), kolistinu (COL) a MIC nanohybridu GCN/Ag na bázi Ag testované vůči rezistentním bakteriím *E. coli*, *P. aeruginosa* a *E. kobei*. V tabulce jsou rovněž uvedeny rozsahy MIC GCN/Ag použité při kombinaci s ATB. Mimo to jsou uvedeny i nejnižší, nejvyšší a průměrné frakční inhibiční koncentrace (FIC) stanové pro každou dvojici antibiotikum-GCN/Ag.

Tabulka 3. Minimální inhibiční koncentrace MIC [mg/l] různých antibiotik a GCN/Ag nanohybridu, průměrné hodnoty FIC pro kombinace antibiotik s nanohybridem GCN/Ag a průměrné hodnoty FIC pro kombinace antibiotik s nanohybridem GCN/Ag, výsledné antibakteriální účinky

	<i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>E. kobei</i>
	GEN	CTZ	CIP	GEN	CTZ	CIP	COL
ATB	128	32	64	8	8	16	64
GCN/Ag	1,688	1,688	1,688	1,688	1,688	1,688	3,375
ATB v kombinaci	4-64	1-16	32	0,5-4	1-4	8	1-32
	0,003	0,211		0,105			0,422
GCN/Ag v kombinaci	-	-	0,844	-	0,844	0,844	-
	0,844	0,844		0,844			1,688
	0,16	0,38		0,38	0,75		0,16
částečné FIC	-	-	1,00	-	-	1,00	-
	0,53	0,63		0,56	1,00		0,63
$\overline{\text{FIC}}$	0,39	0,54	1,00	0,53	0,88	1,00	0,29
Efekt	(S)	(PS)	(A)	(PS)	(PS)	(A)	(S)

Zvýšené (tj. synergické nebo částečně synergické) antibakteriální účinky proti rezistentní *E. coli* byly pozorovány u kombinací GCN/Ag (MIC 1,688 mg/L) s GEN, CTZ a CIP. Nejsilnější synergický účinek s průměrným FIC (0,39) a tedy zvýšení antibakteriální aktivity antibiotika po přidavku GCN/Ag u rezistentní *E. coli* bylo pozorováno u gentamicinu. Kombinace antibiotika s GCN/Ag vedla ke snížení MIC gentamicinu 32krát, a to na pouhé 4 mg/L, kde byla MIC nanohybridu ve stejnou chvíli snížena 8krát na 0,211 mg/L, což vedlo k dosažení nejnižší hodnoty částečného FIC (0,16). Kromě toho byly pro GEN-GCN/Ag pozorovány čtyři další kombinace s nízkými hodnotami dílčího FIC indexu (v rozmezí 0,19 až 0,31) (Obrázek 27), které naznačují silné zvýšení aktivity proti *E. coli*. Nejvyšší hodnota FIC indexu (0,53) byla získána pro dvojici gentamicin/nanohybrid při kombinaci 64 mg/L gentamicinu s 0,053 mg/L GCN/Ag, což odpovídá spíše částečnému než plnému synergickému účinku. Kumulativní FIC pro gentamicin s nanohybridem (definovaný jako aritmetický průměr všech

vypočtených FIC) byl 0,39, což pro kombinaci gentamicin-GCN/Ag ukazuje na celkový synergický antibakteriální účinek.

GEN & GCN/Ag (E. Coli)													GEN
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	[mg/L]
A	FIC _{AVR}	0,39											256
B	Effect	SYN										MIC GEN	128
C							0,53	0,52	0,51	0,50	0,50		64
D						0,31							32
E					0,25								16
F					0,19								8
G			0,53	0,28	0,16								4
H		MIC GCN/Ag											0
GCN/Ag [mg/L]	3,375	1,688	0,844	0,422	0,211	0,105	0,053	0,026	0,013	0,007	0,003	0	

Obrázek 27. Schéma znázorňující bakteriální růst *E. coli* (šedě) na mikrotitračních destičkách při testování synergického účinku GCN/Ag spolu s gentamicinem. V rámci tabulky jsou vypočtené FIC pro jednotlivé kombinace antibiotikum-GCN/Ag nanohybrid a modře je zobrazena MIC samotných antibakteriálních látek. Červeně je zvýrazněna maximální FIC, zeleně minimální FIC a žlutě je pak uvedena průměrná FIC, ze které je pak určen výsledný efekt společného účinku (SYN - synergie).

Částečná synergie (FIC 0,54) byla u *E. coli* pozorována také u kombinace ceftazidimu s GCN/Ag. Zesílení antibakteriální aktivity bylo v tomto případě slabší než u gentamicinu (FIC 0,39), ale i tak kombinace ceftazidimu s nanohybridem umožnila dosáhnout na MIC pod hodnotou breakpointu antibiotika a to po kombinaci s 0,844 mg/L GCN/Ag, kde byla MIC ceftazidimu snížena ze 32 mg/L na 1 mg/L. Nejnižší pozorovaná FIC u dvojice ceftazidim-GCN/Ag byla 0,38 a bylo jí dosaženo při kombinaci 8 mg/L ceftazidimu s 0,211 mg/L GCN/Ag a lze ji tedy označit jako synergickou. Nejvyšší vypočtená hodnota FIC pro tuto dvojici (0,63) byla ještě v částečně synergickém rozmezí (Obrázek 28).

CTZ & GCN/Ag (E. Coli)													CTZ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	[mg/L]
A	FIC _{AVR}	0,54											64
B	Effect	PSYN										MIC CTZ	32
C					0,63								16
D				0,50	0,38								8
E			0,63										4
F			0,56										2
G			0,53										1
H		MIC GCN/Ag											0
GCN/Ag [mg/L]	3,375	1,688	0,844	0,422	0,211	0,105	0,053	0,026	0,013	0,007	0,003	0	

Obrázek 28. Schéma znázorňující bakteriální růst *E. coli* (šedě) na mikrotitračních destičkách při testování synergického účinku GCN/Ag spolu s ceftazidinem. V rámci tabulky jsou vypočtené FIC pro jednotlivé kombinace antibiotikum-GCN/Ag nanohybrid a modře je zobrazena MIC samotných antibakteriálních látek. Červeně je zvýrazněna maximální FIC, zeleně minimální FIC a žlutě je pak uvedena průměrná FIC, ze kterého je pak usuzováno na výsledný účinek (PSYN - částečná synergie).

Posledním testovaným antibiotikem vůči *E. coli* byl ciprofloxacin, který při kombinaci s nanohybridem GCN/Ag vykazoval aditivní účinek (FIC 1,00), což naznačuje účinek nezávislý na přítomnosti nanočástic. Pouze jedna kombinace vykazuje

potenciálně synergický účinek pro toto antibiotikum a obsahuje střední koncentrace obou látek, tedy 32 mg/L ciprofloxacinu a 0,844 mg/L GCN/Ag (Obrázek 29).

CIP & GCN/Ag (E. Coli)													CIP
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	[mg/L]
A	FIC _{AVR}	1,00											128
B	Effect	ADD										MIC CIP	64
C			1,00										32
D													16
E													8
F													4
G													2
H		MIC GCN/Ag											0
GCN/Ag [mg/L]	3,375	1,688	0,844	0,422	0,211	0,105	0,053	0,026	0,013	0,007	0,003	0	

Obrázek 29. Schéma znázorňující bakteriální růst *E. coli* (šedě) na mikrotitračních destičkách při testování synergického účinku GCN/Ag spolu s ciprofloxacinem. V rámci tabulky jsou vypočtené FIC pro jednotlivé kombinace antibiotikum-GCN/Ag nanohybrid a modře je zobrazena minimální inhibiční koncentrace samotných antibakteriálních látek. Červeně je zvýrazněna maximální FIC, zeleně minimální FIC a žlutě je pak uvedena průměrná FIC, ze kterého je pak usuzováno na výsledný účinek (SYN - synergie, PSYN - částečná synergie, ADD - aditivní účinek).

V případě rezistentní *P. aeruginosa* byly FIC všech antibiotik o něco vyšší než u rezistentní *E. coli*, ale MIC GCN/Ag po přepočtu na obsah stříbra byla stejná (1,688 mg/L). Průměrná FIC pro gentamicin (0,53) byla v rozmezí spojovaném s částečnou synergii, ale jeho nejnižší stanovená FIC (0,38) byla v synergickém rozmezí, kde již přidavek 0,422 mg/L GCN/Ag osminásobně snížil potřebnou koncentraci antibiotika. Dílčí hodnoty FIC stanovené pro gentamicin v kombinaci s GCN/Ag byly většinou v rozmezí synergického účinku, pouze dvě v rozmezí částečně synergického účinku, což však vedlo k navýšení průměrného FIC do částečně synergického rozmezí (Obrázek 30).

GEN & GCN/Ag (P. aeruginosa)													GEN
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	[mg/L]
A	FIC _{AVR}	0,53											32
B	Effect	PSYN											16
C												MIC GEN	8
D					0,63	0,56							4
E				0,50									2
F				0,38									1
G			0,56										0,5
H		MIC GCN/Ag											0
GCN/Ag [mg/L]	3,375	1,688	0,844	0,422	0,211	0,105	0,053	0,026	0,013	0,007	0,003	0	

Obrázek 30. Schéma znázorňující bakteriální růst kmene *P. aeruginosa* (šedě) na mikrotitračních destičkách při testování synergického účinku GCN/Ag spolu s gentamicinem. V rámci tabulky jsou vypočtené FIC pro jednotlivé kombinace antibiotikum-GCN/Ag nanohybrid a modře je zobrazena minimální inhibiční koncentrace samotných antibakteriálních látek. Červeně je zvýrazněna maximální FIC, zeleně minimální FIC a žlutě je pak uvedena průměrná FIC, ze kterého je pak usuzováno na výsledný účinek (SYN - synergie, PSYN - částečná synergie, ADD - aditivní účinek).

Částečná synergie proti rezistentní *P. aeruginosa* byla pozorována také u kombinace ceftazidimu s GCN/Ag, jejíž průměrný FIC 0,88 byl vyšší než u gentamicinu (0,53) a také vyšší než u ceftazidimu při použití proti rezistentní *E. coli* (0,54). Nicméně i v tomto případě, kdy se dílčí FIC pohybovaly v rozmezí 0,75 až 1,00, dokázala kombinace 0,844 mg/L GCN/Ag snížit koncentraci ceftazidimu potřebnou k usmrcení rezistentního kmene *P. aeruginosa* čtyřnásobně (Obrázek 31).

CTZ & GCN/Ag (P. aeruginosa)												CTZ	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	[mg/L]
A	FIC _{AVR}	0,88											64
B	Effect	PSYN											32
C													16
D												MIC CTZ	8
E			1,00										4
F			0,75										2
G													1
H		MIC GCN/Ag											0
GCN/Ag [mg/L]	3.375	1.688	0.844	0.422	0.211	0.105	0.053	0.026	0.013	0.007	0.003	0	

Obrázek 31. Schéma znázorňující bakteriální růst kmene *P. aeruginosa* (šedě) na mikrotitračních destičkách při testování synergického účinku GCN/Ag spolu s ceftazidinem. V rámci tabulky jsou vypočtené FIC pro jednotlivé kombinace antibiotikum-GCN/Ag nanohybrid a modře je zobrazena minimální inhibiční koncentrace samotných antibakteriálních látek. Červeně je zvýrazněna maximální FIC, zeleně minimální FIC a žlutě je pak uvedena průměrná FIC, ze kterého je pak usuzováno na výsledný účinek (SYN - synergie, PSYN - částečná synergie, ADD - aditivní účinek).

Index FIC pro kombinaci ciprofloxacinu s nanohybridem GCN/Ag při testování proti kmenu *P. aeruginosa* byl 1,0, což naznačuje aditivní účinek bez významného zlepšení antibakteriální aktivity a je v souladu s výsledky získanými pro ciprofloxacin při testování vůči rezistentní *E. coli* (Obrázek 32).

CIP & GCN/Ag (<i>P. aeruginosa</i>)													CIP
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	[mg/L]
A	FIC _{AVR}	1,00											64
B	Effect	ADD											32
C												MIC CIP	16
D			1,00										8
E													4
F													2
G													1
H		MIC GCN/Ag											0
GCN/Ag [mg/L]	3,375	1,688	0,844	0,422	0,211	0,105	0,053	0,026	0,013	0,007	0,003	0	

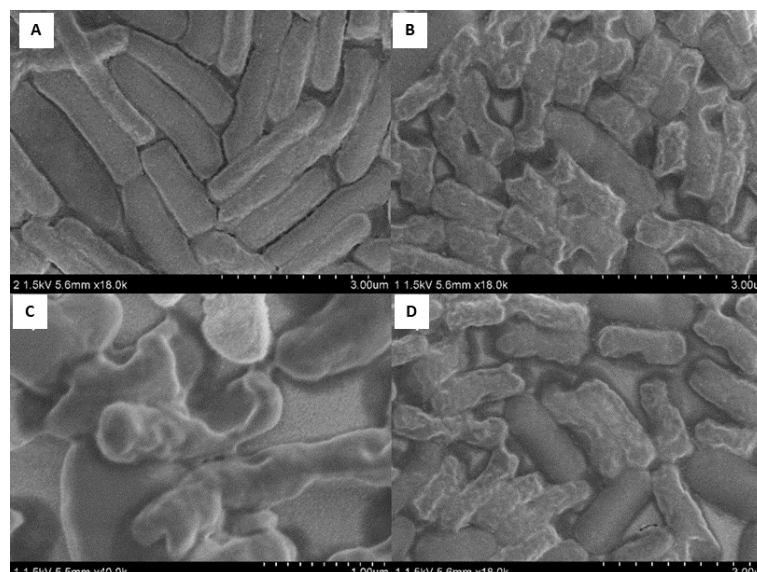
Obrázek 32. Schéma znázorňující bakteriální růst kmene *P. aeruginosa* (šedě) na mikrotitračních destičkách při testování synergického účinku GCN/Ag spolu s ciprofloxacinem. V rámci tabulky jsou vypočtené FIC pro jednotlivé kombinace antibiotikum-GCN/Ag nanohybrid a modře je zobrazena minimální inhibiční koncentrace samotných antibakteriálních látek. Červeně je zvýrazněna maximální FIC, zeleně minimální FIC a žlutě je pak uvedena průměrná FIC, ze kterého je pak usuzováno na výsledný účinek (SYN - synergie, PSY - částečná synergie, ADD - aditivní účinek).

Minimální inhibiční koncentrace nanohybridu GCN/Ag proti *E. kobei* rezistentní vůči kolistinu byla 3,375 mg/L. Kombinovaný efekt GCN/Ag a kolistinu přinesl silný synergický účinek s velmi nízkým FIC indexem 0,29 a naznačuje tedy možné překonání rezistence *E. kobei* vůči účinkům kolistinu. Za optimálních podmínek (v kombinaci s 0,422 mg/L GCN/Ag) se podařila snížit MIC kolistinu 32krát, na pouhé 2 mg/L. Touto kombinací byla MIC nanohybridu snížena osminásobně a poskytla velmi nízký FIC 0,16. Další kombinace kolistinu (1-16 mg/L) s GCN/Ag v koncentracích 0,422-0,844 mg/L měly částečné FIC mezi 0,19 až 0,38, což potvrzuje silný synergický účinek této dvojice (Obrázek 33). Nejvyšší FIC pozorovaný pro párování kolistinu s GCN/Ag proti *E. kobei* byl 0,63, což bylo pozorováno při kombinaci 32 mg/L kolistinu s 0,422 mg/L GCN/Ag.

GEN & GCN/Ag (E. kobei)												COL	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	[mg/L]
A	FIC _{AVR}	0,29										MIC GEN	64
B	Effect	SYN		0,63									32
C				0,38									16
D				0,25									8
E				0,19									4
F				0,16									2
G		0,52	0,27										1
H	MIC GCN/Ag												0
GCN/Ag [mg/L]	3,375	1,688	0,844	0,422	0,211	0,105	0,053	0,026	0,013	0,007	0,003	0	

Obrázek 33. Schéma znázorňující bakteriální růst bakterie *E. kobei* (šedě) na mikrotitračních destičkách při testování synergického účinku GCN/Ag spolu s kolistinem. V rámci tabulky jsou vypočtené FIC pro jednotlivé kombinace antibiotikum-GCN/Ag nanohybrid a modře je zobrazena minimální inhibiční koncentrace samotných antibakteriálních látek. Červeně je zvýrazněna maximální FIC, zeleně minimální FIC a žlutě je pak uvedena průměrná FIC, ze kterého je pak usuzováno na výsledný účinek (SYN - synergie, PSYN - částečná synergie, ADD - aditivní účinek).

Každé z antibiotik testovaných v rámci tohoto výzkumu patří do jiné třídy antibiotik a působí na bakterie jiným mechanismem. [140] Gentamicin patří do skupiny aminoglykosidových antibiotik, která inhibují syntézu proteinů vazbou na podjednotku 30S prokaryotického ribozomu. Bakterie *E. coli* studované v této práci odolávají gentamicinu snížením své buněčné propustnosti, která byla překonána prostřednictvím schopnosti nanohybridu GCN/Ag narušit vnější membránu a buněčnou stěnu (Obrázek 34). Narušení bakteriální buněčné membrány a buněčné stěny zvyšuje propustnost bakteriálních buněk, což umožňuje gentamicinu dosáhnout jeho intracelulárního cílového místa.



Obrázek 34. SEM snímky neošetřené *E. coli* (A), *E. coli* s narušenou buněčnou stěnou po ošetření GCN/Ag (B, C) a GCN/Ag spolu s gentamycinem (D).

Ceftazidim je antibiotikum, jehož způsob účinku je založen na inhibici syntézy buněčné stěny. Kmeny *E. coli* si vyvinuly rezistenci vůči jeho účinku tím, že produkují β -laktamázy s rozšířeným spektrem, [404] které hydrolyzují beta-laktamové jádro v molekule těchto antibiotik, čímž jim znemožňují vazbu na jejich obvyklé cílové místo. Je pravděpodobné, že nanohybrid působí proti této rezistenci tím, že proniká vnější membránou, což umožňuje intenzivnější a snadnější uvolňování β -laktamáz, a to ve větší míře než v případě bakterie s neporušenou membránou, čímž tak oslabuje jejich negativní účinek na antibiotika.

Naproti tomu kolistin je antibiotikum, které cílí na vnitřní buněčnou membránu bakterií tím, že se váže na klíčové složky buněčného obalu (fosfolipidy a lipopolysacharidy) a vytěsňuje ionty hořčíku a vápníku, které membránu stabilizují. Tím se zvyšuje propustnost membrány, což vede ke ztrátě buněčných složek a k buněčné smrti. [429] Rezistentní kmen *E. kobei* zkoumaný v této práci vykazuje rezistenci vůči kolistinu, při níž je vnější membrána modifikována (má mírný záporný náboj rovný -8 mV ve srovnání s -38 mV citlivého kmene) způsobem, který zabraňuje antibiotiku (kladně nabitě s hodnotou zeta-potenciálu 20 mV) dosáhnout svého cíle, tj. vnitřní membrány. Zvýšení antibakteriální aktivity kolistinu při kombinovaném působení s GCN/Ag je pravděpodobně způsobeno adsorpcí pozitivně nabitého kolistinu (zeta potenciál: 20 mV) na negativně nabitý nanohybrid GCN/Ag (zeta potenciál: -35 mV) prostřednictvím elektrostatických interakcí. To by umožnilo nanohybridu působit jako nano-nosič kolistinu, což může oslabit odpudivé interakce mezi kolistinem a vnější

membránou. Kromě toho může nanohybrid narušit vnější membránu bakterií a buněčnou stěnu, což antibiotiku usnadní přístup k vnitřní membráně. V tomto případě jsou sice mechanismy účinku antibiotika a nanohybridu podobné, ale jejich kombinace vede k silnému posílení antimikrobiální aktivity.

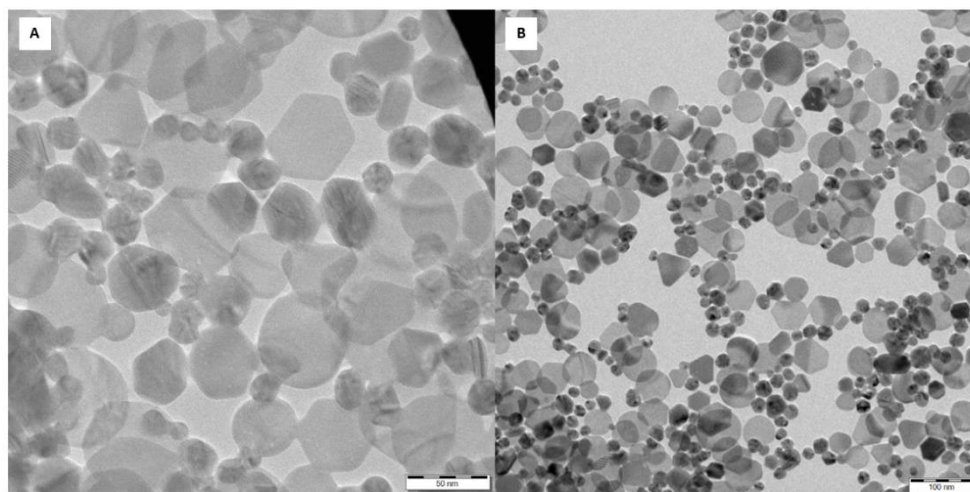
Posledním testovaným antibiotikem v této práci byl ciprofloxacin, který patří do skupiny chinolonových antibiotik, jejichž mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy nukleových kyselin inhibicí DNA gyrázy a topoizomeráz typu II a IV, které jsou klíčové pro dělení bakteriální DNA a buněčné dělení. Rezistence k ciprofloxacinu u testovaného kmene *E. coli* vzniká v důsledku mutace DNA gyrázy, [404] která brání správné vazbě antibiotika. Na rozdíl od dříve diskutovaných mechanismů rezistence tento nezahrnuje změny v buněčné stěně nebo membráně; místo toho ovlivňuje strukturu jaderného proteinu. V důsledku toho nemá nanohybrid žádný chemický nebo biologický způsob, jak tento mechanismus ovlivnit, takže v tomto případě byly pozorovány pouze aditivní, nikoli synergické nebo částečně synergické účinky.

Aktivita nanohybridu GCN/Ag v kombinaci s různými antibiotiky byla testována proti různým bakteriálním kmenům rezistentním vůči antibiotikům. Získané výsledky naznačují, že kombinovaný antibakteriální efekt v některých případech zvyšuje antibakteriální aktivitu, a že stupeň a povaha tohoto zvýšení závisí na základním mechanismu rezistence a způsobu účinku antibiotika. Slibné výsledky byly získány pro antibiotikum, které blokuje syntézu bakteriálních proteinů vazbou na 30. podjednotku bakteriálního ribozomu (gentamicin), a pro antibiotikum, které oslabuje integritu cytoplazmatické membrány (kolistin). Při použití těchto antibiotik v kombinaci s nanohybridem byly pozorovány synergické antimikrobiální účinky, které způsobily, že citlivost těchto bakteriálních kmenů pro daná antibiotika výrazně zvýšila i u multirezistentních bakteriálních kmenů. Důležité je, že i velmi nízké koncentrace nanokompozitu (obvykle 0,422 mg/L) byly dostatečné k obnovení baktericidní aktivity proti bakteriálnímu kmenům *E. coli* i *P. aeruginosa*. Pozitivní výsledky byly získány také pro ceftazidim, který působí inhibicí syntézy bakteriální buněčné stěny. Naopak kombinace nanohybridu s ciprofloxacinem, tedy antibiotikem inhibujícím syntézu bakteriální DNA, nijak výrazně nezvýšilo jeho aktivitu. Všechna tato zjištění pomáhají lépe pochopit mechanismy kombinovaných antibakteriálních účinků antibiotik spolu s dalšími antimikrobiálními látkami a otevírají cestu, jak obnovit antibakteriální účinnost běžných antibiotik a překonat bakteriální rezistenci.

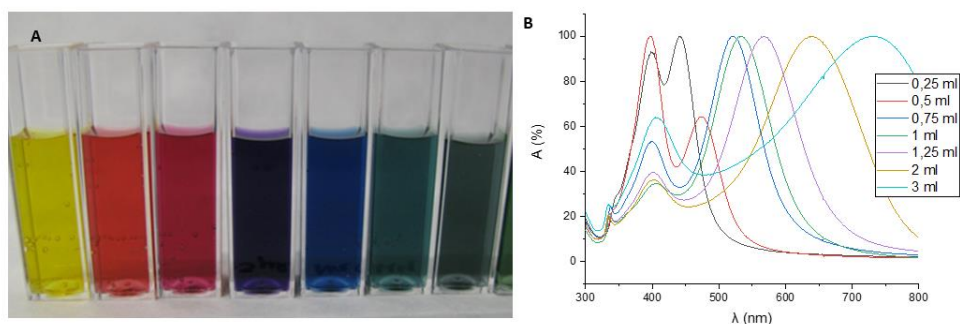
15. Nanočástice stříbra ve fototermální terapii

Fototermální účinek nanočástic stříbra byl v rámci tohoto výzkumu používán k cílenému poškození proteinů v buňkách kultivovaných na plazmonických nanočásticích stříbra nanesených ve formě vrstvy na kultivačních destičkách. Povrch mikrotitračních destiček byl modifikován vrstvou anizotropních stříbrných nanočástic, které po ozáření lasery používanými ve skenovacích mikroskopech umožňují řízený ohřev a tepelné mikroozařování jednotlivých buněk nebo subcelulárních kompartmentů.

Anizotropní částice stříbra byly připraveny dvoukrokovou syntézou, kde byly stříbrné ionty nejprve redukovány silným redukčním činidlem (tetrahydridoboritanem sodným), což vedlo k vytvoření velkého množství zárodečných částic. V závislosti na množství stabilizačního činidla (citronanu sodného) pak byly v druhém redukčním kroku v závislosti na množství stabilizátoru a redukční látky (redukce hydrazinem) syntetizovány částice různých tvarů a velikostí (Obrázek 35), tedy i různých optických vlastností projevujících se různou polohou maxima v UV-VIS absorpčním spektru (Obrázek 36). V závislosti na množství citrátu (0,25-4 ml) a koncentraci redukční látky pak byly připraveny částice lišící se polohou plasmonového píku, a to v rozmezí 440-750 nm.

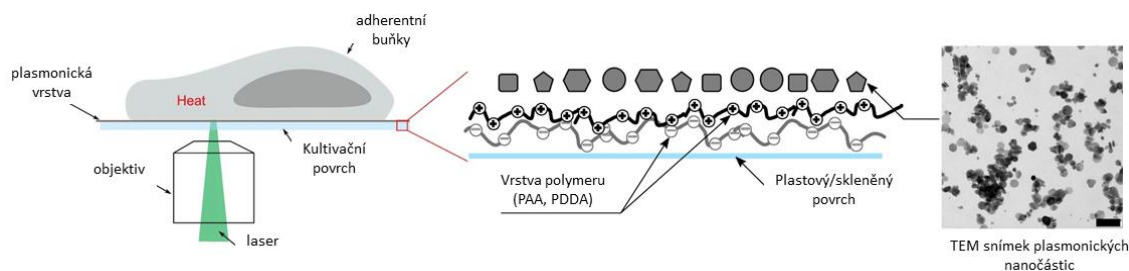


Obrázek 35. TEM snímky anizotropních částic stříbra používaných pro depozici na destičku (vzorek 5).



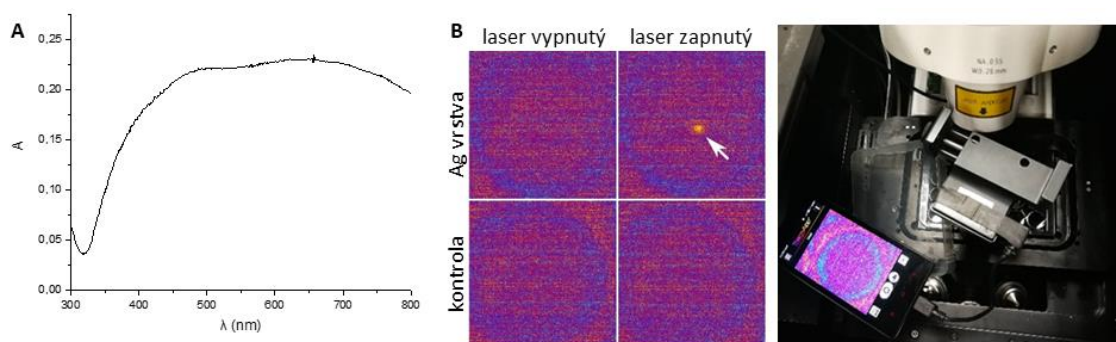
Obrázek 36. Vodné disperse anizotropních nanočástic stříbra (A) a jejich absorpční spektra (B).

Tímto způsobem připravené nanočástice byly následně nanášeny na povrch kultivační desky metodou samouspořádání po vrstvách (layer-by-layer assembly), která umožňuje navázání záporně nabitých stříbrných částic na povrch kultivační destičky, který byl dopředu modifikován (Obrázek 37) tenkým polymerním filmem sestávajícím se z vrstvy naadsorbované kyseliny polyakrylové (PAA) a poly(diallyl dimethylamonium chloridu) (PDDA), jež sloužily k zajištění vyšší smáčivosti (vrstva PAA), respektive silné elektrostatické síle a schopnosti vázat negativně nabitě nanočástice stříbra (vrstva PDDA). [430] V tomto případě byly vybrány částice s maximem povrchové plasmonové rezonance, co nejbližší hodnotě 561 nm, což je vlnová délka použitého excitačního laseru. Takto modifikovaný kultivační povrch je stabilní a plně kompatibilní se standardními metodami tkáňové kultivace, včetně adherence buněk, jejich růstu a životaschopnosti.



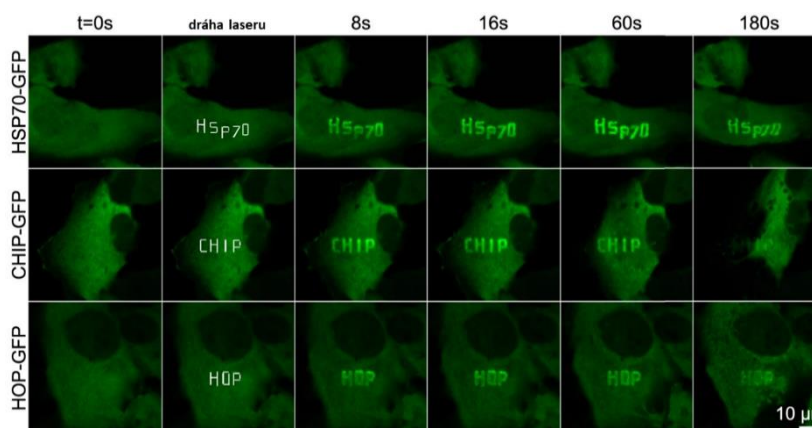
Obrázek 37. Schematické znázornění konceptu mikrotepelného poškození buněčných proteinů. Povrch buněčné kultivační desky byl modifikován tenkou polymerní vrstvou sestávající z PAA a PDDA pro účinnou vazbu plasmonických nanočástic.

Fototermický efekt a tepelná emise plazmonicky modifikovaného povrchu kultivačních desek po ozáření laserem byla pomocí termovizního zobrazování detekovatelná v oblasti LWIR spektra (7,5-14 μm) (Obrázek 38).



Obrázek 38. UV-VIS spektrum funkcionalizované mikrotitrační destičky (A). Termovizní zobrazení znázorňující vyzařované teplo v jamce na nemodifikovaných (kontrola) a modifikovaných destičkách (Ag vrstva) po aktivaci laserem o vlnové délce 561 nm (B).

K analýze schopnosti modifikovaného povrchu vyvolat mikrotepelné poškození proteinů v živých buňkách byla použita lidská reportérová buněčná linie U-2-OS exprimující protein HSP70 (Heat shock protein 70) značený GFP, který se podílí na zpracování nesložených, nebo agregovaných proteinů. [431] Tento protein se pak okamžitě po expozici laserem (během 8 s) nahromadil v místech mikrotepelného poškození a vytvořil přesný vzor laserové dráhy, který umožnil rozpoznání tepelně poškozených proteinů HSP70 v buňkách. (Obrázek 39)



Obrázek 39. Zapojení různých GFP-značených proteinů souvisejících s tepelným šokem proteinů v mikro oblastech v buňkách U-2-OS zahřátých laserem (561 nm, definovaná dráha znázorněna bíle) na Ag-modifikovaných destičkách.

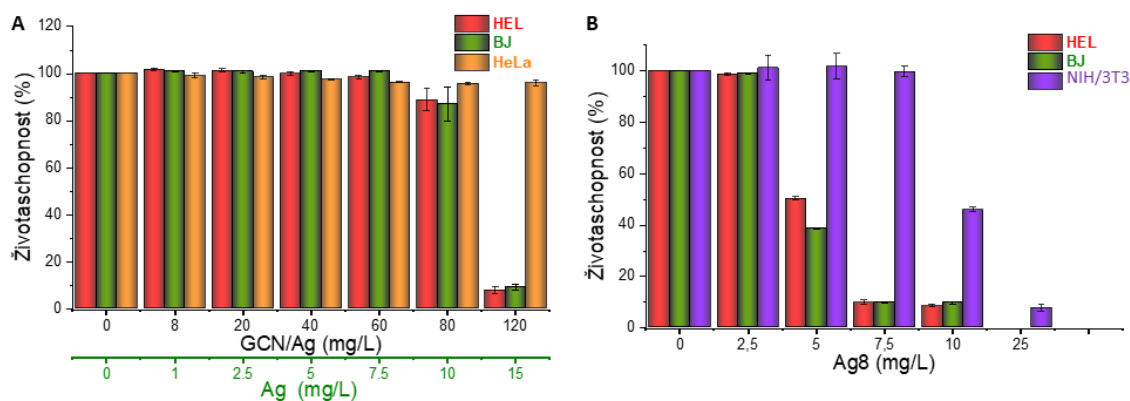
Podrobnější výsledky jsou publikovány v práci Mistrik a kol., jedná se o univerzální metodiku, jež umožňuje nahlédnout do molekulárních mechanismů buněčných reakcí na tepelné poškození v reálném čase, včetně sledování kinetiky komplementárních drah stresové odpovědi, čehož lze dále využívat ve výzkumu věnovaném zpracování poškozených buněčných proteinů, což je zásadní aspekt buněčné biologie s širokými důsledky pro neurodegenerativní, prionové a další život ohrožující choroby.

16. Cytotoxicita nanočástic

Jak již bylo široce diskutováno v teoretické části práce, nanočástice stříbra jsou známy i pro svůj cytotoxický účinek, jež může být v některých případech žádoucí (protinádorová terapie), [432] ale v případě ostatních bio-medicínských aplikací, jako například v případě antibakteriální terapie, je důležitá jejich biokompatibilita a potlačení nežádoucích účinků vůči zdravým buňkám.

Nanočástice stříbra připravené redukcí maltózou byly testovány vůči NIH/3T3 buněčné linii fibroblastů, přičemž bylo prokázáno, že do koncentrace 30 mg/L částice nevykazují žádné toxické účinky. [93] U menších nanočástic jsou pak pro stejné buněčné linie toxické o něco vyšší koncentrace (12 mg/L), tak i tak jsou to ale mnohem vyšší koncentrace, než by byly používány v rámci antibakteriální terapie (Obrázek 40B).

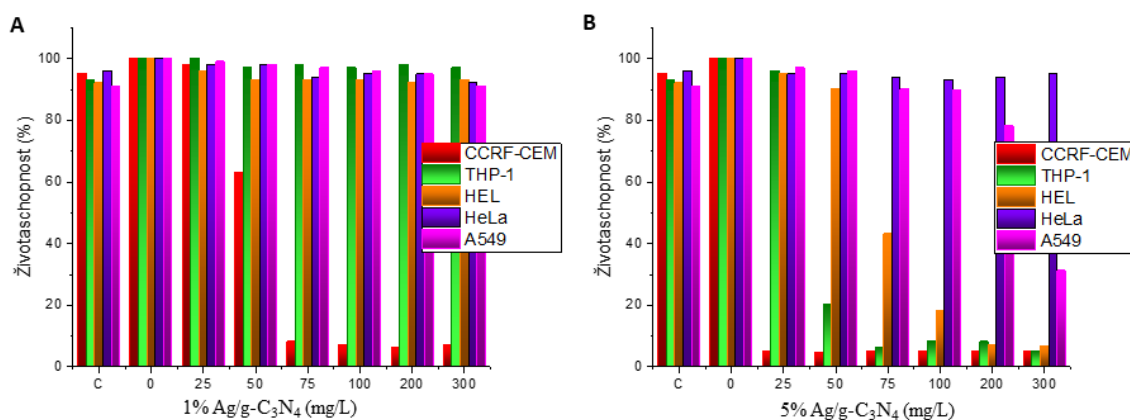
V případě grafenového derivátu byla cytotoxicita zkoumána za použití průtokové cytometrie (s použitím propidium jodidu a kalceinových fluorescenčních sond) na lidských kožních fibroblastech (BJ) a na lidských plicních fibroblastech (HEL 12469). V obou případech byl grafenový derivát tolerován až do koncentrace 60 mg/L (7,5 mg/L obsahu stříbra) (Obrázek 40A), což je přibližně 4 až 37krát více než jeho antibakteriální hodnoty MIC (Tabulka 1) a vykazuje tak tedy malou cytotoxicitu. [48]



Obrázek 40. Životaschopnost lidských plicních fibroblastů HEL, lidských kožních fibroblastů BJ, myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3 a nádorových buněk HeLa ošetřených GCN/Ag (A) Ag8 (B).

Životaschopnost buněk g-C₃N₄ a nanokompozitů Ag/g-C₃N₄ byla taktéž po 24hodinové inkubaci s materiálem hodnocena pomocí průtokové cytometrie na buňkách CCFR-CEM, THP-1, HEL, HeLa a A549. Samotné nanovrstvy nitridu uhlíku (kontrola – C) nevykazovaly cytotoxicitu pro žádnou z buněčných linií ani při nejvyšší testované koncentraci (300 mg/L) a všechny buňky si zachovaly 90 % životaschopnost (Obrázek 41, sloupec C), stejné výsledky byly potvrzeny i pro 1% Ag/g-C₃N₄ s výjimkou CCRF-

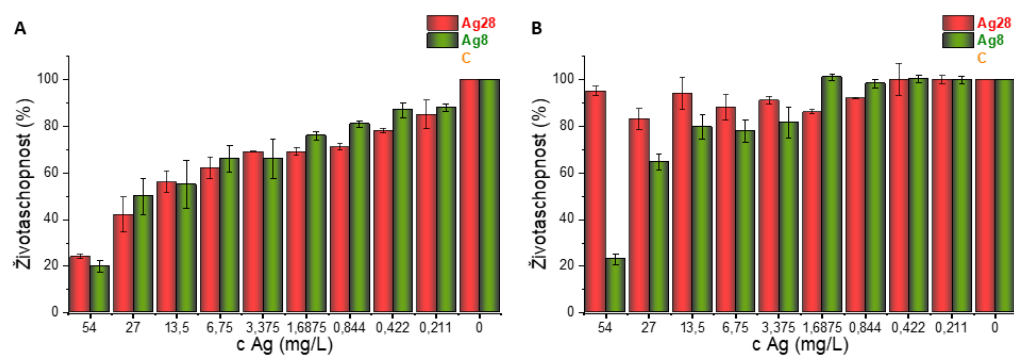
CEM, kde životaschopnost buněk poklesla pod 90 % pro koncentraci 50 mg/L, až na 63 %, jakákoliv vyšší testovaná koncentrace stříbra pak vedla ke snížení životaschopnosti pod 10 % (Obrázek 41A).



Obrázek 41. Životaschopnost buněk CCRF-CEM, THP-1, HEL, HeLa a A549 ošetřených různými koncentracemi a) 1%Ag/g-C₃N₄ a c) 5%Ag/g-C₃N₄ po dobu 24 hodin. C značí kontrolu samotného g-C₃N₄ o koncentraci 300 mg/L.

Životaschopnost buněčných linií po vystavení nanokompozitu 5% Ag/g-C₃N₄, (Obrázek 41B) se pak výrazně lišila. Adherentní rakovinné buňky HeLa a A549 byly obecně méně citlivé k účinkům kompozitu s vyšším obsahem stříbra, avšak buňky HEL, jako zástupce zdravých adherentních buněčných linií, byly k účinkům nanokompozitu mnohem citlivější než ostatní adherentní buňky, přičemž ošetření 75 mg/L 5% Ag/g-C₃N₄ způsobilo významné snížení jejich životaschopnosti. Buňky buněčné linie CCRF-CEM odumíraly i při ošetření minimální testovanou koncentrací 10 mg/L, zatímco buňky THP-1 si zachovaly více než 90 % životaschopnost až do ošetření 25 mg/L.

Nakonec byla cytotoxicita různě velkých nanočástic stříbra zkoumána i vůči AGS a NCI_N87 buňkám adenokarcinomu žaludku (Obrázek 42). Obecně lze říci, že nanočástice působily toxicitěji vůči AGS buňkám, v případě NCI buněk se u větších částic neprojevila žádná toxicita a menší nanočástice nebyly příliš toxické až do koncentrace 13,5 mg/L. Jelikož se jedná o rakovinné buňky, jež jsou často spojovány s infekcí způsobenou bakteriálním kmenem *Helicobacter pylori*, nanočástice stříbra tak do budoucna mohlo být využito až už k eradikaci samotných bakterií, tak ke studiu jejich vlivu na patogenicitu kmene *H. pylori* v AGS buňkách.



Obrázek 42. Životaschopnost AGS (A), NCI (B) buněk ošetřených různě velkými nanočásticemi stříbra.

ZÁVĚR

V rámci disertační práce byly redukcí stříbrných iontů různě silnými redukčními činidly připraveny nanočástice stříbra s rozdílnými velikostmi. Pro přípravu větších nanočástic o velikosti 28 nm byla jako redukční látka použita maltóza, v případě těch menších (8 nm), pak bylo využito silnější redukční činidlo tetrahydridoboritan sodný. Částice jako takové byly sami o sobě ve vodné disperzi stabilní, s ohledem na další využití a další testování byla studována i stabilita v médiích, jež obsahují řadu iontů a proteinů, jejichž přítomnost má vliv na iontovou sílu roztoku, a tedy stabilitu připravených nanočástic. Pro navýšení stability byly nanočástice v rámci disertační práce dodatečně stabilizovány řadou stabilizačních činidel a také kovalentně imobilizovány na uhlíkové nanomateriály, jež pevně navázaly nanočástice na svůj povrch a zabránily tak jejich agregaci.

Hlavní náplní této práce bylo studium antibakteriálních účinků nanomateriálů na bázi stříbra, a to jak vůči standardním sbírkovým kmenům, tak vůči bakteriím, jež jsou rezistentní vůči široké škále běžně používaných antibiotik. V rámci výzkumu byl pozorován vliv velikosti částic stříbra a typu bakteriální buňky na sílu antibakteriálního účinku, přičemž obecně aktivnější byly částice vůči Gram-negativním bakteriím, menší částice a částice imobilizované na povrch uhlíkatých nanomateriálů, jež vykazovaly vyšší antibakteriální aktivitu než samotný dusičnan stříbrný, který je známý pro své výrazné antimikrobiální účinky. Mechanismy účinku samotných nanočástic stříbra jsou v literatuře poměrně široce studovány, a proto byl podrobněji testován pouze účinek grafenového derivátu se stříbrem, jež ze všech testovaných materiálů vykazoval nejlepší antimikrobiální účinky. Stejně jako v případě stříbrných nanočástic, je jedním z hlavních mechanismů účinku grafenového derivátu produkce reaktivních kyslíkových radikálů, jejichž produkce v přítomnosti nanomateriálu výrazně vzrostla. Krom tohoto mechanismu bylo na snímcích ze skenovací elektronové mikroskopie pozorováno také poškození buněčné stěny a membrány, jež taktéž patří mezi známé mechanismy účinku nanomateriálů.

Kromě samotného antibakteriálního účinku grafenového derivátu byl taktéž studován společný účinek v kombinaci s antibiotiky, jež vůči daným bakteriálním kmenům ztratily svoji účinnost a liší se mechanismem svého účinku. V rámci tohoto výzkumu bylo zjištěno, že účinek antibiotik lze v případě gentamicinu, ceftazidimu a kolistinu obnovit už přidavkem grafenového kompozitu s koncentrací stříbra menší než

1 mg/L. Ciprofloxacin byl pak jediné testované antibiotikum, u kterého se ani u jedné z testovaných bakterií (*E. coli*, *P. aeruginosa*) nepodařilo účinek obnovit, což bylo patrně způsobeno tím, že u ciprofloxacin-rezistentních kmenů dochází k mutaci DNA gyrázy, která brání správné vazbě na antibiotikum a tuto genetickou mutaci nelze za pomoci účinků nanočástic stříbra chemicky, ani biologicky překonat.

Podle doposud publikovaných a dostupných výsledků včetně výsledků získaných v rámci této disertační práce se nanočástice stříbra jeví jako dobrá alternativa k současné antibakteriální terapii. Doposud však nebyl publikován dostatek prací, jež by studoval možný vznik bakteriální rezistence vůči tomuto materiálu a zaručil tak dlouhodobější využití této alternativy. Pokud se rezistenci v rámci některých prací podařilo indukovat, tak až na jednu výjimku nebylo nastíněno, jak by mohl být daný mechanismus nově vzniklé rezistence překonán. Výzkum indukce rezistence vůči účinkům nanočástic stříbra navázal na práci doc. Panáčka, jenž popsal vznik a překonání bakteriální rezistence u bakteriálního kmene *E. coli*. Postupným vystavováním bakterie malým koncentracím nanočástic stříbra se v rámci této práce podařilo indukovat rezistenci i u bakteriálního kmene *S. aureus*, jež se oproti *E. coli* liší složením své buněčné stěny. V tomto případě byla rezistence indukována v pozdějším kultivačním kroku, nicméně stejně jako v případě *E. coli* se projevila destabilizací částic stříbra a vznikem agerátů. V případě rezistence u Gram-negativní bakterie *E. coli* za agregací nanočástic stříbra stála produkce bakteriálního proteinu flagelinu, ale jelikož Gram-pozitivní bakterie tento protein neprodukuje, nemohlo se jednat o stejný mechanismus. Na základě Christensenovy metody a snímků ze skenovací elektronové mikroskopie byla jako mechanismus rezistence v tomto případě určena tvorba bakteriálního biofilmu, jejíž přítomnost výrazně snižuje pronikání nanočástic k jednotlivým bakteriálním buňkám a narušuje agregátní stabilitu nanočástic. Nově vzniklý mechanismus rezistence se podařilo překonat jak přidávkou extraktu z kůry granátového jablka (stejně jako v případě *E. coli*), tak navázáním nanočástic na nosič (kyanografen), jež umožnil rovnoměrné a pevné kovalentní navázání částic stříbra na jejich povrch a tím bylo zabráněno jejich případné agregaci.

Poslední část disertační práce byla zaměřena na syntézu anizotropních nanočástic stříbra a nanášení jejich vrstev na kultivační destičky, jež po ozáření laserem umožnili řízený ohřev a tepelné mikroozařování jednotlivých buněk nebo subcelulárních kompartmentů. Na závěr byla pozornost zaměřena na studium cytotoxického účinku

připravených nanomateriálů vůči zvířecím i lidským buňkám, jež měli za cíl prokázat netoxické účinky nanočástic stříbra v koncentracích využívaných v rámci antibakteriální terapie. Ve všech případech bylo prokázáno, že nanočástice stříbra jsou toxické k eukaryotním buňkám při mnohem vyšších koncentracích než vůči buňkám bakteriálním, což je dobrým předpokladem pro další využití nanočástic pro eliminaci bakterií a infekcí jimi vyvolaných.

Využití ať už samotných nanočástic stříbra, tak nanočástic v kombinaci s antibiotiky může do budoucna sloužit jako doplněk ke stávající terapii, nebo ji částečně nahradit a omezit tak narůstající problém s infekcemi způsobenými rezistentními bakteriálními kmeny. S ohledem na dlouhodobější využití je však zapotřebí studovat možnost získání bakteriální rezistence i vůči těmto nanomateriálům a popsat možné způsoby, jak ji předcházet, nebo ji překonat. Převedení nanočástic do klinické praxe musí ale nejprve předcházet výzkum, jež podá hlubší informace o mechanismech bakteriální rezistence, mechanismech účinku nanočástic a jejich toxicitě jak v *in vitro*, tak *in vivo* podmínkách. K lepšímu pochopení farmakokinetiky a biodistribuce částic a nanočástic v kombinaci s antibiotiky, musí být tedy antibakteriální a synergický účinek sledován i na infekčních modelech *in vivo*, jež vyloučí kombinace s extrémně vysokou toxicitou.

SUMMARY

Silver nanoparticles with different sizes and silver-based nanocomposites were prepared by reduction of silver ions with different reducing agents. Maltose was used as a reducing agent for the synthesis of the larger nanoparticles (28 nm), while stronger reducing agent sodium borohydride was used for the synthesis of the smaller ones (8 nm). The particles themselves were stable in water solution, but with respect to further use and testing, the stability in various media containing a wide range of ions and proteins were studied to ensure the stability of prepared nanoparticles. In order to increase the stability, the nanoparticles were additionally stabilized with a number of stabilizing agents and also covalently immobilized on carbon nanomaterials, which bound the nanoparticles tightly to their surface and prevented their aggregation.

The main focus of this work was to study the antibacterial effects of silver-based nanomaterials, both against standard strains and against bacteria that are resistant to a wide range of commonly used antibiotics. The effect of the size of the silver nanoparticles and bacterial cell type on the strength of the antibacterial effect was observed in the study. The particles were generally more active against Gram-negative bacteria and at the same time smaller particles and particles immobilized on the surface of carbon nanomaterials showed higher antibacterial activity than silver nitrate alone, which is known for its profound antimicrobial effects. The mechanisms of action of silver nanoparticles alone have been studied quite extensively in the literature and therefore only the effect of the graphene hybrid, which showed the best antimicrobial effects of all the tested materials, was studied in more detail. As in the case of silver nanoparticles, one of the main mechanisms of action of the graphene hybrid is the production of reactive oxygen species, whose production increased significantly in the presence of the nanohybrid. In addition to this mechanism, damage to the cell wall and membrane, which are also known mechanisms of action of various nanomaterials were also observed on scanning electron microscopy images.

In addition to the antibacterial effect of the graphene hybrid alone, the joint effect in combination with antibiotics that have lost their effectiveness against the bacterial strains in question and differ in their mechanism of action has also been studied. In this research, it was found that the effect of antibiotics could be restored in the case of the antibiotic gentamicin, ceftazidime, colistin after the addition of a graphene hybrid with silver concentration lower than 1 mg/L. Ciprofloxacin was the only tested antibiotic that

did not show any enhanced effect with any of the tested bacteria (*E. coli*, *P. aeruginosa*). The failure to restore the effect is probably connected to the fact that ciprofloxacin-resistant strains undergo a DNA gyrase mutation that prevents proper binding to the antibiotic and this genetic mutation cannot be chemically or biologically overcome by the effects of silver nanoparticles.

After the testing of the antibacterial activity of silver nanoparticles and reading the first review, silver nanoparticles appeared to be a good alternative to antibacterial therapy. However, not enough papers have been published so far studying the possible emergence of bacterial resistance to this material to secure a long-term use of this alternative. Plus, even if the resistance was induced, no further research focusing on overcoming this newly formed mechanism of resistance was carried out (besides one exception). The research on the induction of resistance to the effects of silver nanoparticles has been built upon work published by Panáček et al., who described the induction and overcoming of bacterial resistance in a bacterial strain *E. coli*. By gradually exposing the bacterium to low concentrations of silver nanoparticles, resistance was induced in *S. aureus*, which is a different bacterial strain differing in the composition of its cell wall. In this case, resistance appeared later but, as in the case of *E. coli*, it was manifested by destabilisation of the particles and the formation of aggregates. In the case of the resistance in Gram-negative *E. coli*, the aggregation of silver nanoparticles was caused by the production of the bacterial protein flagellin, but since Gram-positive bacteria do not produce this protein, it could not be the same mechanism. Based on Christensen's method and scanning electron microscopy images, the resistance mechanism in this case was determined as bacterial biofilm formation, whose presence significantly reduces the penetration of the nanoparticles to individual bacterial cells and disrupts the aggregation stability of the nanoparticles. The newly developed mechanism of resistance was overcome both by the addition of pomegranate rind extract (as in the case of *E. coli*) and by binding of the nanoparticles to a carrier (cyanographene), which allowed the particles to be uniformly covalently bound to their surface and thus prevent their eventual aggregation.

The last part of the dissertation work was focused on the synthesis of anisotropic silver nanoparticles and the deposition of their layers on culture plates. Plasmonic layers allowed controlled heating and thermal microirradiation of individual cells, subcellular compartments and targeted protein damage after laser irradiation. Finally, attention was

focused on studying the cytotoxic effect of the prepared nanomaterials against animal and human cells, which aimed to demonstrate the non-toxic effects of silver nanoparticles at concentrations used in antibacterial therapy. In all cases, silver nanoparticles were shown to be toxic to eucaryotic cells at much higher concentrations than to bacterial cells, which is a good precondition for further use of nanoparticles.

The use of silver nanoparticles alone or in combination with antibiotics may serve as an alternative to existing antibacterial therapies and eliminate the growing problem of infections caused by resistant bacterial strains. However, with respect to long-term use, the possibility of acquiring bacterial resistance also towards these nanomaterials needs to be studied and possible ways how to prevent or overcome it need to be described. Also, the translation of nanoparticles into clinical practice must be preceded by research that provides more in-depth information on the mechanisms of bacterial resistance, the mechanisms of action of the nanoparticles and their toxicity under both *in vitro* and *in vivo* conditions. Thus, to better understand the pharmacokinetics and biodistribution of the particles, the synergistic effect must be also monitored in *in vivo* infection models that would exclude combinations with extremely high toxicity.

LITERATURA

- [1] Bleeker EAJ, de Jong WH, Geertsma RE, Groenewold M, Heugens EHW, Koers-Jacquemijns M, et al. Considerations on the EU definition of a nanomaterial: Science to support policy making. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2013;65:119–25. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.11.007>.
- [2] Ni B, Wang X. Face the Edges: Catalytic Active Sites of Nanomaterials. *Advanced Science* 2015;2.
- [3] Viñes F, Gomes JRB, Illas F. Understanding the reactivity of metallic nanoparticles: Beyond the extended surface model for catalysis. *Chem Soc Rev* 2014;43:4922–39. <https://doi.org/10.1039/c3cs60421g>.
- [4] Zhang J, Mou L, Jiang X. Surface chemistry of gold nanoparticles for health-related applications. *Chem Sci* 2020;11:923–36. <https://doi.org/10.1039/c9sc06497d>.
- [5] Schmid O, Stoeger T. Surface area is the biologically most effective dose metric for acute nanoparticle toxicity in the lung. *J Aerosol Sci* 2016;99:133–43. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2015.12.006>.
- [6] Saleh TA. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environ Technol Innov* 2020;20. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101067>.
- [7] Gong C, Hu K, Wang X, Wangyang P, Yan C, Chu J, et al. 2D Nanomaterial Arrays for Electronics and Optoelectronics. *Adv Funct Mater* 2018;28. <https://doi.org/10.1002/adfm.201706559>.
- [8] Yang Y, Wu M, Zhu X, Xu H, Ma S, Zhi Y, et al. 2020 Roadmap on two-dimensional nanomaterials for environmental catalysis. *Chinese Chemical Letters* 2019;30:2065–88. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2019.11.001>.
- [9] Kumar S, Saeed G, Zhu L, Hui KN, Kim NH, Lee JH. 0D to 3D carbon-based networks combined with pseudocapacitive electrode material for high energy density supercapacitor: A review. *Chemical Engineering Journal* 2021;403. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126352>.
- [10] Dong Y, Wu ZS, Ren W, Cheng HM, Bao X. Graphene: a promising 2D material for electrochemical energy storage. *Sci Bull (Beijing)* 2017;62:724–40. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2017.04.010>.
- [11] Pomerantseva E, Bonaccorso F, Feng X, Cui Y, Gogotsi Y. Energy storage: The future enabled by nanomaterials. *Science (1979)* 2019;366. <https://doi.org/10.1126/science.aan8285>.
- [12] Wang L, Xiong Q, Xiao F, Duan H. 2D nanomaterials based electrochemical biosensors for cancer diagnosis. *Biosens Bioelectron* 2017;89:136–51. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.011>.
- [13] Lim HR, Kim HS, Qazi R, Kwon YT, Jeong JW, Yeo WH. Advanced Soft Materials, Sensor Integrations, and Applications of Wearable Flexible Hybrid Electronics in Healthcare, Energy, and Environment. *Advanced Materials* 2020;32. <https://doi.org/10.1002/adma.201901924>.
- [14] Shen S, Liu M, Li T, Lin S, Mo R. Recent progress in nanomedicine-based combination cancer therapy using a site-specific co-delivery strategy. *Biomater Sci* 2017;5:1367–81. <https://doi.org/10.1039/c7bm00297a>.

- [15] Ouyang J, Rao S, Liu R, Wang L, Chen W, Tao W, et al. 2D materials-based nanomedicine: From discovery to applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2022;185. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114268>.
- [16] Hu T, Mei X, Wang Y, Weng X, Liang R, Wei M. Two-dimensional nanomaterials: fascinating materials in biomedical field. *Sci Bull (Beijing)* 2019;64:1707–27. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2019.09.021>.
- [17] Chimene D, Alge DL, Gaharwar AK. Two-Dimensional Nanomaterials for Biomedical Applications: Emerging Trends and Future Prospects. *Advanced Materials* 2015;27:7261–84. <https://doi.org/10.1002/adma.201502422>.
- [18] Liu S, Pan X, Liu H. Two-Dimensional Nanomaterials for Photothermal Therapy. *Advanced Materials* 2020;132:5943–53. <https://doi.org/10.1002/ANGE.201911477>.
- [19] Chugh H, Sood D, Chandra I, Tomar V, Dhawan G, Chandra R. Role of gold and silver nanoparticles in cancer nano-medicine. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018;46:1210–20. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1449118>.
- [20] Lee SH, Jun BH. Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine. *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/ijms20040865>.
- [21] Almatroudi A. Silver nanoparticles: Synthesis, characterisation and biomedical applications. *Open Life Sci* 2020;15:819–39. <https://doi.org/10.1515/biol-2020-0094>.
- [22] Naik AN, Patra S, Sen D, Goswami A. Evaluating the mechanism of nucleation and growth of silver nanoparticles in a polymer membrane under continuous precursor supply: Tuning of multiple to single nucleation pathway. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2019;21:4193–9. <https://doi.org/10.1039/c8cp06202a>.
- [23] Thanh NTK, Maclean N, Mahiddine S. Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. *Chem Rev* 2014;114:7610–30. <https://doi.org/10.1021/cr400544s>.
- [24] Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv* 2014;4:3974–83. <https://doi.org/10.1039/c3ra44507k>.
- [25] Qin Y, Ji X, Jing J, Liu H, Wu H, Yang W. Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2010;372:172–6. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.10.013>.
- [26] Gurusamy V, Krishnamoorthy R, Gopal B, Veeraravagan V, Periyasamy. Systematic investigation on hydrazine hydrate assisted reduction of silver nanoparticles and its antibacterial properties. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry* 2017;47:761–7. <https://doi.org/10.1080/15533174.2015.1137074>.
- [27] Filippo E, Serra A, Buccolieri A, Manno D. Green synthesis of silver nanoparticles with sucrose and maltose: Morphological and structural characterization. *J Non Cryst Solids* 2010;356:344–50. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2009.11.021>.
- [28] Roy A, Bulut O, Some S, Mandal AK, Yilmaz MD. Green synthesis of silver nanoparticles: Biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC Adv* 2019;9:2673–702. <https://doi.org/10.1039/c8ra08982e>.

- [29] Panáček A, Kvítek L, Pucek R, Kolář M, Večeřová R, Pizúrová N, et al. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry B* 2006;110:16248–53. <https://doi.org/10.1021/jp063826h>.
- [30] Helmlinger J, Sengstock C, Groß-Heitfeld C, Mayer C, Schildhauer TA, Köller M, et al. Silver nanoparticles with different size and shape: Equal cytotoxicity, but different antibacterial effects. *RSC Adv* 2016;6:18490–501. <https://doi.org/10.1039/c5ra27836h>.
- [31] Ranoszek-Soliwoda K, Tomaszewska E, Socha E, Krzyczmonik P, Ignaczak A, Orlowski P, et al. The role of tannic acid and sodium citrate in the synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* 2017;19. <https://doi.org/10.1007/s11051-017-3973-9>.
- [32] Wang L, Lu Z, Lin F, Qin H, Zhang Z, Zhang J, et al. Two-step process for synthesizing flower-like silver nanoparticles by wet-chemical method. *Mater Lett* 2018;233:184–7. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.09.018>.
- [33] Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv* 2014;4:3974–83. <https://doi.org/10.1039/c3ra44507k>.
- [34] Gilroy KD, Hughes RA, Neretina S. Kinetically controlled nucleation of silver on surfactant-free gold seeds. *J Am Chem Soc* 2014;136:15337–45. <https://doi.org/10.1021/ja5081635>.
- [35] Polte J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles - a new perspective. *CrystEngComm* 2015;17:6809–30. <https://doi.org/10.1039/c5ce01014d>.
- [36] Zong R, Wang X, Shi S, Zhu Y. Kinetically controlled seed-mediated growth of narrow dispersed silver nanoparticles up to 120 nm: Secondary nucleation, size focusing, and Ostwald ripening. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2014;16:4236–41. <https://doi.org/10.1039/c3cp54846e>.
- [37] Sugimoto T. Underlying mechanisms in size control of uniform nanoparticles. *J Colloid Interface Sci* 2007;309:106–18. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.01.036>.
- [38] Wu C, Zhou X, Wei J. Localized Surface Plasmon Resonance of Silver Nanotriangles Synthesized by a Versatile Solution Reaction. *Nanoscale Res Lett* 2015;10. <https://doi.org/10.1186/s11671-015-1058-1>.
- [39] Parnklang T, Lamlua B, Gatemala H, Thammacharoen C, Kuimalee S, Lohwongwatana B, et al. Shape transformation of silver nanospheres to silver nanoplates induced by redox reaction of hydrogen peroxide. *Mater Chem Phys* 2015;153:127–34. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2014.12.044>.
- [40] Huang T, Xu XHN. Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy. *J Mater Chem* 2010;20:9867–76. <https://doi.org/10.1039/c0jm01990a>.
- [41] Liao C, Li Y, Tjong SC. Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/ijms20020449>.
- [42] Siddiqi KS, Husen A, Rao RAK. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnology* 2018;16. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>.

- [43] Asghar MA, Zahir E, Shahid SM, Khan MN, Asghar MA, Iqbal J, et al. Iron, copper and silver nanoparticles: Green synthesis using green and black tea leaves extracts and evaluation of antibacterial, antifungal and aflatoxin B1 adsorption activity. *LWT* 2018;90:98–107. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.009>.
- [44] Lee JH, Lim JM, Velmurugan P, Park YJ, Park YJ, Bang KS, et al. Photobiologic-mediated fabrication of silver nanoparticles with antibacterial activity. *J Photochem Photobiol B* 2016;162:93–9. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.06.029>.
- [45] Das B, Dash S, Mandal D, Adhikary J, Chattopadhyay S, Tripathy S, et al. Green-synthesized silver nanoparticles kill virulent multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains: A mechanistic study. *BLDE University Journal of Health Sciences* 2016;1:89. <https://doi.org/10.4103/2468-838x.196087>.
- [46] Liu J, Wang H, Antonietti M. Graphitic carbon nitride “reloaded”: Emerging applications beyond (photo)catalysis. *Chem Soc Rev* 2016;45:2308–26. <https://doi.org/10.1039/c5cs00767d>.
- [47] Jaworski S, Wierzbicki M, Sawosz E, Jung A, Gielerak G, Biernat J, et al. Graphene oxide-based nanocomposites decorated with silver nanoparticles as an antibacterial agent. *Nanoscale Res Lett* 2018;13. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2533-2>.
- [48] Panáček D, Hochvaldová L, Bakandritsos A, Malina T, Langer M, Belza J, et al. Silver Covalently Bound to Cyanographene Overcomes Bacterial Resistance to Silver Nanoparticles and Antibiotics. *Advanced Science* 2021;2003090:3–10. <https://doi.org/10.1002/advs.202003090>.
- [49] Svoboda L, Bednar J, Dvorsky R, Panacek A, Hochvaldova L, Kvitek L, et al. Crucial cytotoxic and antimicrobial activity changes driven by amount of doped silver in biocompatible carbon nitride nanosheets. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2021;202. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111680>.
- [50] Vasilev K. Nanoengineered antibacterial coatings and materials: A perspective. *Coatings* 2019;9. <https://doi.org/10.3390/coatings9100654>.
- [51] Hotze EM, Phenrat T, Lowry G v. Nanoparticle Aggregation: Challenges to Understanding Transport and Reactivity in the Environment. *J Environ Qual* 2010;39:1909–24. <https://doi.org/10.2134/jeq2009.0462>.
- [52] Jana S. Advances in nanoscale alloys and intermetallics: Low temperature solution chemistry synthesis and application in catalysis. *Dalton Transactions* 2015;44:18692–717. <https://doi.org/10.1039/c5dt03699b>.
- [53] Ershov V, Tarasova N, Ershov B. Evolution of electronic state and properties of silver nanoparticles during their formation in aqueous solution. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms221910673>.
- [54] Brown MA, Goel A, Abbas Z. Effect of Electrolyte Concentration on the Stern Layer Thickness at a Charged Interface. *Angewandte Chemie* 2016;128:3854–8. <https://doi.org/10.1002/ange.201512025>.
- [55] Béltéky P, Rónavári A, Igaz N, Szerencsés B, Tóth IY, Pfeiffer I, et al. Silver nanoparticles: Aggregation behavior in biorelevant conditions and its impact on biological activity. *Int J Nanomedicine* 2019;14:667–87. <https://doi.org/10.2147/IJN.S185965>.

- [56] Wang J, Zhao J, Ma G. Extremely concentrated silver nanoparticles stabilized in aqueous solution by Bovine Serum Albumin (BSA). *Nano-Structures and Nano-Objects* 2019;19. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2019.100349>.
- [57] Sivera M, Kvitek L, Soukupova J, Panacek A, Prucek R, Vecerova R, et al. Silver nanoparticles modified by gelatin with extraordinary pH stability and long-term antibacterial activity. *PLoS One* 2014;9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103675>.
- [58] Agasti N, Singh VK, Kaushik NK. Synthesis of water soluble glycine capped silver nanoparticles and their surface selective interaction. *Mater Res Bull* 2015;64:17–21. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2014.12.030>.
- [59] Tanvir F, Yaqub A, Tanvir S, Anderson WA. Poly-l-arginine coated silver nanoprisms and their anti-bacterial properties. *Nanomaterials* 2017;7. <https://doi.org/10.3390/nano7100296>.
- [60] Kyrychenko A, Pasko DA, Kalugin ON. Poly(vinyl alcohol) as a water protecting agent for silver nanoparticles: The role of polymer size and structure. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2017;19:8742–56. <https://doi.org/10.1039/c6cp05562a>.
- [61] Panáček A, Prucek R, Hrbáč J, Nevečná T, Šteffková J, Zbořil R, et al. Polyacrylate-assisted size control of silver nanoparticles and their catalytic activity. *Chemistry of Materials* 2014;26:1332–9. <https://doi.org/10.1021/cm400635z>.
- [62] Díaz-Cruz C, Alonso Nuñez G, Espinoza-Gómez H, Flores-López LZ. Effect of molecular weight of PEG or PVA as reducing-stabilizing agent in the green synthesis of silver-nanoparticles. *Eur Polym J* 2016;83:265–77. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.08.025>.
- [63] Pisárčik M, Lukáč M, Jampílek J, Bilka F, Bilková A, Pašková L, et al. Silver nanoparticles stabilized with phosphorus-containing heterocyclic surfactants: Synthesis, physico-chemical properties, and biological activity determination. *Nanomaterials* 2021;11. <https://doi.org/10.3390/nano11081883>.
- [64] Li HJ, Zhang AQ, Hu Y, Sui L, Qian DJ, Chen M. Large-scale synthesis and self-organization of silver nanoparticles with Tween 80 as a reductant and stabilizer. *Nanoscale Res Lett* 2012;7:1–13. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-612>.
- [65] Gref R, Luck M, Quéllec P, Marchand M, Dellacherie E, Harnisch S, et al. ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEGchain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2000;18:301–13.
- [66] Tripathi N, Goshisht MK. Recent Advances and Mechanistic Insights into Antibacterial Activity, Antibiofilm Activity, and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles. *ACS Appl Bio Mater* 2022;5:1391–463. <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00014>.
- [67] Kennedy DC, Gies V, Jezierski A, Yang L. Effects of human serum on the stability and cytotoxicity of silver nanoparticles. *SN Appl Sci* 2019;1. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1480-6>.
- [68] Durán N, Silveira CP, Durán M, Martinez DST. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: A mini-review. *J Nanobiotechnology* 2015;13. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0114-4>.

- [69] Park K, Lee Y. The stability of citrate-capped silver nanoparticles in isotonic glucose solution for intravenous injection. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* 2013;76:1236–45. <https://doi.org/10.1080/15287394.2013.849215>.
- [70] Chen LQ, Fang L, Ling J, Ding CZ, Kang B, Huang CZ. Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: Size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. *Chem Res Toxicol* 2015;28:501–9. <https://doi.org/10.1021/tx500479m>.
- [71] Ferdous Z, Beegam S, Tariq S, Ali BH, Nemmar A. The in Vitro Effect of Polyvinylpyrrolidone and Citrate Coated Silver Nanoparticles on Erythrocytic Oxidative Damage and Eryptosis. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2018;49:1577–88. <https://doi.org/10.1159/000493460>.
- [72] Corbo C, Molinaro R, Parodi A, Toledano Furman NE, Salvatore F, Tasciotti E. The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. *Nanomedicine* 2016;11:81–100. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.188>.
- [73] Hühn D, Kantner K, Geidel C, Brandholt S, de Cock I, Soenen SJH, et al. Polymer-coated nanoparticles interacting with proteins and cells: Focusing on the sign of the net charge. *ACS Nano* 2013;7:3253–63. <https://doi.org/10.1021/nn3059295>.
- [74] Walkey CD, Chan WCW. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem Soc Rev* 2012;41:2780–99. <https://doi.org/10.1039/c1cs15233e>.
- [75] Martínez R, Navarro Poupard MF, Álvarez A, Soprano E, Migliavacca M, Carrillo-Carrión C, et al. Nanoparticle behavior and stability in biological environments. *Nanoparticles for Biomedical Applications: Fundamental Concepts, Biological Interactions and Clinical Applications*, Elsevier; 2019, p. 5–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816662-8.00002-3>.
- [76] Tomak A, Yilancioglu B, Winkler D, Karakus CO. Protein corona formation on silver nanoparticles under different conditions. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2022;651. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129666>.
- [77] Shannahan JH, Lai X, Ke PC, Podila R, Brown JM, Witzmann FA. Silver Nanoparticle Protein Corona Composition in Cell Culture Media. *PLoS One* 2013;8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074001>.
- [78] Erlichman JS, Leiter JC. Complexity of the nano-bio interface and the tortuous path of metal oxides in biological systems. *Antioxidants* 2021;10. <https://doi.org/10.3390/antiox10040547>.
- [79] Akter M, Sikder MT, Rahman MM, Ullah AKMA, Hossain KFB, Banik S, et al. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *J Adv Res* 2018;9:1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.008>.
- [80] Kang H, Buchman JT, Rodriguez RS, Ring HL, He J, Bantz KC, et al. Stabilization of Silver and Gold Nanoparticles: Preservation and Improvement of Plasmonic Functionalities. *Chem Re* 2019;119:644–99.
- [81] Pelaz B, del Pino P, Maffre P, Hartmann R, Gallego M, Rivera-Fernández S, et al. Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein

- Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano* 2015;9:6996–7008.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01326>.
- [82] Oh JY, Kim HS, Palanikumar L, Go EM, Jana B, Park SA, et al. Cloaking nanoparticles with protein corona shield for targeted drug delivery. *Nat Commun* 2018;9.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-06979-4>.
 - [83] Pozzi D, Colapicchioni V, Caracciolo G, Piovesana S, Capriotti AL, Palchetti S, et al. Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain length on the bio-nano- interactions between PEGylated lipid nanoparticles and biological fluids: From nanostructure to uptake in cancer cells. *Nanoscale* 2014;6:2782–92. <https://doi.org/10.1039/c3nr05559k>.
 - [84] Bertrand N, Grenier P, Mahmoudi M, Lima EM, Appel EA, Dormont F, et al. Mechanistic understanding of in vivo protein corona formation on polymeric nanoparticles and impact on pharmacokinetics. *Nat Commun* 2017;8.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00600-w>.
 - [85] Fernando I, Zhou Y. Impact of pH on the stability, dissolution and aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Chemosphere* 2019;216:297–305.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.122>.
 - [86] Jeyaraj M, Gurunathan S, Qasim M, Kang MH, Kim JH. A comprehensive review on the synthesis, characterization, and biomedical application of platinum nanoparticles. *Nanomaterials* 2019;9. <https://doi.org/10.3390/nano9121719>.
 - [87] Ong WTJ, Nyam KL. Evaluation of silver nanoparticles in cosmeceutical and potential biosafety complications. *Saudi J Biol Sci* 2022;29:2085–94.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.01.035>.
 - [88] Istiqola A, Syafiuddin A. A review of silver nanoparticles in food packaging technologies: Regulation, methods, properties, migration, and future challenges. *Journal of the Chinese Chemical Society* 2020;67:1942–56.
<https://doi.org/10.1002/jccs.202000179>.
 - [89] Couto C, Almeida A. Metallic Nanoparticles in the Food Sector: A Mini-Review. *Foods* 2022;11. <https://doi.org/10.3390/foods11030402>.
 - [90] Simbine EO, Rodrigues L da C, Lapa-Guimarães J, Kamimura ES, Corassin CH, de OLIVEIRA CAF. Application of silver nanoparticles in food packages: A review. *Food Science and Technology (Brazil)* 2019;39:793–802. <https://doi.org/10.1590/fst.36318>.
 - [91] Tavakoli H, Rastegar H, Taherian M, Samadi M, Rostami H. The effect of nano-silver packaging in increasing the shelf life of nuts: An in vitro model. *Ital J Food Saf* 2017;6:156–61. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2017.6874>.
 - [92] Wu Z, Zhou W, Pang C, Deng W, Xu C, Wang X. Multifunctional chitosan-based coating with liposomes containing laurel essential oils and nanosilver for pork preservation. *Food Chem* 2019;295:16–25.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.114>.
 - [93] Panáček A, Kolar M, Vecerova R, Pucek R, Soukupova J, Krystof V, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* 2009;30:6333–40.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.065>.

- [94] Mansoor S, Zahoor I, Baba TR, Padder SA, Bhat ZA, Koul AM, et al. Fabrication of Silver Nanoparticles Against Fungal Pathogens. *Frontiers in Nanotechnology* 2021;3. <https://doi.org/10.3389/fnano.2021.679358>.
- [95] Callewaert C, de Maeseneire E, Kerckhof FM, Verliefde A, van de Wiele T, Boon N. Microbial odor profile of polyester and cotton clothes after a fitness session. *Appl Environ Microbiol* 2014;80:6611–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.01422-14>.
- [96] Syafiuddin A. Toward a comprehensive understanding of textiles functionalized with silver nanoparticles. *Journal of the Chinese Chemical Society* 2019;66:793–814. <https://doi.org/10.1002/jccs.201800474>.
- [97] Szunerits S, Boukherroub R. Antibacterial activity of graphene-based materials. *J Mater Chem B* 2016;4:6892–912. <https://doi.org/10.1039/c6tb01647b>.
- [98] Sattari S, Adeli M, Beyranvand S, Nemati M. Functionalized graphene platforms for anticancer drug delivery. *Int J Nanomedicine* 2021;16:5955–80. <https://doi.org/10.2147/IJN.S249712>.
- [99] Liu J, Cui L, Losic D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomater* 2013;9:9243–57. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.08.016>.
- [100] Morales-Narváez E, Merkoçi A. Graphene Oxide as an Optical Biosensing Platform: A Progress Report. *Advanced Materials* 2019;31. <https://doi.org/10.1002/adma.201805043>.
- [101] Park CS, Yoon H, Kwon OS. Graphene-based nanoelectronic biosensors. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2016;38:13–22. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.04.021>.
- [102] Yoo JM, Kang JH, Hong BH. Graphene-based nanomaterials for versatile imaging studies. *Chem Soc Rev* 2015;44:4835–52. <https://doi.org/10.1039/c5cs00072f>.
- [103] Garg B, Sung CH, Ling YC. Graphene-based nanomaterials as molecular imaging agents. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2015;7:737–58. <https://doi.org/10.1002/wnan.1342>.
- [104] Bei HP, Yang Y, Zhang Q, Tian Y, Luo X, Yang M, et al. Graphene-based nanocomposites for neural tissue engineering. *Molecules* 2019;24. <https://doi.org/10.3390/molecules24040658>.
- [105] Li D, Liu T, Yu X, Wu D, Su Z. Fabrication of graphene-biomacromolecule hybrid materials for tissue engineering application. *Polym Chem* 2017;8:4309–21. <https://doi.org/10.1039/c7py00935f>.
- [106] Zheng H, Ma R, Gao M, Tian X, Li YQ, Zeng L, et al. Antibacterial applications of graphene oxides: structure-activity relationships, molecular initiating events and biosafety. *Sci Bull (Beijing)* 2018;63:133–42. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2017.12.012>.
- [107] Rojas-Andrade MD, Chata G, Rouholiman D, Liu J, Saltikov C, Chen S. Antibacterial mechanisms of graphene-based composite nanomaterials. *Nanoscale* 2017;9:994–1006. <https://doi.org/10.1039/c6nr08733g>.
- [108] Alemi F, Zarezadeh R, Sadigh AR, Hamishehkar H, Rahimi M, Majidinia M, et al. Graphene oxide and reduced graphene oxide: Efficient cargo platforms for cancer theranostics. *J Drug Deliv Sci Technol* 2020;60. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101974>.

- [109] Shafiee A, Iravani S, Varma RS. Graphene and graphene oxide with anticancer applications: Challenges and future perspectives. *MedComm (Beijing)* 2022;3. <https://doi.org/10.1002/mco2.118>.
- [110] Divya M, Kiran GS, Hassan S, Selvin J. Biogenic synthesis and effect of silver nanoparticles (AgNPs) to combat catheter-related urinary tract infections. *Biocatal Agric Biotechnol* 2019;18. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101037>.
- [111] LewisOscar F, Nithya C, Vismaya S, Arunkumar M, Pugazhendhi A, Nguyen-Tri P, et al. In vitro analysis of green fabricated silver nanoparticles (AgNPs) against *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilm formation, their application on urinary catheter. *Prog Org Coat* 2021;151. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2020.106058>.
- [112] Bhargava A, Pareek V, Roy Choudhury S, Panwar J, Karmakar S. Superior Bactericidal Efficacy of Fucose-Functionalized Silver Nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and Prevention of Its Colonization on Urinary Catheters. *ACS Appl Mater Interfaces* 2018;10:29325–37. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b09475>.
- [113] Sabarees G, Velmurugan V, Tamilarasi GP, Alagarsamy V, Raja Solomon V. Recent Advances in Silver Nanoparticles Containing Nanofibers for Chronic Wound Management. *Polymers (Basel)* 2022;14:3994. <https://doi.org/10.3390/polym14193994>.
- [114] Zhang K, Lui VCH, Chen Y, Lok CN, Wong KKY. Delayed application of silver nanoparticles reveals the role of early inflammation in burn wound healing. *Sci Rep* 2020;10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63464-z>.
- [115] Oryan A, Alemzadeh E, Tashkhourian J, Nami Ana SF. Topical delivery of chitosan-capped silver nanoparticles speeds up healing in burn wounds: A preclinical study. *Carbohydr Polym* 2018;200:82–92. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.077>.
- [116] Pannerselvam B, Dharmalingam Jothinathan MK, Rajenderan M, Perumal P, Pudupalayam Thangavelu K, Kim HJ, et al. An in vitro study on the burn wound healing activity of cotton fabrics incorporated with phytosynthesized silver nanoparticles in male Wistar albino rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2017;100:187–96. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.01.015>.
- [117] Choudhury H, Pandey M, Lim YQ, Low CY, Lee CT, Marilyn TCL, et al. Silver nanoparticles: Advanced and promising technology in diabetic wound therapy. *Materials Science and Engineering C* 2020;112. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110925>.
- [118] Thanganadar Appapalam S, Paul B, Arockiasamy S, Panchamoorthy R. Phytofabricated silver nanoparticles: Discovery of antibacterial targets against diabetic foot ulcer derived resistant bacterial isolates. *Materials Science and Engineering C* 2020;117. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111256>.
- [119] Kalantari K, Mostafavi E, Afifi AM, Izadiyan Z, Jahangirian H, Rafiee-Moghaddam R, et al. Wound dressings functionalized with silver nanoparticles: Promises and pitfalls. *Nanoscale* 2020;12:2268–91. <https://doi.org/10.1039/c9nr08234d>.
- [120] Hendi A. Silver nanoparticles mediate differential responses in some of liver and kidney functions during skin wound healing. *J King Saud Univ Sci* 2011;23:47–52. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2010.06.006>.
- [121] Orłowski P, Zmigrodzka M, Tomaszewska E, Ranoszek-Soliwoda K, Czupryn M, Antos-Bielska M, et al. Tannic acid-modified silver nanoparticles for wound healing:

- The importance of size. *Int J Nanomedicine* 2018;13:991–1007. <https://doi.org/10.2147/IJN.S154797>.
- [122] Lee SJ, Heo M, Lee D, Han S, Moon JH, Lim HN, et al. Preparation and characterization of antibacterial orthodontic resin containing silver nanoparticles. *Appl Surf Sci* 2018;432:317–23. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.04.030>.
 - [123] Bapat RA, Chaubal T v., Joshi CP, Bapat PR, Choudhury H, Pandey M, et al. An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. *Materials Science and Engineering C* 2018;91:881–98. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.069>.
 - [124] Fernandez CC, Sokolonski AR, Fonseca MS, Stanisic D, Araújo DB, Azevedo V, et al. Applications of silver nanoparticles in dentistry: Advances and technological innovation. *Int J Mol Sci* 2021;22:1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms22052485>.
 - [125] Butrón Téllez Girón C, Hernández Sierra JF, Dealba-Montero I, Urbano Peña M de los A, Ruiz F. Therapeutic Use of Silver Nanoparticles in the Prevention and Arrest of Dental Caries. *Bioinorg Chem Appl* 2020;2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8882930>.
 - [126] Qing Y, Cheng L, Li R, Liu G, Zhang Y, Tang X, et al. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *Int J Nanomedicine* 2018;13:3311–27. <https://doi.org/10.2147/IJN.S165125>.
 - [127] Castiglioni S, Cazzaniga A, Locatelli L, Maier JAM. Silver nanoparticles in orthopedic applications: New insights on their effects on osteogenic cells. *Nanomaterials* 2017;7. <https://doi.org/10.3390/nano7060124>.
 - [128] Gunputh UF, Le H, Handy RD, Tredwin C. Anodised TiO₂ nanotubes as a scaffold for antibacterial silver nanoparticles on titanium implants. *Materials Science and Engineering C* 2018;91:638–44. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.074>.
 - [129] Miranda RR, Sampaio I, Zucolotto V. Exploring silver nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2022;210. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112254>.
 - [130] Pedrosa P, Baptista P v. Gold and Silver Nanoparticles for Diagnostics of Infection. *Nanotechnology in Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of Infectious Diseases*, Elsevier Inc.; 2015, p. 1–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801317-5.00001-3>.
 - [131] Jouyban A, Rahimpour E. Optical sensors based on silver nanoparticles for determination of pharmaceuticals: An overview of advances in the last decade. *Talanta* 2020;217. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121071>.
 - [132] Mondal I, Raj S, Roy P, Poddar R. Silver nanoparticles (AgNPs) as a contrast agent for imaging of animal tissue using swept-source optical coherence tomography (SSOCT). *Laser Phys* 2018;28. <https://doi.org/10.1088/1555-6611/aa884b>.
 - [133] Kravets V, Almemar Z, Jiang K, Culhane K, Machado R, Hagen G, et al. Imaging of biological cells using luminescent silver nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 2016;11. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1243-x>.
 - [134] Salleh A, Naomi R, Utami ND, Mohammad AW, Mahmoudi E, Mustafa N, et al. The potential of silver nanoparticles for antiviral and antibacterial applications: A mechanism of action. *Nanomaterials* 2020;10:1–20. <https://doi.org/10.3390/nano10081566>.

- [135] Ratan ZA, Mashrur FR, Chhoan AP, Shahriar SM, Haidere MF, Runa NJ, et al. Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Pharmaceutics* 2021;13. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122034>.
- [136] Hochvaldová L, Večeřová R, Kolář M, Pucek R, Kvítek L, Lapčík L, et al. Antibacterial nanomaterials: Upcoming hope to overcome antibiotic resistance crisis. *Nanotechnol Rev* 2022;11:1115–42. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2022-0059>.
- [137] Kolář Milan, Urbánek K, Hanulík V, Vojtová V. Vliv antibiotické léčby na vývoj bakteriální rezistence. *Klinická Farmakologie a Farmacie* 2010;24:181–3.
- [138] Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013;11:297–308. <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>.
- [139] Součková L, Ruzsíková A. Nová antibiotika v klinické praxi a výzkumu. *Klinická Farmakologie a Farmacie* 2016;30:23–8.
- [140] Kırmusaoğlu S, Gareayaghi N, S. Kocazeybek B. Introductory Chapter: The Action Mechanisms of Antibiotics and Antibiotic Resistance. *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*, Published Online: IntechOpen; 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85211>.
- [141] Beyth N, Houry-Haddad Y, Domb A, Khan W, Hazan R. Alternative antimicrobial approach: Nano-antimicrobial materials. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015;2015. <https://doi.org/10.1155/2015/246012>.
- [142] O'neil Jim. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. 2016.
- [143] CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Atlanta, Georgia: 2019. <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>.
- [144] ECDC. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report for 2019. 2019.
- [145] Graham CJ. The global threat of antibiotic resistance: what can be done? *J Glob Health Rep* 2017;1:1–8. <https://doi.org/10.29392/joghr.1.e2017002>.
- [146] Shaffer RK. The challenge of Antibiotic-resistant Staphylococcus: Lessons from Hospital nurseries in the mid-20th century. *Yale Journal of Biology and Medicine* 2013;86:261–70.
- [147] Terreni M, Taccani M, Pregnolato M. New antibiotics for multidrug-resistant bacterial strains: Latest research developments and future perspectives. *Molecules* 2021;26. <https://doi.org/10.3390/molecules26092671>.
- [148] Mullard A. 2021 FDA approvals. *Nat Rev Drug Discov* 2022;21:83–8. <https://doi.org/10.1038/d41573-022-00001-9>.
- [149] Zielińska-Górska MK, Sawosz E, Górski K, Chwalibog A. Does nanobiotechnology create new tools to combat microorganisms? *Nanotechnol Rev* 2017;6:171–89. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2016-0042>.
- [150] Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2015;13:42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>.

- [151] Herkel T, Uvizl R, Doubravska L, Adamus M, Gabrhelik T, Sedlakova MH, et al. Epidemiology of hospital-acquired pneumonia: Results of a Central European multicenter, prospective, observational study compared with data from the European region. *Biomedical Papers* 2016;160:448–55. <https://doi.org/10.5507/bp.2016.014>.
- [152] Rello J, Torres A, Ricart M, Valles J, Gonzalez J, Artigas A, et al. Ventilator-associated Pneumonia by *Staphylococcus aureus* Comparison of Methicillin-resistant and Methicillin-sensitive Episodes. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:1545–9.
- [153] Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, Trecarichi EM, Posteraro B, Fiori B, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: Importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1987–94. <https://doi.org/10.1128/AAC.01509-06>.
- [154] Harriso EM, Ba X, Coll F, Blane B, Restif O, Carvell H, et al. Genomic identification of cryptic susceptibility to penicillins and β -lactamase inhibitors in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Microbiol* 2019;4:1680–1691. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0471-0>.
- [155] Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine* 2017;12:1227–49. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>.
- [156] Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H. Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J Nanobiotechnology* 2017;15. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>.
- [157] Panáček A, Smékalova M, Kiliánova M, Pucek R, Bogdanova K, Vecerova R, et al. Strong and nonspecific synergistic antibacterial efficiency of antibiotics combined with silver nanoparticles at very low concentrations showing no cytotoxic effect. *Molecules* 2016;21:1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules21010026>.
- [158] Panáček A, Smékalová M, Večeřová R, Bogdanová K, Röderová M, Kolář M, et al. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant Enterobacteriaceae. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016;142:392–9. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.007>.
- [159] Hwang I sok, Hwang JH, Choi H, Kim KJ, Lee DG. Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. *J Med Microbiol* 2012;61:1719–26. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.047100-0>.
- [160] Saratale GD, Saratale RG, Benelli G, Kumar G, Pugazhendhi A, Kim DS, et al. Anti-diabetic Potential of Silver Nanoparticles Synthesized with *Argyrea nervosa* Leaf Extract High Synergistic Antibacterial Activity with Standard Antibiotics Against Foodborne Bacteria. *J Clust Sci* 2017;28:1709–27. <https://doi.org/10.1007/s10876-017-1179-z>.
- [161] Carrizales M, Velasco KI, Castillo C, Flores A, Magaña M, Martinez-Castanon GA, et al. In Vitro Synergism of Silver Nanoparticles with Antibiotics as an Alternative Treatment in Multiresistant Uropathogens. *Antibiotics* 2018;7:1–13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020050>.
- [162] Gao W, Zhang L. Nanomaterials arising amid antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2021;19. <https://doi.org/10.1038/s41579-41020-40420-41571>.

- [163] Muthukrishnan L, Chellappa M, Nanda A. Bio-engineering and cellular imaging of silver nanoparticles as weaponry against multidrug resistant human pathogens. *J Photochem Photobiol B* 2019;194:119–27. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.03.021>.
- [164] Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:1803–15. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.011>.
- [165] Wang X, Du Y, Fan L, Liu H, Hu Y. Chitosan- metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization and Structure-activity study. *Polymer Bulletin* 2005;55:105–13. <https://doi.org/10.1007/s00289-005-0414-1>.
- [166] Sarwar S, Chakraborti S, Bera S, Sheikh IA, Hoque KM, Chakrabarti P. The antimicrobial activity of ZnO nanoparticles against *Vibrio cholerae*: Variation in response depends on biotype. *Nanomedicine* 2016;12:1499–509. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.02.006>.
- [167] Natan M, Banin E. From Nano to Micro: Using nanotechnology to combat microorganisms and their multidrug resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2017;41:302–22. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux003>.
- [168] Yuan YG, Peng QL, Gurunathan S. Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: An alternative approach for antimicrobial therapy. *Int J Mol Sci* 2017;18. <https://doi.org/10.3390/ijms18030569>.
- [169] Cheloni G, Marti E, Slaveykova VI. Interactive effects of copper oxide nanoparticles and light to green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology* 2016;170:120–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.018>.
- [170] Quinteros MA, Cano Aristizábal V, Dalmasso PR, Paraje MG, Páez PL. Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicology in Vitro* 2016;36:216–23. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.08.007>.
- [171] Yan X, He B, Liu L, Qu G, Shi J, Hu L, et al. Antibacterial mechanism of silver nanoparticles in: *Pseudomonas aeruginosa*: Proteomics approach. *Metallomics* 2018;10:557–64. <https://doi.org/10.1039/c7mt00328e>.
- [172] Tian Y, Li G, Zhang H, Xu L, Jiao A, Chen F, et al. Construction of optimized Au@Ag core-shell nanorods for ultralow SERS detection of antibiotic levofloxacin molecules. *Opt Express* 2018;26:23347. <https://doi.org/10.1364/oe.26.023347>.
- [173] Fahimmunisha BA, Ishwarya R, AlSalhi MS, Devanesan S, Govindarajan M, Vaseeharan B. Green fabrication, characterization and antibacterial potential of zinc oxide nanoparticles using *Aloe socotrina* leaf extract: A novel drug delivery approach. *J Drug Deliv Sci Technol* 2020;55. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101465>.
- [174] Kariminezhad H, Mousapour M, Khorram S, Amani H. Photodynamic Inactivation of *Staphylococcus epidermidis*: Application of PEGylated Gold Nanoparticles. *Arab J Sci Eng* 2020;45:71–9. <https://doi.org/10.1007/s13369-019-04248-0>.
- [175] Yadav S, Jaiswar G. Review on Undoped/Doped TiO₂ Nanomaterial; Synthesis and Photocatalytic and Antimicrobial Activity. *Journal of the Chinese Chemical Society* 2017;64:103–16. <https://doi.org/10.1002/jccs.201600735>.

- [176] Kőrösi L, Bognár B, Horváth M, Schneider G, Kovács J, Scarpellini A, et al. Hydrothermal evolution of PF-co-doped TiO₂ nanoparticles and their antibacterial activity against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Catal B* 2018;231:115–22. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2018.03.012>.
- [177] Arakha M, Pal S, Samantarrai D, Panigrahi TK, Mallick BC, Pramanik K, et al. Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface. *Sci Rep* 2015;5. <https://doi.org/10.1038/srep14813>.
- [178] Alexander JW. History of the Medical Use of Silver*. *Surg Infect (Larchmt)* 2009;10:289–92.
- [179] Sterling JC, Handfield-Jones S, Hudson³ PM, Sterling JC, Cox NH, Anstey A, et al. Guidelines for the management of cutaneous warts. vol. 144. 2001.
- [180] Medici S, Peana M, Nurchi VM, Zoroddu MA. Medical Uses of Silver: History, Myths, and Scientific Evidence. *J Med Chem* 2019;62:5923–43. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01439>.
- [181] Brown AN, Smith K, Samuels TA, Lu J, Obare SO, Scott ME. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:2768–74. <https://doi.org/10.1128/AEM.06513-11>.
- [182] Burduşel AC, Gherasim O, Grumezescu AM, Mogoantă L, Ficaï A, Andronesu E. Biomedical applications of silver nanoparticles: An up-to-date overview. *Nanomaterials* 2018;8. <https://doi.org/10.3390/nano8090681>.
- [183] Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G, et al. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules* 2015;20:8856–74. <https://doi.org/10.3390/molecules20058856>.
- [184] Kvítek L, Panáček A, Soukupová J, Kolář M, Večeřová R, Pucek R, et al. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *Journal of Physical Chemistry C* 2008;112:5825–34. <https://doi.org/10.1021/jp711616v>.
- [185] Li WR, Xie XB, Shi QS, Duan SS, Ouyang YS, Chen Y ben. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *BioMetals* 2011;24:135–41. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9381-6>.
- [186] Suchomel P, Kvítek L, Panacek A, Pucek R, Hrbac J, Vecerova R, et al. Comparative Study of Antimicrobial Activity of AgBr and Ag Nanoparticles (NPs). *PLoS One* 2015;10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119202>.
- [187] Ahmad AS, Sachi Das S, Khatoon A, Tahir Ansari M, Afzal M, Saquib Hasnain M, et al. Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review. *Mater Sci Energy Technol* 2020;3:756–69. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2020.09.002>.
- [188] Qing Y, Cheng L, Li R, Liu G, Zhang Y, Tang X, et al. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *Int J Nanomedicine* 2018;13:3311–27. <https://doi.org/10.2147/IJN.S165125>.

- [189] Abbaszadegan A, Ghahramani Y, Gholami A, Hemmateenejad B, Dorostkar S, Nabavizadeh M, et al. The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: A preliminary study. *J Nanomater* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/720654>.
- [190] Jeong Y, Lim DW, Choi J. Assessment of size-dependent antimicrobial and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *Advances in Materials Science and Engineering* 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/763807>.
- [191] Raza MA, Kanwal Z, Rauf A, Sabri AN, Riaz S, Naseem S. Size- and shape-dependent antibacterial studies of silver nanoparticles synthesized by wet chemical routes. *Nanomaterials* 2016;6. <https://doi.org/10.3390/nano6040074>.
- [192] Ivask A, Kurvet I, Kasemets K, Blinova I, Aruoja V, Suppi S, et al. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PLoS One* 2014;9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102108>.
- [193] Ferrag C, Li S, Jeon K, Andoy NM, Sullan RMA, Mikhaylichenko S, et al. Polyacrylamide hydrogels doped with different shapes of silver nanoparticles: Antibacterial and mechanical properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2021;197. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111397>.
- [194] Cheon JY, Kim SJ, Rhee YH, Kwon OH, Park WH. Shape-dependent antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2019;14:2773–80. <https://doi.org/10.2147/IJN.S196472>.
- [195] Phanjom P, Ahmed G. Effect of different physicochemical conditions on the synthesis of silver nanoparticles using fungal cell filtrate of *Aspergillus oryzae* (MTCC No. 1846) and their antibacterial effect. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 2017;8. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aa92bc>.
- [196] van der Wal A, Norde W, Zehnder AJB, Lyklema J. Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1997;9:81–100.
- [197] el Badawy AM, Silva RG, Morris B, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environ Sci Technol* 2011;45:283–7. <https://doi.org/10.1021/es1034188>.
- [198] Ashraf S, Akhtar N, Ghauri MA, Rajoka MI, Khalid ZM, Hussain I. Polyhexamethylene biguanide functionalized cationic silver nanoparticles for enhanced antimicrobial activity. *Nanoscale Res Lett* 2012;7. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-267>.
- [199] Lee YJ, Kim J, Oh J, Bae S, Lee S, Hong IS, et al. Ion-release kinetics and ecotoxicity effects of silver nanoparticles. *Environ Toxicol Chem* 2012;31:155–9. <https://doi.org/10.1002/etc.717>.
- [200] Pokhrel LR, Jacobs ZL, Dikin D, Akula SM. Five nanometer size highly positive silver nanoparticles are bactericidal targeting cell wall and adherent fimbriae expression. *Sci Rep* 2022;12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10778-9>.
- [201] Liu M, Li J, Li B. Mannose-Modified Polyethylenimine: A Specific and Effective Antibacterial Agent against *Escherichia coli*. *Langmuir* 2018;34:1574–80. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b03556>.

- [202] Gibney KA, Sovadinova I, Lopez AI, Urban M, Ridgway Z, Caputo GA, et al. Poly(ethylene imine)s as antimicrobial agents with selective activity. *Macromol Biosci* 2012;12:1279–89. <https://doi.org/10.1002/mabi.201200052>.
- [203] Beyth N, Hourri-Haddad Y, Baraness-Hadar L, Yudovin-Farber I, Domb AJ, Weiss EI. Surface antimicrobial activity and biocompatibility of incorporated polyethylenimine nanoparticles. *Biomaterials* 2008;29:4157–63. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.07.003>.
- [204] Ajitha B, Ashok Kumar Reddy Y, Sreedhara Reddy P. Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles with controlled particle size by pH variation. *Powder Technol* 2015;269:110–7. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.08.049>.
- [205] Qiao Y, Ma F, Liu C, Zhou B, Wei Q, Li W, et al. Near-Infrared Laser-Excited Nanoparticles to Eradicate Multidrug-Resistant Bacteria and Promote Wound Healing. *ACS Appl Mater Interfaces* 2018;10:193–206. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b15251>.
- [206] Minh Dat N, Linh VNP, Phuong NTL, Quan LN, Huong NT, Huy LA, et al. The effects of concentration, contact time, and pH value on antibacterial activity of silver nanoparticles decorated reduced graphene oxide. *Materials Technology* 2019;34:792–9. <https://doi.org/10.1080/10667857.2019.1630898>.
- [207] Mateo EM, Jiménez M. Silver Nanoparticle-Based Therapy: Can It Be Useful to Combat Multi-Drug Resistant Bacteria? *Antibiotics* 2022;11. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091205>.
- [208] Wahab S, Khan T, Adil M, Khan A. Mechanistic aspects of plant-based silver nanoparticles against multi-drug resistant bacteria. *Heliyon* 2021;7. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07448>.
- [209] Kumar P, Huo P, Zhang R, Liu B. Antibacterial Properties of Graphene-Based Nanomaterials. *Nanomaterials* 2019;9:737. <https://doi.org/10.3390/nano9050737>.
- [210] He K, Zeng Z, Chen A, Zeng G, Xiao R, Xu P, et al. Advancement of Ag–Graphene Based Nanocomposites: An Overview of Synthesis and Its Applications. *Small* 2018;14. <https://doi.org/10.1002/sml.201800871>.
- [211] Wierzbicki M, Jaworski S, Sawosz E, Jung A, Gielerak G, Jaremek H, et al. Graphene Oxide in a Composite with Silver Nanoparticles Reduces the Fibroblast and Endothelial Cell Cytotoxicity of an Antibacterial Nanoplatfrom. *Nanoscale Res Lett* 2019;14. <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3166-9>.
- [212] Thinh DB, Dat NM, Tuyen NNK, Tai LT, Hai ND, Tinh NT, et al. A review of silver-doped graphene oxide nanocomposite: Synthesis and multifunctional applications. *Vietnam Journal of Chemistry* 2022;60:553–70. <https://doi.org/10.1002/vjch.202200034>.
- [213] Vi TTT, Kumar SR, Pang JHS, Liu YK, Chen DW, Lue SJ. Synergistic antibacterial activity of silver-loaded graphene oxide towards staphylococcus aureus and escherichia coli. *Nanomaterials* 2020;10. <https://doi.org/10.3390/nano10020366>.
- [214] Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:563–75. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>.

- [215] Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association* 2018;81:7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>.
- [216] Swidan NS, Hashem YA, Elkhatib WF, Yassien MA. Antibiofilm activity of green synthesized silver nanoparticles against biofilm associated enterococcal urinary pathogens. *Sci Rep* 2022;12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07831-y>.
- [217] Cooper RJ, Spitzer N. Silver nanoparticles at sublethal concentrations disrupt cytoskeleton and neurite dynamics in cultured adult neural stem cells. *Neurotoxicology* 2015;48:231–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.04.008>.
- [218] Sanyasi S, Majhi RK, Kumar S, Mishra M, Ghosh A, Suar M, et al. Polysaccharide-capped silver Nanoparticles inhibit biofilm formation and eliminate multi-drug-resistant bacteria by disrupting bacterial cytoskeleton with reduced cytotoxicity towards mammalian cells. *Sci Rep* 2016;6. <https://doi.org/10.1038/srep24929>.
- [219] Singh P, Pandit S, Beshay M, Mokkapati VRSS, Garnaes J, Olsson ME, et al. Anti-biofilm effects of gold and silver nanoparticles synthesized by the *Rhodiola rosea* rhizome extracts. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018;46:886–99. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1518909>.
- [220] Hetta HF, Al-Kadmy IMS, Khazaal SS, Abbas S, Suhail A, El-Mokhtar MA, et al. Antibiofilm and antivirulence potential of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep* 2021;11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90208-4>.
- [221] Gaidhani S, Singh R, Singh D, Patel U, Shevade K, Yeshvekar R, et al. Biofilm disruption activity of silver nanoparticles synthesized by *Acinetobacter calcoaceticus* PUCM 1005. *Mater Lett* 2013;108:324–7. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.07.023>.
- [222] Karimi F, Dabbagh S, Alizadeh S, Rostamnia S. Evaluation of AgClNPs@SBA-15/IL nanoparticle-induced oxidative stress and DNA mutation in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016;100:7161–70. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7593-6>.
- [223] le Ouay B, Stellacci F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. *Nano Today* 2015;10:339–54. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.04.002>.
- [224] Swasey SM, Leal LE, Lopez-Acevedo O, Pavlovich J, Gwinn EG. Silver (I) as DNA glue: Ag⁺-mediated guanine pairing revealed by removing Watson-Crick constraints. *Sci Rep* 2015;5. <https://doi.org/10.1038/srep10163>.
- [225] Molleman B, Hiemstra T. Time, pH, and size dependency of silver nanoparticle dissolution: The road to equilibrium. *Environ Sci Nano* 2017;4:1314–27. <https://doi.org/10.1039/c6en00564k>.
- [226] Dong Y, Zhu H, Shen Y, Zhang W, Zhang L. Antibacterial activity of silver nanoparticles of different particle size against *Vibrio Natriegens*. *PLoS One* 2019;14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222322>.
- [227] Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Front Microbiol* 2016;7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>.
- [228] Ramalingam B, Parandhaman T, Das SK. Antibacterial Effects of Biosynthesized Silver Nanoparticles on Surface Ultrastructure and Nanomechanical Properties of Gram-

- Negative Bacteria viz. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016;8:4963–76. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b00161>.
- [229] Huang L, Yang H, Zhang Y, Xiao W. Study on Synthesis and Antibacterial Properties of Ag NPs/GO Nanocomposites. *J Nanomater* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5685967>.
- [230] Nallanthighal S, Tierney L, Cady NC, Murray TM, Chittur S v., Reliene R. Surface coatings alter transcriptional responses to silver nanoparticles following oral exposure. *NanoImpact* 2020;17. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100205>.
- [231] Jiang HS, Zhang Y, Lu ZW, Lebrun R, Gontero B, Li W. Interaction between Silver Nanoparticles and Two Dehydrogenases: Role of Thiol Groups. *Small* 2019;15. <https://doi.org/10.1002/sml.201900860>.
- [232] Zou L, Wang J, Gao Y, Ren X, Rottenberg ME, Lu J, et al. Synergistic antibacterial activity of silver with antibiotics correlating with the upregulation of the ROS production. *Sci Rep* 2018;8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29313-w>.
- [233] Deng H, McShan D, Zhang Y, Sinha SS, Arslan Z, Ray PC, et al. Mechanistic Study of the Synergistic Antibacterial Activity of Combined Silver Nanoparticles and Common Antibiotics. *Environ Sci Technol* 2016;50:8840–8. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00998>.
- [234] Naqvi SZH, Kiran U, Ali MI, Jamal A, Hameed A, Ahmed S, et al. Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. *Int J Nanomedicine* 2013;8:3187–95. <https://doi.org/10.2147/IJN.S49284>.
- [235] Thomas R, Nair AP, Kr S, Mathew J, Ek R. Antibacterial activity and synergistic effect of biosynthesized AgNPs with antibiotics against multidrug-resistant biofilm-forming coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples. *Appl Biochem Biotechnol* 2014;173:449–60. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0852-z>.
- [236] Gu H, Ho PL, Tong E, Wang L, Xu B. Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. *Nano Lett* 2003;3:1261–3. <https://doi.org/10.1021/nl034396z>.
- [237] Roshmi T, Soumya KR, Jyothis M, Radhakrishnan EK. Effect of biofabricated gold nanoparticle-based antibiotic conjugates on minimum inhibitory concentration of bacterial isolates of clinical origin. *Gold Bull*, vol. 48, Springer Verlag; 2015, p. 63–71. <https://doi.org/10.1007/s13404-015-0162-4>.
- [238] Sharma N, Jandaik S, Kumar S. Synergistic activity of doped zinc oxide nanoparticles with antibiotics: Ciprofloxacin, ampicillin, fluconazole and amphotericin B against pathogenic microorganisms. *An Acad Bras Cienc* 2016;88:1689–98. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150713>.
- [239] Ma K, Dong P, Liang M, Yu S, Chen Y, Wang F. Facile Assembly of Multifunctional Antibacterial Nanoplatfrom Leveraging Synergistic Sensitization between Silver Nanostructure and Vancomycin. *ACS Appl Mater Interfaces* 2020;12:6955–65. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b22043>.
- [240] Tarjoman Z, Ganji SM, Mehrabian S. Synergistic effects of the bismuth nanoparticles along. *Merit Research Journals* 2015;3:387–93.

- [241] Kalaiarasi S, Jose M. Streptomycin loaded TiO₂ nanoparticles: preparation, characterization and antibacterial applications. *J Nanostructure Chem* 2017;7:47–53. <https://doi.org/10.1007/s40097-016-0213-2>.
- [242] Kumar N, Das S, Jyoti A, Kaushik S. Synergistic effect of silver nanoparticles with doxycycline against *Klebsiella pneumonia*. *Int J Pharm Pharm Sci* 2016;8.
- [243] Padalia H, Moteriya P, Chanda S. Green synthesis of silver nanoparticles from marigold flower and its synergistic antimicrobial potential. *Arabian Journal of Chemistry* 2015;8:732–41. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.015>.
- [244] Prema P, Iniya PA, Immanuel G. Microbial mediated synthesis, characterization, antibacterial and synergistic effect of gold nanoparticles using *Klebsiella pneumoniae* (MTCC-4030). *RSC Adv* 2016;6:4601–7. <https://doi.org/10.1039/c5ra23982f>.
- [245] Krajewski S, Prucek R, Panacek A, Avci-Adali M, Nolte A, Straub A, et al. Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood. *Acta Biomater* 2013;9:7460–8. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.016>.
- [246] Lee NY, Ko WC, Hsueh PR. Nanoparticles in the treatment of infections caused by multidrug-resistant organisms. *Front Pharmacol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01153>.
- [247] Jelinkova P, Mazumdar A, Sur VP, Kociova S, Dolezelikova K, Jimenez AMJ, et al. Nanoparticle-drug conjugates treating bacterial infections. *Journal of Controlled Release* 2019;307:166–85. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.06.013>.
- [248] 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;275:177–82. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>.
- [249] Shahverdi AR, Fakhimi A, Shahverdi HR, Minaian S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine* 2007;3:168–71. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2007.02.001>.
- [250] Li P, Li J, Wu C, Wu Q, Li J. Synergistic antibacterial effects of β -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005;16:1912–7. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/9/082>.
- [251] Chopade B, Ghosh, Patil, Ahire, Kitture, Jabgunde, et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *Int J Nanomedicine* 2012;483. <https://doi.org/10.2147/ijn.s24793>.
- [252] Batarseh KI. Anomaly and correlation of killing in the therapeutic properties of silver (I) chelation with glutamic and tartaric acids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004;54:546–8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh349>.
- [253] Graves JL, Tajkarimi M, Cunningham Q, Campbell A, Nonga H, Harrison SH, et al. Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. *Front Genet* 2015;5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00042>.

- [254] Gunawan C, Teoh WY, Marquis CP, Amal R. Induced adaptation of *Bacillus* sp. to antimicrobial nanosilver. *Small* 2013;9:3554–60. <https://doi.org/10.1002/sml.201300761>.
- [255] Panáček A, Kvítek L, Smékalová M, Večeřová R, Kolář M, Röderová M, et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nat Nanotechnol* 2018;13:65–71. <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0013-y>.
- [256] Zhang R, Carlsson F, Edman M, Hummelgård M, Jonsson BG, Bylund D, et al. *Escherichia coli* Bacteria Develop Adaptive Resistance to Antibacterial ZnO Nanoparticles. *Adv Biosyst* 2018;2. <https://doi.org/10.1002/adbi.201800019>.
- [257] Elbehiry A, Al-Dubaib M, Marzouk E, Moussa I. Antibacterial effects and resistance induction of silver and gold nanoparticles against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis and the potential toxicity in rats. *Microbiologyopen* 2019;8. <https://doi.org/10.1002/mbo3.698>.
- [258] Teitzel GM, Parsek MR. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:2313–20. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2313-2320.2003>.
- [259] Pereira S, Micheletti E, Zille A, Santos A, Moradas-Ferreira P, Tamagnini P, et al. Using extracellular polymeric substances (EPS)-producing cyanobacteria for the bioremediation of heavy metals: Do cations compete for the EPS functional groups and also accumulate inside the cell? *Microbiology (N Y)* 2011;157:451–8. <https://doi.org/10.1099/mic.0.041038-0>.
- [260] Ferris FG, Beveridge TJ. Binding of a paramagnetic metal cation to *Escherichia coli* K-12 outer-membrane vesicles. *FEMS Microbiol Lett* 1984;24:43–6. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1984.tb01241.x>.
- [261] Miller CD, Pettee B, Zhang C, Pabst M, McLean JE, Anderson AJ. Copper and cadmium: Responses in *Pseudomonas putida* KT2440. *Lett Appl Microbiol* 2009;49:775–83. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02741.x>.
- [262] Poirier I, Hammann P, Kuhn L, Bertrand M. Strategies developed by the marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* BA3SM1 to resist metals: A proteome analysis. *Aquatic Toxicology* 2013;128–129:215–32. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.006>.
- [263] Zhang X, Wu W, Virgo N, Zou L, Liu P, Li X. Global transcriptome analysis of hexavalent chromium stress responses in *Staphylococcus aureus* LZ-01. *Ecotoxicology* 2014;23:1534–45. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1294-7>.
- [264] Jelenko C. Silver Nitrate Resistant *E. Coli*: Report of Case. *Ann Surg* 1969;170:296–9.
- [265] Hosny AEDMS, Rasmy SA, Aboul-Magd DS, Kashef MT, El-Bazza ZE. The increasing threat of silver-resistance in clinical isolates from wounds and burns. *Infect Drug Resist* 2019;12:1985–2001. <https://doi.org/10.2147/IDR.S209881>.
- [266] Bacterial antimicrobial metal ion resistance. n.d.
- [267] Li X-Z, Nikaido H, Williams KE. Silver-Resistant Mutants of *Escherichia coli* Display Active Efflux of Ag and Are Deficient in Porins. vol. 179. 1997.

- [268] Silver S. Bacterial silver resistance: Molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev* 2003;27:341–53. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00047-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00047-0).
- [269] Silver S, Phung LT, Silver G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 33, 2006, p. 627–34. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0139-7>.
- [270] Valentin E, Bottomley AL, Chilambi GS, Harry EJ, Amal R, Sotiriou GA, et al. Heritable nanosilver resistance in priority pathogen: A unique genetic adaptation and comparison with ionic silver and antibiotics. *Nanoscale* 2020;12:2384–92. <https://doi.org/10.1039/c9nr08424j>.
- [271] Hachicho N, Hoffmann P, Ahlert K, Heipieper HJ. Effect of silver nanoparticles and silver ions on growth and adaptive response mechanisms of *Pseudomonas putida* mt-2. *FEMS Microbiol Lett* 2014;355:71–7. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12460>.
- [272] Wang Q, Kang F, Gao Y, Mao X, Hu X. Sequestration of nanoparticles by an EPS matrix reduces the particle-specific bactericidal activity. *Sci Rep* 2016;6. <https://doi.org/10.1038/srep21379>.
- [273] Yang Y, Alvarez PJJ. Sublethal Concentrations of Silver Nanoparticles Stimulate Biofilm Development. *Environ Sci Technol Lett* 2015;2:221–6. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.5b00159>.
- [274] Khan S, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Silver nanoparticles tolerant bacteria from sewage environment. *Journal of Environmental Sciences* 2011;23:346–52. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60412-3](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60412-3).
- [275] Faghihzadeh F, Anaya NM, Astudillo-Castro C, Oyanedel-Craver V. Kinetic, metabolic and macromolecular response of bacteria to chronic nanoparticle exposure in continuous culture. *Environ Sci Nano* 2018;5:1386–96. <https://doi.org/10.1039/c8en00325d>.
- [276] Ellis DH, Maurer-Gardner EI, Sulentic CEW, Hussain SM. Silver nanoparticle antibacterial efficacy and resistance development in key bacterial species. *Biomed Phys Eng Express* 2019;5. <https://doi.org/10.1088/2057-1976/aad5a7>.
- [277] Losasso C, Belluco S, Cibir V, Zavagnin P, Mičetić I, Gallochio F, et al. Antibacterial activity of silver nanoparticles: Sensitivity of different *Salmonella* serovars. *Front Microbiol* 2014;5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00227>.
- [278] Kędziora A, Wernecki M, Korzekwa K, Speruda M, Gerasymchuk Y, Łukowiak A, et al. Consequences of long-term bacteria's exposure to silver nanoformulations with different physicochemical properties. *Int J Nanomedicine* 2020;15:199–213. <https://doi.org/10.2147/IJN.S208838>.
- [279] van Aerle R, Lange A, Moorhouse A, Paszkiewicz K, Ball K, Johnston BD, et al. Molecular mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Environ Sci Technol* 2013;47:8005–14. <https://doi.org/10.1021/es401758d>.
- [280] Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol Lett* 2009;190:156–62. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.009>.

- [281] Li L, Cui J, Liu Z, Zhou X, Li Z, Yu Y, et al. Silver nanoparticles induce SH-SY5Y cell apoptosis via endoplasmic reticulum- and mitochondrial pathways that lengthen endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites and alter inositol-3-phosphate receptor function. *Toxicol Lett* 2018;285:156–67. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.01.004>.
- [282] Jiang X, Lu C, Tang M, Yang Z, Jia W, Ma Y, et al. Nanotoxicity of Silver Nanoparticles on HEK293T Cells: A Combined Study Using Biomechanical and Biological Techniques. *ACS Omega* 2018;3:6770–8. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00608>.
- [283] Grzelak A, Wojewódzka M, Meczynska-Wielgosz S, Zuberek M, Wojciechowska D, Kruszewski M. Crucial role of chelatable iron in silver nanoparticles induced DNA damage and cytotoxicity. *Redox Biol* 2018;15:435–40. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.006>.
- [284] Yu Z, Li Q, Wang J, Yu Y, Wang Y, Zhou Q, et al. Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field. *Nanoscale Res Lett* 2020;15. <https://doi.org/10.1186/s11671-020-03344-7>.
- [285] Zhu L, Guo D, Sun L, Huang Z, Zhang X, Ma W, et al. Activation of autophagy by elevated reactive oxygen species rather than released silver ions promotes cytotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in hematopoietic cells. *Nanoscale* 2017;9:5489–98. <https://doi.org/10.1039/c6nr08188f>.
- [286] Piao MJ, Kang KA, Lee IK, Kim HS, Kim S, Choi JY, et al. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol Lett* 2011;201:92–100. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.010>.
- [287] Gurunathan S, Qasim M, Park C, Yoo H, Kim JH, Hong K. Cytotoxic potential and molecular pathway analysis of silver nanoparticles in human colon cancer cells HCT116. *Int J Mol Sci* 2018;19. <https://doi.org/10.3390/ijms19082269>.
- [288] Fahmy HM, Mosleh AM, Elghany AA, Shams-Eldin E, Abu Serea ES, Ali SA, et al. Coated silver nanoparticles: Synthesis, cytotoxicity, and optical properties. *RSC Adv* 2019;9:20118–36. <https://doi.org/10.1039/c9ra02907a>.
- [289] Zhang XF, Shen W, Gurunathan S. Silver nanoparticle-mediated cellular responses in various cell lines: An in vitro model. *Int J Mol Sci* 2016;17. <https://doi.org/10.3390/ijms17101603>.
- [290] Johnston KA, Stabryla LM, Smith AM, Gan XY, Gilbertson LM, Millstone JE. Impacts of broth chemistry on silver ion release, surface chemistry composition, and bacterial cytotoxicity of silver nanoparticles. *Environ Sci Nano* 2018;5:304–12. <https://doi.org/10.1039/c7en00974g>.
- [291] Sun J, Wan J, Zhai X, Wang J, Liu Z, Tian H, et al. Silver nanoparticles: Correlating particle size and ionic Ag release with cytotoxicity, genotoxicity, and inflammatory responses in human cell lines. *Toxicol Ind Health* 2021;37:198–209. <https://doi.org/10.1177/0748233721996561>.
- [292] Beer C, Foldbjerg R, Hayashi Y, Sutherland DS, Autrup H. Toxicity of silver nanoparticles-Nanoparticle or silver ion? *Toxicol Lett* 2012;208:286–92. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.002>.

- [293] Aziz N, Faraz M, Sherwani MA, Fatma T, Prasad R. Illuminating the anticancerous efficacy of a new fungal chassis for silver nanoparticle synthesis. *Front Chem* 2019;7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00065>.
- [294] Zhang T, Wang L, Chen Q, Chen C. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. *Yonsei Med J* 2014;55:283–91. <https://doi.org/10.3349/ymj.2014.55.2.283>.
- [295] Wang X, Ji Z, Chang CH, Zhang H, Wang M, Liao YP, et al. Use of coated silver nanoparticles to understand the relationship of particle dissolution and bioavailability to cell and lung toxicological potential. *Small* 2014;10:385–98. <https://doi.org/10.1002/sml.201301597>.
- [296] Gliga AR, Skoglund S, Odnevall Wallinder I, Fadeel B, Karlsson HL. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: The role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol* 2014;11. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-11>.
- [297] Recordati C, de Maglie M, Bianchessi S, Argenti S, Cella C, Mattiello S, et al. Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice: Nano-specific and size-dependent effects. *Part Fibre Toxicol* 2016;13. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0124-x>.
- [298] Stoehr LC, Gonzalez E, Stampfl A, Casals E, Duschl A, Puentes V, et al. Shape matters: Effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells. *Part Fibre Toxicol* 2011;8. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-36>.
- [299] Mohanta YK, Mishra AK, Nayak D, Patra B, Bratovic A, Avula SK, et al. Exploring Dose-Dependent Cytotoxicity Profile of Gracilaria edulis-Mediated Green Synthesized Silver Nanoparticles against MDA-MB-231 Breast Carcinoma. *Oxid Med Cell Longev* 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/3863138>.
- [300] Miethling-Graff R, Rumpker R, Richter M, Verano-Braga T, Kjeldsen F, Brewer J, et al. Exposure to silver nanoparticles induces size- and dose-dependent oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicology in Vitro* 2014;28:1280–9. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.06.005>.
- [301] Sapkota K, Narayanan KB, Han SS. Environmentally Sustainable Synthesis of Catalytically-Active Silver Nanoparticles and Their Cytotoxic Effect on Human Keratinocytes. *J Clust Sci* 2017;28:1605–16. <https://doi.org/10.1007/s10876-017-1169-1>.
- [302] Bobyk L, Tarantini A, Beal D, Veronesi G, Kieffer I, Motellier S, et al. Toxicity and chemical transformation of silver nanoparticles in A549 lung cells: Dose-rate-dependent genotoxic impact. *Environ Sci Nano* 2021;8:806–21. <https://doi.org/10.1039/d0en00533a>.
- [303] Vuković B, Milić M, Dobrošević B, Milić M, Ilić K, Pavičić I, et al. Surface stabilization affects toxicity of silver nanoparticles in human peripheral blood mononuclear cells. *Nanomaterials* 2020;10:1–18. <https://doi.org/10.3390/nano10071390>.
- [304] Verkhovskii R, Kozlova A, Atkin V, Kamyshinsky R, Shulgina T, Nechaeva O. Physical properties and cytotoxicity of silver nanoparticles under different polymeric stabilizers. *Chem Re* 2019;119:664–99. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019>.
- [305] Nguyen KC, Seligy VL, Massarsky A, Moon TW, Rippstein P, Tan J, et al. Comparison of toxicity of uncoated and coated silver nanoparticles. *J Phys Conf Ser* 2013;429. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/429/1/012025>.

- [306] van der Zande M, Vandebriel RJ, van Doren E, Kramer E, Herrera Rivera Z, Serrano-Rojero CS, et al. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano* 2012;6:7427–42. <https://doi.org/10.1021/nn302649p>.
- [307] Bergin IL, Wilding LA, Morishita M, Walacavage K, Ault AP, Axson JL, et al. Effects of particle size and coating on toxicologic parameters, fecal elimination kinetics and tissue distribution of acutely ingested silver nanoparticles in a mouse model. *Nanotoxicology* 2016;10:352–60. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1072588>.
- [308] Sokołowska P, Białkowska K, Siatkowska M, Rosowski M, Kucińska M, Komorowski P, et al. Human brain endothelial barrier cells are distinctly less vulnerable to silver nanoparticles toxicity than human blood vessel cells: A cell-specific mechanism of the brain barrier? *Nanomedicine* 2017;13:2127–30. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.05.015>.
- [309] Kaba SI, Egorova EM. In vitro studies of the toxic effects of silver nanoparticles on HeLa and U937 cells. *Nanotechnol Sci Appl* 2015;8:19–29. <https://doi.org/10.2147/NSA.S78134>.
- [310] Karan T, Erenler R, Moran Bozer B. Synthesis and characterization of silver nanoparticles using curcumin: Cytotoxic, apoptotic, and necrotic effects on various cell lines. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 2022;77:343–50. <https://doi.org/10.1515/znc-2021-0298>.
- [311] Holmes AM, Lim J, Studier H, Roberts MS. Varying the morphology of silver nanoparticles results in differential toxicity against micro-organisms, HaCaT keratinocytes and affects skin deposition. *Nanotoxicology* 2016;10:1503–14. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1236993>.
- [312] Galandáková A, Franková J, Ambrožová N, Habartová K, Pivodová V, Zálešák B, et al. Effects of silver nanoparticles on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Hum Exp Toxicol* 2016;35:946–57. <https://doi.org/10.1177/0960327115611969>.
- [313] Saravanakumar K, Chelliah R, MubarakAli D, Oh DH, Kathiresan K, Wang MH. Unveiling the potentials of biocompatible silver nanoparticles on human lung carcinoma A549 cells and *Helicobacter pylori*. *Sci Rep* 2019;9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42112-1>.
- [314] González-Vega JG, García-Ramos JC, Chavez-Santoscoy RA, Castillo-Quiñones JE, Arellano-Garcia ME, Toledano-Magaña Y. Lung Models to Evaluate Silver Nanoparticles' Toxicity and Their Impact on Human Health. *Nanomaterials* 2022;12. <https://doi.org/10.3390/nano12132316>.
- [315] Miyayama T, Matsuoka M. Involvement of lysosomal dysfunction in silver nanoparticle-induced cellular damage in A549 human lung alveolar epithelial cells. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 2016;11. <https://doi.org/10.1186/s12995-016-0090-0>.
- [316] Han JW, Gurunathan S, Jeong JK, Choi YJ, Kwon DN, Park JK, et al. Oxidative stress mediated cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in human lung epithelial adenocarcinoma cell line. *Nanoscale Res Lett* 2014;9. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-459>.

- [317] Zein R, Alghoraibi I, Soukkaireh C, Salman A, Alahmad A. In-vitro anticancer activity against Caco-2 cell line of colloidal nano silver synthesized using aqueous extract of Eucalyptus Camaldulensis leaves. *Heliyon* 2020;6. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04594>.
- [318] Chang X, Wang X, Li J, Shang M, Niu S, Zhang W, et al. Silver nanoparticles induced cytotoxicity in HT22 cells through autophagy and apoptosis via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Ecotoxicol Environ Saf* 2021;208. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111696>.
- [319] Roshni K, Younis M, D I, Basavaraju P, Puthamohan VM. Anticancer Activity of Biosynthesized Silver Nanoparticles using *Murraya koenigii* Leaf Extract against HT-29 Colon Cancer Cell Line. *J Cancer Sci Ther* 2018;10. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000521>.
- [320] Huang H, Lai W, Cui M, Liang L, Lin Y, Fang Q, et al. An Evaluation of Blood Compatibility of Silver Nanoparticles. *Sci Rep* 2016;6. <https://doi.org/10.1038/srep25518>.
- [321] Bian Y, Kim K, Ngo T, Kim I, Bae ON, Lim KM, et al. Silver nanoparticles promote procoagulant activity of red blood cells: A potential risk of thrombosis in susceptible population. *Part Fibre Toxicol* 2019;16. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0292-6>.
- [322] Dalzon B, Torres A, Diemer H, Ravanel S, Collin-Faure V, Pernet-Gallay K, et al. How reversible are the effects of silver nanoparticles on macrophages? A proteomic-instructed view. *Environ Sci Nano* 2019;6:3133–57. <https://doi.org/10.1039/c9en00408d>.
- [323] Wypij M, Jędrzejewski T, Trzcińska-Wencel J, Ostrowski M, Rai M, Golińska P. Green Synthesized Silver Nanoparticles: Antibacterial and Anticancer Activities, Biocompatibility, and Analyses of Surface-Attached Proteins. *Front Microbiol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.632505>.
- [324] Gliga AR, de Loma J, di Bucchianico S, Skoglund S, Keshavan S, Odnevall Wallinder I, et al. Silver nanoparticles modulate lipopolysaccharide-triggered Toll-like receptor signaling in immune-competent human cell lines. *Nanoscale Adv* 2020;2:648–58. <https://doi.org/10.1039/c9na00721k>.
- [325] Lategan KL, Walters CR, Pool EJ. The effects of silver nanoparticles on RAW 264.7. Macrophages and human whole blood cell cultures. *Frontiers In Bioscience* 2019;24:347–65.
- [326] Ferdous Z, Nemmar A. Health impact of silver nanoparticles: A review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure. *Int J Mol Sci* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/ijms21072375>.
- [327] Turner P v, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA. Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2011;50:600–13.
- [328] Yang L, Kuang H, Zhang W, Aguilar ZP, Wei H, Xu H. Comparisons of the biodistribution and toxicological examinations after repeated intravenous administration of silver and gold nanoparticles in mice. *Sci Rep* 2017;7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03015-1>.

- [329] Qin G, Tang S, Li S, Lu H, Wang Y, Zhao P, et al. Toxicological evaluation of silver nanoparticles and silver nitrate in rats following 28 days of repeated oral exposure. *Environ Toxicol* 2017;32:609–18. <https://doi.org/10.1002/tox.22263>.
- [330] Boudreau MD, Imam MS, Paredes AM, Bryant MS, Cunningham CK, Felton RP, et al. Differential Effects of Silver Nanoparticles and Silver Ions on Tissue Accumulation, Distribution, and Toxicity in the Sprague Dawley Rat Following Daily Oral Gavage Administration for 13 Weeks. *Toxicological Sciences* 2016;150:131–60. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv318>.
- [331] Wen H, Dan M, Yang Y, Lyu J, Shao A, Cheng X, et al. Acute toxicity and genotoxicity of silver nanoparticle in rats. *PLoS One* 2017;12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185554>.
- [332] Lee TY, Liu MS, Huang LJ, Lue SI, Lin LC, Kwan AL, et al. Bioenergetic failure correlates with autophagy and apoptosis in rat liver following silver nanoparticle intraperitoneal administration. *Part Fibre Toxicol* 2013;10. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-40>.
- [333] Tavares AJ, Poon W, Zhang YN, Dai Q, Besla R, Ding D, et al. Effect of removing Kupffer cells on nanoparticle tumor delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:E10871–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713390114>.
- [334] Khan AM, Korzeniowska B, Gorshkov V, Tahir M, Schröder H, Skytte L, et al. Silver nanoparticle-induced expression of proteins related to oxidative stress and neurodegeneration in an in vitro human blood-brain barrier model. *Nanotoxicology* 2019;13:221–39. <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1540728>.
- [335] Gonzalez-Carter DA, Leo BF, Ruenraroengsak P, Chen S, Goode AE, Theodorou IG, et al. Silver nanoparticles reduce brain inflammation and related neurotoxicity through induction of H₂S-synthesizing enzymes. *Sci Rep* 2017;7. <https://doi.org/10.1038/srep42871>.
- [336] Zhang XF, Park JH, Choi YJ, Kang MH, Gurunathan S, Kim JH. Silver nanoparticles cause complications in pregnant mice. *Int J Nanomedicine* 2015;10:7057–71. <https://doi.org/10.2147/IJN.S95694>.
- [337] Hossain MM, Polash SA, Takikawa M, Shubhra RD, Saha T, Islam Z, et al. Investigation of the Antibacterial Activity and in vivo Cytotoxicity of Biogenic Silver Nanoparticles as Potent Therapeutics. *Front Bioeng Biotechnol* 2019;7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00239>.
- [338] Pallavicini P, Arciola CR, Bertoglio F, Curtosi S, Dacarro G, D'Agostino A, et al. Silver nanoparticles synthesized and coated with pectin: An ideal compromise for anti-bacterial and anti-biofilm action combined with wound-healing properties. *J Colloid Interface Sci* 2017;498:271–81. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.03.062>.
- [339] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [340] Tao L, Chen X, Sun J, Wu C. Silver nanoparticles achieve cytotoxicity against breast cancer by regulating long-chain noncoding RNA XLOC_006390-mediated pathway. *Toxicol Res (Camb)* 2021;10:123–33. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa090>.

- [341] Khorrami S, Zarrabi A, Khaleghi M, Danaei M, Mozafari MR. Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7 tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties. *Int J Nanomedicine* 2018;13:8013–24. <https://doi.org/10.2147/IJN.S189295>.
- [342] Xu Z, Feng Q, Wang M, Zhao H, Lin Y, Zhou S. Green Biosynthesized Silver Nanoparticles With Aqueous Extracts of Ginkgo Biloba Induce Apoptosis via Mitochondrial Pathway in Cervical Cancer Cells. *Front Oncol* 2020;10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.575415>.
- [343] Yuan YG, Zhang S, Hwang JY, Kong IK. Silver nanoparticles potentiates cytotoxicity and apoptotic potential of camptothecin in human cervical cancer cells. *Oxid Med Cell Longev* 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6121328>.
- [344] Xiao H, Chen Y, Alnaggar M. Silver nanoparticles induce cell death of colon cancer cells through impairing cytoskeleton and membrane nanostructure. *Micron* 2019;126. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2019.102750>.
- [345] Al-Zahrani SA, Bhat RS, Al-Onazi MA, Alwhibi MS, Soliman DA, Aljebrin NA, et al. Anticancer potential of biogenic silver nanoparticles using the stem extract of *Commiphora gileadensis* against human colon cancer cells. *Green Processing and Synthesis* 2022;11:435–44. <https://doi.org/10.1515/gps-2022-0042>.
- [346] Fahrenholtz CD, Swanner J, Ramirez-Perez M, Singh RN. Heterogeneous Responses of Ovarian Cancer Cells to Silver Nanoparticles as a Single Agent and in Combination with Cisplatin. *J Nanomater* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5107485>.
- [347] Yin M, Xu X, Han H, Dai J, Sun R, Yang L, et al. Preparation of triangular silver nanoparticles and their biological effects in the treatment of ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2022;15. <https://doi.org/10.1186/s13048-022-01056-3>.
- [348] Dasari S, Yedjou CG, Brodell RT, Cruse AR, Tchounwou PB. Therapeutic strategies and potential implications of silver nanoparticles in the management of skin cancer. *Nanotechnol Rev* 2020;9:1500–21. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2020-0117>.
- [349] Kim D, Amatya R, Hwang S, Lee S, Ah Min K, Shin MC. BSA-Silver Nanoparticles: A Potential Multimodal Therapeutics for Conventional and Photothermal Treatment of Skin Cancer. *Pharmaceutics* 2021;13:575–89. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics>.
- [350] Que YM, Fan XQ, Lin XJ, Jiang XL, Hu PP, Tong XY, et al. Size dependent anti-invasiveness of silver nanoparticles in lung cancer cells. *RSC Adv* 2019;9:21134–8. <https://doi.org/10.1039/c9ra03662h>.
- [351] Sehgal S, Kumar J, Nishtha. Involvement of gold and silver nanoparticles in lung cancer nanomedicines: A review. *Mater Today Proc* 2022;62:6468–76. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.04.199>.
- [352] Swanner J, Fahrenholtz CD, Tenvooren I, Bernish BW, Sears JJ, Hooker A, et al. Silver nanoparticles selectively treat triple-negative breast cancer cells without affecting non-malignant breast epithelial cells in vitro and in vivo. *FASEB Bioadv* 2019;1:639–60. <https://doi.org/10.1096/fba.2019-00021>.
- [353] Fang J, Islam W, Maeda H. Exploiting the dynamics of the EPR effect and strategies to improve the therapeutic effects of nanomedicines by using EPR effect enhancers. *Adv Drug Deliv Rev* 2020;157:142–60. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.005>.

- [354] Sharifi M, Cho WC, Ansariesfahani A, Tarharoudi R, Malekisarvar H, Sari S, et al. An Updated Review on EPR-Based Solid Tumor Targeting Nanocarriers for Cancer Treatment. *Cancers (Basel)* 2022;14. <https://doi.org/10.3390/cancers14122868>.
- [355] Bose T, Latawiec D, Mondal PP, Mandal S. Overview of nano-drugs characteristics for clinical application: The journey from the entry to the exit point. *Journal of Nanoparticle Research* 2014;16. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2527-7>.
- [356] Mi Y, Hagan CT, Vincent BG, Wang AZ. Emerging Nano-/Microapproaches for Cancer Immunotherapy. *Advanced Science* 2019;6. <https://doi.org/10.1002/advs.201801847>.
- [357] Rai M, Ingle AP, Gupta I, Brandelli A. Bioactivity of noble metal nanoparticles decorated with biopolymers and their application in drug delivery. *Int J Pharm* 2015;496:159–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.059>.
- [358] Abdelfattah A, Aboutaleb AE, Abdel-Aal AM, Abdellatif AAH, Tawfeek HM, Abdel-Rahman SI. Design and optimization of PEGylated silver nanoparticles for efficient delivery of doxorubicin to cancer cells. *J Drug Deliv Sci Technol* 2022;71. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103347>.
- [359] Vedelago J, Gomez CG, Valente M, Mattea F. Green synthesis of silver nanoparticles aimed at improving theranostics. *Radiation Physics and Chemistry* 2018;146:55–67. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2018.01.001>.
- [360] Sharma H, Mishra PK, Talegaonkar S, Vaidya B. Metal nanoparticles: A theranostic nanotool against cancer. *Drug Discov Today* 2015;20:1143–51. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.05.009>.
- [361] Wang L, Hasanzadeh Kafshgari M, Meunier M. Optical Properties and Applications of Plasmonic-Metal Nanoparticles. *Adv Funct Mater* 2020;30. <https://doi.org/10.1002/adfm.202005400>.
- [362] Zhang YX, Wang YH. Nonlinear optical properties of metal nanoparticles: A review. *RSC Adv* 2017;7:45129–44. <https://doi.org/10.1039/c7ra07551k>.
- [363] Mayer KM, Hafner JH. Localized surface plasmon resonance sensors. *Chem Rev* 2011;111:3828–57. <https://doi.org/10.1021/cr100313v>.
- [364] Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *Journal of Physical Chemistry B* 2003;107:668–77. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>.
- [365] Kim M, Lee JH, Nam JM. Plasmonic Photothermal Nanoparticles for Biomedical Applications. *Advanced Science* 2019;6. <https://doi.org/10.1002/advs.201900471>.
- [366] Bilankohi SM. Optical scattering and absorption characteristics of silver and silica/silver core/shell nanoparticles. *Oriental Journal of Chemistry* 2015;31:2259–63. <https://doi.org/10.13005/ojc/310452>.
- [367] Pastoriza-Santos I, Liz-Marzán LM. Colloidal silver nanoplates. State of the art and future challenges. *J Mater Chem* 2008;18:1724–37. <https://doi.org/10.1039/b716538b>.
- [368] Shanmugaraj K, Sasikumar T, Campos CH, Ilanchelian M, Mangalaraja RV, Torres CC. Colorimetric determination of cysteamine based on the aggregation of polyvinylpyrrolidone-stabilized silver nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2020;236. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118281>.

- [369] Mistrik M, Skrott Z, Muller P, Panacek A, Hochvaldova L, Chroma K, et al. Microthermal-induced subcellular-targeted protein damage in cells on plasmonic nanosilver-modified surfaces evokes a two-phase HSP-p97/VCP response. *Nat Commun* 2021;12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20989-9>.
- [370] Bian W, Wang Y, Pan Z, Chen N, Li X, Wong WL, et al. Review of Functionalized Nanomaterials for Photothermal Therapy of Cancers. *ACS Appl Nano Mater* 2021;4:11353–85. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c01903>.
- [371] Aliannezhadi M, Minbashi M, Tuchin V v. Effect of laser intensity and exposure time on photothermal therapy with nanoparticles heated by a 793-nm diode laser and tissue optical clearing. *Quantum Elec (Woodbury)* 2018;48:559–64. <https://doi.org/10.1070/qel16505>.
- [372] Fan F, Hou Y, Zhang Y, Zeng Y, Zhang Y, Zhang S, et al. Tumor imaging and photothermal therapy in second near infrared window: A systematic review and meta-analysis. *Front Oncol* 2022;12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.987491>.
- [373] Li J, Zhang W, Ji W, Wang J, Wang N, Wu W, et al. Near infrared photothermal conversion materials: mechanism, preparation, and photothermal cancer therapy applications. *J Mater Chem B* 2021;9:7909–26. <https://doi.org/10.1039/d1tb01310f>.
- [374] Pallavicini P, Dacarro G, Taglietti A. Self-Assembled Monolayers of Silver Nanoparticles: From Intrinsic to Switchable Inorganic Antibacterial Surfaces. *Eur J Inorg Chem* 2018;2018:4846–55. <https://doi.org/10.1002/ejic.201800709>.
- [375] Goda RM, El-Baz AM, Khalaf EM, Alharbi NK, Elkhooly TA, Shohayeb MM. Combating Bacterial Biofilm Formation in Urinary Catheter by Green Silver Nanoparticle. *Antibiotics* 2022;11. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040495>.
- [376] Cloutier M, Mantovani D, Rosei F. Antibacterial Coatings: Challenges, Perspectives, and Opportunities. *Trends Biotechnol* 2015;33:637–52. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.09.002>.
- [377] Xiong Z, Liu L, Zhang Z, Cao L, Cao D, Du Z, et al. Unravelling the role of surface modification in the dermocompatibility of silver nanoparticles in vitro and in vivo. *Chemosphere* 2022;291. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133111>.
- [378] Richardson JJ, Cui J, Björnmalm M, Braunger JA, Ejima H, Caruso F. Innovation in Layer-by-Layer Assembly. *Chem Rev* 2016;116:14828–67. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00627>.
- [379] Vasilev K, Sah VR, Goreham R v., Ndi C, Short RD, Griesser HJ. Antibacterial surfaces by adsorptive binding of polyvinyl-sulphonate- stabilized silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2010;21. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/21/215102>.
- [380] Kuddannaya S, Chuah YJ, Lee MHA, Menon N v., Kang Y, Zhang Y. Surface chemical modification of poly(dimethylsiloxane) for the enhanced adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013;5:9777–84. <https://doi.org/10.1021/am402903e>.
- [381] Srivastava S, Kotov NA. Composite Layer-by-Layer (LBL) assembly with inorganic nanoparticles and nanowires. *Acc Chem Res* 2008;41:1831–41. <https://doi.org/10.1021/ar8001377>.

- [382] D'Agostino A, Taglietti A, Grisoli P, Dacarro G, Cucca L, Patrini M, et al. Seed mediated growth of silver nanoplates on glass: Exploiting the bimodal antibacterial effect by near IR photo-thermal action and Ag⁺ release. *RSC Adv* 2016;6:70414–23. <https://doi.org/10.1039/c6ra11608f>.
- [383] Kaur S, Tambat R, Pathania V, Nandanwar H, Soni S. Photo-thermally enhanced antimicrobial efficacy of silver nanoplates against Gram-negative, Gram-positive bacterial and fungal pathogens. *J Appl Microbiol* 2022;133:569–78. <https://doi.org/10.1111/jam.15588>.
- [384] Liu Y, Li F, Guo Z, Xiao Y, Zhang Y, Sun X, et al. Silver nanoparticle-embedded hydrogel as a photothermal platform for combating bacterial infections. *Chemical Engineering Journal* 2020;382. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122990>.
- [385] D'Agostino A, Taglietti A, Desando R, Bini M, Patrini M, Dacarro G, et al. Bulk surfaces coated with triangular silver nanoplates: Antibacterial action based on silver release and photo-thermal effect. *Nanomaterials* 2017;7. <https://doi.org/10.3390/nano7010007>.
- [386] Correia JH, Rodrigues JA, Pimenta S, Dong T, Yang Z. Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics* 2021;13. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>.
- [387] Wei X, Luo M, Li W, Yang L, Liang X, Xu L, et al. Synthesis of silver nanoparticles by solar irradiation of cell-free *Bacillus amyloliquefaciens* extracts and AgNO₃. *Bioresour Technol* 2012;103:273–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.118>.
- [388] Sun P, Ye L, Tan X, Peng J, Zhao L, Zhou Y. Silver Nanoparticle-Assisted Photodynamic Therapy for Biofilm Eradication. *ACS Appl Nano Mater* 2022;5:8251–9. <https://doi.org/10.1021/acsanm.2c01327>.
- [389] Shabangu SM, Babu B, Soy RC, Managa M, Sekhosana KE, Nyokong T. Photodynamic antimicrobial chemotherapy of asymmetric porphyrin-silver conjugates towards photoinactivation of *Staphylococcus aureus*. *J Coord Chem* 2020;73:593–608. <https://doi.org/10.1080/00958972.2020.1739273>.
- [390] Ding R, Yu X, Wang P, Zhang J, Zhou Y, Cao X, et al. Hybrid photosensitizer based on amphiphilic block copolymer stabilized silver nanoparticles for highly efficient photodynamic inactivation of bacteria. *RSC Adv* 2016;6:20392–8. <https://doi.org/10.1039/c6ra01660j>.
- [391] Ribeiro MS, de Melo LSA, Farooq S, Baptista A, Kato IT, Núñez SC, et al. Photodynamic inactivation assisted by localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles: In vitro evaluation on *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2018;22:191–6. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.04.007>.
- [392] Misba L, Kulshrestha S, Khan AU. Antibiofilm action of a toluidine blue O-silver nanoparticle conjugate on *Streptococcus mutans*: a mechanism of type I photodynamic therapy. *Biofouling* 2016;32:313–28. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1141899>.
- [393] Lyutakov O, Hejna O, Solovyev A, Kalachyova Y, Svorcik V. Polymethylmethacrylate doped with porphyrin and silver nanoparticles as light-activated antimicrobial material. *RSC Adv* 2014;4:50624–30. <https://doi.org/10.1039/c4ra08385g>.

- [394] Nakonieczna J, Rapacka-Zdonczyk A, Kawiak A, Bielawski KP, Grinholc M. Sub-lethal photodynamic inactivation renders *Staphylococcus aureus* susceptible to silver nanoparticles. *Photochemical and Photobiological Sciences* 2013;12:1622–7. <https://doi.org/10.1039/c3pp50039j>.
- [395] Fernandes N, Rodrigues CF, Moreira AF, Correia IJ. Overview of the application of inorganic nanomaterials in cancer photothermal therapy. *Biomater Sci* 2020;8:2990–3020. <https://doi.org/10.1039/d0bm00222d>.
- [396] Lv Z, He S, Wang Y, Zhu X. Noble Metal Nanomaterials for NIR-Triggered Photothermal Therapy in Cancer. *Adv Healthc Mater* 2021;10. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001806>.
- [397] Bose P, Priyam A, Kar R, Pattanayak SP. Quercetin loaded folate targeted plasmonic silver nanoparticles for light activated chemo-photothermal therapy of DMBA induced breast cancer in Sprague Dawley rats. *RSC Adv* 2020;10:31961–78. <https://doi.org/10.1039/d0ra05793b>.
- [398] Thompson EA, Graham E, Macneill CM, Young M, Donati G, Wailes EM, et al. Differential response of MCF7, MDA-MB-231, and MCF 10A cells to hyperthermia, silver nanoparticles and silver nanoparticle-induced photothermal therapy. *International Journal of Hyperthermia* 2014;30:312–23. <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.936051>.
- [399] Boca-Farcau S, Potara M, Simon T, Juhem A, Baldeck P, Astilean S. Folic acid-conjugated, SERS-labeled silver nanotriangles for multimodal detection and targeted photothermal treatment on human ovarian cancer cells. *Mol Pharm* 2014;11:391–9. <https://doi.org/10.1021/mp400300m>.
- [400] Shivashankarappa A, Sanjay KR. Photodynamic therapy on skin melanoma and epidermoid carcinoma cells using conjugated 5-aminolevulinic acid with microbial synthesised silver nanoparticles. *J Drug Target* 2019;27:434–41. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1531418>.
- [401] Boca SC, Potara M, Gabudean AM, Juhem A, Baldeck PL, Astilean S. Chitosan-coated triangular silver nanoparticles as a novel class of biocompatible, highly effective photothermal transducers for in vitro cancer cell therapy. *Cancer Lett* 2011;311:131–40. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.06.022>.
- [402] Marghani BH, Fehaid A, Ateya AI, Ezz MA, Saleh RM. Photothermal therapeutic potency of plasmonic silver nanoparticles for apoptosis and anti-angiogenesis in testosterone induced benign prostate hyperplasia in rats. *Life Sci* 2022;291. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120240>.
- [403] Hartl FU. Protein Misfolding Diseases. *Annual Reviews Biochemistry* 2017;86:21–6. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem>.
- [404] Röderova M, Halova D, Papousek I, Dolejska M, Masarikova M, Hanulik V, et al. Characteristics of quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment in the Czech Republic. *Front Microbiol* 2017;7:1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02147>.
- [405] EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2021. <http://www.eucast.org>.

- [406] Kvítek L, Pucek R, Panáček A, Novotný R, Hrbáč J, Zbořil R. The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis. *J Mater Chem* 2005;15:1099–105. <https://doi.org/10.1039/b417007e>.
- [407] Bakandritsos A, Pykal M, Boński P, Jakubec P, Chronopoulos DD, Poláková K, et al. Cyanographene and Graphene Acid: Emerging Derivatives Enabling High-Yield and Selective Functionalization of Graphene. *ACS Nano* 2017;11:2982–91. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b08449>.
- [408] Svoboda L, Dvorsky R, Bednar J, Matysek D, Pomiklova M. Influence of different preparation methods of silver-modified carbon nitride on the photocatalytic activity towards indigo carmine dye. *Materials Science Forum* 2020;990:133–8. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.990.133>.
- [409] Asadishad B, Hidalgo G, Tufenkji N. Pomegranate materials inhibit flagellin gene expression and flagellar-propelled motility of uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073. *FEMS Microbiol Lett* 2012;334:87–94. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02622.x>.
- [410] Panáček A, Balzerová A, Pucek R, Ranc V, Večeřová R, Husíčková V, et al. Preparation, characterization and antimicrobial efficiency of Ag/PDDA-diatomite nanocomposite. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013;110:191–8. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.04.031>.
- [411] Hochvaldová L, Panáček D, Válková L, Pucek R, Kohlová V, Večeřová R, et al. Restoration of antibacterial activity of inactive antibiotics via combined treatment with a cyanographene/Ag nanohybrid. *Sci Rep* 2022;12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09294-7>.
- [412] Praus P, Svoboda L, Ritz M, Troppová I, Šihor M, Kočí K. Graphitic carbon nitride: Synthesis, characterization and photocatalytic decomposition of nitrous oxide. *Mater Chem Phys* 2017;193:438–46. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2017.03.008>.
- [413] Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2018;18:318–27. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3).
- [414] Khalil O, Enbaawy MI, Salah T, Mahmoud H, Ragab E. In Vitro Investigation of the Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles on ESBL-producing *E. coli* and *Klebsiella* spp. Isolated from Pet Animals. *Worlds Veterinary Journal* 2020;10:514–24. <https://doi.org/10.36380/scil.2020.wvj62>.
- [415] Alqahtani MA, al Othman MR, Mohammed AE. Bio fabrication of silver nanoparticles with antibacterial and cytotoxic abilities using lichens. *Sci Rep* 2020;10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73683-z>.
- [416] Hamida RS, Ali MA, Goda DA, Khalil MI, Al-Zaban MI. Novel Biogenic Silver Nanoparticle-Induced Reactive Oxygen Species Inhibit the Biofilm Formation and Virulence Activities of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strain. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00433>.
- [417] Rai MK, Deshmukh SD, Ingle AP, Gade AK. Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J Appl Microbiol* 2012;112:841–52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x>.

- [418] Jorge de Souza TA, Rosa Souza LR, Franchi LP. Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity. *Ecotoxicol Environ Saf* 2019;171:691–700. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.095>.
- [419] Mosselhy DA, He W, Li D, Meng Y, Feng Q. Silver nanoparticles: in vivo toxicity in zebrafish embryos and a comparison to silver nitrate. *Journal of Nanoparticle Research* 2016;18. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3514-y>.
- [420] Kwan KHL, Yeung KWK, Liu X, Wong KKY, Shum HC, Lam YW, et al. Silver nanoparticles alter proteoglycan expression in the promotion of tendon repair. *Nanomedicine* 2014;10:1375–83. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.11.015>.
- [421] Salas-Orozco M, Niño-Martínez N, Martínez-Castañón GA, Méndez FT, Jasso MEC, Ruiz F. Mechanisms of resistance to silver nanoparticles in endodontic bacteria: A literature review. *J Nanomater* 2019;2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7630316>.
- [422] Jacqueline C, Caillon J. Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2014;69. <https://doi.org/10.1093/jac/dku254>.
- [423] Black CE, Costerton JW. Current Concepts Regarding the Effect of Wound Microbial Ecology and Biofilms on Wound Healing. *Surgical Clinics of North America* 2010;90:1147–60. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.08.009>.
- [424] Venkatesan N, Perumal G, Doble M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiol* 2015;10:1743–50. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.69>.
- [425] Craft KM, Nguyen JM, Berg LJ, Townsend SD. Methicillin-resistant: *Staphylococcus aureus* (MRSA): Antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *Medchemcomm* 2019;10:1231–41. <https://doi.org/10.1039/c9md00044e>.
- [426] Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of Coagulase-Negative *Staphylococci* to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of *Staphylococci* to Medical Devices. *J Clin Microbiol* 1985;22:996–1006.
- [427] Meléndez PA, Capriles VA. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine* 2006;13:272–6. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.11.009>.
- [428] Braga LC, Shupp JW, Cummings C, Jett M, Takahashi JA, Carmo LS, et al. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *J Ethnopharmacol* 2005;96:335–9. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.08.034>.
- [429] Trevizol JS, Martins BL, Queiroz-Fernandes GM de. Resistance to polymyxins in *Escherichia coli*. *J Exp Clin Microbiol* 2018;1:8–11.
- [430] Zhao S, Zhang K, An J, Sun Y, Sun C. Synthesis and layer-by-layer self-assembly of silver nanoparticles capped by mercaptosulfonic acid. *Mater Lett* 2006;60:1215–8. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2005.11.007>.
- [431] Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Ulrich Hartl F. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem* 2013;82:323–55. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442>.
- [432] Kovács D, Igaz N, Gopisetty MK, Kiricsi M. Cancer Therapy by Silver Nanoparticles: Fiction or Reality? *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/ijms23020839>.

Anotace

Disertační práce se zaměřuje na výzkum v oblasti syntézy nanostrukturních materiálů na bázi stříbra, studiu jejich interakce s bakteriálními a savčími buňkami, a potenciální využití v biologických aplikacích. V současné době představuje nárůst počtu bakteriálních infekcí vyvolaných bakteriemi rezistentními vůči běžně využívaným antibiotikům velký terapeutický problém, a proto je v rámci této práce studována antibakteriální aktivita nanomateriálů, jež představují možnou alternativu v boji proti rezistentním bakteriálním kmenům. Krom samotných účinků a mechanismů účinků nanomateriálů na bázi stříbra jsou testovány jejich antibakteriální účinky i v kombinaci s antibiotiky, jež jsou vůči daným rezistentním bakteriálním kmenům neúčinné, a přidavkem velmi malého množství antibakteriálního materiálu k antibiotiku se pokouší dané mechanismy rezistence překonat. S ohledem na to, že jsou si bakterie schopny vytvořit různé mechanismy obrany vůči široké škále antibiotik, je tato schopnost studována i v případě nanomateriálů. Krom samotné biologické aktivity nanočástic stříbra jsou testovány i toxické účinky vůči zvířecím a lidským buňkám, jejichž výsledky slouží k eliminaci toxických koncentrací, jež s ohledem na jejich negativní účinky nelze v antibakteriální terapii použít. Kromě přímého biologického efektu nanočástic stříbra je také využíváno jejich biologické aktivity vyvolané prostřednictvím fototermálního efektu, tedy za využití absorbované světelné energie a následné transformace na tepelnou, která v důsledku zvýšení teploty vede například k usmrcení nádorových buněk nebo sledování tepelného poškození buněčných proteinů.

Annotation

The dissertation focuses on the synthesis of silver-based nanostructured materials, studying their interaction with bacterial and mammalian cells and their potential use in biological applications. Nowadays, the increase in the number of bacterial infections caused by bacteria resistant to commonly used antibiotics is a major therapeutic problem. Therefore, the antibacterial activity of the nanomaterials is studied as a possible alternative in the fight against resistant strains. In addition to the antibacterial studies and studies of the mechanisms of action of silver-based nanomaterials, their antibacterial effects are also tested in combination with antibiotics that are currently ineffective against given resistant strains. The addition of very small amounts of antibacterial material to the antibiotic attempts to overcome the given resistance mechanisms and are studied in respect to the mechanism of action of the antibiotic. Bacteria are able to develop different defence mechanisms against a wide range of antibiotics, therefore this ability is investigated also in the case of the nanomaterials. In addition to the biological activity of silver nanoparticles themselves, toxic effects against animal and human cell lines are tested, and toxic concentrations are eliminated for further antibacterial therapy. In addition to the direct biological effect of silver nanoparticles, their biological activity induced by photothermal action, i.e. the use of absorbed light energy and subsequent transformation to thermal energy. The increase of the temperature cause thermal damage to cellular proteins and is further exploited within this study.

SEZNAM PŘÍLOH

Odborné vědecké publikace:

1. **Hochvaldová L**, Panáček D, Válková L, Pucek R, Kohlová V, Večeřová R, et al. Restoration of antibacterial activity of inactive antibiotics via combined treatment with a cyanographene/Ag nanohybrid. *Sci Rep* 2022;12.
2. **Hochvaldová L**, Večeřová R, Kolář M, Pucek R, Kvítek L, Lapčík L, et al. Antibacterial nanomaterials: Upcoming hope to overcome antibiotic resistance crisis. *Nanotechnol Rev* 2022;11:1115–42.
3. Panáček D, **Hochvaldová L**, Bakandritsos A, Malina T, Langer M, Belza J, et al. Silver Covalently Bound to Cyanographene Overcomes Bacterial Resistance to Silver Nanoparticles and Antibiotics. *Advanced Science* 2021;2003090:3–10.
4. Svoboda L, Bednar J, Dvorsky R, Panacek A, **Hochvaldova L**, Kvitek L, et al. Crucial cytotoxic and antimicrobial activity changes driven by amount of doped silver in biocompatible carbon nitride nanosheets. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2021;202.
5. Mistrik M, Skrott Z, Muller P, Panacek A, **Hochvaldova L**, Chroma K, et al. Microthermal-induced subcellular-targeted protein damage in cells on plasmonic nanosilver-modified surfaces evokes a two-phase HSP-p97/VCP response. *Nat Commun* 2021;12.