

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 až 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),

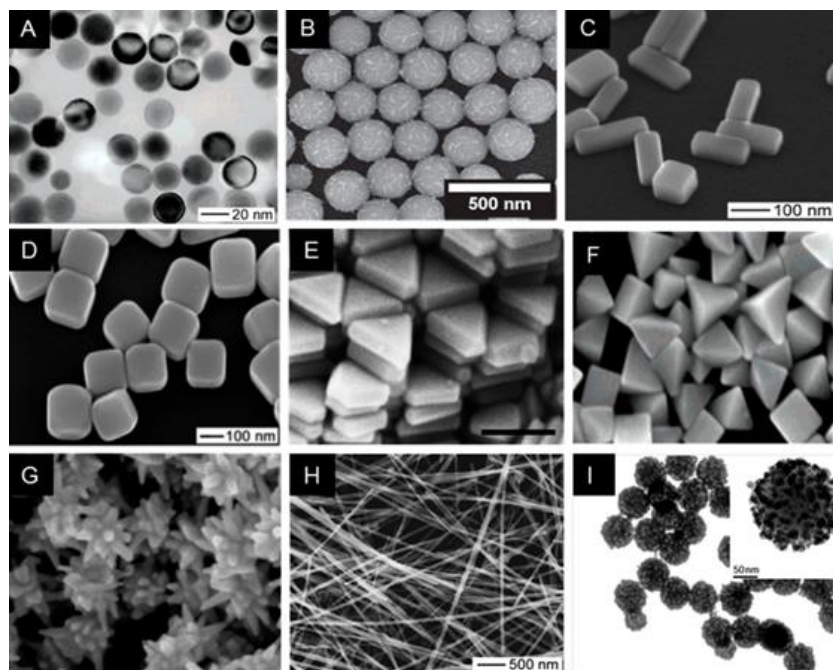
redukovaný oxid grafenu (rGO), nitrit grafitu ($g-C_3N_4$) a spousta dalších vrstevnatých materiálů. Jako jedny z nejtenčích materiálů mají 2D nanomateriály ze všech známých materiálů největší specifický povrch, čímž disponují velkým množstvím reaktivních míst na jejich povrchu. [16] Tenkost těchto materiálů 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 matrici 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

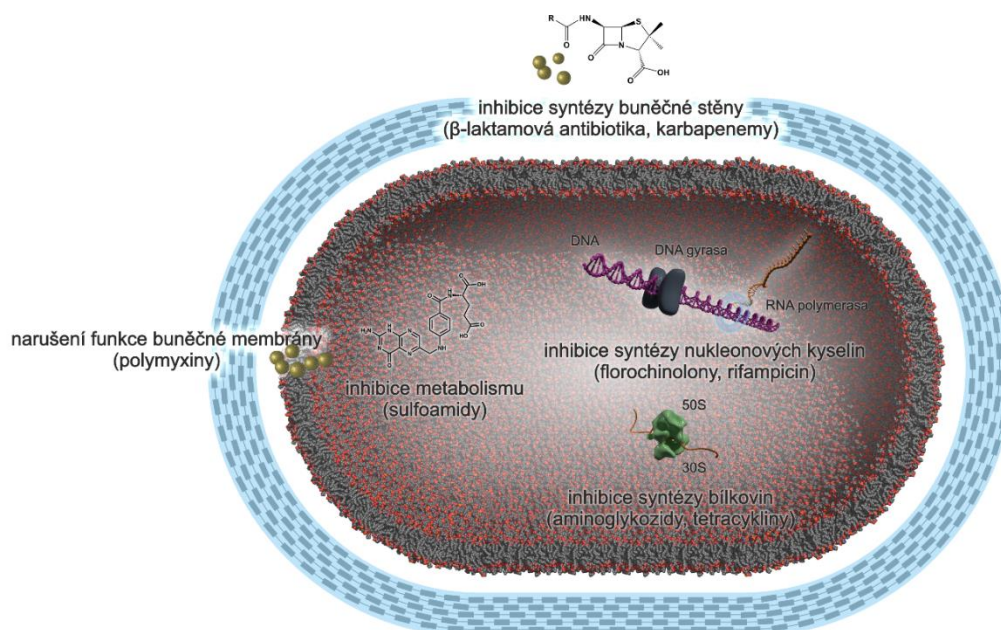
3.1.1 Antibakteriální terapie dnes

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.



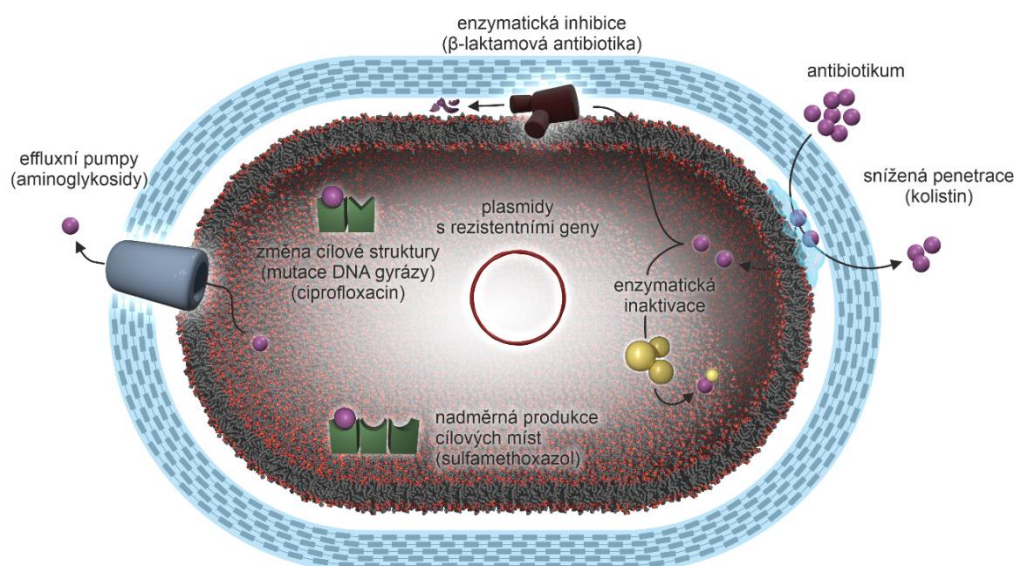
Obrázek 2. Mechanismy účinku antibiotik. [136]

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]

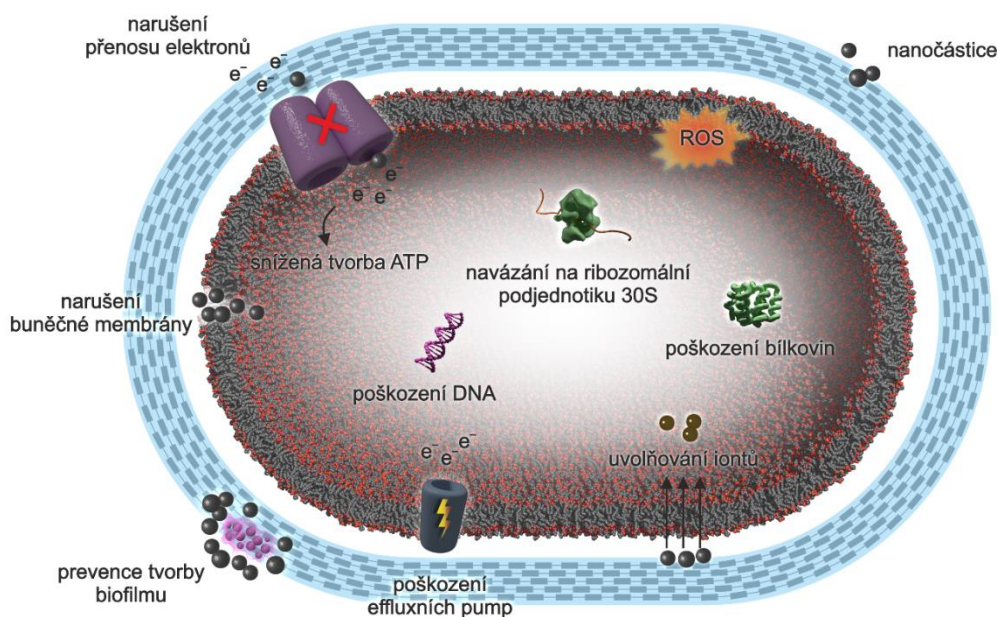
Protože se zdá nepravděpodobné, že by nová antibiotika v blízké budoucnosti poskytla způsob, jak rychle překonat bakteriální rezistenci, potřebujeme alternativní způsoby překonání bakteriální rezistence. Velmi slibnou možností je kombinovaná léčba, při níž se tradiční antibiotika kombinují s dalšími 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

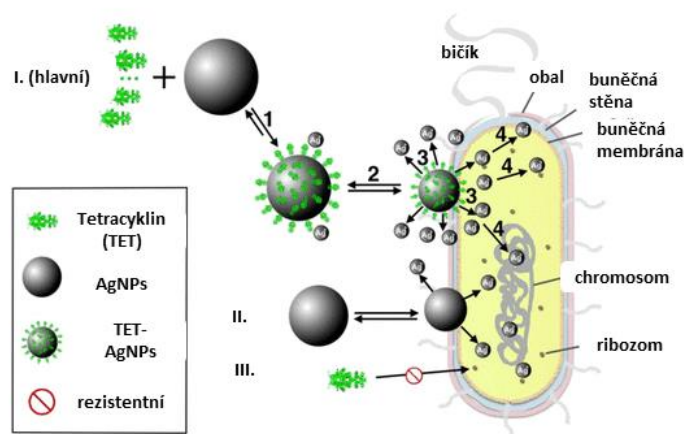
Přesný mechanismus účinku nanočástic stříbra není doposud zcela objasněn, což komplikuje pochopení interakcí mezi nanočásticemi a bakteriálními buňkami. Všechny existující údaje však naznačují, že stříbrné nanočástice vykazují paralelně různé antibakteriální mechanismy a nespecificky se vážou na širokou 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 tkáně a zlepšení odpovědi pacientů na danou léčbu. Léčba nádorových onemocněních se v současné době ubírá směrem personalizované terapie,

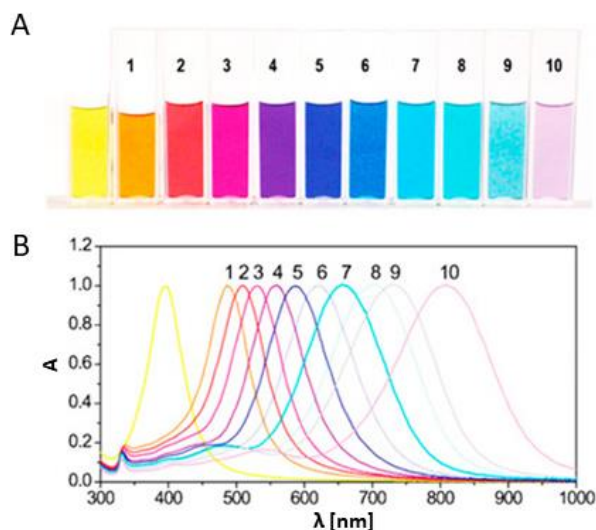
přičemž do popředí se dostává teranostika, což je kombinace jak samotné diagnostiky nádorového onemocnění, tak následná terapie. [359]

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

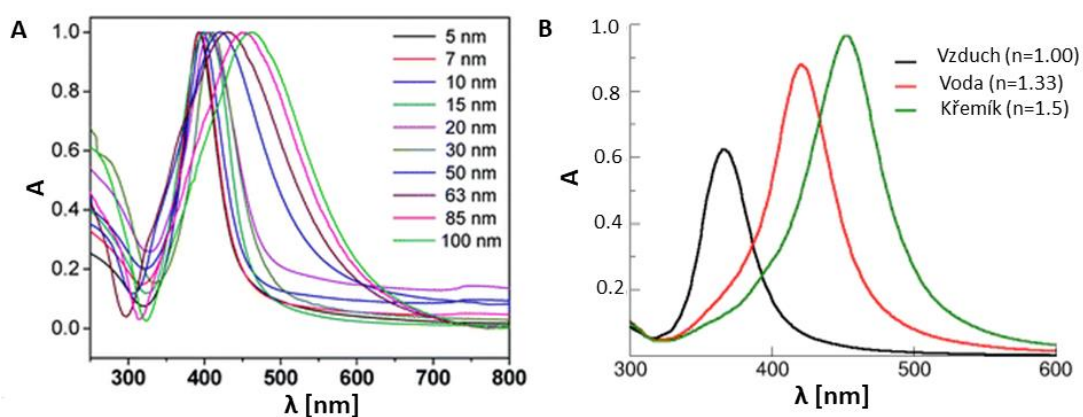
Nanočástice stříbra absorbují a rozptylují světlo s mimořádnou účinností, a to v širokém rozsahu vlnových délek. K jejich silné interakci se světlem dochází proto, že volné elektrony ve vodivostním pásu v blízkosti povrchu částic podléhají po excitaci světlem o specifických vlnových délkách koherentním 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 absorpenci 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]

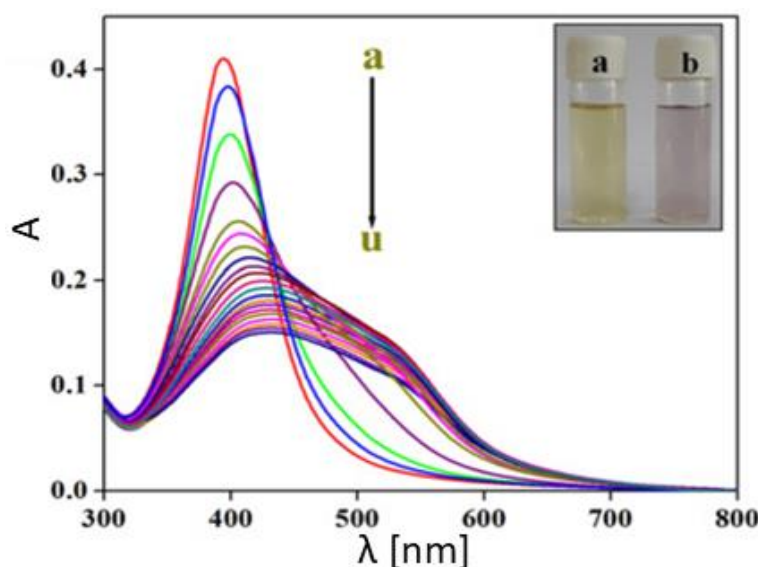


Obrázek 7. Absorpční spektra nanočástic stříbra různých velikostí (A), [33]
spektra nanočástic v prostředí s různým indexem lomu (B). [366]

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]

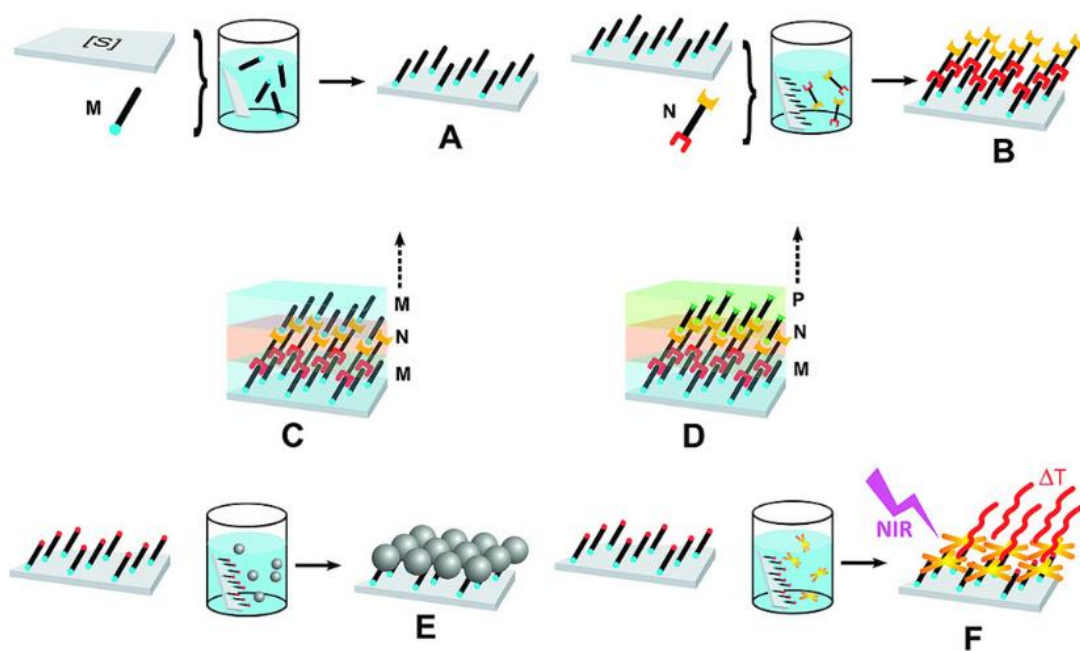
Příprava materiálů pro fototermální terapii

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]

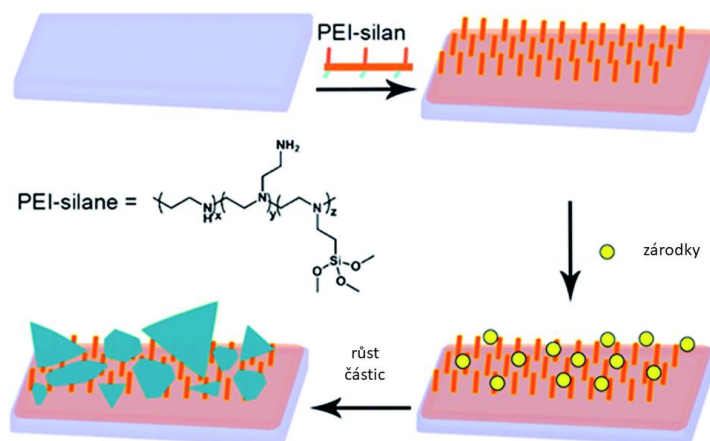
Modifikace povrchu vrstvami stříbrných nanočástic může být odpovědí nejen na problém mikrobiálních infekcí a vzniku bakteriálních biofilmů na povrchu stříbrem funkcionalizovaných zdravotnických prostředků, jako jsou protézy a katetry ale mohou zvýšit stabilitu částic, zabránit cytotoxicitě vůči živým 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 alkoksysilanovým 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 aktivovanému 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 ($\geq 99\%$), 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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, nanosena 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.

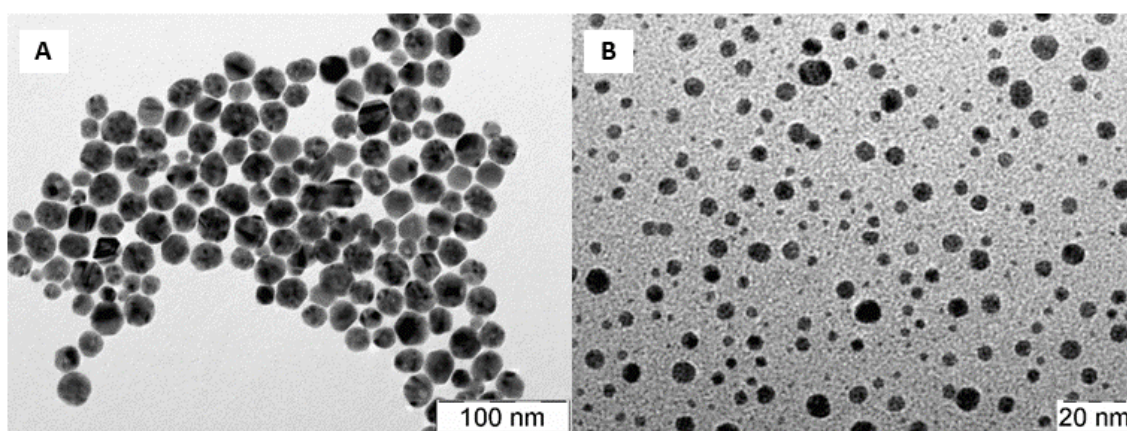
10.2 MTT test

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

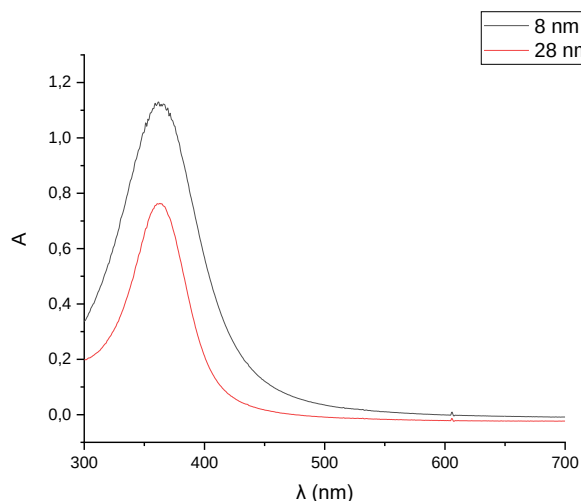
11. Příprava a stabilizace nanočástic

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.



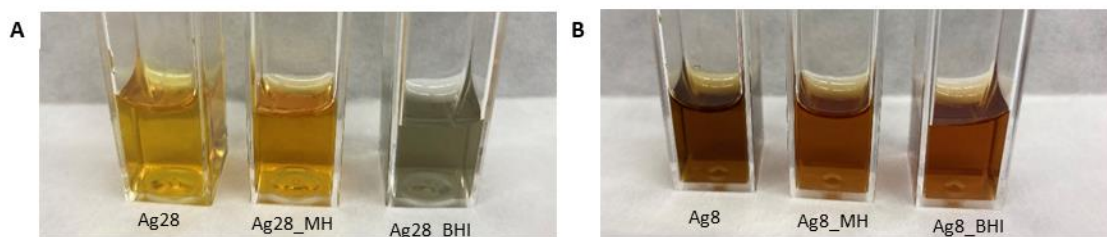
Obrázek 11. Snímky nanočástic stříbra z transmisního elektronového mikroskopu připravené redukcí maltózou (A), tetrahydridoboritanem sodným (B).

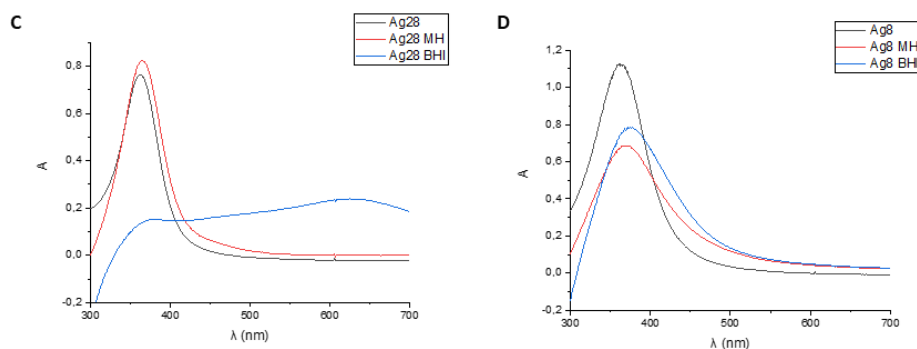
V rámci charakterizace nanočástic byla změřena jejich absorpční spektra v UV/VIS oblasti, na nichž byl pozorován výrazný pík v oblasti 400 nm, což je lokalizovaná plazmonová rezonance (LSPR) charakteristická pro stříbrné nanočástice. (Obrázek 12) Poměrně úzká šířka píků pak naznačuje úzkou distribuci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



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

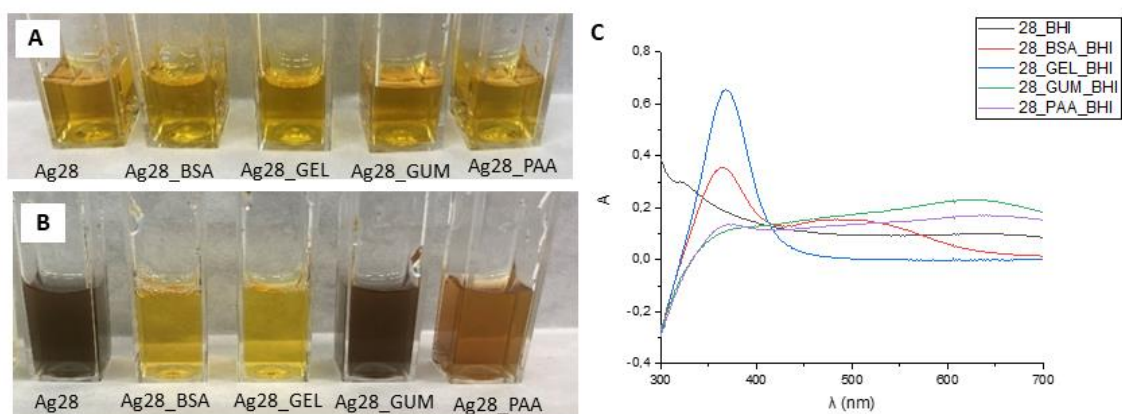
Částice mají vysokou hodnotu zeta potenciálu (-29 mV) a jsou ve vodné disperzi dlouhodobě stabilní. Pokud ale dále přemýšlíme o využití v antibakteriální terapii, popřípadě o translaci do medicínální praxe, je potřeba dále sledovat i interakci s bakteriálními a buněčnými médii *in vitro*, tedy stabilitu 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).





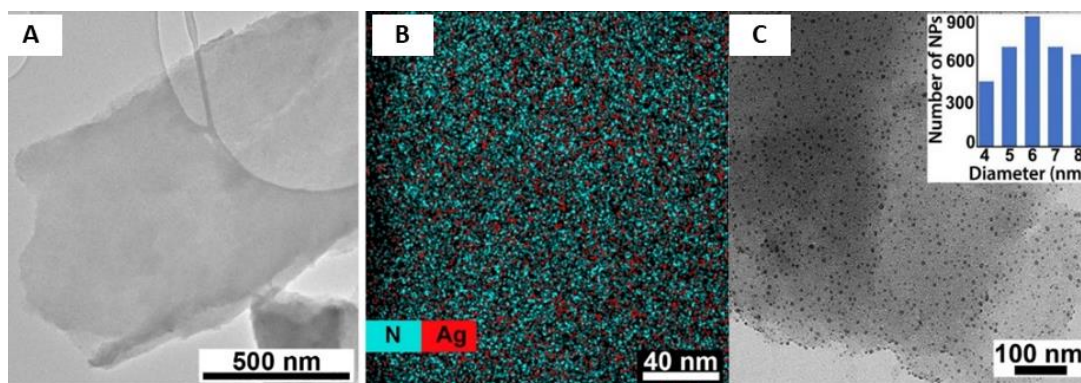
Obrázek 13. Fotografie a absorpční spektra vodných disperzí stříbrných nanočástic o velikosti 28 (A, C) a 8 nm (B, D) ihned po přípravě a nanočástic po interakci s bakteriálním bujónem (MH, BHI).

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.



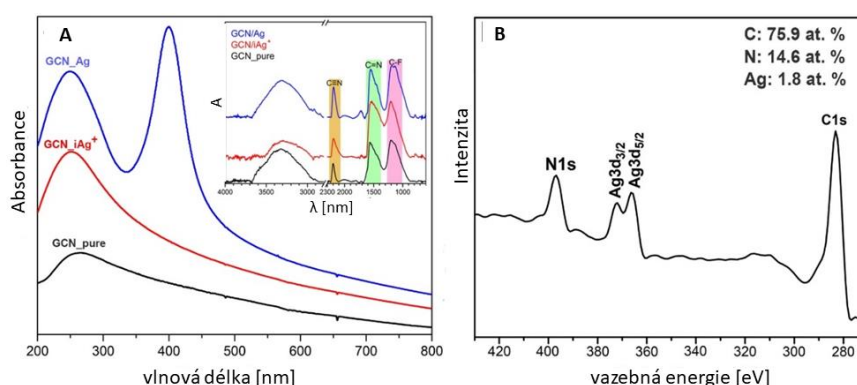
Obrázek 14. Fotografie vodných disperzí různě stabilizovaných nanočástic stříbra Ag28 (A), a fotografie těchto nanočástic po interakci s BHI bujonom (B). Absorpční spektra stabilizovaných částic v BHI bujonu (C).

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 vložek 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]

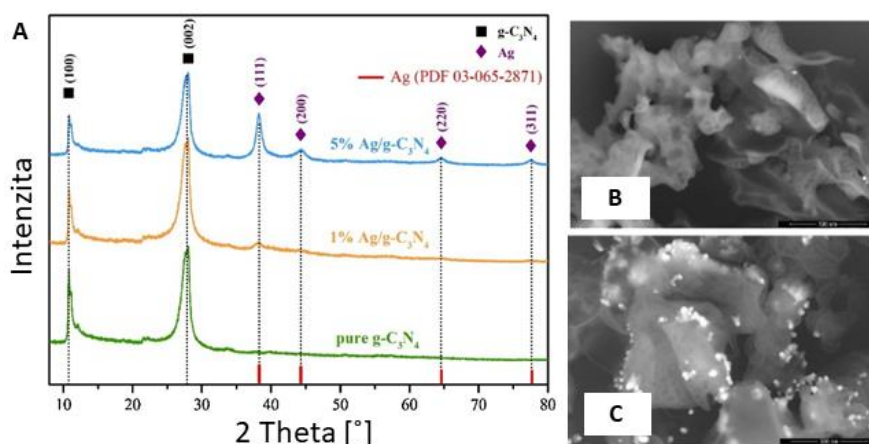
Absorpční spektrofotometrie prekurzorů GCN/Ag⁺ a vodných disperzí GCN/Ag potvrdila, že nanočástice vznikly až po přidavku redukčního činidla (Obrázek 16A) a to na základě výskytu charakteristické povrchové plazmonové rezonance stříbrných nanočástic při vlnové délce 400 nm. [33] Nitrilové skupiny byly 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 redukováného 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), GCN_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 g-C₃N₄ 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 g-C₃N₄. [49] Druhá fáze přípravy zahrnovala 10minutové ozáření (416 nm, 10 W LED) g-C₃N₄ s již adsorbovanými Ag⁺ ionty, které byly vlivem záření redukovány na stříbrné nanočástice a mohl tak vzniknout nanokompozit Ag/ g-C₃N₄. 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

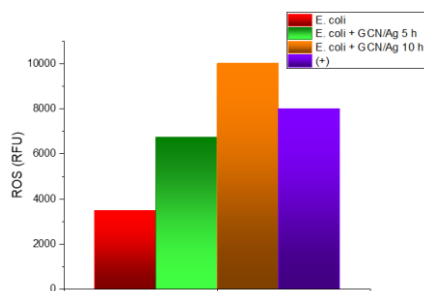
Vysoká antibakteriální aktivita nanočástic stříbra různých velikostí, tvarů a povrchových modifikací byla v minulosti široce studována a byla popsána v celé řadě vědeckých publikací, jež jsou v krátkosti popsány v rámci teoretické části této práce. Námi získané výsledky pro různě velké nanočástice (Ag8, 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]

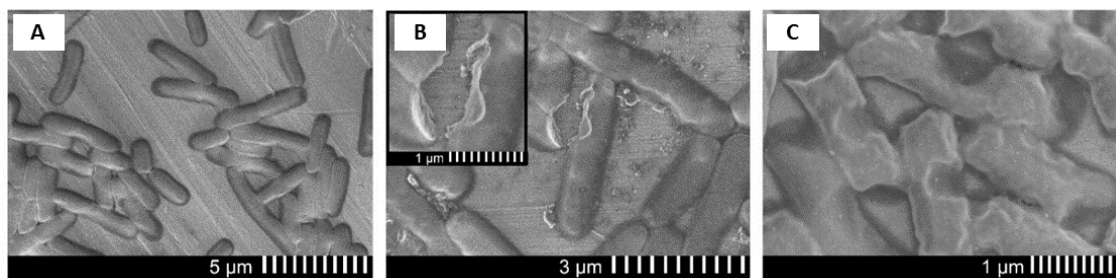
Mechanismus antibakteriálního účinku

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.

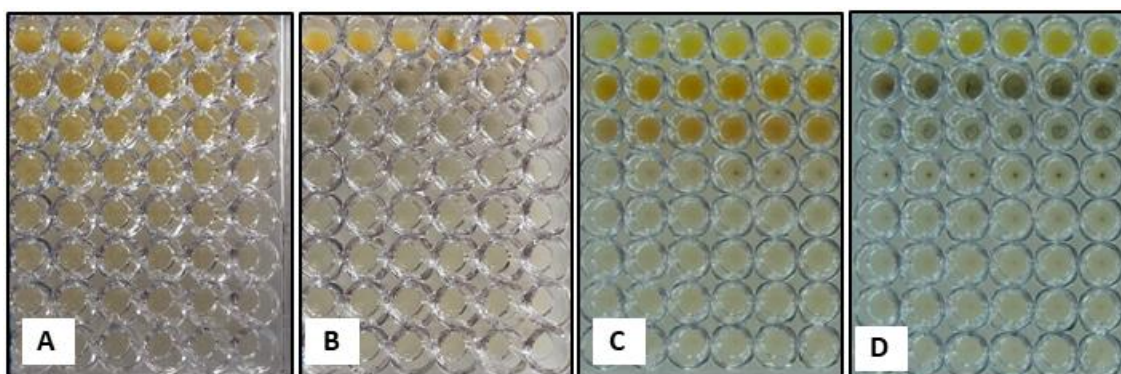
Rezistence vůči nanočásticím stříbra byla už dříve v rámci naší skupiny indukována u Gram-negativní bakterie *E. coli* a *P. aeruginosa*. V rámci tohoto výzkumu pak bylo cílem prokázat možnost tvorby rezistence vůči stříbrným nanočásticím i u Gram-pozitivního kmene *S. aureus*. Minimální inhibiční koncentrace 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

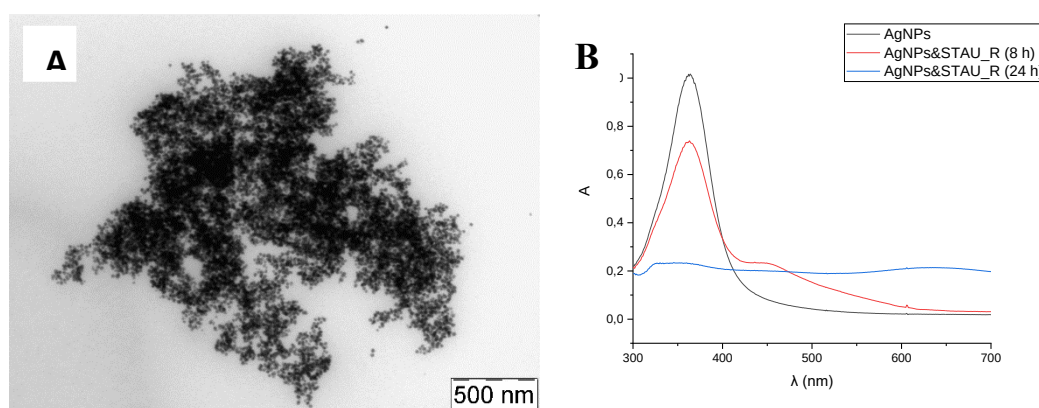
* MIC je vždy vztažena na množství stříbra v disperzi. Maximální hodnota MIC je omezena koncentrací nanočástic, přičemž nejvyšší testovaná koncentrace může být maximálně poloviční. U nanočástic stříbra o koncentraci 108 mg/L, je tedy max stanovená MIC 54 mg/L, respektive MIC >54 mg/L.

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 agregací 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.



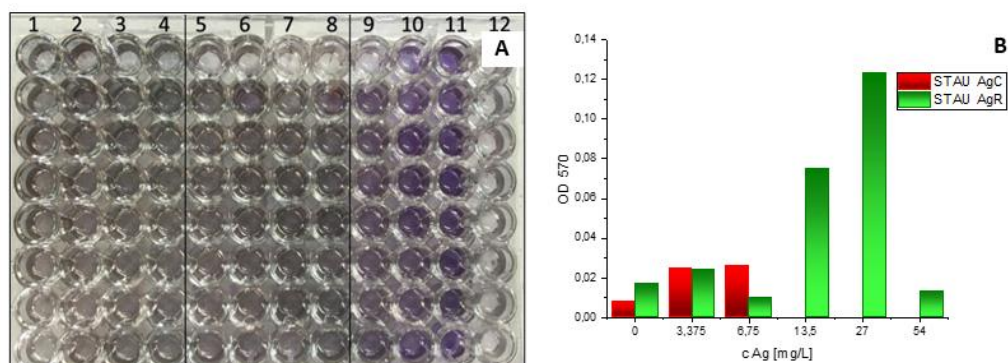
Obrázek 21. A) TEM snímek agregovaných částic po 24 h kultivaci s rezistentním *S. aureus*. B) absorpční spektra stříbrných nanočástic zředěných v Muellerově-Hintonově bujónu v poměru 1:1 před (původní disperze) a po kultivaci citlivého a rezistentního *S. aureus* CCM 3953.

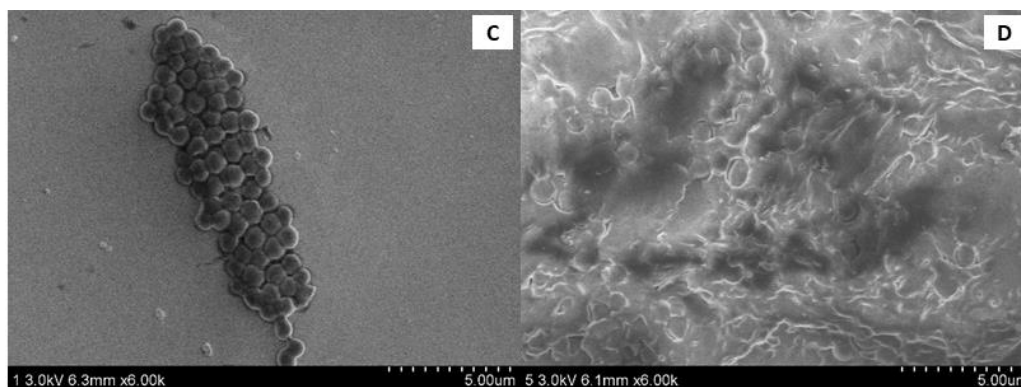
V případě *E. coli* byl mechanismus rezistence již dříve popsán Panáčkem a kol., kteří uvádí, že za tvorbou agregátů nanočástic stříbra stojí produkce bakteriálního proteinu flagelinu. Flagelum a flagelin jsou výsadou Gram-negativních bakterií, a nelze

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.





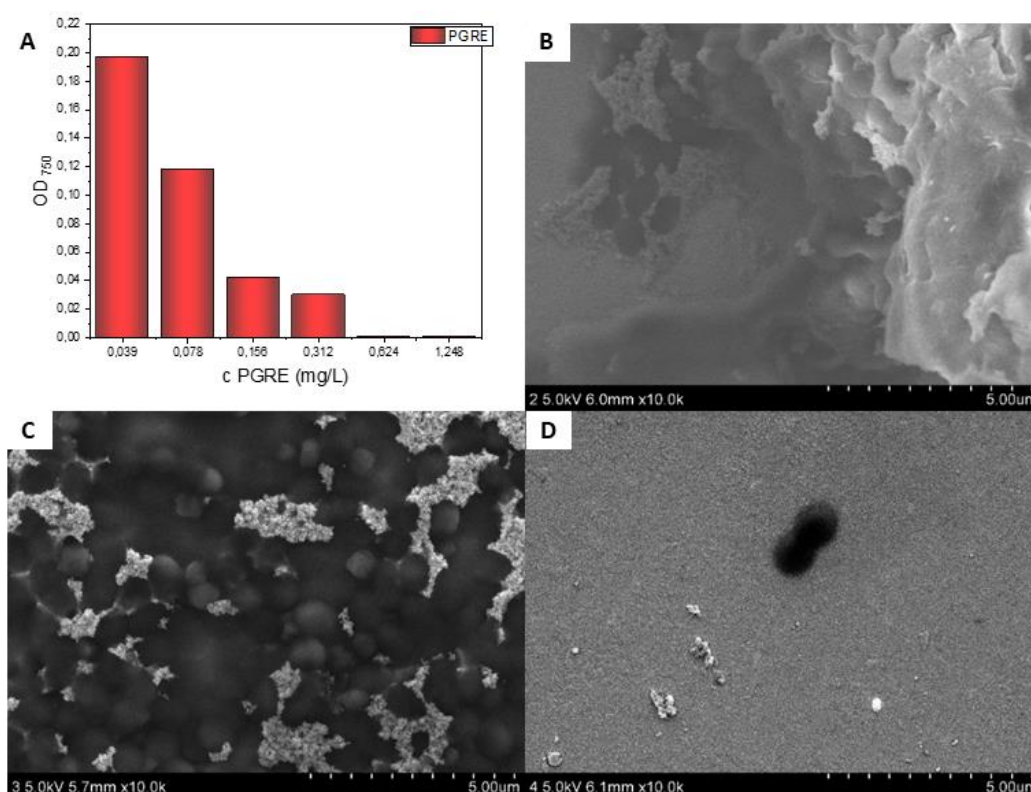
Obrázek 22. A) 96jamková destička inkubovaná bez bakterií (sloupec 1-4, reference), inkubovaná s citlivým (5-8) nebo rezistentním kmenem (9-11) *S. aureus*. Biofilm na dně jamek byl po 24 h kultivaci obarven krystalovou violetí (viz. Christensenova metoda) a následně byla změřena jejich optická hustota 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	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	[mg/L]
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]													

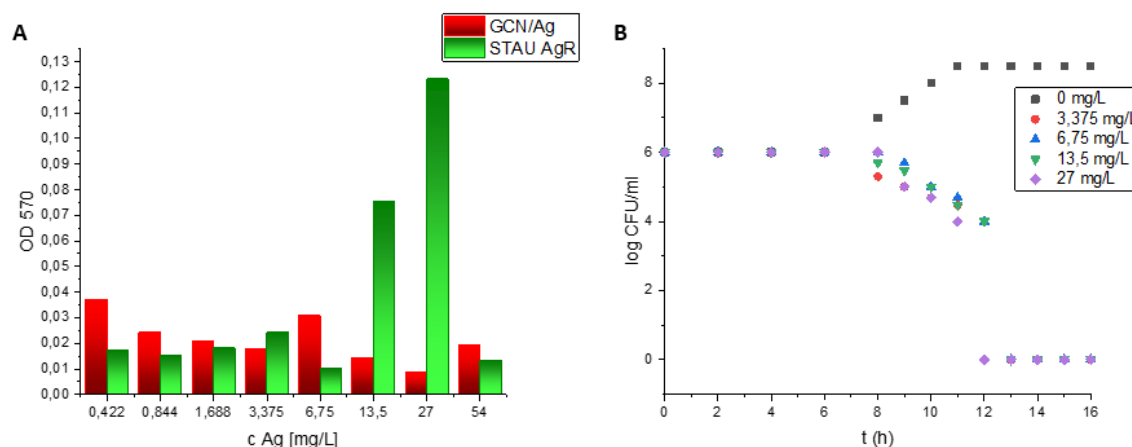
Obrázek 23. Schéma znázorňující růst bakteriálního kmene *S. aureus* rezistentního k AgNPs (šedě) na mikrotitračních destičkách při testování synergického účinku AgNPs spolu s PGRE. V rámci tabulky jsou vypočtené FIC pro jednotlivé kombinace PGRE-AgNPs a modře je zobrazena minimální inhibiční koncentrace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



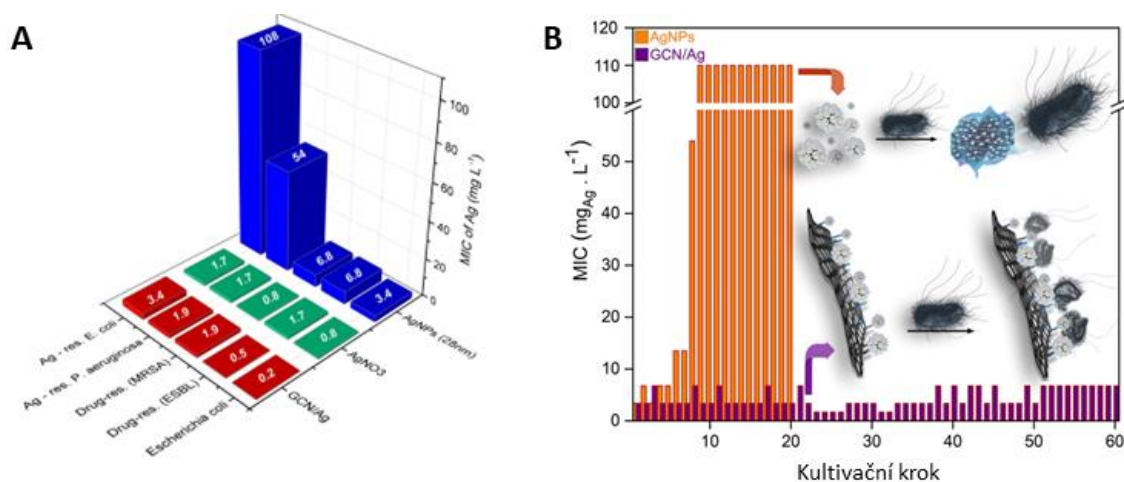
Obrázek 24. (A) Graf znázorňující optickou hustotu biofilmu vytvořeného v kultivačním médiu obsahujícím různá množství PGRE v přítomnosti rezistentního kmene *S. aureus*. (B) SEM snímky biofilmu vytvořeného v přítomnosti 27 mg/l AgNPs bez PGRE, (C) s 0,039% PGRE, (D) s 0,624% PGRE.

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
GCN/Ag v kombinaci	0,003	0,211		0,105			0,422
	-	-		-			-
	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	0,844	1,688
částečné FIC	0,16	0,38		0,38	0,75		0,16
	-	-	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	

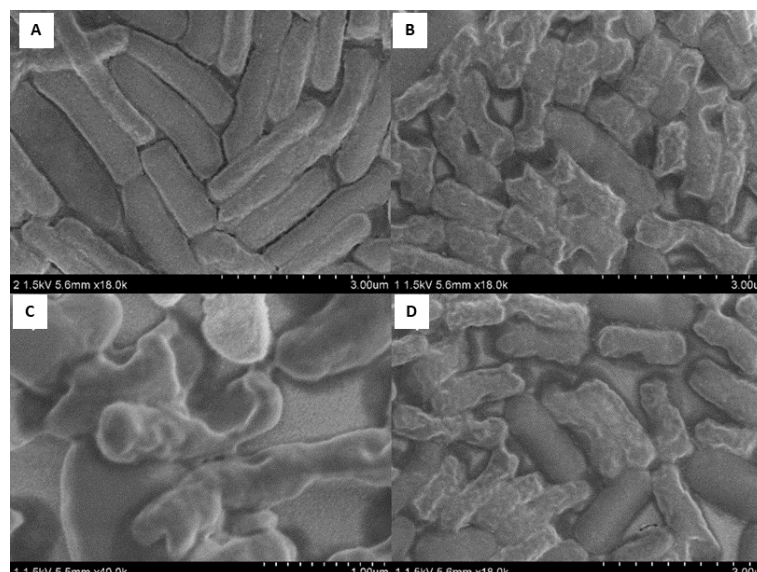
Obrázek 32. Schéma znázorňující bakteriální růst kmene *P. aeruginosa* (šedě) na mikrotitračních destičkách při testování synergického účinku GCN/Ag spolu s ciprofloxacinem. V rámci tabulky jsou vypočtené FIC pro jednotlivé kombinace antibiotikum-GCN/Ag nanohybrid a modře je zobrazena minimální inhibiční 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.

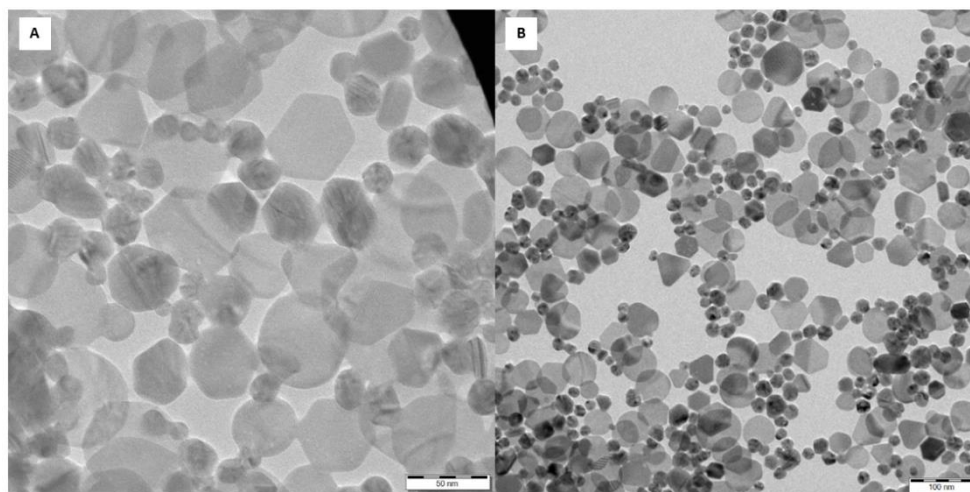
Posledním testovaným antibiotikem v této práci byl ciprofloxacin, který patří do skupiny chinolonových antibiotik, jejichž mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy nukleových kyselin inhibicí DNA gyrázy a topoizomeráz typu II a IV, které jsou klíčové pro dělení bakteriální DNA a buněčné dělení. 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.

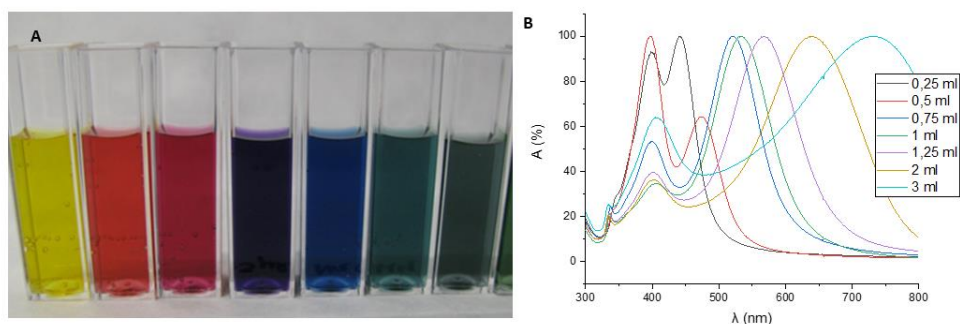
15. Nanočástice stříbra ve fototermální terapii

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.

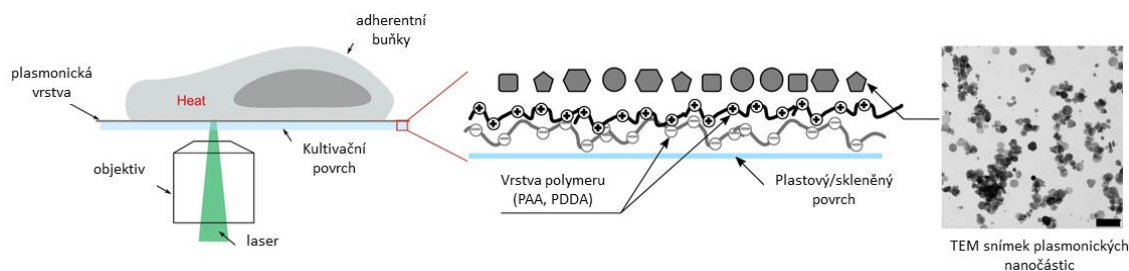


Obrázek 35. TEM snímky anizotropních částic stříbra používaných pro depozici na destičku (vzorek 5).



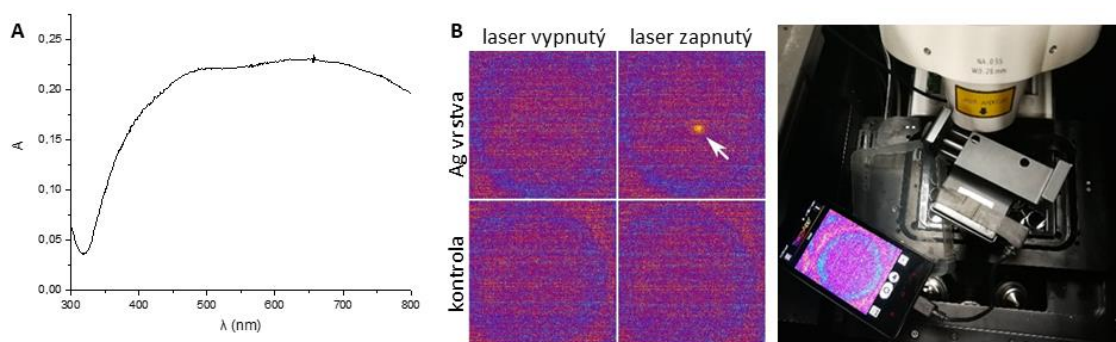
Obrázek 36. Vodné disperse anizotropních nanočástic stříbra (A) a jejich absorpční spektra (B).

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.



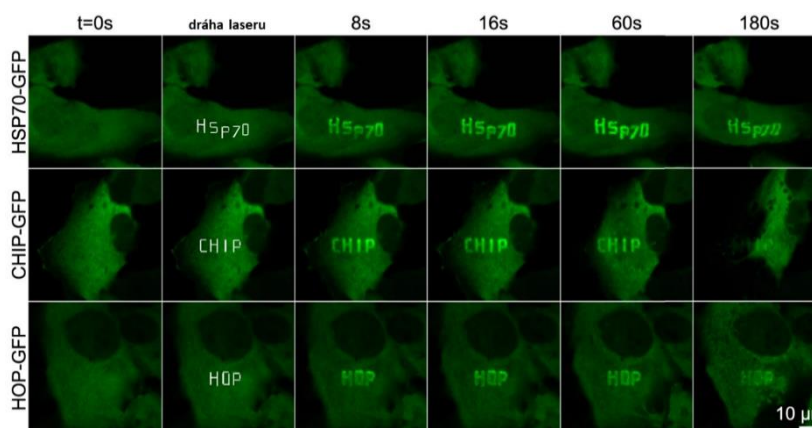
Obrázek 37. Schematické znázornění konceptu mikrotepelného poškození buněčných proteinů. Povrch buněčné kultivační desky byl modifikován tenkou polymerní vrstvou sestávající z PAA a PDDA pro účinnou vazbu plasmonických nanočástic.

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.

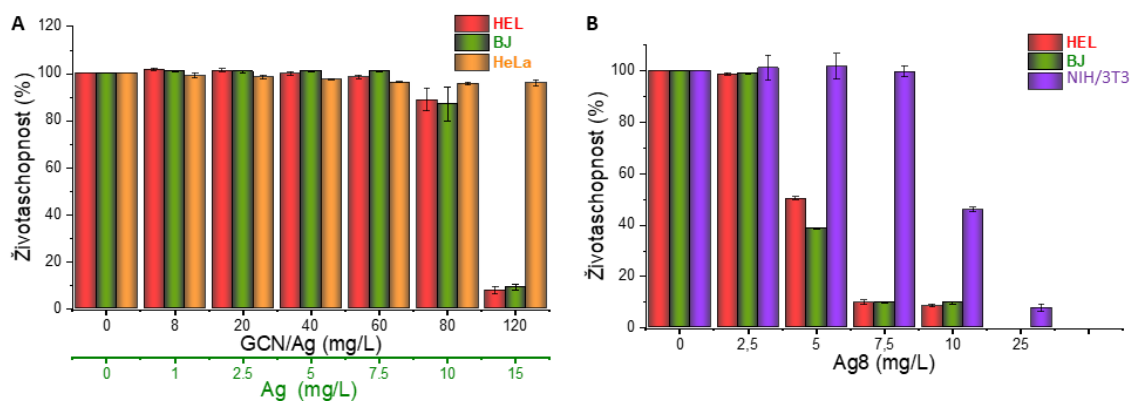
Podrobnější výsledky jsou publikovány v práci Mistrik a kol., jedná se o univerzální metodiku, jež umožňuje nahlédnout do molekulárních mechanismů buněčných reakcí na tepelné poškození v reálném čase, včetně sledování kinetiky komplementárních drah stresové odpovědi, čehož lze dále využívat ve výzkumu 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).

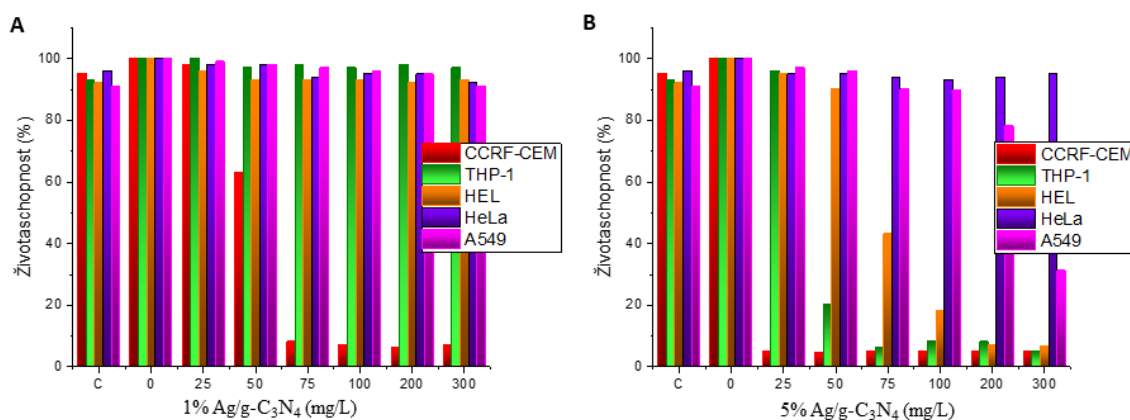
V případě grafenového derivátu byla cytotoxicita zkoumána za použití průtokové cytometrie (s použitím propidium jodidu a kalceinových fluorescenčních sond) na lidských kožních fibroblastech (BJ) a na lidských plicních fibroblastech (HEL 12469). V obou případech byl grafenový derivát tolerován až do koncentrace 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. Životoschopnost lidských plicních fibroblastů HEL, lidských kožních fibroblastů BJ, myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3 a nádorových buněk HeLa ošetřených GCN/Ag (A) Ag8 (B).

Životoschopnost 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 % životoschopnost (Obrázek 41, sloupec C), stejné výsledky byly potvrzeny i pro 1% Ag/g-C₃N₄ s výjimkou CCRF-

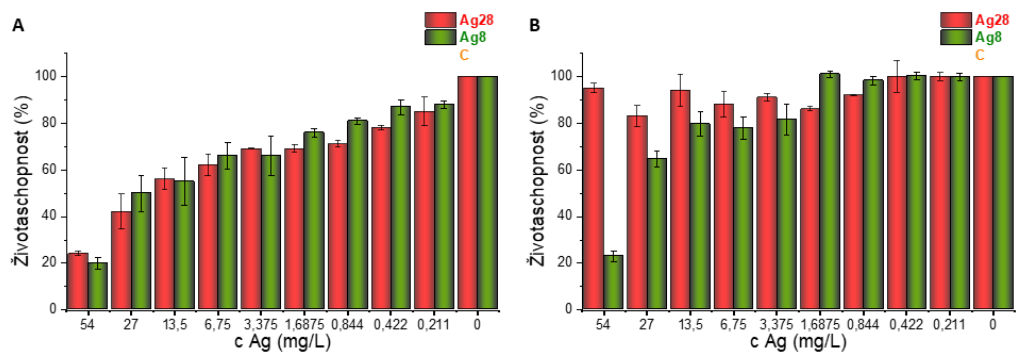
CEM, kde životaschopnost buněk poklesla pod 90 % pro koncentraci 50 mg/L, až na 63 %, jakákoliv vyšší testovaná koncentrace stříbra pak vedla ke snížení životaschopnosti pod 10 % (Obrázek 41A).



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 ať 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. Převezení 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, Pucek 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, Pucek 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] Pisárčík 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, Prucek 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, Hourri-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] Fahimnisha 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, Andronescu 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, Kvitek 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, Prucek 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, Prucek 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, Prucek 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, Prucek 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, Prucek 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.



OPEN

Restoration of antibacterial activity of inactive antibiotics via combined treatment with a cyanographene/Ag nanohybrid

Lucie Hochvaldová¹, David Panáček^{1,2}, Lucie Válková¹, Robert Pucek¹, Věra Kohlová¹, Renata Večeřová³, Milan Kolář³, Libor Kvítek¹ & Aleš Panáček¹✉

The number of antibiotic-resistant bacterial strains is increasing due to the excessive and inappropriate use of antibiotics, which are therefore becoming ineffective. Here, we report an effective way of enhancing and restoring the antibacterial activity of inactive antibiotics by applying them together with a cyanographene/Ag nanohybrid, a nanomaterial that is applied for the first time for restoring the antibacterial activity of antibiotics. The cyanographene/Ag nanohybrid was synthesized by chemical reduction of a precursor material in which silver cations are coordinated on a cyanographene sheet. The antibacterial efficiency of the combined treatment was evaluated by determining fractional inhibitory concentrations (FIC) for antibiotics with different modes of action (gentamicin, ceftazidime, ciprofloxacin, and colistin) against the strains *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter kobei* with different resistance mechanisms. Synergistic and partial synergistic effects against multiresistant strains were demonstrated for all of these antibiotics except ciprofloxacin, which exhibited an additive effect. The lowest average FICs equal to 0.29 and 0.39 were obtained for colistin against *E. kobei* and for gentamicin against *E. coli*, respectively. More importantly, we have experimentally confirmed for the first time, that interaction between the antibiotic's mode of action and the mechanism of bacterial resistance strongly influenced the combined treatment's efficacy.

Misuse and overuse of antibiotics has led to the rapid emergence of bacterial resistance to antibiotics following their introduction¹. As a result, we are entering the so-called “post-antibiotic era” in which some bacterial infections risk becoming untreatable as they were in the past. In the US alone, 2.8 million people are infected by antibiotic-resistant bacteria every year, and about 35,000 of them die as a result². The US centres for disease control and prevention (CDC) states that constantly increasing tendency of emerging bacterial resistance can be prevented by adopting a strategy concentrating on preventing infection and transmission, effective treatment, and diagnosis-based antimicrobial usage.

Current antibiotics cannot treat all known resistant bacterial infections, so there is a need for new antibiotics that should ideally target cellular pathways that microbes cannot readily modify. However, established drug development pathways have only yielded modifications of known antibiotic classes rather than the discovery of new ones. As a result, the number of newly developed antibiotics has decreased steadily over the last three decades and there is now a lack of effective treatment options for multidrug resistant infections. Additionally, inventing new drugs seems unattractive because of the high cost of research, the time-consuming drug approval process, the rather short window during which a new treatment remains effective and an effort to limit the using of antibiotics according to the principles of Antibiotic Stewardship^{3–7}, including shortening the duration of antibiotic application. Because of these factors, many pharmaceutical companies are leaving the antimicrobial field or struggling to stay in business⁸.

¹Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic. ²Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Czech Advanced Technology and Research Institute, Palacký University in Olomouc, Křížkovského 511/8, 779 00 Olomouc, Czech Republic. ³Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University in Olomouc, Hněvotínská 5, 775 15 Olomouc, Czech Republic. ✉email: ales.panacek@upol.cz

Because new antibiotics seem unlikely to provide a way of quickly overcoming bacterial resistance in the near future, we need alternative ways of overcoming bacterial resistance. A very promising option is combination therapy, in which traditional antibiotics are combined with other substances that enhance their effectiveness. Bacteria can build up resistance towards certain antibiotics in various ways; consequently, antibiotics should ideally be applied in conjunction with a substance that can block the appropriate resistance mechanism. For example, because resistance to penicillins is driven by the production of β -lactamases, the efficacy of these antibiotics could be restored by applying them in tandem with β -lactamase inhibitors such as clavulanic acid, tazobactam, and sulbactam⁹. However, bacteria have since developed resistance even to these combined treatments, so there is a need for other options, preferably involving a complementary antibacterial agent capable of acting on multiple cellular levels simultaneously. Inorganic nanoparticles of materials such as silver, TiO₂, ZnO, or graphene may be appropriate for this purpose; they exhibit strong antibacterial activity at very low concentrations (in the ppm range) and show no cytotoxicity towards various mammalian cell lines (human skin fibroblasts BJ or mouse embryonic fibroblast NIH/3T3 cell lines)^{10–12}. Since antibiotics and nanoparticles have different modes of action, a combined treatment using low doses of both agent types could be highly effective. For example, it has been shown that treatment with silver nanoparticles (sometimes even at concentrations below 1 mg/L) can restore the susceptibility of resistant strains to antibiotics that are otherwise ineffective^{11–15}. However, several recent publications have reported the development of bacterial resistance to even strong antibacterial agents such as silver nanoparticles^{16–18}. For instance, Panacek et al. described a mechanism of bacterial resistance to silver nanoparticles based on aggregation induced by secretion of the bacterial protein flagellin. To maintain the strong antibacterial effectiveness of nanoparticles, their aggregation must be prevented. This can be achieved to some extent by surface modification and stabilization, but such approaches are unfortunately insufficient in most cases. Aggregation can be also suppressed by using nanocomposite materials that provide a supporting structure for strongly bonded silver nanoparticles and thereby suppress their aggregation¹⁶.

Graphene and its derivatives are an interesting class of supporting materials with promising antibacterial properties. For instance, graphene oxide (GO) exhibits antibacterial activity at concentrations as low as 40 mg/L, potentially making it suitable for medicinal applications. However, its strong inter-plane interactions promote aggregation, reduce the surface area of nanoparticles, and block certain antibacterial modes of action, leading to reduced antibacterial activity^{19–21}. The aggregation of GO and the associated reduction in antimicrobial activity could be minimised by surface modification or functionalisation with metals, antibiotics, enzymes, or polymers²². For example, GO can be modified with silver nanoparticles^{23,24}, whose deposition on a graphene surface may suppress their aggregation and improve their antibacterial properties. Accordingly, Panacek et al.²⁵ recently reported the synthesis of cyanographene/Ag nanoparticles and showed that they exhibit highly promising activity against bacteria.

Given the strong antibacterial activity of cyanographene decorated with silver nanoparticles and the fact that antibiotics and silver nanoparticles are known to exhibit synergistic antibacterial activity, it was hypothesised that the minimal inhibitory concentrations of antibiotics when applied together with the cyanographene/Ag composite would be below the susceptibility breakpoints of resistant bacteria, making their effectiveness against resistant strains comparable to that seen for sensitive strains¹¹. Therefore, this work investigates the synergistic antibacterial effects resulting from combining a cyanographene/Ag nanohybrid with inactive antibiotics having different modes of action (gentamicin, ceftazidime, ciprofloxacin and colistin) against bacteria with different resistance mechanisms. The objective was to find the combinations of antibiotics and the cyanographene/Ag nanohybrid exhibiting the greatest activity against the resistant strains and to thereby identify effective ways of overcoming bacterial resistance for individual antibiotics against particular resistant bacteria based on their mode of action and mechanism of resistance, respectively.

Methods

Chemicals and biological materials. The cyanographene/silver (GCN/Ag) nanohybrid was synthesized using fluorinated graphite (extent of labelling: > 61 wt% F), ammonia (28–30% [w/w], p.a.), sodium borohydride, and sodium citrate dihydrate (p.a.), all obtained from Sigma-Aldrich. Mueller–Hinton Broth (Becton, Dickson, and Company) was used as the culture medium. Synergetic effects were tested for combinations of the GCN/Ag nanohybrid with the antibiotics gentamicin (GEN), ceftazidime (CTZ), ciprofloxacin (CIP) against the multiresistant strain *Escherichia coli* CE5556. Resistance mechanisms of *Escherichia coli* CE5556 to β -lactams, quinolones and aminoglycosides described within this work were previously studied and confirmed by Roderova et al.,²⁶ who identified cefotaximase-Munich CTX-M-15 type of extended spectrum β -lactamases and mutation of the *gyrA* gene [Ser (83) Leu; Asp (87) Asn], *parC* [Ser (80) Ile; Glu (84) Val], PMQR [cr] resulting in changes in the target enzyme DNA gyrase causing resistance to fluoroquinolones. Additional antimicrobial tests were performed against *Pseudomonas aeruginosa* 21,425 using combinations of GEN, CIP and CTZ with GCN/Ag; this strain shows similar resistance to antibiotics like *E. coli* CE 5556 as it was confirmed by phenotypic methods according to EUCAST⁶. Finally, tests were performed using colistin (COL) with GCN/Ag against *Enterobacter kobei* 3683/C/2017. Resistance to colistin was confirmed by phenotypic methods according to EUCAST²⁷. The zeta potential of the sensitive and resistant strains (according to their MIC) was measured and a significant drop (from – 30 to – 5 mV) was observed, which has an effect on the interaction of the bacteria with positively charged colistin. All bacteria were obtained from the microorganism collection of the Department of Microbiology at the Faculty of Medicine of Palacky University in Olomouc. MIC (mg/L) values of used strains are shown in supplementary material (SI Fig. 4).

Synthesis and characterization of GCN/Ag nanohybrid. The GCN/Ag nanohybrid was prepared by synthesizing cyanographene and then coordinating silver NPs on the GCN sheet as described previously by

	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. kobei</i>
CIP	512	256	–
CTZ	1024	256	–
GEN	1024	128	–
COL	–	–	256

Table 1. Stock solution concentrations of the tested antibiotics in mg/L.

Panacek et al.²⁵. Briefly, GCN/Ag was synthesized by chemical reduction of a precursor material, then silver cations from AgNO₃ were coordinated on the GCN sheet under vigorous stirring for 24 h at room temperature. The resulting dispersion of Ag⁺-modified GCN was purified by washing with distilled water to remove silver ions not firmly coordinated on the GCN flakes. Chemical reduction was then initiated by adding NaBH₄ solution to the dispersion, which was then kept in darkness for one hour. The final silver-nanoparticle-decorated GCN/Ag product was washed with distilled water and dried. The GCN/Ag nanohybrid was characterised by various instrumental techniques; for details, see the supporting material.

Determination of synergetic effects of antibiotics and AgNPs. A standard checkerboard microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the GCN/Ag nanohybrid and each antibiotic (ATB) by themselves and the MICs of different concentrations of nanohybrids in combination with different concentrations of antibiotics. The nanohybrid and antibiotics were always diluted in a geometric progression in Mueller–Hinton broth when determining MICs. Based on its strong antibacterial effect, the initial concentration of the GCN/Ag nanohybrid for microbial evaluation was set to 13.5 mg/L. The initial concentrations of the antibiotics depended on their reported susceptibility breakpoints and are shown in Table 1. Both nanoparticles and antibiotics were diluted in geometric progressions; the tested ATB concentrations were 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, and 2 mg/L for those with high initial concentrations and 1, 0.5, and 0.25 mg/L for those with lower initial concentrations. Due to the strong antibacterial activity of the GCN/Ag nanohybrid, its initial concentration was lower; the dilution series began at 3.375 mg/L (based on the mass of silver) and progressed to 1.688, 0.844, 0.422, 0.211, 0.105, and 0.002 mg/L. To determine the enhancement of antibacterial activity resulting from combined treatment with GCN/Ag and the studied antibiotics, 96-well microtitration plates were filled with vertically diluted antibiotics and horizontally diluted GCN/Ag.

For each antimicrobial assay, a fresh bacterial suspension was prepared from bacteria that had been grown on blood agar at 35 °C for 24 h. The optical density of the bacterial inoculum was determined to be equal to 1 based on McFarland's standard using a densitometer (Densi-La-Meter, LACHEMA, Czech Republic); after appropriate dilution, this gave a starting concentration of 10⁶ CFU for microbial testing. Antibacterial activity was assessed according to standard testing protocols (CLSI, EUCAST) and the MIC was determined as the lowest concentration of antibacterial agent that visibly inhibited bacterial growth after 24 h incubation at 35 °C.

The fractional inhibitory concentration (FIC) index was calculated using the following equation:

$$\overline{\text{FIC}} = \frac{\text{MIC}_{\text{Ag in combination}}}{\text{MIC}_{\text{Ag alone}}} + \frac{\text{MIC}_{\text{ATB in combination}}}{\text{MIC}_{\text{ATB alone}}}$$

Results are reported as average $\overline{\text{FIC}}$ values (calculations shown in SI); antibacterial effects are classified as synergistic ($\text{FIC} \leq 0.5$), partially synergetic ($0.5 < \text{FIC} \leq 1$), additive ($\text{FIC} = 1$), indifferent ($1 < \text{FIC} < 4$), or antagonistic ($\text{FIC} \geq 4$)^{15,28,29}.

Results

A cyanographene/silver nanohybrid (GCN/Ag) was synthesized via a previously published method based on the reduction of Ag⁺ ions bound to a cyanographene derivative modified with nitrile groups referred to as the GCN/Ag⁺ precursor²⁵. High-resolution transmission electron microscopy images of the GCN/Ag⁺ precursor (Fig. 1a) confirmed the absence of AgNPs prior to the application of the reducing agent. Furthermore, chemical elemental mapping revealed dense and homogeneous coverage of the graphene flakes with both nitrogen and silver atoms (Fig. 1b). After removing unbound silver ions by thorough washing, reduction with NaBH₄ provided a final GCN/Ag product consisting of small AgNPs (Fig. 1c,d) with diameters of 4 to 8 nm (Fig. 1c, inset).

Absorption spectrophotometry of the precursor GCN/Ag⁺ and GCN/Ag water dispersions confirmed that the nanoparticles formed only after treatment with the reducing agent (Fig. 2a) based on the appearance of the characteristic surface plasmon resonance of metallic AgNPs at a wavelength of 400 nm³⁰. Nitrile groups were also observed by FT-IR before and after immobilization of AgNPs, confirming their stability even after AgNPs binding; the inset of Fig. 2a shows that the nitrile peak at around 1500 cm^{−1} is present in the spectra of both the precursor and the reduced product. The Ag content of the GCN/Ag hybrid was 1.8 at. % (atomic content), according to X-ray photoelectron spectroscopy (Fig. 2b). The exact amount of silver in water dispersions of GCN/Ag after purification before the antibacterial assays was 330 mg/L, corresponding to 125 mg of Ag per 1 g of GCN/Ag nanohybrid based on the AAS data.

The antibacterial activity of the purified GCN/Ag nanohybrid dispersion towards selected resistant bacteria was then tested both alone and in combination with various antibiotics. Note that all of the MICs reported for GCN/Ag in this work are based on the silver content of the GCN/Ag water dispersion (the silver concentration in

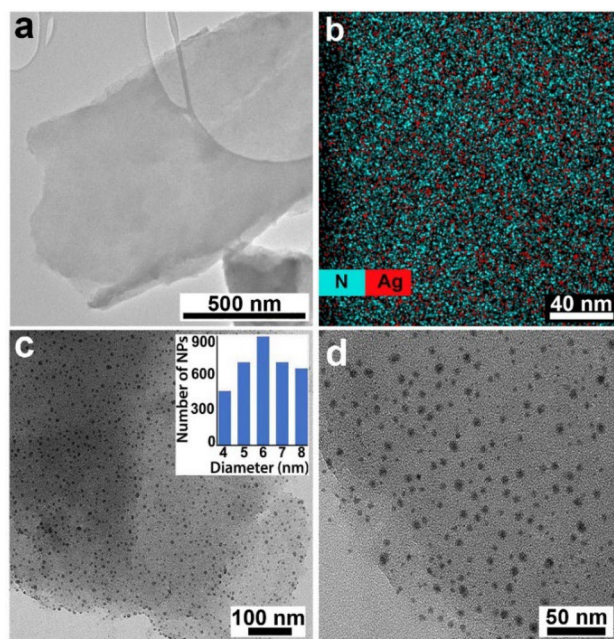


Figure 1. (a) HRTEM image of the GCN/Ag⁺ precursor. (b) Combined chemical mapping of nitrogen and silver on the graphene surface. (c,d) TEM images of GCN/Ag and size distribution of the AgNPs (inset in panel c).

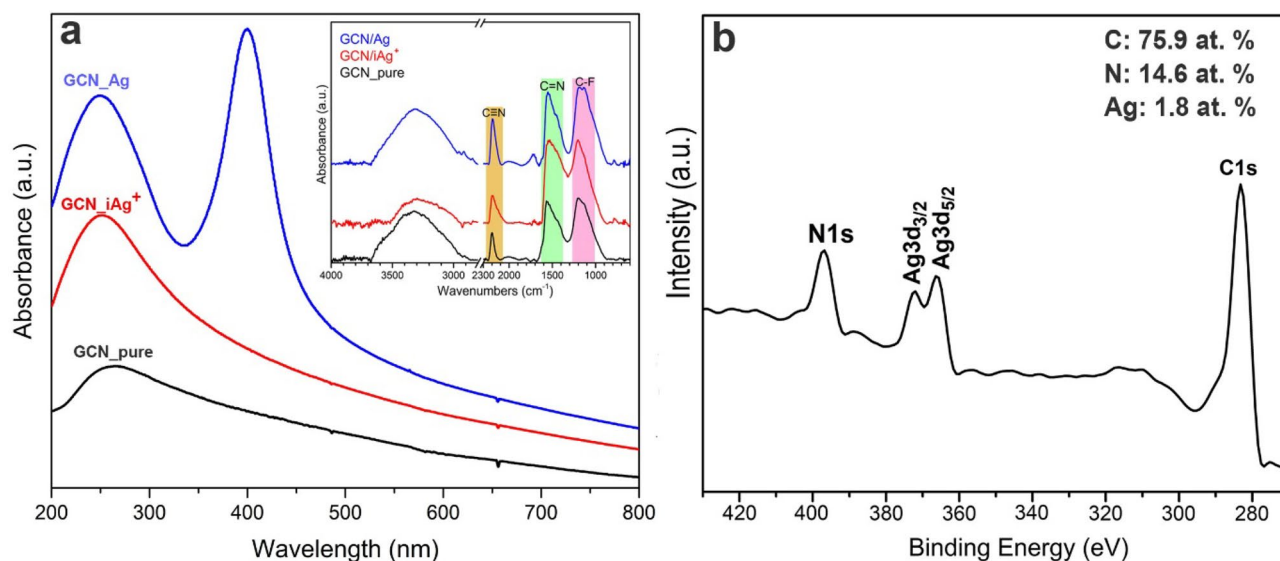


Figure 2. (a) UV-Vis absorption spectra of pure GCN (black line), GCN with immobilized ionic silver (red line), and GCN with immobilized AgNPs (blue line); the corresponding FT-IR spectra are shown in the inset of panel (a). (b) XPS survey spectrum of the GCN/Ag nanohybrid showing atomic content of the material.

the dispersion was 330 mg/L as determined by AAS). Table 2 summarises the minimum inhibitory concentrations (MICs) of the antibiotics (ATBs) ciprofloxacin (CIP), ceftazidime (CTZ), gentamicin (GEN), and colistin (COL) as well as the Ag-based MICs of the GCN/Ag nanohybrid against *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *E. kobei*. The table also shows the MIC ranges of GCN/Ag and each ATB when applied in combination together with the lowest, highest, and mean fractional inhibitory concentrations (FICs) determined for each antibiotic/nanohybrid pair. Enhanced (i.e., synergistic or partially synergistic) antibacterial effects against resistant *E. coli* were observed for the combinations of GCN/Ag (Ag-related MIC: 1688 mg/L) with GEN, CTZ, and CIP. The strongest synergistic effect and enhancement of activity against *E. coli* was observed for gentamicin with GCN/Ag; this pairing yielded the lowest partial FIC (0.16) and average FIC (0.39). Combined treatment with GCN/Ag reduced the MIC of gentamicin 32-fold, to just 4 mg/L, and reduced that of the nanohybrid eightfold, to 0.211 mg/L. Four

	<i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>E. kobei</i>
	GEN	CTZ	CIP	GEN	CTZ	CIP	COL
ATB alone	128	32	64	8	8	16	64
GCN/Ag alone	1.688	1.688	1.688	1.688	1.688	1.688	3.375
ATB in combination	4–64	1–16	32	0.5–4	1–4	8	1–32
GCN/Ag in combination	0.003–0.844	0.211–0.844	0.844	0.105–0.844	0.844	0.844	0.422–1.688
Partial FIC	0.16–0.53	0.38–0.63	1.00	0.38–0.56	0.75–1.00	1.00	0.16–0.63
FIC	0.39	0.54	1.00	0.53	0.88	1.00	0.29
Effect	(S)	(PS)	(A)	(PS)	(PS)	(A)	(S)

Table 2. Minimum inhibitory concentrations MIC [mg/L]^a of various antibiotics and the GCN/Ag nanohybrid, average $\overline{\text{FIC}}$ ^b values for combinations of antibiotics with the GCN/Ag nanohybrid, and the resulting antibacterial effects. ^aThe MIC determination is a qualitative assay and the estimated error is of the order of magnitude of the value; (n = 3). ^bAverage value (SD); (n = 3). * (S) synergy, (PS) partial synergy, (A) additive. **GCN/Ag shows silver related concentration. ***The ranges given in the *ATB in combination* row of this table indicate the ranges of MICs obtained for the indicated antibiotic when applied with varying concentrations of the GCN/Ag nanohybrid. Similarly, the ranges given in the *GCN/Ag in combination* row indicate the ranges of MICs obtained for the nanohybrid when applied in combination with varying concentrations of the indicated antibiotic.

additional antibacterial combinations with low partial FIC index values (ranging from 0.19 to 0.31) indicating strong enhancement of activity against *E. coli* were also discovered (see Figure S1, Supplementary information). The highest FIC index value for the gentamicin/nanohybrid pair (0.53) was obtained when combining 64 mg/L gentamicin with 0.053 mg/L GCN/Ag (see Figure S1). While this FIC value corresponds to a partial rather than full synergistic effect, the cumulative FIC for gentamicin with the nanohybrid (defined as the arithmetic mean of all calculated FICs; see the SI for details) was 0.39, indicating a synergistic antibacterial effect. Partial synergy (FIC 0.54) was also observed for the combination of ceftazidime with GCN/Ag when used against *E. coli*. The enhancement in this case was weaker than for gentamicin (FIC 0.39), but even so, combining ceftazidime with the nanohybrid made it possible to achieve an MIC below the susceptibility breakpoint; the MIC of ceftazidime was reduced from 32 to 1 mg/L when applied together with 0.844 mg/L GCN/Ag. The lowest FIC observed for the ceftazidime/nanohybrid pair was 0.38, which was achieved when combining 8 mg/L ceftazidime with 0.211 mg/L GCN/Ag. The highest calculated FIC for this pair (0.63) was still within the partially synergetic range (Figure S1). The final antibiotic tested against *E. coli* was ciprofloxacin, which exhibited an additive effect (FIC = 1.00) when combined with the GCN/Ag nanohybrid, suggesting an indifferent effect without significant enhancement of activity. The only combination showing any potentially synergistic effect for this antibiotic featured intermediate concentrations of both agents – 32 mg/L ciprofloxacin and 0.844 mg/L GCN/Ag (Figure S1).

In the case of resistant *P. aeruginosa*, the FICs of all antibiotics were slightly higher than for resistant *E. coli*, but the Ag-related MIC of GCN/Ag was the same (1.688 mg/L) as for *E. coli*. The average FIC for gentamicin (0.53) was in the range associated with partial synergy, but its lowest determined FIC (0.38) was in the synergistic range. In this case, combined treatment with just 0.422 mg/L GCN/Ag reduced the antibiotic concentration needed to get below the gentamicin breakpoint by a factor of eight. The partial FIC values determined for gentamicin combined with GCN/Ag were mostly in the synergistic effect range, with just two in the partially synergetic range, but this was sufficient to raise the average FIC for this combination into the partially synergetic range (Figure S2). Partial synergy against resistant *P. aeruginosa* was also observed for the pairing of ceftazidime combined with GCN/Ag, whose average FIC of 0.88 was higher than that of gentamicin (0.53) and also higher than that for ceftazidime when used against *E. coli* (0.54). However, even in this case, with partial FICs ranging from 0.75 to 1.00, combined treatment with 0.844 mg/L GCN/Ag reduced the ceftazidime concentration needed to kill resistant *P. aeruginosa* by a factor of four. The FIC index for the combination of ciprofloxacin with the GCN/Ag nanohybrid when tested against *P. aeruginosa* was 1.0, indicating an additive effect with no significant improvement in antibacterial activity; this is consistent with the results obtained for ciprofloxacin when used against resistant *E. coli*.

The MIC of the GCN/Ag nanohybrid against colistin-resistant *E. kobei* was 3.375 mg/L. Combined treatment with GCN/Ag and colistin yielded a strong synergistic effect with a very low FIC index of 0.29, overcoming the strain's antibiotic resistance. Under optimal conditions, the combined treatment reduced the MIC of colistin 32-fold, down to just 2 mg/L when applied together with 0.422 mg/L GCN/Ag. This combined treatment also reduced the MIC of the nanohybrid eightfold and yielded a very low FIC of 0.16. Other combinations of colistin with GCN/Ag at concentrations of 1–16 mg/L and 0.422–0.844 mg/L, respectively, had partial FICs between 0.19 and 0.38, confirming a strong synergistic effect for this pairing (Figure S3). The highest FIC observed for the pairing of colistin with GCN/Ag against *E. kobei* was 0.63, which was seen when combining 32 mg/L colistin with 0.422 mg/L GCN/Ag.

Discussion

A GCN/Ag nanohybrid was prepared according to a previously published protocol²⁵ that involves cyanographene synthesis followed by coordination of silver NPs on the GCN sheet. Many previous studies have used graphene oxide (GO) as a solid support for the immobilization of AgNPs due to its ability to prevent their aggregation^{31–33}.

However, its surface is chemically inhomogeneous with many different oxygen-containing groups, which prevents strong and selective silver binding at the surface^{34,35}. Furthermore, the hard soft acid base theory suggests that oxygen-containing functional groups are unsuitable ligands for silver binding³⁶. To overcome these limitations, densely functionalized graphene (cyanographene, GCN)³⁷ was used as a solid support and was shown to be a very effective covalent trap for silver ions due to the strong coordination of silver ions by nitrile groups³⁶. This strong binding enabled the preparation of a highly pure GCN/Ag⁺ precursor and subsequent reduction of only those Ag ions that remained firmly anchored to the GCN support (Fig. 1a).

According to Panacek et al. and the results presented herein, dispersions of the cyanographene silver nano-hybrid in water have ultralow MICs ranging from 1.8 to 14.7 mg/L. If MIC values are based solely on the silver content of the hybrid rather than its total mass, the MICs are lower still (up to 3.375 mg/L) and fall below those reported for 28 nm AgNPs dispersed in water (3.4–108 mg/L)^{11,25}. The strong covalent immobilization and dense coverage of the graphene surface with AgNPs yielded a material with excellent properties that was recently used as a very effective antibacterial material against AgNPs-resistant bacterial strains²⁵. Because the GCN/Ag nano-hybrid has greater antibacterial activity than typically used silver nanoparticles, it was expected that it would also show strong antibacterial properties when combined with antibiotics. The aim of this work was to restore the antibacterial activity of antibiotics that have become ineffective against resistant strains. Reducing the MICs of antibiotics via combined treatment with GCN/Ag has important therapeutic advantages because it reduces the amount of the antibiotic and nanocomposite that must be applied to control bacterial infections, reducing the risk of adverse effects in patients. Moreover, the GCN/Ag nanohybrid shows little cytotoxicity in human embryonic lung fibroblasts (HEL), human skin fibroblasts (BJ) and human cervix adenocarcinoma cells (HeLa); it was fully tolerated at concentrations of 60 mg/L (based on the total mass of the composite) or 7.5 mg/L (based only on its silver content)²⁵.

Each of the antibiotics tested in this work belongs to a different antibiotic class and interacts with bacteria via a different mechanism³⁸. Gentamicin belongs to the group of aminoglycoside antibiotics, which inhibit protein synthesis by binding to the 30S subunit of the prokaryotic ribosome. The bacteria *E. coli* studied in this work resist gentamicin by reducing their cell permeability, which was overcome via the outer membrane- and cell wall-disrupting ability of the GCN/Ag nanohybrid (see Fig. 3). Disruption of the bacterial cell membrane and cell wall increases the permeability of the bacterial cells, allowing gentamicin to reach its intracellular target site.

Ceftazidime is an antibiotic whose mode of action is based on inhibiting cell wall synthesis. *E. coli* strains have developed resistance to its activity by producing extended spectrum β -lactamases²⁶ that hydrolyse the beta-lactam core of these antibiotics, making them unable to bind to their usual target site. It is most likely that the nanohybrid counteracts this resistance by penetrating the outer membrane, allowing a more intense and easier release of β -lactamases in higher extent than in the case of a bacteria with an intact membrane and thereby weakening their negative effect on the antibiotics.

In contrast, colistin is an antibiotic that targets the inner cell membrane of bacteria by binding to key components of the cellular envelope (phospholipids and lipopolysaccharides) and displacing magnesium and calcium ions that stabilize the membrane. This increases the membrane's permeability, leading to loss of cellular components and cell death³⁹. The resistant *E. coli* strain examined in this work exhibits colistin resistance in which the outer membrane is modified (has slight negative charge equal to -8 mV compared to -38 mV of sensitive strain) in a way that prevents the antibiotic (positively charged with zeta-potential value 20 mV) from reaching its target, i.e. the inner membrane. The enhancement of colistin's antibacterial activity upon combined treatment with GCN/Ag is probably due to adsorption of the positively charged colistin (zeta potential: 20 mV) on the negatively charged GCN/Ag nanohybrid (zeta potential: -35 mV) via electrostatic interactions. This would allow the nanohybrid to act as a nanocarrier of colistin, which may weaken the repulsive interactions between colistin and the outer membrane. Additionally, the nanohybrid may disrupt the bacterial outer membrane and cell wall, giving the antibiotic easier access to the inner membrane. In this case, although the mechanisms of action of the antibiotic and the nanohybrid are similar, their combination results in strong enhancement of antimicrobial activity.

The final antibiotic tested in this work was ciprofloxacin, which belongs to the quinolone class of antibiotics whose mechanism of action involves inhibiting nucleic acid synthesis by inhibiting DNA gyrase and the type II and type IV topoisomerases, which are crucial for bacterial DNA separation and cell division. Ciprofloxacin resistance in the tested *E. coli* strain originates from a DNA gyrase mutation²⁶ that prevents proper binding of the antibiotic. Unlike the previously discussed resistance mechanisms, this one does not involve changes in the cell wall or membrane; instead, it affects the structure of a nuclear protein. Consequently, the nanohybrid has no chemical or biological way to affect this mechanism, so only additive rather than synergistic or partially synergistic effects were seen in this case.

The activity of a GCN/Ag nanohybrid in combination with various antibiotics has been tested against various antibiotic-resistant bacterial strains. The results obtained suggest that combined treatment enhances antibacterial activity in some cases but that the degree and nature of the enhancement depends on the underlying mechanism of resistance and the mode of action of the antibiotic. Promising results were obtained for an antibiotic that blocks bacterial protein synthesis by binding to the 30 s subunit of the bacterial ribosome (gentamicin) and for one that weakens cytoplasmic membrane integrity (colistin). Synergistic antimicrobial effects were observed when these antibiotics were applied in combination with the nanohybrid, causing their MICs to fall below their susceptibility breakpoints even against multiresistant bacterial strains. Importantly, even very low concentrations of the nanocomposite (usually 0.422 mg/L) were sufficient to restore bactericidal activity against *E. coli* and *P. aeruginosa*. Positive results were also obtained for ceftazidime, which acts by inhibiting bacterial cell wall synthesis. However, combined treatment with the nanohybrid did not greatly enhance the activity of ciprofloxacin, which acts by inhibiting bacterial DNA synthesis. The present findings help to better understand the mechanisms of

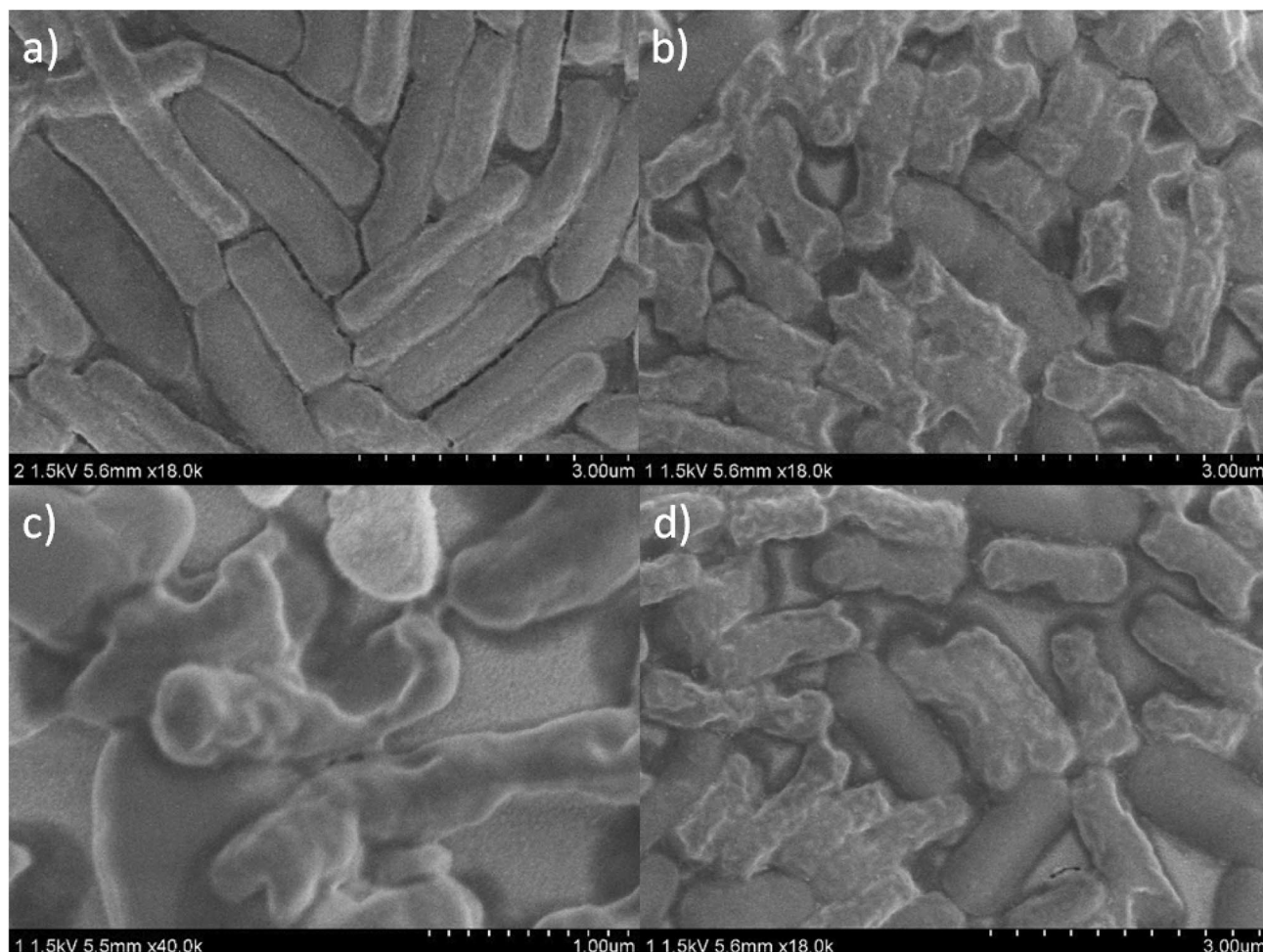


Figure 3. SEM images of (a) untreated *E. coli* and *E. coli* with disrupted cell walls after treatment with (b,c) GCN/Ag (bacteria on image (c) were captured at higher magnification), (d) GCN/Ag and gentamicin.

combination antibacterial therapy using antibiotics together with other antimicrobials and open the way how to restore antibacterial efficiency of conventional antibiotics and overcome bacterial resistance.

Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information files).

Received: 7 October 2021; Accepted: 14 March 2022

Published online: 25 March 2022

References

- Graham, C. J. The global threat of antibiotic resistance: What can be done?. *J. Glob. Health Rep.* **1**, 1–8 (2017).
- CDC. Antibiotic resistance threats in the United States. *Centers for Disease Control and Prevention* (2019) CS239559-B.
- Barlam, T. F. *et al.* Implementing an antibiotic stewardship program: Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Clin. Infect. Dis.* **62**, e51–e77 (2016).
- Dyar, O. J., Huttner, B., Schouten, J. & Pulcini, C. What is antimicrobial stewardship?. *Clin. Microbiol. Infect.* **23**, 793–798 (2017).
- Srinivasan, A. Antibiotic stewardship: Why we must, how we can. *Cleveland Clin. J. Med.* **84**, 673–679 (2017).
- Kolar, M. *et al.* Implementation of antibiotic stewardship in a university hospital setting. *Antibiotics* **10**, 1–16 (2021).
- Luyt, C. E., Bréchet, N., Trouillet, J. L. & Chastre, J. Antibiotic stewardship in the intensive care unit. *Crit. Care* **18**, 1–12 (2014).
- Talbot, G. H. *et al.* The infectious diseases society of america's 10 × '20 initiative (10 new systemic antibacterial agents US food and drug administration approved by 2020): Is 20 × '20 a possibility?. *Clin. Infect. Dis.* **69**, 1–11 (2019).
- Harriso, E. M. *et al.* Genomic identification of cryptic susceptibility to penicillins and β -lactamase inhibitors in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Microbiol.* **4**, 1680–1691 (2019).
- Panáček, A. *et al.* Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* **30**, 6333–6340 (2009).
- Panáček, A. *et al.* Strong and nonspecific synergistic antibacterial efficiency of antibiotics combined with silver nanoparticles at very low concentrations showing no cytotoxic effect. *Molecules* **21**, 1–17 (2016).
- Panáček, A. *et al.* Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant Enterobacteriaceae. *Colloids Surf. B* **142**, 392–399 (2016).
- Hwang, I., Hwang, J. H., Choi, H., Kim, K. J. & Lee, D. G. Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. *J. Med. Microbiol.* **61**, 1719–1726 (2012).

14. Saratale, G. D. *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. Cluster Sci.* **28**, 1709–1727 (2017).
15. Carrizales, M. *et al.* In vitro synergism of silver nanoparticles with antibiotics as an alternative treatment in multiresistant uropathogens. *Antibiotics* **7**, 1–13 (2018).
16. Panáček, A. *et al.* Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nat. Nanotechnol.* **13**, 65–71 (2018).
17. Graves, J. L. *et al.* Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. *Front. Genet.* **5**, 1–13 (2015).
18. Valentin, E. *et al.* Heritable nanosilver resistance in priority pathogen: A unique genetic adaptation and comparison with ionic silver and antibiotics. *Nanoscale* **12**, 2384–2392 (2020).
19. Chen, J. *et al.* Graphene oxide exhibits broad-spectrum antimicrobial activity against bacterial phytopathogens and fungal conidia by intertwining and membrane perturbation. *Nanoscale* **6**, 1879–1889 (2014).
20. Gao, Y. *et al.* Impact of graphene oxide on the antibacterial activity of antibiotics against bacteria. *Environ. Sci. Nano* **4**, 1016–1024 (2017).
21. Lu, X. *et al.* Enhanced antibacterial activity through the controlled alignment of graphene oxide nanosheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E9793–E9801 (2017).
22. Kumar, P., Huo, P., Zhang, R. & Liu, B. Antibacterial properties of graphene-based nanomaterials. *Nanomaterials* **9**, 737 (2019).
23. Zhao, R. *et al.* Stable nanocomposite based on PEGylated and silver nanoparticles loaded graphene oxide for long-term antibacterial activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 15328–15341 (2017).
24. Vi, T. T. *et al.* Synergistic antibacterial activity of silver-loaded graphene oxide towards *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomaterials* **10**, 1–22 (2020).
25. Panáček, D. *et al.* Silver covalently bound to cyanographene overcomes bacterial resistance to silver nanoparticles and antibiotics. *Adv. Sci.* **2003090**, 3–10 (2021).
26. Röderova, M. *et al.* Characteristics of quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment in the Czech Republic. *Front. Microbiol.* **7**, 1–12 (2017).
27. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. <http://www.eucast.org> (2021).
28. Jeong, N. *et al.* Antibiotic and synergistic effect of Leu-Lys rich peptide against antibiotic resistant microorganisms isolated from patients with cholelithiasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **399**, 581–586 (2010).
29. Dawis, M. A., Isenberg, H. D., France, K. A. & Jenkins, S. G. In vitro activity of gatifloxacin alone and in combination with cefepime, meropenem, piperacillin and gentamicin against multidrug-resistant organisms. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 1203–1211 (2003).
30. Loiseau, A. *et al.* Silver-based plasmonic nanoparticles for and their use in biosensing. *Biosensors* **9**, 1–40 (2019).
31. Zou, X., Zhang, L., Wang, Z. & Luo, Y. Mechanisms of the antimicrobial activities of graphene materials. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 2064–2077 (2016).
32. Xin, Q. *et al.* Antibacterial carbon-based nanomaterials. *Adv. Mater.* **31**, 1–15 (2019).
33. Kellici, S. *et al.* Calixarene assisted rapid synthesis of silver-graphene nanocomposites with enhanced antibacterial activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 19038–19046 (2016).
34. Eng, A. Y. S., Chua, C. K. & Pumera, M. Refinements to the structure of graphite oxide: Absolute quantification of functional groups via selective labelling. *Nanoscale* **7**, 20256–20266 (2015).
35. Loh, K. P., Bao, Q., Eda, G. & Chhowalla, M. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nat. Chem.* **2**, 1015–1024 (2010).
36. Lemire, J. A., Harrison, J. J. & Turner, R. J. Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 371–384 (2013).
37. Bakandritsos, A. *et al.* Cyanographene and graphene acid: Emerging derivatives enabling high-yield and selective functionalization of graphene. *ACS Nano* **11**, 2982–2991 (2017).
38. Kirmusaoglu, S., Gareayaghi, N. & Kocazeybek, B. S. Introductory chapter: The action mechanisms of antibiotics and antibiotic resistance. *IntechOpen* 1–9 (2019).
39. Trevizol, J. S., Martins, B. L. & De Queiroz-Fernandes, G. M. Resistance to polymyxins in *Escherichia coli*. *J. Exp. Clin. Microbiol.* **1**, 8–11 (2018).

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from the Ministry of Health of the Czech Republic (Project NU20-05-00165).

Author contributions

Conceptualization, A.P., L.K. and M.K.; methodology, D.P., L.H., L.V., R.P., V.K., and R.V.; validation, A.P., M.K. and R.V.; formal analysis, L.H.; data curation, A.P., L.H.; writing—original draft preparation, L.H.; writing—review and editing, A.P.; funding acquisition, A.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09294-7>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.P.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

Review Article

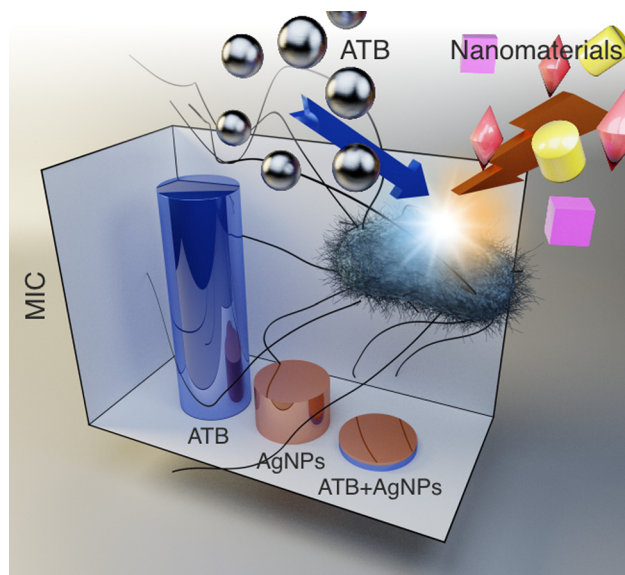
Lucie Hochvaldová, Renata Večeřová, Milan Kolář, Robert Pucek, Libor Kvítek, Lubomír Lapčík, and Aleš Panáček*

Antibacterial nanomaterials: Upcoming hope to overcome antibiotic resistance crisis

<https://doi.org/10.1515/ntrev-2022-0059>

received June 22, 2021; accepted January 21, 2022

Abstract: When combined with nanomaterials, antibiotics show antibacterial activity against susceptible and resistant bacterial strains at significantly lower concentrations. Unfortunately, to date, no research study has examined the effect of the antibiotic mode of action and mechanism of bacterial resistance on the effectiveness of combined antibacterial treatment with nanomaterials. Therefore, in this review, we performed a thorough analysis and critical evaluation of previously published data related to the combined antibacterial effect of antibiotics with nanostructured materials with a targeted focus on relationships between antibiotic's modes of action and bacterial resistance mechanisms for relevant nanomaterials and their impact on the resulting synergistic effects. Following thorough data analysis and critical discussion, we have discovered and are the first who present that antibiotic's mode of action and bacterial resistance mechanism determine the final effectiveness of combined antibacterial treatment with nanomaterials. We therefore conclude that only certain combinations of nanomaterials with antibiotics can lead to the enhancement and restoration of the antibacterial effectiveness of antibiotics against certain resistant bacteria. Moreover, the recently occurring development of bacterial resistance towards nanomaterials is also discussed together with a possibility of how to prevent it. All discovered findings provide a new view and perspective on this



Graphical abstract

issue helping to navigate further approaches to combat the antibiotic crisis.

Keywords: antibiotics, bacteria, modes of action, nanoparticles, resistance, silver

1 Introduction

Bacterial infections still represent a serious and increasing therapeutic problem despite exponentially increasing knowledge in all fields of medicine and considerable improvements in both diagnostic and therapeutic medicine. The main reasons are: (i) the endogenous character of a large proportion of bacterial infections, that is, pathogens originating from the human microflora; (ii) increasing resistance to the effect of antimicrobial drugs; (iii) increasing numbers of immunocompromised patients and persons with artificial materials; and (iv) a high frequency of invasive diagnostic and therapeutic procedures.

Antibacterial agents, as currently known, have been used for more than 75 years. Despite their boom in the

* **Corresponding author: Aleš Panáček**, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, Czech Republic, e-mail: ales.panacek@upol.cz

Lucie Hochvaldová, Robert Pucek, Libor Kvítek, Lubomír Lapčík: Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

Renata Večeřová, Milan Kolář: Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, Czech Republic

1960s and 1970s, documented by the development and implementation of numerous novel drugs, they remain a major issue. Today's medicine even faces a real threat of antimicrobials losing their effectiveness against bacteria, and thus their ability to treat bacterial infections. According to a September 2016 statement by the UN General Assembly, it may be estimated that if bacterial resistance continues to increase at the same rate as before, untreatable infections caused by multidrug-resistant bacteria will be the most common cause of death by 2050 [1]. The increasing resistance of bacterial pathogens to antibacterial agents raises the possibility of a return to the *no-antibiotic era*, in which adequate drugs will be unavailable to treat bacterial infections with the etiological role of multidrug-resistant bacteria. According to the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) interactive database, the high percentages of isolates with resistance to key antimicrobial groups reported from many European countries are of great concern and represent a serious threat to patient safety. For invasive bacterial infections, prompt treatment with effective antimicrobial agents is especially important and is one of the single most effective interventions to reduce the risk of a fatal outcome. Moreover, due to the emergence and spread of bacterial resistance by a mechanism based on the takeover of genetic material from resistant bacterial cells *via* recombination processes, an unstoppable spread of resistance to antibiotics occurs, regardless of their consumption [2]. Concerns about the approaching end of the nearly 80-year era of classic antibiotics caused by increasing bacterial resistance are more than justified and it is high time to adequately address this issue at all possible levels, including the development of new antimicrobial drugs effective against multidrug-resistant bacterial pathogens. At the present time, developing novel antibacterial drugs is not very popular and despite serious threats caused by bacteria (multidrug-resistant strains, newly emerging pathogens, bioterrorism), most big pharmaceutical companies have completely abandoned the development of antibacterials. Among others, this is mainly due to economic factors since higher profits may be earned by developing drugs against other types of diseases (hypertension, cancer, AIDS, *etc.*). The economic calculations must include considerable competition in the market and strict drug approval regulations. Finally, the process of developing novel antibacterials is also technically demanding and time-consuming.

One option for overcoming bacterial resistance is the combination of selected penicillin antibiotics (*e.g.*, ampicillin, amoxicillin, or piperacillin) with bacterial β -lactamase inhibitors (clavulanic acid, sulbactam, or tazobactam) [3]. However, numerous bacterial species exhibit markedly

increased resistance against such combinations of antibiotics with other substances that block the defined bacterial resistance mechanism [4]. Thus, if a novel, developmental, antimicrobial drug is to be effective at conquering bacterial resistance, it must act at several cellular levels and not at a specific level, unlike traditional antibiotics. An option to overcome biofilm formation and bacterial resistance is restoring the antibacterial effects of antibiotics by their combination with novel nanostructured antibacterial substances. Nanomaterials have emerged as novel antimicrobial agents for the treatment and prevention of infectious diseases with demonstrated efficacy against resistant bacteria due to their high surface area to volume ratios resulting in higher ratios between atoms on the surface and atoms inside of materials in comparison with corresponding bulk materials [5–7]. The nanostructured antibacterial materials include metal or nonmetal nanoparticles (NPs) such as silver, gold, copper, bismuth, and selenium, and metal oxide NPs such as ZnO, TiO₂, CaO, MgO, Fe₂O₃, or Al₂O₃ NPs. Most of these nanostructured materials show antibacterial effects themselves through nonspecific activity, which can limit the development of bacterial resistance. Silver and its compounds including nanoscale silver materials represent well-known and highly effective antibacterial substances and thanks to that silver in various forms (metallic silver, silver salts, and colloidal silver) has been used as an effective antibacterial agent for many centuries. Silver NPs can inhibit the growth of pathogenic microorganisms including highly resistant strains at very low concentrations of units of ppm showing no cytotoxicity to mammalian cells [8–11]. Gold, copper, and copper oxide NPs themselves show lower antibacterial activity compared to silver NPs, but they significantly enhance the antibacterial effects of antibiotics in mutual combinations or in combinations with other metal NPs [12–15]. Copper oxide NPs cause bacterial leakage of the cellular content of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and show high activity against staphylococcal biofilm formation [16]. Chemically (redox reaction) or biologically (using microbes) synthesized selenium NPs mainly inhibit staphylococcal bacteria including bacterial biofilm formation and slightly less Gram-negative *Escherichia coli* [17–19]. Bismuth NPs exhibit antibacterial properties just at relatively high concentrations (1 mM). Their antibacterial properties are limited by their low solubility in water, although it can be increased by chelation with dimercaptopropanol, for example [20]. Titanium dioxide and zinc oxide NPs show antibacterial activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria thanks to photocatalytic properties and the generation of reactive oxygen species (ROS), which can damage the bacterial membrane,

DNA, and other bacterial functions, resulting in cell death [21,22]. In addition, zinc oxide NPs are compatible with human skin cells so they can be used as a coating material for medical devices and textiles that come into contact with the human body, and therefore act as wound dressing material [23]. Magnesium and calcium oxide NPs exhibit strong antibacterial effects with minimum inhibitory concentrations of 6 and 100 mg L⁻¹, respectively, thanks to the production of ROS and their high alkalinity [24,25]. Aluminium oxide exhibits poor antibacterial properties and needs to be used in really high concentrations exceeding 1,000 mg L⁻¹ [26].

Recently, several studies have indicated that nanostructured materials and especially silver, gold, copper, bismuth, and other NPs may strengthen the antibacterial effects of conventional antibiotics at low doses of both antibiotics and nanobased compounds. This finding clearly suggests that it is possible to find an effective combination of an antibiotic with nano-based compounds, resulting in a synergistic antimicrobial effect allowing efficient inhibition of bacterial pathogens using significantly lower doses as compared with the antibiotic alone [27–30]. High synergistic antibacterial effects of silver NPs even at a concentration below 1 mg L⁻¹ in combination with antibiotics have been reported [31–35]. Such low concentrations do not exert cytotoxic effects on human cells or blood as was proved in earlier studies [36–38]. More importantly, restoring of susceptibility of resistant bacterial strains to antibiotics through the synergistic effect in combination with silver, gold, and TiO₂ NPs has been reported [37,39–44]. In other words,

antibiotics that originally were totally ineffective show bactericidal effects against multidrug-resistant bacterial strains when combined with metal and metal oxide NPs. This constitutes a great perspective for nanostructured materials as antibacterial agents; combining antibiotics with nanomaterials provides one potential approach to an effective fight against the unresolved problem of increasing resistance of pathogenic bacteria against traditional antibiotics.

On the other hand, bacteria can resist the antibacterial effect of metal cations and oxyanions by, among others, energy-dependent active efflux of toxic ions [45]. Given the constant changes of bacterial genomes and their ability to adapt to negative conditions, it is apparent and predictable that bacteria are able to counter the antibacterial effects of metal and metal oxide NPs even though, unlike classic antibiotics, NPs show a multilevel mode of action that makes the development of bacterial resistance more complicated and difficult but cannot prevent it completely. Recently, Graves *et al.* reported that bacteria can easily develop resistance to silver NPs due to relatively simple genomic changes [46]. On the contrary, Panacek *et al.* and Gunawan *et al.* reported silver resistance in *Escherichia coli* strains, which is not due to changes in the bacterial DNA. Gunawan *et al.* found that *Bacillus subtilis* has a natural ability to adapt to cellular oxidative stress induced by Ag⁺ leaching upon prolonged exposure to silver NPs supported on crystalline TiO₂ [47]. Panáček *et al.* stated that the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* can develop resistance to silver NPs after repeated exposure by flagellin production, which triggers the

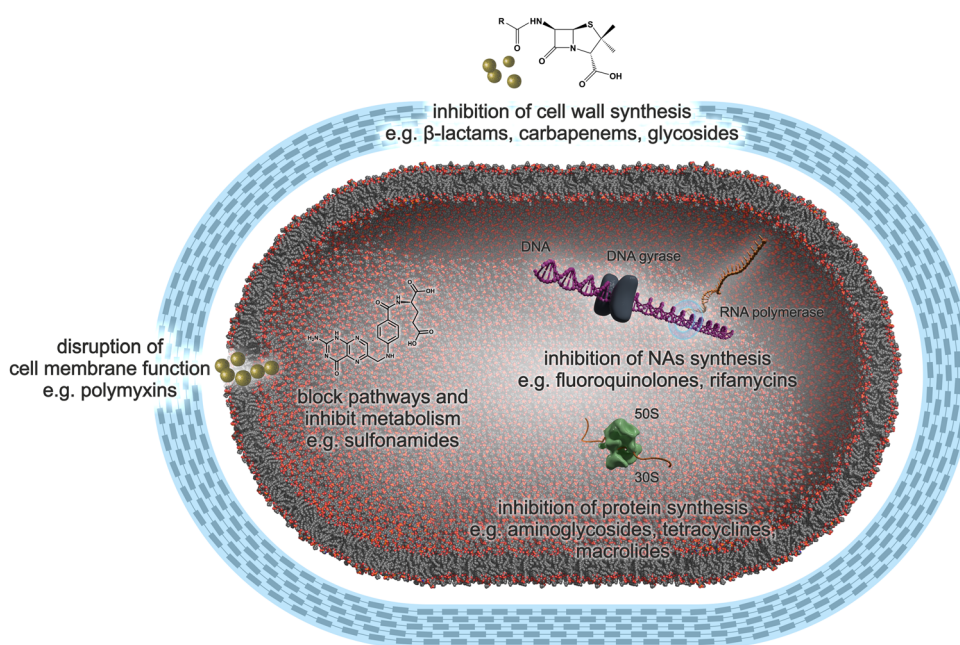


Figure 1: Mechanisms of action of antibiotics.

aggregation and destabilization of silver NPs [48]. Zhang *et al.* reported that *Escherichia coli* develops adaptive resistance to ZnO NPs after several days' exposure to the NPs, consisting of changes in the shape of the bacteria and the expressions of membrane proteins [49].

2 Antibiotics and bacterial resistance

Antibiotics are classified as antibacterial substances with bacteriostatic (inhibiting bacteria) or bactericidal (killing bacteria) properties. They are classified into several groups based on their mode of action, chemical structure, or spectrum of activity. Generally, the bacteriostatic or bactericidal effects of antibiotics are based on affecting bacterial growth processes and bacterial functions. On the other hand, an individual antibiotic with an appropriate mode of action usually acts upon one specific target site of the bacterial cell. Based on the mode of action (Figure 1), we recognize antibiotics inhibiting bacterial cell wall synthesis (e.g. β -lactams or glycopeptides), disturbing the cell membrane (polymyxins), inhibiting nucleic acid synthesis (fluoroquinolones), proteosynthesis (tetracyclines, aminoglycosides, or macrolides), and folic acid synthesis (sulfonamides) [50].

In order to exert its antimicrobial action, an antibiotic has to go through a few steps. First, it must enter the bacterial cell (influx), and then remain stable or be activated and accumulated to inhibitory concentrations. Afterwards, it can locate and interact with its target and perform antimicrobial action. Changes to any of these steps result in bacterial resistance to the antibiotic, no matter its mode of action, chemical structure, or spectrum of activity [21].

Bacterial resistance to antibacterial agents may be understood as the ability of the bacterial population to survive the effect of a defined concentration of a particular antibacterial. However, it is necessary to distinguish (i) natural (primary) resistance, that is, the resistance of bacterial species that are outside the range of effects of that antibacterial agent; an example of natural resistance is the absence of a target structure for a particular antibacterial; and (ii) acquired (secondary) resistance, that is, a change from an originally susceptible bacterium to a resistant one. The mechanisms of resistance to the effects of antibacterial agents may be characterized as follows: (i) production of bacterial enzymes that disrupt or modify the structure of antibacterials; (ii) changes in the permeability of the bacterial wall and cytoplasmic membrane; (iii) modification of antibacterial target sites; and (iv) increased elimination of an antimicrobial from bacterial cells (bacterial efflux) [51–53] (Figure 2).

The latter presents a more serious problem as its full extent cannot be defined in advance and needs to be detected by relevant microbiological tests. These require some time, which may be a problem, particularly in case of severe bacterial infections. Antibiotic therapy must be initiated as soon as possible, or immediately after the diagnosis is made, due to higher mortality of patients in whom adequate antibiotic therapy was delayed [54].

It should be stressed that the development and spread of bacterial resistance must be seen as natural processes that cannot be fully prevented but may be used and influenced, both positively and negatively. The majority of resistance mechanisms in bacteria developed long before the first modern antibacterial agents were used for treatment. This is probably determined by the fact that most antibacterials are derived from compounds commonly

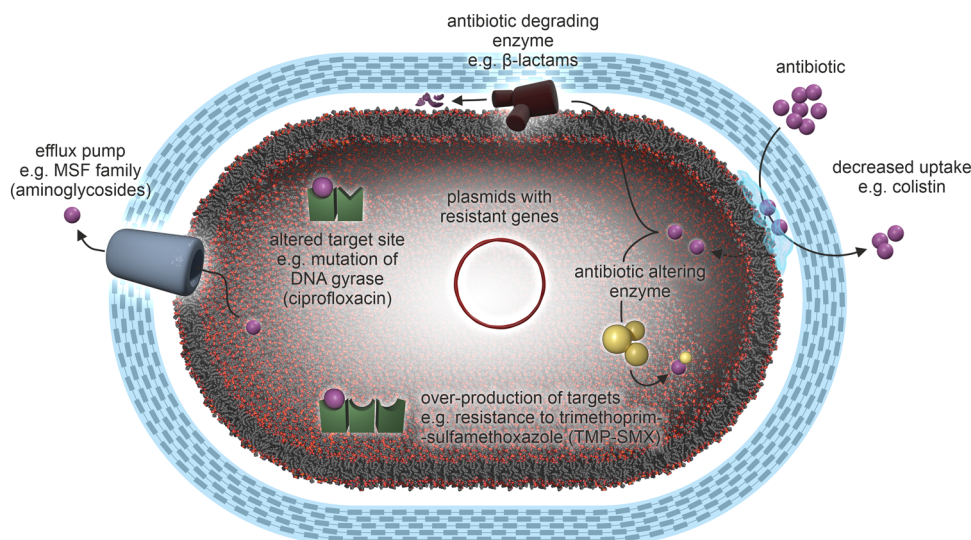


Figure 2: Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics.

produced by other microorganisms. Resistance mechanisms usually do not occur by accident and suddenly but wait for conditions that allow them to succeed in the bacterial population. A typical example may be the resistance of *Staphylococcus aureus* to β -lactam antibiotics. After penicillin was introduced into treatment, strains resistant to penicillin occurred rapidly. In the early 1940s, less than 1% of *Staphylococcus aureus* strains in English hospitals were resistant to penicillin. The rate increased to as much as 60% in 1946 [55].

The most important causes for the development of bacterial resistance are changes in bacterial genotype. These may be defined by chromosomal mutations followed by a selection of resistant cells (chromosomal resistance) that may be negatively influenced by the selection pressure of antibacterial drugs, that is, antibiotic therapy itself. However, a more important mechanism is a process based on the transfer of genetic material through recombination processes, that is, conjugation, transformation, and transduction (extrachromosomal resistance). Therefore, a very worrying possibility must be considered that an imaginary threshold has been crossed and resistance of numerous bacteria to broad-spectrum antibiotics “lives its own life” through the transfer of mobile genetic elements encoding resistance, for example, production of broad-spectrum β -lactamases. The threshold means a certain level of resistance genes circulating in the bacterial population that are horizontally transferred by recombination processes (mainly conjugation), causing the unstoppable spread of resistance to antimicrobials independently of their consumption [56]. Bacterial resistance is not a theoretical microbiological term but a reality with serious negative clinical impacts.

Many studies have been published that document higher mortality and shorter survival of patients with infections caused by multidrug-resistant bacteria compared to infections caused by susceptible strains of the same species. For example, Rello *et al.* reported 86% mortality of patients with ventilator-associated pneumonia due to methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* as compared with 12% in the case of *Staphylococcus aureus* isolates susceptible to methicillin/oxacillin. Tumbarello *et al.* found that the mortality of patients with bloodstream infections caused by enterobacteria with positive production of broad-spectrum β -lactamases reached 60% in case of inadequate antibiotic therapy but only 19% if antibiotic therapy was effective. Kang *et al.* documented a difference in 30-day mortality from infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* between adequate initial antibiotic therapy (28%) and delayed initiation of effective treatment (43%). Herkel *et al.* showed a statistically significant difference in mortality between adequate and inadequate antibiotic therapy

of ventilator-associated pneumonia. The mortality rates were 27% for patients receiving adequate therapy and 45% for inadequate therapy, meaning that bacterial pathogens were resistant to initial antibiotic treatment [54,57–59].

The development of bacterial resistance is unstoppable and will continue despite all measures taken. One possible solution is undoubtedly nanotechnology, for example, a combination of existing antibacterials with silver NPs. These are highly active against numerous bacteria including multidrug-resistant strains, for example, methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci, and enterobacteria producing broad-spectrum β -lactamases.

3 Antibacterial nanomaterials and their mechanism of action

The mode of action of metal and metal oxide NPs is not fully described and clear yet, but for relevant metals, several modes of action have been proposed (Figure 3). Each of the NPs, regardless of the chemical composition, is able to fight bacteria by various mechanisms and such a multilevel mode of action makes the development of bacterial resistance much more difficult. Besides, NPs are able to deliver antibiotics to the bacteria, while acting as a drug carrier, which results in drug potency enhancement and limits overall drug exposure. The most commonly applied ways of how NPs fight a wide range of pathogens are disruption of the cell wall, cytoplasmic membrane, and production of ROS leading to oxidative stress, followed, to a lesser extent, by enzymatic inhibition, changes in gene expression, and protein deactivation [5,60,61].

NPs are accumulated on the surface and create “pits” in the bacterial wall. Therefore, they are able to penetrate the cell wall, causing changes to the cell membrane, structural damage, and cell death [62]. The bactericidal effect of positively charged ions released by NPs is enhanced by binding with the negatively charged surface of bacteria (carboxyl, phosphate groups) in a process known as biosorption [5,60]. Besides that, electrostatic binding to the cell wall leads to membrane depolarization, change of membrane potential, and loss of its integrity, resulting in interruption of energy transduction and cell death [22]. However, thanks to the thick peptidoglycan layer of Gram-positive bacteria, penetration of NPs into bacteria is harder and, therefore, NPs interact with the bacterial surface only [63,64].

Oxidative stress is induced by ROS, which has strong positive redox potential. ROS are induced by respiratory

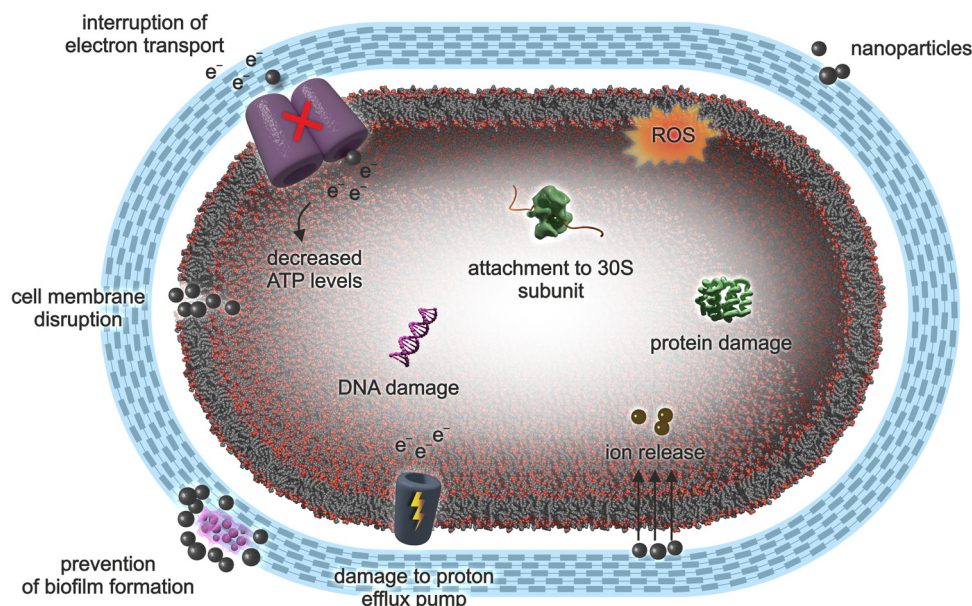


Figure 3: Mechanisms of action of nanostructured materials.

chain disruption or by NPs themselves [65]. ROS include hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen (O_2), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), and superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Different combinations of ROS are produced by different NPs, resulting in different antimicrobial properties. For example, Ag and Cu NPs generate all types of ROS, whereas MgO NPs only produce the superoxide radical and ZnO NPs produce a combination of hydrogen peroxide and the hydroxyl radical only [5]. ROS production occurs during the basic mechanism and it is caused by defects and vacancies in the crystal [66]. Normally, the production and the removal of ROS are balanced. However, under high levels of stress, there is excessive production of ROS, which changes the permeability of the cell membrane and causes bacterial damage [60,67,68]. The production of ROS is mediated by various mechanisms. The photocatalytic hypothesis is based on the irradiation of NPs with energy greater than the band gap, which leads to the stimulation of electrons in the valence band and their transition to the conduction band, resulting in a hole in the valence band and the production of highly reactive reactants on the surface of and inside the material. Intracellular and extracellular ROS can disrupt the cell membrane by lipid oxidation, easily producing free radicals [69,70]. Thanks to its thickness and negatively charged surface, the cell wall structure of Gram-positive bacteria is more difficult to penetrate, which slows down the penetration of oxygen radicals such as $\text{OH}^{\cdot}$. Besides oxidative stress, ROS can cause cell damage to macromolecules, leading to lipid peroxidation, alteration of protein, inhibition of enzymes, and RNA or DNA damage.

Significant antimicrobial effects *via* production of ROS can be observed in the case of Ag [71–73], ZnO [74,75], TiO_2 [76–78] and iron oxide [79] NPs.

3.1 Silver NPs

The mechanism of action is not fully understood, which complicates the understanding of interactions between NPs and bacterial cells. However, all existing data suggest that Ag NPs exhibit various antibacterial mechanisms in parallel and bind non-specifically to a wide variety of targets. By doing so, they disturb many aspects of the cell metabolism, which makes the development of resistance towards them much more difficult [80,81]. It is thought that silver NPs serve as a reservoir for silver ions released *via* the oxidative dissolution process [82,83]. NPs

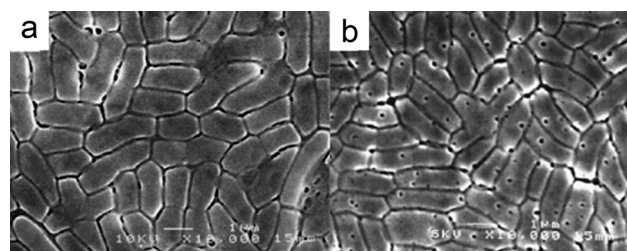


Figure 4: Scanning electron microscopy images of (a) native *E. coli* cells and (b) cells treated with silver NPs created “pits.” Reproduced with permission [92]; Copyright 2004, *Journal of Colloid and Interface Science*.

are then able to adhere to the negatively charged bacterial cell wall and create “pits” (holes) in it (Figure 4b), which leads to depolarization and collapse of plasma membrane potential [62,84]. As a result, the cytoplasmic contents flow out and the cell membrane becomes more permeable, making penetration of NPs into the cells and their interaction with intercellular components much easier [85–87]. A released Ag^+ ion inhibits the site between cytochrome $\alpha 2$ and b-cytochromes in the respiratory chain. NPs can also interrupt the cellular respiration process, inhibit the cytochrome in the electron transport chain or denature the 30 S ribosomal subunit (prevent protein translation) [60,88]. The second mechanism proposes the production of ROS at the cell membrane, which leads to DNA replication damage, destruction of biomolecules and contributes to oxidative stress. Furthermore, silver NPs bind easily to thiol, amino, and phosphate groups, which are important parts of DNA, peptides, and enzymes. Interaction of NPs with those groups can therefore inactivate enzymes, change protein expression and interrupt metabolic processes, which might lead to damage or inhibition of DNA/RNA replication and cause irreversible bacterial damage and cell death [84,85,89,90]. The antibacterial mechanism involved in the synergism is the production of hydroxyl radicals and degradation of the function and protective factors, which leads to reduction of the antibiotic concentration and decline of bacterial viability [91].

3.2 Gold NPs

The most common antibacterial action of gold NPs is through inhibition of tRNA binding to the ribosome during DNA transcription or attachment of the NPs to the bacterial cell wall, changing its potential and leading to the adenosine triphosphate level decrease, leakage of cell contents, and cell death [93,94]. Gold NPs are more effective against Gram-negative bacteria, which is due to easier incorporation of the NPs into the bacteria [95,96]. Since gold NPs might have a ROS-independent mechanism, they seem to be safer for mammalian cells [97].

3.3 Titanium dioxide NPs

Thanks to their photocatalytic properties, TiO_2 NPs are able to kill bacteria just by simple UV illumination, which induces the generation of ROS, leading to oxidative stress, DNA, lipid, and protein damage [77,98]. However, even without illumination, TiO_2 NPs keep their antibacterial properties. In this case, NPs adsorb on the surface and

interact directly with the cell wall, resulting in the loss of membrane integrity [99]. Doping by other metal NPs enhances their antibacterial properties and helps them fight bacteria [76,100–102].

3.4 Zinc oxide NPs

Similar to TiO_2 NPs, zinc oxide NPs exhibit strong photocatalytic properties. After UV irradiation or even without it, they produce ROS that might further cause inhibition of DNA replication, protein denaturation, or cell membrane disruption, resulting in high antibacterial effects [75,103]. Another proposed mechanism of action is zinc ion release followed by accumulation of ZnO NPs on the bacterial membrane (by electrostatic forces), therefore interrupting transmembrane electron transport or entrance into the cell causing enzymatic inhibition, DNA or mitochondrial damage, which all lead to inhibition of bacterial growth and cell death [104–106]. Recently, Kadiyala *et al.* suggested a mechanism of action related to energy metabolism alteration within the cell resulting in increased pyrimidine biosynthesis (especially uridine monophosphate biosynthesis), carbohydrate metabolism, and decreased amino acid synthesis. This mechanism also explains higher antibacterial activity against *S. aureus* in comparison with *E. coli*, because *E. coli* does not require uridine for anaerobic growth [107,108].

3.5 Iron oxide NPs

The mode of action of iron oxide NPs is through the dissolution of metal ions, which interact with the bacterial cell, penetrate the membrane and interfere with electron transfer or through the formation of ROS, which damage DNA and proteins [5,109,110].

3.6 Platinum NPs

Like other metal NPs, platinum NPs diffuse through the cell wall and cytoplasmic membrane and induce ROS generation, DNA damage, accumulation of cells during the S-phase of the cell cycle, and consequently, cell death [111–113].

3.7 Copper and copper oxide NPs

Copper NPs and their subsequent ion release can cause morphological changes and interact with the cell membrane

and decrease its transmembrane electrochemical potential, which affects the membrane integrity and causes cellular death [114]. Besides, they are able to generate ROS, which might result in mitochondrial damage, lipid peroxidation, and DNA damage. Copper oxide also produces ROS, which is followed by DNA degradation or membrane disruption leading to damage of vital enzymes and cell death [115–120]. In the presence of CuO NPs, the expression of key proteins is changed, which has a major influence on bacterial denitrification and other metabolic processes such as active transport and electron transfer [65,121].

3.8 Selenium NPs

Selenium oxyanions released from selenium NPs can disrupt the cell wall or produce ROS able to react with thiol groups present in the cell; together, they produce superoxide radicals that result in oxidative stress. Another mechanism of action might be disruption of intercellular adenosine triphosphate concentrations or depolarization/disruption of the bacterial membrane, which has a negative effect on cell division and membrane transport and leakage of the cytosolic content, respectively [122–124].

3.9 Magnesium oxide NPs

Antibacterial properties of magnesium oxide depend not only on the size of particles but also on pH, while high pH damages the cell membrane and causes bacterial cell death [115,125–127]. MgO NPs also generate ROS on the surface and damage the cell wall, which results in intracellular contents leakage and cell death [128–130].

4 Synergistic effect of antibiotics in combination with antibacterial nanomaterials

4.1 Synergistic activity against antibiotic-susceptible bacteria

In the previous section, the antibacterial activity of various metal or metalloid NPs and their compounds including their mechanism of action at different bacterial cellular levels have been reviewed and discussed. Additionally, nanostructured materials may also be applied in combination with antibiotics to enhance their antibacterial effects

at significantly lower concentrations of both NPs and antibiotics. Many scientific papers have described synergistic effects of metal and metal oxide NPs in combination with antibiotics resulting in increased antibiotic activity and decreased nanoparticle toxicity to mammalian cells. The current state of the art on this synergistic activity has been repeatedly summarized [65,109,115,131]. However, most of the synergies reported in those reviews were observed using antibiotic-sensitive bacteria. The synergic effects were usually examined by either the disc diffusion method or the microdilution method (Figure 5). The microdilution method provides information on the level of synergy by determining the fractional inhibitory concentration (FIC), enabling to specify the enhancement of antibacterial activity as synergistic, additive, indifferent, and antagonistic effects. On the contrary, the disc diffusion method does not enable quantifying the synergistic effect in principle, and it is difficult to differentiate between synergistic and additive, indifferent or antagonistic effects.

To date, synergistic effects of antibiotics combined with metal and metal oxide NPs have been predominantly evaluated against antibiotic-sensitive bacteria. Most of the experiments determining synergistic effects were conducted on silver [33,35,133–140] and gold NPs [34,141–144]. However, synergistic effects have also been evaluated using other metal and metal oxide NPs showing antibacterial properties such as copper [28,145,146], titanium dioxide [147,148], and zinc oxide [30,64,149]. The synergy of silver NPs has been deeply studied in combination with antibiotics of various modes of action and chemical structures, for example, antibiotics inhibiting protein synthesis (aminoglycosides), cell wall synthesis (β -lactams and carbapenems), nucleic acid synthesis (quinolones), and antibiotics disrupting the cytoplasmic membrane (polymyxins). In this particular case, synergistic effects of silver NPs combined with β -lactams (ampicillin, methicillin, penicillin), glycopeptides (vancomycin), quinolones (ciprofloxacin), sulfonamides (trimethoprim), aminoglycosides (amikacin, gentamicin, kanamycin, streptomycin), macrolides (erythromycin), and tetracyclines (tetracycline) [33,34,39,133–135,138,139,150,151], have been confirmed against a wide range of both Gram-negative and Gram-positive bacteria. Silver NPs enhance antibiotic activity at very low concentrations ranging from tens to several units of ppm, which is beneficial to nanoparticle toxicity because low silver concentrations do not show toxic effects on mammalian cells and humans. Synergistic effects of gold NPs in combination with different antibiotics against sensitive bacteria have been observed in almost all cases including both Gram-negative and Gram-positive bacteria. For example, high synergistic effects of gold NPs combined with meropenem against *Acinetobacter baumannii* [143] and

amoxicillin and streptomycin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [34] at concentrations ranging from 1 to 16 mg L⁻¹ gold have been reported. In the case of bismuth NPs, synergistic effects have only been evaluated using antibiotics inhibiting nucleic acid synthesis (fluoroquinolones). Enhancement of antibacterial activity was only shown for ciprofloxacin combined with bismuth NPs against *Klebsiella pneumoniae* [27]. Copper NPs enhance the antibacterial activity of antibiotics at concentrations ranging from 20 to 50 mg L⁻¹ depending on the antibiotic or bacterial strain. For example, synergistic effects of copper NPs combined with ampicillin, amoxicillin, ciprofloxacin, and gentamicin have been observed against various bacteria such as *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Salmonella typhimurium* [28]. Zinc oxide NPs at concentrations ranging from 30 to 80 mg L⁻¹ have been combined with fluoroquinolones (norfloxacin, ofloxacin) [30] or β -lactams (cephalexin, ceftriaxone, cefotaxime) [152] in order to highly enhance their activity against both Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria. Titanium dioxide NPs have been studied as a potential antibacterial agent in combination with streptomycin, with increased antibacterial properties being shown against *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*.

4.2 Synergistic activity against antibiotic-resistant bacteria

It must be noted that all the mentioned results on high synergistic effects of metal and metal oxide NPs have been conducted on bacteria sensitive to antibiotics. On the one hand, those experiments are crucial to prove the ability of NPs to enhance the antibacterial properties of antibiotics. On the other hand, such research is relatively unnecessary, insignificant, and senseless as there is no need to increase the effectiveness of antibiotics reliably shown to fight bacteria. Enhancing and restoring the effects of

antibiotics only make sense in the case of antibiotic-resistant bacteria that currently complicate the treatment of bacterial infections, increasing patient's mortality. Therefore, the following parts of this review are concerned with the synergistic effects and enhancement of the antibacterial activity of antibiotics combined with nanomaterials against antibiotic-resistant bacteria, which is important and significant to explore possible ways of overcoming bacterial resistance. All data are summarized in Table 1 and Figure 6. Moreover, relationships between antibiotic modes of action, bacterial resistance mechanisms, and types of nanostructured materials and their impact on the final synergistic effects are discussed below.

Enhancement of antibacterial activity of various antibiotics combined with silver [39–44], gold [13,153–156], and TiO₂ NPs [147] against resistant Gram-positive and Gram-negative bacteria has only been studied so far. Generally, bacteria can resist the antibacterial effects of antibiotics primarily (naturally) or secondarily (through genetic mutations or a gene transfer from other bacteria) (see the Antibiotics and Bacterial Resistance section). Enhancement of antibacterial activity of antibiotics against primarily resistant bacteria was only investigated in combination with silver NPs, whereas in the case of secondarily resistant bacteria, the synergistic effects of antibiotics combined with silver, gold, and TiO₂ NPs have been evaluated.

4.2.1 Silver NPs

4.2.1.1 Primarily resistant bacteria

Silver NPs are currently among the most studied biologically active metal NPs, with most experiments on synergistic effects against resistant bacteria being conducted exclusively with silver NPs. More importantly, the combination of silver NPs with antibiotics may result in increased antibacterial activity and restored activity of currently ineffective antibiotics against resistant bacteria [8].

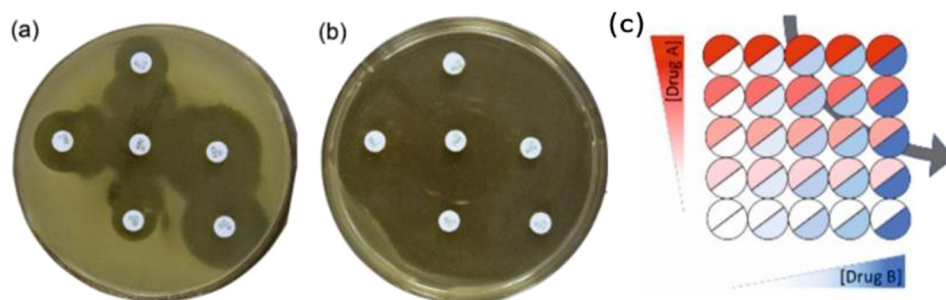


Figure 5: Disc diffusion method showing antibacterial activity of (a) an antibiotic alone and (b) in combination with Ag NPs. Reproduced with permission [37]; Copyright 2016, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. (c) Microdilution checkerboard method for simultaneous MIC and FIC determination. Reproduced with permission [132]; Copyright 2018, *Journal of Visualized Experiments*.

Table 1: Summary of antibacterial effects of antibiotics combined with silver, gold, and TiO₂ NPs against resistant bacteria

NPs	R	Mode of action	Antibiotic class	Antibiotic	No enhancement	Enhancement
Ag	Primary resistance	Cell wall synthesis	β -Lactams	Ampicillin	—	<i>A. baumannii</i> <i>E. cloacae</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>
				Vancomycin	<i>A. baumannii</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	
			β -Lactams	Imipenem	—	<i>A. baumannii</i> <i>B. subtilis</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>M. luteus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>A. baumannii</i>
				Meropenem	—	<i>A. pleuropneumoniae</i> <i>E. coli</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. oralis</i>
	Secondary resistance	Cell wall synthesis	β -Lactams	Amoxicillin	—	<i>A. pleuropneumoniae</i> <i>E. coli</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. oralis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. mutans</i> <i>S. sonnei</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>A. pleuropneumoniae</i> <i>S. aureus</i> <i>S. mutants</i> <i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>A. baumannii</i> <i>E. coli</i> <i>E. faecium</i> <i>M. pneumoniae</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. sonnei</i> <i>S. aureus</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. oralis</i> <i>S. mutants</i> <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>S. mutants</i> <i>A. actinomycetemcomitans</i>
				Penicillin	—	<i>S. aureus</i> <i>S. mutants</i>
				Ampicillin	<i>P. aeruginosa</i>	
				Cefotaxime	—	
				Ceftazidime	<i>A. baumannii</i>	
				Cefpodoxime	<i>E. faecalis</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. oralis</i>	
				Cefuroxime	<i>E. faecalis</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. oralis</i>	
			Glycopeptides	Vancomycin	<i>B. subtilis</i> <i>E. faecalis</i> <i>M. luteus</i> <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. mutants</i>
					—	<i>A. pleuropneumoniae</i> <i>P. multocida</i>
		Cell membrane	Polymyxins	Colistin	—	

(Continued)

Table 1: Continued

NPs	R	Mode of action	Antibiotic class	Antibiotic	No enhancement	Enhancement
		Protein synthesis	Aminoglycosides	Amikacin	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i> <i>E. cloacae</i> <i>E. coli</i> <i>E. faecium</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. sonnei</i> <i>S. aureus</i>
				Gentamicin	<i>A. baumannii</i> <i>E. coli</i> <i>E. faecalis</i> <i>S. gordonii</i>	<i>A. baumannii</i> <i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>A. pleuropneumoniae</i> <i>B. subtilis</i> <i>E. faecalis</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>M. luteus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>P. multocida</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. oralis</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. mutants</i> <i>S. sonnei</i> <i>S. aureus</i>
				Neomycin	—	<i>S. typhimurium</i>
				Kanamycin	—	<i>A. baumannii</i> <i>E. aerogenes</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. typhimurium</i> <i>A. actinomycetemcomitans</i>
				Clydamycin	<i>E. coli</i> <i>E. faecalis</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>S. oralis</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. gordonii</i>
				Erythromycin		<i>A. actinomycetemcomitans</i>
					<i>E. coli</i> <i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. oralis</i>
				Chloramphenicol	—	<i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. oralis</i>
				Tetracycline	<i>S. oralis</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>S. gordonii</i>
		Folate synthesis	Sulfonamides	Trimethoprim	<i>A. baumannii</i> <i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i> <i>E. faecalis</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>M. luteus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	—
		NA synthesis	Qinolones	Ciprofloxacin	<i>A. baumannii</i> <i>E. faecalis</i>	<i>A. baumannii</i>

(Continued)

Table 1: Continued

NPs	R	Mode of action	Antibiotic class	Antibiotic	No enhancement	Enhancement
					<i>E. coli</i> <i>M. luteus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. oralis</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>B. subtilis</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>S. mutants</i>
Au	Secondary resistance	Cell wall synthesis	β-Lactams	Amoxicillin Methicillin Cefotaxime Ceftriaxone	— <i>S. epidermidis</i> <i>S. haemolyticus</i> — —	<i>S. aureus</i> — <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>S. aureus</i>
			Glycopeptides	Vancomycin	<i>S. haemolyticus</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. mutants</i> <i>S. epidermidis</i>
		Protein synthesis	Aminoglycosides	Gentamicin	—	
		NA synthesis	Quinolones	Ciprofloxacin	—	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. haemolyticus</i>
				Levofloxacin	—	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>S. aureus</i>
				Nalidixic acid	—	<i>S. epidermidis</i> <i>S. haemolyticus</i>
				Rifampicin	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i> <i>S. haemolyticus</i>
TiO ₂	Secondary resistance	Cell wall synthesis	β-Lactams	Penicillin G Ampicillin Cloxacillin Oxacillin Amoxycillin	—	<i>S. aureus</i>
			Glycopeptides	Vancomycin		
			Cephalosporins	Cefotaxime Ceftazidime Cephalexin		
		Protein synthesis	Aminoglycosides	Amikacin Gentamycin Streptomycin		
			Azalides	Clarithromycin		
			Lincosamides	Clindamycin		
			Macrolides	Erythromycin		
		NA synthesis	Fluoroquinolones	Ciprofloxacin Norfloxacin		
			Sulfonamides	Tetracycline Cotrimoxazole Rifampicin Sulphazidime Chloramphenicol		
			Quinolone	Nalidixic acid	<i>S. aureus</i>	—

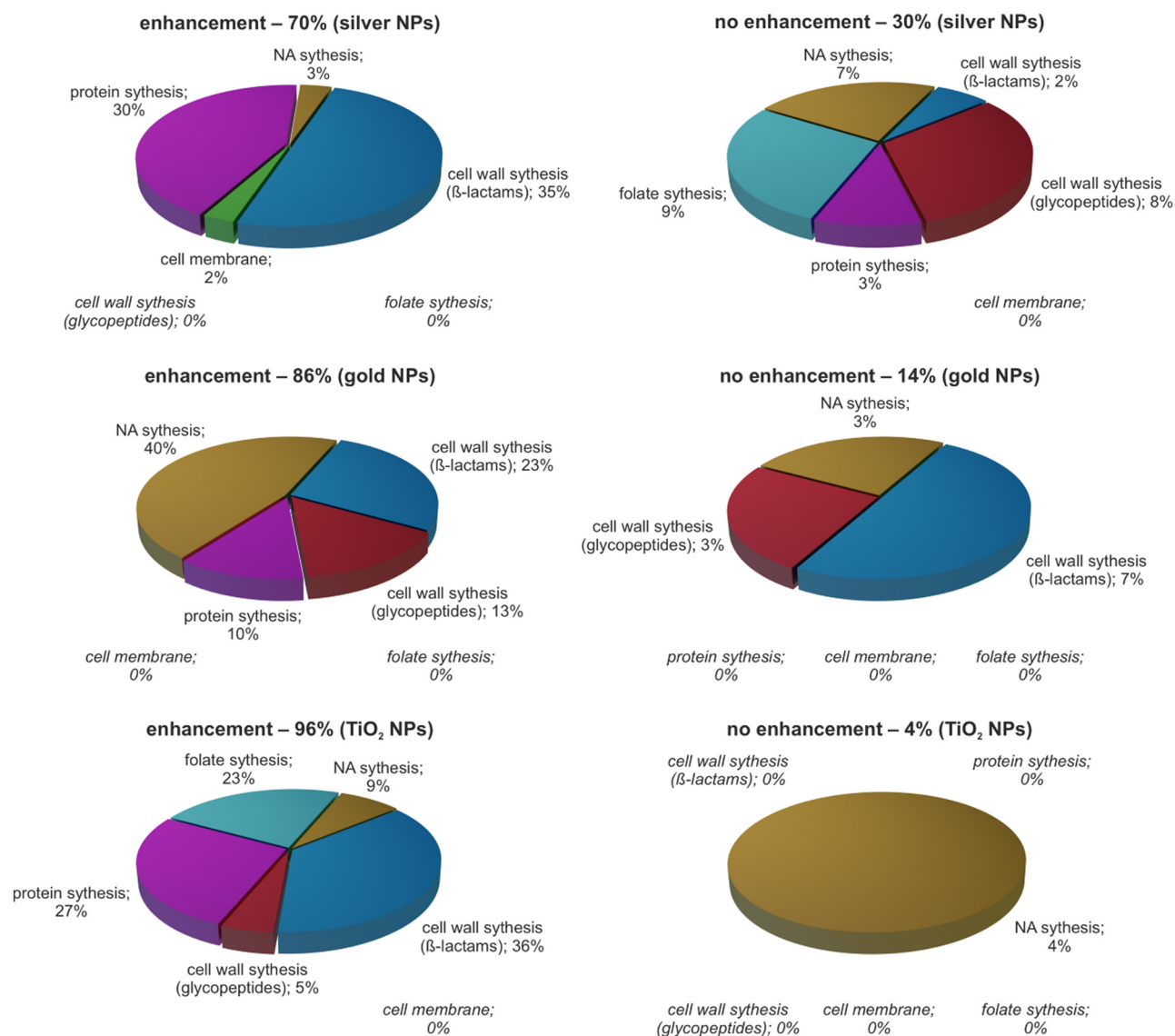


Figure 6: Percentages of enhancement and indifferent effects (no enhancement) of antibiotic classes divided based on the mode of action against resistant bacteria.

Synergistic enhancement of antibacterial activity using silver NPs against *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumonia*, and *Pseudomonas aeruginosa* primarily resistant to ampicillin and *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli* primarily resistant to vancomycin has been studied by Lopez-Carrizales *et al.* [39] and Naqvi *et al.* [42].

Ampicillin and vancomycin belong to a group of antibiotics inhibiting cell wall synthesis, albeit through different molecular mechanisms. Ampicillin inhibits the synthesis of peptidoglycan, a building unit of the cell wall, through binding to a penicillin-binding protein (enzyme transpeptidase reforming the peptide cross-links) involved in peptidoglycan synthesis in both Gram-negative and

Gram-positive bacteria. Vancomycin binds to the monomers of *N*-acetylmuramic acid and *N*-acetylglucosamine, building blocks of peptidoglycan, preventing the transpeptidase from acting on these newly formed blocks and thus cross-linking of the peptidoglycan layer, but only in the case of Gram-positive bacteria. Nevertheless, all tested bacteria naturally resist the effects of ampicillin and vancomycin. In the case of ampicillin, all tested bacteria naturally produce β-lactamases, enzymes changing the configuration of ampicillin molecules; this prevents binding to the target site (penicillin-binding protein) and inhibits peptidoglycan synthesis. Vancomycin is not active against Gram-negative bacteria due to the different mechanisms by which Gram-negative bacteria produce their cell walls and various factors

related to entering the outer membrane of Gram-negative organisms.

Synergistic effects and restored antibacterial effects of antibiotics have been observed for all experiments with ampicillin (a β -lactam antibiotic targeting cell wall synthesis) against all tested resistant bacteria (*Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*), as reported by Lopez-Carrizales *et al.* [39] It is probably thanks to silver NPs that can disrupt the bacterial cell wall and cytoplasmic membrane easily. Cell wall disruption leads to the leakage of the periplasmic contents (including β -lactamases) out of the bacteria. As a result, the concentration of β -lactamases in the periplasm decrease, and the bacteria are not able to resist the ampicillin action. After that, the antibiotic may bind to the target site and exert its antibacterial activity. Silver NPs can also damage several molecular systems of efflux pumps working at the cell wall and cytoplasmic membrane. Therefore, antibiotic molecules cannot be pumped out of the bacteria, reach the minimum inhibitory concentration within the cell, and the antibiotic can become effective again.

Unlike ampicillin, the synergistic effects of silver NPs combined with vancomycin have not been demonstrated in all of the cases. Naqui *et al.* reported that silver NPs combined with vancomycin do not show enhancement of antibacterial activity against *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli*. In the case of *Pseudomonas aeruginosa*, the vancomycin inhibition zone slightly increased from 14 to 17 mm when the drug was combined with silver NPs. However, such an increase is insignificant and cannot clearly confirm the enhancement of antibacterial activity. Considering the mechanism of primary resistance of Gram-negative bacteria involving the lacking target site for vancomycin, it may be expected that silver NPs cannot enhance the antibacterial effects of antibiotics. If there is no specific target site to bind an antibiotic in bacteria, its antibacterial activity cannot be enhanced. On the other hand, Kaur *et al.* and Ma *et al.* described the enhancement of antibacterial effect in *Escherichia coli*, where the vancomycin was bounded to the nanoparticle surface, so this interaction was able to provide effective delivery of the antibiotic to the bacteria, where both silver ions and vancomycin interacted with the cell membrane and inhibited bacterial growth [157,158].

4.2.1.2 Secondarily resistant bacteria

Synergistic effects of silver NPs with antibiotics and their ability to restore the activity of antibiotics against bacteria

showing acquired (secondary) antibiotic resistance have not been studied as extensively as in antibiotic-sensitive bacteria [39–44]. Overall, approximately 100 experiments evaluating the synergistic effects of antibiotics with different modes of action and chemical structures combined with silver NPs against various resistant bacteria have been performed. This is a relatively small number compared to more than 700 experiments on the synergistic effects of silver NPs combined with antibiotics against antibiotic-susceptible bacteria. Most of the tested resistant bacteria involved Gram-negative strains causing the most problematic and difficult-to-treat infections in humans. Twenty percent of all tested resistant bacteria with described resistance mechanisms originated from public strain collections and 80% of resistant strains were isolated from human clinical materials; for these, unfortunately, any description of resistance mechanisms is missing. As for the mode of action, 43% of the reported antibiotics are protein synthesis inhibitors, 27% cell wall synthesis inhibitors, 25% nucleic acid inhibitors, and 5% cytoplasmic membrane disruptors.

The synergistic effects of β -lactam antibiotics (cell wall synthesis inhibitors) combined with silver NPs have been reported by Sharma *et al.*, Panáček *et al.*, and Ono *et al.* [37,159–161] The best outcomes have been observed with imipenem and meropenem (carbapenems). In the case of imipenem, the synergistic effects have been seen for all the tested resistant bacteria (Gram-negative *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and Gram-positive *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, and *Staphylococcus aureus*). Meropenem combined with silver NPs showed higher antibacterial activity against *Klebsiella pneumoniae*. In the case of Gram-negative bacteria, the mechanisms of resistance to carbapenems usually involve plasmid-mediated carbapenemase production and loss of porin channels [159]. A Gram-positive strain of *E. faecalis* is known for resistance to imipenem through carbapenemase production and also for overproduction of peptidoglycan strengthening the cell wall [160]. All these mechanisms of resistance to imipenem and meropenem can be overcome by the effects of silver NPs located in the cell wall (peptidoglycan overproduction) and periplasmic space (carbapenemase production). Silver NPs may interact with porin channels and peptidoglycan on the surface of the bacteria, disrupt and penetrate the cell wall, allowing the antibiotic to get inside and be effective again. Moreover, disrupting the cell wall and outer membrane may result in carbapenemase leaking out of the bacterial cell and decreasing its activity inside the periplasmic space.

Enhancing antibiotic effects with silver NPs has also been proven for amoxicillin, ampicillin, penicillin, ceftazidime, and cefotaxime, that is, β -lactam antibiotics inhibiting cell wall

synthesis. Silver NPs enhance the antibacterial effects of amoxicillin against *Acinetobacter baumannii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Shigella sonnei*, or *Staphylococcus aureus* [140,162,163]. They also act synergistically or additively against *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Escherichia coli*, depending on the particle size. Ipe *et al.*, on the other hand, described an antagonistic effect in *Streptococcus oralis* and no enhancement in *Streptococcus gordonii* [163]. Surprisingly, larger silver NPs (25 nm) showed slightly stronger synergistic effects than smaller silver NPs (8 nm). A size-dependent final synergistic effect was also observed for penicillin against *A. pleuropneumoniae*; in this case, however, better antibacterial synergistic effects were obtained if penicillin was combined with smaller silver NPs. Besides, synergistic effects have been observed against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutants* [139,140]. Silver NPs additively or synergistically enhance effects of ampicillin against *Acinetobacter baumannii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutants*, *Streptococcus gordonii*, and *Streptococcus oralis*. Enhanced antibacterial activity was reported in all of them, but the one described by Ipe *et al.*, no enhancement was observed [39,41,140,162–165]. Panacek *et al.* reported synergistic or additive enhancement of ceftazidime and cefotaxime combined with silver NPs against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. The reason why silver NPs enhance the antibacterial activity of penicillins against resistant bacteria in the same way as in combination with carbapenems is the similar mechanism of bacterial resistance, that is, β -lactamase production and decreased uptake that can be overcome by effects of silver NPs. Singh *et al.* reported the enhancement of the antibacterial properties of ceftazidime against *Streptococcus mutants*. On the other hand, no effect has been observed in the case of *Acinetobacter baumannii* and the strain remained resistant even after the addition of silver NPs. Although these results are slightly inconsistent with the theory, no assumptions should be made based on a single negative result [140]. In the same way, there is not enough data available to evaluate the link between bacteria and their synergistic effect with antibiotics cefpodoxime and cefuroxime. Enhancement of their antibacterial effect was observed in *Streptococcus mutants* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* but was not in *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus gordonii* [163].

Synergistic effects of vancomycin, a cell wall synthesis inhibitor, combined with silver NPs have not been observed for Gram-positive *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, and *Micrococcus luteus*. Only a

very slight increase in the inhibition zone from 14 mm to 17 mm for vancomycin alone and in combination with silver NPs, respectively, was observed against *Micrococcus luteus*. The reason why antibacterial effects cannot be enhanced by silver NPs can be found in the resistance mechanism of Gram-positive bacteria, which commonly involves a chemical change of the target site. The mechanism of acquiring vancomycin resistance in Gram-positive bacteria involves alteration of the peptidoglycan synthesis pathway. This includes the conversion of D-alanyl-D-alanine to D-alanyl-D-lactate or to D-alanyl-D-serine, leading to normal transpeptidase-mediated cross-linking of peptidoglycans in the cell wall. This resistance mechanism involving chemical changes of the target site is probably difficult to overcome for silver NPs. On the other hand, some authors [139,140,157,158] reported the increased antibacterial activity of silver NPs combined with vancomycin against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus mutants*. Resistance to vancomycin is likely to be caused by a mechanism other than the one described above. The mechanisms are not described in any of the studies but since the synergistic effects were reported, we assume that bacterial resistance was acquired by a genetic mutation, accompanied by cell wall thickening and reduction of the cell's negative charge as previously described for *Staphylococcus* species [166,167]. Although vancomycin alone is unable to penetrate the bacterial cell wall, in combination with silver NPs, synergistic effects can be observed, resulting from the ability of NPs to penetrate the cell wall and create pits in it [92]. This allows vancomycin to get inside the bacteria and bind to the usual binding site.

Additive effects have been observed for colistin (a polymyxin antibiotic targeting the outer and cytoplasmic membranes) in combination with silver NPs against *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida*. Colistin is a polycationic peptide having both hydrophilic and lipophilic moieties. These cationic regions interact with bacterial lipopolysaccharides of the outer membrane by displacing magnesium and calcium bacterial counter ions in the lipopolysaccharide. Hydrophobic/hydrophilic regions interact with the cytoplasmic membrane just like a detergent, solubilizing the membrane in an aqueous environment. The most documented mechanisms of colistin resistance in bacteria involve *mcr-1* gene-mediated modification of the lipid A subunit of the outer membrane by phosphoethanolamine and 4-amino-4-deoxy-L-arabinose residues by the enzymatic activity of diphosphate-glucose dehydrogenase, Ara4N biosynthetic enzymes, and lipid A phosphoethanolamine transferase. The altered lipid A has a much lower negative charge and affinity for colistin and related polymyxins, resulting in reduced activity and uptake of the antimicrobial substance. In addition, multidrug efflux systems can

also be responsible for polymyxin resistance in bacteria. Silver NPs are able to enhance the antibacterial activity of colistin by disrupting the outer membrane and cell wall, allowing colistin to penetrate them (*i.e.*, silver NPs open doors to colistin) and target the cytoplasmic membrane. As the mechanisms of action of silver NPs and colistin are similar (disruption of the outer membrane, cell wall, and cytoplasmic membrane), their combinations result in increased antibacterial activity.

Aminoglycosides such as amikacin, kanamycin, neomycin, and gentamicin represent a group of antibiotics inhibiting protein synthesis in bacteria. Amikacin was successfully evaluated for its synergistic effect in combination with silver NPs against *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* in a study by Lopez-Carrizales *et al.* [39] and against *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella typhimurium*, and *Shigella sonnei* in a study by Singh *et al.* [140]. Deng *et al.* reported that kanamycin and neomycin combined with silver NPs showed synergistic effects against *Salmonella typhimurium* [40]. For kanamycin, Ramirez and Tolmasky proved enhancement against *Acinetobacter baumannii*, while Singh *et al.* proved it for *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella typhimurium* [140,168]. Synergistic effects have been confirmed for gentamicin combined with silver NPs against *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutants*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. On the contrary, synergistic effects have not been confirmed in the case of gentamicin combined with silver NPs against *Streptococcus gordonii*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Actinobacillus baumannii* [42,43,140,163,169]. Among those widely studied aminoglycosides, Ipe *et al.* also studied synergistic effect between silver NPs and clindamycin, erythromycin, chloramphenicol, and tetracycline, respectively. In most of the resistant strains, the antibacterial effect has been enhanced but there were always some strains, where it was not enhanced. Unfortunately, the mechanism of resistance was not described in any of the strains, so no assumptions can be made based on the available information (Table 1).

Aminoglycosides act primarily by inhibiting the bacterial protein synthesis through binding to the 30 S and 50 S subunits of prokaryotic ribosomes. In addition, they also disrupt the bacterial cell walls of Gram-negative bacteria. Passage of these highly polar molecules across the

outer membrane of Gram-negative bacteria is a self-promoted uptake process involving drug-induced disruption of Mg^{2+} bridges between adjacent lipopolysaccharide molecules. Bacteria can resist the antibacterial effects of aminoglycosides by four different mechanisms including reduced uptake and decreased cell permeability, alterations at the ribosomal binding sites, or production of aminoglycoside-modifying enzymes. Although silver NPs enhance the antibacterial effects of aminoglycosides against most tested resistant bacteria, the enhancement was not proven in some cases (*Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii*). Enhanced or indifferent effects of silver NPs combined with gentamicin against resistant bacteria possibly depend on the resistance mechanisms of bacterial strains. Some of them, such as reduced uptake and decreased cell permeability can be overcome by disrupting the outer membrane and cell wall by the effects of silver NPs. On the other hand, alterations at the ribosomal binding sites and production of aminoglycoside-modifying enzymes can be difficult to overcome by silver NPs. Unfortunately, the exact resistance mechanisms were not described in all tested bacteria resistant to gentamicin, and therefore, it is not possible to clearly determine which can be overcome and which cannot.

Silver NPs were evaluated for their synergistic effects in combination with trimethoprim, an antibiotic inhibiting folic acid synthesis (sulfonamide antibiotic). Trimethoprim acts on bacteria by blocking the production of tetrahydrofolic acid from dihydrofolic acid by binding to and reversibly inhibiting the required enzyme, dihydrofolate reductase. Thus, sulfamethoxazole and trimethoprim block two consecutive steps in the biosynthesis of nucleic acids and proteins essential to many bacteria. Bacterial resistance to trimethoprim is mostly acquired by a chromosomal mutation that results in the production of the enzyme dihydrofolate reductase, which is less vulnerable to trimethoprim inhibition. Due to irreversible mutation, bacterial resistance was not overcome by silver NPs for any of the tested bacteria *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, and *Pseudomonas aeruginosa* [42].

Quinolones are antibiotics whose antibacterial action involves inhibition of nucleic acid synthesis. Although ciprofloxacin is the only antibiotic from this wide group evaluated for synergistic effects in combination with silver NPs, a wide range of resistant bacteria has been included. The reported results on the synergistic effects of ciprofloxacin in combination with silver NPs are rather inconsistent. Enhancement of antibacterial activity was shown for *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*,

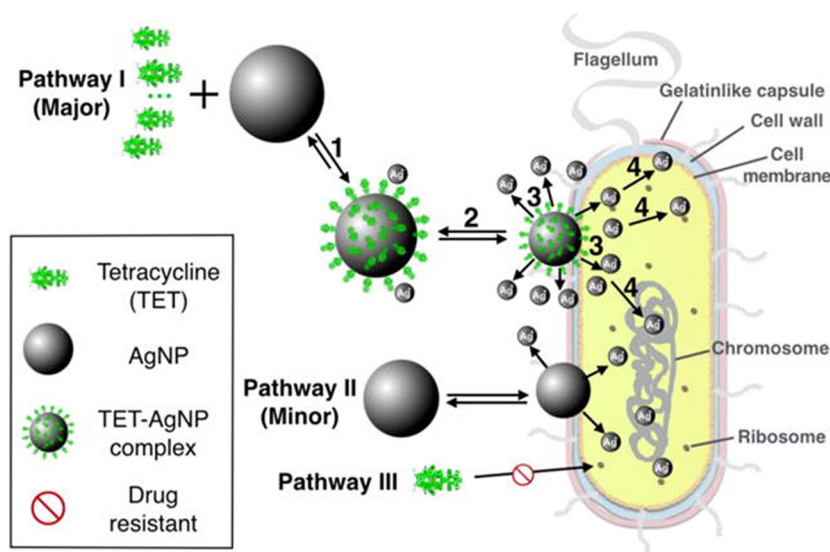


Figure 7: Synergistic antibacterial pathway I of silver NPs with tetracycline against resistant *Salmonella* leading to cell death and inefficient pathway III due to antibacterial resistance. Reproduced with permission [40]; Copyright 2016, Environmental Science and Technology.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, *Streptococcus mutans*, *Acinetobacter baumannii*, and *Escherichia coli* [37,42,163]. On the contrary, indifferent effects were determined for *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus gordonii* [42,44,163].

Ciprofloxacin is a broad-spectrum antibiotic active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. It functions by inhibiting DNA gyrase and topoisomerase IV, a type II topoisomerase [170], necessary to separate bacterial DNA, thereby inhibiting cell division. Three mechanisms of resistance to quinolones are currently recognized: mutations that alter the drug targets' bacterial topoisomerases and DNA gyrase and mutations that reduce drug accumulation and efflux resistance mechanisms. The reason why synergistic effects have or have not been proven is probably similar to that for gentamicin combined with silver NPs. The final effect depends on the resistance mechanisms of bacterial strains. While some of them such as reduced uptake and decreased cell permeability can be overcome by disturbing the outer membrane and cell wall *via* silver NPs, others such as changing the target site probably cannot.

Silver NPs may facilitate the interaction of antibiotics with cells in numerous ways. For example, silver NPs may help antibiotics penetrate into the bacterial cell by changing membrane permeability; alternatively, both can cooperate to disrupt the cell wall. In the case of β -lactam antibiotics, silver NPs may decrease the activity of β -

lactamases produced by bacteria by allowing their leakage after cell wall disruption. The cells can be damaged and weakened by the simultaneous action of antibiotics and silver NPs, leading to cell death. Hwang *et al.* suggested that this synergism is associated with the generation of hydroxyl radicals, alteration of protective cellular functions, and anti-biofilm potential [138].

The synergism between silver NPs and antibiotics (Figure 7) can be explained by the binding reaction between them [40,139]. Namely, the amino and hydroxy groups of an antibiotic are bonded to the nanoparticle *via* chelation, which results in the creation of a conjugate in which the silver core is surrounded by antibiotic molecules [162]. Silver NPs are then selectively attracted to the cytoplasmic membrane consisting of glycoproteins and phospholipids, so that the NPs act as drug carriers transporting the antibiotic near the cytoplasmic membrane (1), resulting in an enhanced contact with the cell wall and increased concentrations of the antibiotic and silver close to the cell membrane (2). The local increase in the silver ion concentration near the bacterial surface causes bacterial toxicity by binding silver ions to the proteins and DNA molecules of the cell wall as well as those inside the cell (3), leading to bacterial death. Membrane permeability might also be increased by binding silver NPs to sulfur-containing proteins, improving the infiltration of the antibiotic into the cell [171]. Another mechanism of action involved in the synergism could be ROS production ($\text{OH}^\bullet$), alteration of the cell's protective function, and unwinding of DNA leading to bactericidal effects [138,172].

4.2.2 Gold NPs

Gold NPs were also widely evaluated for their impact on the antibacterial activity of antibiotics against resistant bacteria. The synergistic effects have been proven for antibiotics whose mode of action is targeted at the inhibition of cell wall synthesis, namely, amoxicillin (β -lactam) [153] and cefotaxime or ceftriaxone (carbapenems) [155] against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus*, respectively. Because gold NPs may attack bacteria in a way similar to silver NPs, the mechanism of overcoming bacterial resistance is very likely to be similar to that of silver NPs combined with β -lactam antibiotics, as described above.

On the other hand, no synergy has been observed in the case of another β -lactam antibiotic, methicillin, tested with *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* [156]. The reason why bacteria still resist methicillin after combination with gold NPs is the resistance mechanism involving a change of the target site, namely modification of transpeptidase (penicillin-binding protein).

In the case of vancomycin (glycopeptide antibiotic targeting cell wall synthesis), synergistic effects have been proven against the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Staphylococcus epidermidis* [13,154,156]. The possible mechanism of restoring the antibacterial activity was proposed by Fayaz *et al.*, who confirmed synergistic effects of vancomycin combined with gold NPs against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. They suggest that the mechanism involves the formation of complex vancomycin-gold NPs which, instead of binding to terminal peptides, bind to the transpeptidase of glycol-peptidyl groups on the cell wall and disrupt it [13].

Roshmi *et al.* have reported that the combination of gold NPs with gentamicin [156] (an aminoglycoside antibiotic targeting protein synthesis) against *Staphylococcus epidermidis* resulted in the enhancement of antibacterial activity. Unfortunately, the authors did not describe the mechanism of resistance of *Staphylococcus epidermidis* to gentamicin, and therefore, it is hard to discuss by which mechanism gold NPs can overcome the resistance. Especially in the case of gentamicin whose antibacterial effects are resisted by four different mechanisms (reduced uptake and decreased cell permeability, alterations at the ribosomal binding sites, or production of aminoglycoside-modifying enzymes), it is extremely difficult to identify exactly the particular mechanism overcome by gold NPs. Roshmi *et al.* and Pradeepa Vidya *et al.* also reported enhancement of antibacterial activity of ciprofloxacin, levofloxacin, and rifampin (antibiotics inhibiting nucleic acid synthesis)

against both Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) [155,156]. Synergies of ciprofloxacin and levofloxacin with gold NPs were confirmed against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus* and, in the case of ciprofloxacin, also against *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*. In the case of rifampin, the synergistic effect has been observed against *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*. On the other hand, synergistic effects against *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* have not been confirmed for nalidixic acid. The reason why gold NPs show or do not show synergistic effects is similar to that for silver NPs combined with quinolones. The final effect depends on the resistance mechanisms of bacterial strains. Some of them such as reduced uptake and decreased cell permeability can be overcome by disrupting the outer membrane and cell wall *via* silver NPs; others probably cannot be overcome, for example, change of the target site.

4.2.3 Titanium dioxide NPs

Roy *et al.* reported the synergistic effects of titanium dioxide combined with different classes of antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [147]. Antimicrobial activity increased in the case of antibiotics inhibiting cell wall synthesis (β -lactams, cephalosporins, glycopeptides) and protein synthesis (aminoglycosides, lincosamides, macrolides, azalides). In the case of antibiotics inhibiting nucleic acid synthesis, only a slight increase in the inhibition zone was observed and, therefore, the synergistic effect was weak [147]. The best results have been observed for penicillin, ampicillin (β -lactam), amikacin, and gentamicin (aminoglycosides). Only nalidixic acid (an antibiotic inhibiting bacterial DNA synthesis) has not shown increased antibacterial effects in combination with TiO₂ NPs. According to Muzammil *et al.*, the enhancement of antibacterial action may be explained by the interaction of titanium NPs with efflux pumps normally responsible for bacterial resistance [115].

4.3 Impact of antibiotic's mode of action and mechanism of bacterial resistance on the effectiveness of combined antibacterial treatment with nanomaterials

Pie charts in Figure 6 help to visualize that the mechanisms of action of antibiotics strongly determine the

resulting synergistic effects between different antibiotics and metal NPs. These, together with the above information, provide an interesting insight into whether an antibacterial activity can be increased or not. Enhancement of antibacterial properties of antibiotics combined with silver NPs was observed for all tested combinations with antibiotics causing cell membrane disruption (colistin). NPs enhance their antibacterial activity by disrupting the outer membrane and cell wall, which allows colistin to penetrate them and target the cytoplasmic membrane. Antibacterial effects of almost all antibiotics disrupting cell wall synthesis (amoxicillin, ampicillin, cefotaxime, ceftazidime, meropenem, imipenem, penicillin) and protein synthesis (amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin) could be enhanced; the few exceptions were amoxicillin, amikacin, and gentamicin since not all the combinations were evaluated by all authors in the same way. Generally, however, it may be said that bacterial resistance to antibiotics acting on cell membrane/protein/cell wall synthesis (β -lactams) could be reversed and antibiotics combined with silver NPs regain their antibacterial properties even at lower concentrations than before. Silver NPs probably interact with porin channels and peptidoglycan on the surface of the bacteria, disrupting and penetrating the cell wall, allowing the antibiotic to get inside and be effective again. In the case of β -lactam antibiotics, disruption of the cell wall and outer membrane may result in carbapenemase leaking out of the bacterial cell and decreasing its activity inside the periplasmic space, therefore reversing their mechanism of resistance. On the contrary, the antimicrobial activity of glycopeptide antibiotics (vancomycin) acting on cell wall synthesis could not be enhanced in all of the cases. Resistance mechanisms in most cases involve chemical changes of the target side (e.g., D-alanyl-D-alanine to D-alanyl-D-lactate conversion) and those are difficult to overcome. However, if the mechanism of resistance is cell wall-related, NPs help antibiotics to penetrate the wall while creating pits in it [92], which allows antibiotics to get inside the bacteria and bind to its usual binding site.

The enhancement of antibacterial activity was not observed for antibiotics inhibiting folate acid synthesis (trimethoprim) and for almost all cases tested with antibiotics inhibiting nucleic acid synthesis (ciprofloxacin); however, certain differences between the obtained results were noted. Resistance to those antibiotics is mostly acquired by an irreversible chromosomal mutation that cannot be so easily reversed by the NPs.

The pie charts (Figure 6) also show results for other nanomaterials (gold NPs, TiO₂ NPs) but those materials have not been tested as extensively as silver NPs. In

several cases, a single bacterial strain was tested with a certain antibiotic, so the results might be skewed. Overall, gold NPs have the ability to increase the antibacterial properties of antibiotics inhibiting protein synthesis (gentamicin), synthesis of nucleic acids (ciprofloxacin, levofloxacin, nalidixic acid, rifampicin) and cell wall synthesis (only glycopeptide antibiotics, vancomycin). However, in the case of vancomycin and rifampicin, a single bacterium tested had no effect on the enhancement of antibacterial properties. In the case of β -lactam antibiotics acting on cell wall synthesis, enhancement was observed for amoxicillin, cefotaxime, and ceftriaxone, but not for methicillin and two of the tested bacteria. Finally, the bacterial resistance of *S. aureus* was overcome by the combination of titanium dioxide NPs with all tested antibiotics acting on cell wall/protein/nucleic acid synthesis except for nalidixic acid. However, it must be stressed that only one bacterial strain was evaluated by one author.

5 Bacterial resistance to silver

It is generally known that bacteria are able to resist the antibacterial action of heavy metals by various mechanisms including efflux, extracellular barrier, reduction of metal ions, and extracellular and intracellular sequestration. The most frequent mechanism of resistance is the efflux of toxic ions outside the bacteria or forming an extracellular barrier (e.g. extracellular polymer substance of the biofilm), which prevents the ions from entering the cell and prevents them from the stress induced by toxic metals [173–175]. Besides that, bacteria are able to upregulate genes, which are responsible for ROS elimination, DNA damage repair, and hydrolysis of abnormally assembled proteins, which might repair damages caused by toxic ions [176–178].

Resistance to silver and its compounds represents one of the most studied metal resistances in bacteria. Silver-resistant bacteria were first isolated in 1960 from burns treated with silver nitrate [179]. Examples of bacterial strains resistant to silver include *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* [180]. Bacteria can resist silver by several mechanisms such as reduction of Ag⁺ to less toxic oxidation states and decreased permeability of the cytoplasmic membrane. Nevertheless, active efflux is the most applied mechanism of how bacteria resist and eliminate the toxic effects of silver cations. The mechanism of resistance to ionic silver involves active efflux of Ag⁺ from the cell by P-type

adenosine triphosphatases or chemiosmotic Ag^+/H^+ antiporters [181–185]. Simon Silver reported the resistance to silver compounds by bacterial plasmids and genes in *Salmonella* spp. strains. Silver resistance conferred by the *Salmonella* plasmid pMGH100 involves nine genes in three transcription units. A sensor/responder (SilRS) two-component transcriptional regulatory system governs the synthesis of a periplasmic $\text{Ag}(\text{I})$ -binding protein (SilE) and two efflux pumps (P-type ATPase (SilP) plus a three-protein chemiosmotic RND $\text{Ag}(\text{I})/\text{H}^+$ exchange system (SilCBA)) [181].

Thanks to their ability to resist silver ions together with the constant changes of the bacterial genome and their ability to adapt to negative conditions, it is expected that bacteria may develop a resistance mechanism to AgNPs as well. Certain bacteria, at least if they have the ability, can be partially resistant to metal and metal oxide NPs by eliminating the toxic effects of metal cations or oxyanions. In this way, bacteria can eliminate one of the mechanisms of nanoparticle antibacterial activity consisting of the toxic effects of metal ions released from the NPs and, therefore, they can tolerate the toxic effect of metal NPs to a certain extent. Valentin *et al.* described resistance to both ionic silver and silver NPs in *Staphylococcus aureus*, which was associated with gene mutations involved in nucleotide synthesis, oxidative stress defense, and changes in cysteine metabolism [186]. Resistance in *Staphylococcus aureus* was also described by Elbehiry *et al.*, who has induced resistance to both silver and gold NPs, while no cross-resistance was observed [187].

Bacteria might resist NPs via two main approaches, they can either prevent the entrance of silver NPs or silver ions into the cell, or once it gets there reduce the amount of the antibacterial agent within the cell. For instance, *Pseudomonas putida* is able to decrease the bacterial membrane fluidity via *cis-trans* isomerization of unsaturated fatty acids [188]. However, in most cases, bacteria produce extracellular substances, which immobilize NPs and do not allow them to have contact with bacteria [189]. Yang and Alvarez described increased stimulation of biofilm development after prolonged exposure to AgNPs and upregulated quorum sensing and liposaccharide biosynthesis as the main mechanisms of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* [190]. Khan *et al.* reported bacterial resistance in *Bacillus pumilus* and suggest that exopolysaccharide-capped AgNPs show less toxicity to various bacterial strains [191]. Protein corona formation was also reported in *Escherichia coli* after chronic exposure to NPs in continuous culture in bioreactors [192]. Besides extracellular polymeric substances other compounds can be produced by bacteria to withstand the negative effects of antimicrobials. Ellis *et al.* described the mechanism of

resistance in *Pseudomonas aeruginosa* based on increased phenazine pigment production, which limits bacterial exposure to AgNPs [193]. Panáček *et al.* described bacterial resistance in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, which stems from the production of the adhesive flagellum protein flagellin. This protein triggers the aggregation and destabilization of AgNPs, which reduces their stability and therefore eliminates their antibacterial activity [48].

Once silver NPs get to the cell, the minimal inhibition concentration (MIC) has to be reached to perform their antibacterial action. Bacteria can develop resistance to AgNPs through simple genomic changes (e.g., mutation of the *mdtB* gene) resulting in adaptation to released ions via an efflux system, which transports released ions through the plasma membrane to periplasm [46]. Besides, the presence of an efflux network, which works as a mechanism of resistance towards AgNPs was described also in *Bacillus subtilis* [47], *Salmonella seftenberg* [194], *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* [195], and *Escherichia coli* [46,192,195]. In this case, antimicrobials are pumped out of the cell and therefore MIC cannot be reached, so they cannot act as they are supposed to and perform sufficient antibacterial action.

Only Panáček *et al.* have tried to overcome the newly built mechanism of resistance. Additional stabilization via various surfactants and polymers was not successful, but they were able to inhibit flagellin production by the addition of pomegranate rind extract, which has suppressed the aggregation of the NPs, so NPs were able to keep their antibacterial properties [48]. As mentioned in this section, bacteria are able to build up resistance even to silver NPs, therefore, the mechanisms of resistance should be studied in more detail and new ways how to overcome them should be outlined in the near future.

6 Conclusion

The treatment of bacterial infections is no longer a simple task. Antibiotics remain the mainstay to fight bacterial infections, but due to overprescription, misuse, and overuse in animal production, episodes of resistant infections are alarmingly on the rise, and resistance of bacterial strains to antibiotics is becoming a pressing public health problem that is predicted to only worsen in the future. Many efforts have been made to overcome the emerging problem of losing the effectiveness of major antibiotics against resistant strains. Fortunately, advances in biomedical nanotechnology applications may offer a great opportunity for research in this field, open new doors, and advance the

way bacterial infections and resistant bacteria are coped with. For their small size and increased surface area, metal NPs are known to possess strong antibacterial activities, as seen from several studies. Their impact on both growth and maturation of bacterial biofilm suggests a broad spectrum of antimicrobial properties, which can be applied in the dressing of surgical tools, dental products, catheters, but also in other products as cosmetics, clothing, and food packaging [196].

Since many metallic NPs with promising antibacterial activities have not been fully investigated in combination with antibiotics against resistant strains, more studies should be conducted. To the best of our knowledge, only silver, gold, and titanium dioxide NPs have been tested in combination with antibiotics, especially against resistant strains. In many of those papers, the long-lost effectiveness of antibiotics against resistant strains was restored *via* combination with small concentrations of inorganic NPs. This finding is of great importance and could become a game-changer in combating bacterial resistance to commonly used antibiotics. However, as shown in this review, there are some combinations that do not possess those enhanced properties. As of now, no one has tried to explain the reasons why some combinations work, and others do not. The answer to this question might be found in the mechanism of action of the antibiotics or the mechanism of bacterial resistance. These have not been studied yet and might be crucial for subsequent research. Right now, it is really difficult to generalize from individual studies, mainly due to the fact that there is no standardized method for the evaluation of the synergistic effects and also because researchers perform experiments based on available NPs and bacteria, rather than targeting specific bacteria with previously described mechanisms of resistance. Without a properly characterized material (size, morphology, surface modification) and the knowledge of resistance mechanisms, correlation with basic physicochemical properties and evaluation of the synergistic effect is not possible. Therefore, standardized methods, NPs, and bacteria should be included in future studies.

The application of metal NPs in combination with antibiotics against various bacterial infections holds promise in paving the way for future therapeutics in nanomedicine. This approach may serve as an adjunct to the existing therapies and might restrain the escalating problem with resistant strains. At the same time, the possibility of acquiring bacterial resistance even to those nanomaterials needs to be studied and possible ways of preventing or overcoming it need to be described. Furthermore, the translation to clinical medicine should be preceded by a deeper knowledge of the mechanisms of

bacterial resistance, mechanisms of action of NPs and by verification of combinations of certain NPs and antibiotics by *in vivo* infection models in order to better understand their pharmacokinetics and biodistribution. Finally, an important part of *in vitro* and *in vivo* testing is toxicity tests, which help us exclude combinations with extremely high toxicity.

Acknowledgements: The authors gratefully acknowledge financial support from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000754), the Czech Science Foundation (project GA CR – 19-22720S), the Ministry of Health of the Czech Republic (project NU20-05-00165), and Internal Student Grant Agency of the Palacký University in Olomouc, Czech Republic (IGA_PrF_2021_028).

Funding information: Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000754), the Czech Science Foundation (project GA CR – 19-22720S), the Ministry of Health of the Czech Republic (project NU20-05-00165), and Internal Student Grant Agency of the Palacký University in Olomouc, Czech Republic (IGA_PrF_2021_028).

Author contributions: All authors have accepted responsibility for the entire content of this manuscript and approved its submission.

Conflict of interest: The authors state no conflict of interest.

References

- [1] O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. London: Government of the United Kingdom; 2016.
- [2] ECDC. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net). Surveillance Report; 2019.
- [3] Harris 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;4:1680–91.
- [4] ECDC. Surveillance report: Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016; 2017.
- [5] Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomed*. 2017;12:1227–49.
- [6] Han C, Romero N, Fischer S, Dookran J, Berger A, Doiron AL. Recent developments in the use of nanoparticles for treatment of biofilms. *Nanotechnol Rev*. 2017;6(5):383–404.

- [7] Giannossa LC, Longano D, Ditaranto N, Nitti MA, Paladini F, Pollini M, et al. Metal nanoantimicrobials for textile applications. *Nanotechnol Rev.* 2013;2(3):307–31.
- [8] Panacek A, Kvítek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizúrova N, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B.* 2006;110(33):16248–53.
- [9] Panáček A, Kolář M, Vecerová R, Prucek R, Soukupová J, Krystof V, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials.* 2009;30(31):6333–40.
- [10] Liao S, Zhang Y, Pan X, Zhu F, Jiang C, Liu Q, et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Nan.* 2019;14:1469–87.
- [11] Rai M, Birla S, Ingle AP, Gupta I, Gade A, Abd-Elsalam K, et al. Nanosilver: an inorganic nanoparticle with myriad potential applications. *Nanotechnol Rev.* 2014;3(3):281–309.
- [12] Gu H, Ho PL, Tong E, Wang L, Xu B. Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. *Nano Lett.* 2003;3(9):1261–3.
- [13] Fayaz A, Girilal M, Mahdy SA, Somsundar SS, Venkatesan R, Kalaichelvan PT. Vancomycin bound biogenic gold nanoparticles: a different perspective for development of anti VRSA agents. *Process Biochem.* 2011;46(3):636–41.
- [14] Chang HY, Cang J, Roy P, Chang HT, Huang YC, Huang CC. Synthesis and antimicrobial activity of gold/silver-tellurium nanostructures. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014;6(11):8305–12.
- [15] Chu Z, Zhang S, Zhang B, Zhang C, Fang CY, Rehor I, et al. Unambiguous observation of shape effects on cellular fate of nanoparticles. *Sci Rep.* 2014;4:1–9.
- [16] Singh A, Ahmed A, Prasad KN, Khanduja S, Singh SK, Srivastava JK. Antibiofilm and membrane-damaging potential of cuprous oxide nanoparticles against *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* 2015;59(11):6882–90.
- [17] Cremonini E, Zonaro E, Donini M, Lampis S, Boaretti M, Dusi S, et al. Biogenic selenium nanoparticles: characterization, antimicrobial activity and effects on human dendritic cells and fibroblasts. *Microb Biotechnol.* 2016;9(6):758–71.
- [18] Huang XQ, Chen X, Chen QC, Yu QQ, Sun DD, Liu J. Investigation of functional selenium nanoparticles as potent antimicrobial agents against superbugs. *Acta Biomaterialia.* 2016;30:397–407.
- [19] Tran PA, O'Brien-Simpson, N, Reynolds EC, Pantarat N, Biswas DP, O'Connor, AJ. Low cytotoxic trace element selenium nanoparticles and their differential antimicrobial properties against *S. aureus* and *E. coli*. *Nanotechnology.* 2016;27(4):045101.
- [20] Badireddy AR, Hernandez-Delgadillo R, Sánchez-Nájera RI, Chellam S, Cabral-Romero C. Synthesis and characterization of lipophilic bismuth dimercaptopropanol nanoparticles and their effects on oral microorganisms growth and biofilm formation. *J Nanopart Res.* 2014;16(6):2456.
- [21] Beyth N, Hourri-Haddad Y, Domb A, Khan W, Hazan R. Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. *Evidence Complementary Alternative Med.* 2015;2015:1–16.
- [22] Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Delivery Rev.* 2013;65(13–14):1803–15.
- [23] Nikdel M, Rajabinejad H, Yaghoubi H, Mikaeiliagah E, Cella MA, Sadeghianmaryan A, et al. Fabrication of cellulosic nonwoven material coated with polyvinyl alcohol and zinc oxide/mesoporous silica nanoparticles for wound dressing purposes with cephalixin delivery fabrication of cellulosic nonwoven material coated with polyvinyl alcohol and Z. *ECS J Solid State Sci Technol.* 2021;10:057003.
- [24] Maji J, Pandey S, Basu S. Synthesis and evaluation of antibacterial properties of magnesium oxide nanoparticles. *Bull Mater Sci.* 2020;43(1):1–10.
- [25] Ijaz U, Bhatti IA, Mirza S, Ashar A. Characterization and evaluation of antibacterial activity of plant mediated calcium oxide (CaO) nanoparticles by employing *Mentha pipertia* extract. *Mater Res Express.* 2017;4:105402.
- [26] Manyasree D, Kiranmayi P, RaviKumar RVSSN. Synthesis, characterization and antibacterial activity of aluminium oxide nanoparticles. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2018;10(1):32.
- [27] Tarjoman Z, Ganji SM, Mehrabian S. Synergistic effects of the bismuth nanoparticles along with antibiotics on PKS positive *Klebsiella pneumoniae* isolates from colorectal cancer patients; comparison with quinolone antibiotics. *Merit Res J Med Med Sci.* 2015;3(9):387–93.
- [28] Mandava K, Kadimcharla K, Keesara NR, Fatima SN, Bommenna P, Batchu UR. Green synthesis of stable copper nanoparticles and synergistic activity with antibiotics. *Indian J Pharm Sci.* 2017;79(5):695–700.
- [29] Kalaiaresi S, Jose M. Streptomycin loaded TiO₂ nanoparticles: preparation, characterization and antibacterial applications. *J Nanostructure Chem.* 2017;7(1):47–53.
- [30] Namasivayam SKR, Prasanna M, Subathra S. Synergistic antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles with antibiotics against the human pathogenic bacteria. *J Chem Pharm Res.* 2015;7(3):133–8.
- [31] Pant B, Pokharel P, Tiwari AP, Saud PS, Park M, Ghouri ZK, et al. Characterization and antibacterial properties of aminophenol grafted and Ag NPs decorated graphene nanocomposites. *Ceram Int.* 2015;41(4):5656–62.
- [32] Kumar N, Das S, Jyoti A, Kaushik S. Synergistic effect of silver nanoparticles with doxycycline against *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2016;8(7):183–6.
- [33] Padalia H, Moteriya P, Chanda S. Green synthesis of silver nanoparticles from marigold flower and its synergistic antimicrobial potential. *Arab J Chem.* 2015;8(5):732–41.
- [34] Prema P, Iniya PA, Immanuel G. Microbial mediated synthesis, characterization, antibacterial and synergistic effect of gold nanoparticles using *Klebsiella pneumoniae* (MTCC-4030). *R Soc Chem.* 2016;6:4601–7.
- [35] 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(3):1709–27.
- [36] Panáček A, Smékalová M, Kilianová M, Prucek R, Bogdanová K, Věčřová 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):1–17.
- [37] Panáček A, Smékalová M, Věčřová 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.
- [38] 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 Biomaterialia*. 2013;9(7):7460–8.
- [39] Lopez-Carrizales M, Velasco K, Castillo C, Flores A, Magaña M, Martinez-Castanon G, et al. In vitro synergism of silver nanoparticles with antibiotics as an alternative treatment in multiresistant uropathogens. *Antibiotics*. 2018;7(2):50.
- [40] 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(16):8840–8.
- [41] Naik MM, Prabhu MS, Samant SN, Naik PM, Shirodkar S. Synergistic action of silver nanoparticles synthesized from silver resistant estuarine *Pseudomonas aeruginosa* strain SN5 with antibiotics against antibiotic resistant bacterial human pathogens. *Thalassas*. 2017;33(1):73–80.
- [42] Naqvi SZ, 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 Nanomed*. 2013;8:3187–95.
- [43] Smekalova M, Aragon V, Panacek A, Prucek R, Zboril R, Kvitek L. Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. *Veterinary J*. 2016;209:174–9.
- [44] 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(2):449–60.
- [45] Santiago GA, Chen T, Genova LA, Jung W, George AM. Adaptor protein mediates dynamic pump assembly for bacterial metal efflux. *PNAS*. 2017;114(26):6694–9.
- [46] Graves Jr 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;6:42.
- [47] Gunawan C, Teoh WY, Marquis CP, Amal R. Induced adaptation of *Bacillus* sp. to antimicrobial nanosilver. *Small*. 2013;9(21):3554–60.
- [48] Panáček A, Kvitek L, Smekalová M, Večeřová R, Kolář M, Röderová M, et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nat Nanotechnol*. 2018;13(1):65–71.
- [49] 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(5):1800019.
- [50] Kirmusaoğlu S, Gareayaghi N, Kocazeybek BS. Introductory chapter: the action mechanisms of antibiotics and antibiotic resistance. *Antimicrobials, antibiotic resistance, antibiofilm strategies and activity methods*. IntechOpen; 2019. doi: 10.5772/intechopen.85211.
- [51] Zielińska-Górska MK, Sawosz E, Górski K, Chwalibog A. Does nanobiotechnology create new tools to combat microorganisms. *Nanotechnol Rev*. 2017;6(2):171–89.
- [52] Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Publ Group*. 2014;13(1):42–51.
- [53] Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiology*. 2013;11(6):371–84.
- [54] Herkel T, Uvizl R, Doubravska L, Adamus M, Gabrhelik T, Htoutou M. Epidemiology of hospital-acquired pneumonia: results of a Central European multicenter, prospective, observational study compared with data from the European region. *Biomed Pap*. 2016;160(3):448–55.
- [55] Barber MMR-D. Infection by penicillin-resistant. *Lancet*. 1948;2(6530):641–4.
- [56] Sun D. Pull in and push out: mechanisms of horizontal gene transfer in bacteria. *Front Microbiology*. 2018;9(September):1–8.
- [57] Rello J, Torres A, Ricart M. Ventilator-associated pneumonia by *Staphylococcus aureus*. Comparison of methicillin-resistant and methicillin. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150(6):1545–9.
- [58] 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. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2007;51(6):1987–94.
- [59] Kang C, Chung DR, Ko KS. Risk factors for infection and treatment outcome of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in patients with hematologic malignancy. *Ann Hematol*. 2012;91:115–21.
- [60] Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J Nanobiotechnology*. 2017;15(1):1–20.
- [61] Gao W, Zhang L. Nanomaterials arising amid antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiology*. 2021;19(1):5–6.
- [62] Muthukrishnan L, Chellappa M, Nanda A. Biology bio-engineering and cellular imaging of silver nanoparticles as weaponry against multidrug resistant human pathogens. *J Photochemistry Photobiology, B: Biol*. 2019;194(July 2018):119–27.
- [63] Feng QL, Wu J. Chitosan-metal complexes as antimicrobial agent: synthesis, characterization and Structure-activity study. *Polym Bull*. 2005;55(1–2):105–13.
- [64] 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: Nanotechnology, Biology, Med*. 2016;12(6):1499–509.
- [65] Natan M, Banin E. From nano to micro: using nanotechnology to combat microorganisms and their multidrug resistance. *FEMS Microbiology Rev*. 2017;41:302–22.
- [66] Malka E, Perelshtein I, Lipovsky A, Shalom Y, Naparstek L, Perkash N, et al. Eradication of multi-drug resistant bacteria by a novel Zn-doped CuO nanocomposite. *Small*. 2013;9:1–8.
- [67] 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;18:569–91. doi: 10.3390/ijms18030569.

- [68] Cheloni G, Marti E, Slaveykova VI. Interactive effects of copper oxide nanoparticles and light to green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat Toxicol*. 2016;170:120–8.
- [69] Yu J, Zhang W, Li Y, Wang G, Yang L, Jin J, et al. Synthesis, characterization, antimicrobial activity and mechanism of a novel hydroxyapatite whisker/nano zinc oxide biomaterial. *Biomed Mater (Bristol)*. 2015;10(1):1–15. doi: 10.1088/1748-6041/10/1/015001.
- [70] Ortiz-bení EA. Antibacterial mechanism of gold nanoparticles on *Streptococcus pneumoniae*. *Metallomics*. 2019;11:1265–76.
- [71] Quinteros MA, CanoAristizábal, V, Dalmaso PR, Paraje MG, Páez PL. Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicol Vitro*. 2016;36:216–23.
- [72] 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(4):557–64.
- [73] 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. *Optics Express*. 2018;26(18):23347.
- [74] Kariminezhad H, Mousapour M, Khorram S, Amani H. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus epidermidis*: application of PEGylated gold nanoparticles. *Arab J Sci Eng*. 2020;45(1):71–9.
- [75] Fahimmunisha AB, Ishwarya R, Alsalthi 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 Delivery Sci Technol*. 2020;55(December 2019):101465.
- [76] Yadav S, Jaiswar G. Review on undoped/doped TiO₂ nanomaterial; synthesis and photocatalytic and antimicrobial activity. *J Chin Chem Soc*. 2017;64(1):103–16.
- [77] 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: Environ*. 2018;231(March):115–22.
- [78] Priyadarshini S, Mainal A, Sonsudin F, Yahya R, Alyousef AA, Mohammed A. Biosynthesis of TiO₂ nanoparticles and their superior antibacterial effect against human nosocomial bacterial pathogens. *Res Chem Intermed*. 2020;46(2):1077–89.
- [79] 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;5:1–12.
- [80] Karimi F, Dabbagh S, Alizadeh S, Rostamnia S. Evaluation of AgCINPs@SBA-15/IL nanoparticle-induced oxidative stress and DNA mutation in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(16):7161–70.
- [81] Ouay B, Stellacci F, LeOuay B, Stellacci F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: a surface science insight. *Nano Today*. 2015;10(3):339–54.
- [82] 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(April):1–9.
- [83] Molleman B, Hiemstra T. Time, pH, and size dependency of silver nanoparticle dissolution: the road to equilibrium. *Environmental Science. Nano*. 2017;4:1314–27.
- [84] Dong Y, Zhu H, Id YS, Zhang W, Zhang L. Antibacterial activity of silver nanoparticles of different particle size against *Vibrio Natriegens*. *PLoS ONE*. 2019;14:1–12.
- [85] Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Front Microbiology*. 2016;7(NOV):1–17.
- [86] Durán N, Durán M, dejesus, MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, Med*. 2016;12(3):789–99.
- [87] Ramalingam B, Parandhaman T, Das SK. Antibacterial effects of biosynthesized silver nanoparticles on surface ultra-structure and nanomechanical properties of gram-negative bacteria viz. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(7):4963–76.
- [88] Huang L, Yang H, Zhang Y, Xiao W. Study on synthesis and antibacterial properties of Ag NPs/GO nanocomposites. *J Nanomaterials*. 2016;2016:1–9.
- [89] Nallanthighal S, Tierney L, Cady NC, Murray TM, Chittur SV, Reliene R. Surface coatings alter transcriptional responses to silver nanoparticles following oral exposure. *NanoImpact*. 2020;17(September 2019):100205.
- [90] Jiang SH, Zhang Y, Lu ZW, Lebrun R, Gontero B, Li W. Interaction between silver nanoparticles and two dehydrogenases: role of interaction between silver nanoparticles and two dehydrogenases: role of thiol groups. *Small*. 2019;15(27):1900860.
- [91] 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(1):1–11.
- [92] 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(1):177–82.
- [93] Shamailla S, Zafar N, Riaz S, Sharif R, Nazir J. Gold nanoparticles: an efficient antimicrobial agent against enteric bacterial human pathogen. *Nanomaterials (Basel, Switz)*. 2016;6:1–10.
- [94] Gupta A, Landis RF, Rotello VM, Gupta A, Landis RF. Nanoparticle-based antimicrobials: surface functionality is critical. *F1000Research*. 2016;5:1–10.
- [95] Shikha S, Chaudhuri SR, Bhattacharyya MS. Facile one pot greener synthesis of sophorolipid capped gold nanoparticles and its antimicrobial activity having special efficacy against gram negative *vibrio cholerae*. *Sci Rep*. 2020;10(1463):1–13.
- [96] Katas H, Lim CS, Nor Azlan A, Buang F, Mh Busra MF. Antibacterial activity of biosynthesized gold nanoparticles using biomolecules from *Lignosus rhinocerotis* and chitosan. *Saudi Pharm J*. 2019;27(2):283–92.
- [97] Lee H, Lee DG. Biointerfaces gold nanoparticles induce a reactive oxygen species-independent apoptotic pathway in *Escherichia coli*. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2018;167:1–7.
- [98] Ripolles-Avila C, Martinez-Garcia M, Hascoët AS, Rodríguez-Jerez JJ. Bactericidal efficacy of UV activated TiO₂

- nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria on suspension. *CYTA – J Food*. 2019;17(1):408–18.
- [99] Khater MS, Kulkarni GR, Khater SS, Gholap H, Patil R. Study to elucidate effect of titanium dioxide nanoparticles on bacterial membrane potential and membrane permeability. *Mater Res E*. 2020;7:035005.
- [100] Györgyey Á, Janovák L, Ádám A, Kopniczky J, Tóth KL, Deák Á, et al. Investigation of the in vitro photocatalytic antibacterial activity of nanocrystalline TiO₂ and coupled TiO₂/Ag containing copolymer on the surface of medical grade titanium. *J Biomater Appl*. 2016 Jul 1;31(1):55–67.
- [101] Veres Á, Janovák L, Bujdosó T, Rica T, Fodor E, Tallósy S, et al. Silver and phosphate functionalized reactive TiO₂/polymer composite films for destructions of resistant bacteria using visible light. *J Adv Oxid Technol*. 2012;15(1):205–16.
- [102] Tallósy SP, Janovák L, Ménesi J, Nagy E, Juhász Á, Balázs L, et al. Investigation of the antibacterial effects of silver-modified TiO₂ and ZnO plasmonic photocatalysts embedded in polymer thin films. *Environ Sci Pollut Res*. 2014 Aug 1;21(19):11155–67.
- [103] Karimzadeh MR, Soltanian S, Sheikhbahaei M. Characterization and biological activities of synthesized zinc oxide nanoparticles using the extract of *Acantholimon serotinum*. *Green Process Synth*. 2020;9:722–33.
- [104] Siddiqi KS, Rahman A, Husen A. Properties of zinc oxide nanoparticles and their activity against microbes. *Nanoscale Res Lett*. 2018;13(141):141.
- [105] Singh R, Cheng S, Singh S. Oxidative stress-mediated genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles. *3 Biotech*. 2020;10(66):66.
- [106] Liang SXT, Wong LS, Lim YM, Lee PF. Effects of zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus pyogenes*. *South Afr J Chem Eng*. 2020;34(May):63–71.
- [107] McIlmurray MB, Lascelles J. Anaerobiosis and the activity of enzymes of pyrimidine biosynthesis in *staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol*. 1970;64:269–77.
- [108] Kadiyala U, Turali-Emre ES, Bahng JH, Kotov NA, Scott Vanepps J. Unexpected insights into antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles against methicillin resistant: *staphylococcus aureus* (MRSA). *Nanoscale*. 2018;10(10):4927–39.
- [109] Baptista PV, Mccusker MP, Carvalho A, Ferreira DA. Nanostrategies to fight multidrug resistant bacteria – “A Battle of the Titans”. *Front Microbiology*. 2018;9(July):1–26.
- [110] Zowalaty E, Hassan S, Al H, Geilich BM, Webster TJ, Hussein MZ. The ability of streptomycin-loaded chitosan-coated magnetic nanocomposites to possess antimicrobial and antituberculosis activities. *Int J Nanomed*. 2015;10:3269–74.
- [111] Beyth N, Yudovin-Farber I, Perez-Davidi M, Domb AJ, Weiss EI. Polyethyleneimine nanoparticles incorporated into resin composite cause cell death and trigger biofilm stress in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(51):22038–43.
- [112] Hashimoto M, Yanagiuchi H, Kitagawa H, Honda Y. Inhibitory effect of platinum nanoparticles on biofilm formation of oral bacteria. *Nano Biomedicine*. 2017;9(2):77–82.
- [113] Ahmed BKA, Raman T, Anbazhagan V. Platinum nanoparticles inhibit bacteria proliferation and rescue zebra fish from bacterial. *RSC Adv*. 2016;6(May):44415–24.
- [114] Roy K, Sarkar CK, Ghosh CK. Antibacterial mechanism of biogenic copper nanoparticles synthesized using *Heliconia psittacorum* leaf extract. *Nanotechnol Rev*. 2016;5(6):529–36.
- [115] Muzammil S, Hayat S, Fakhar-E-Alam M, Aslam B, Siddique MH, Nisar MA, et al. Nanoantibiotics: future nanotechnologies to combat antibiotic resistance. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2018;10:352–74.
- [116] Lv Q, Zhang B, Xing X, Zhao Y, Cai R, Wang W, et al. Biosynthesis of copper nanoparticles using *Shewanella loihica* PV-4 with antibacterial activity: novel approach and mechanisms investigation. *J Hazard Mater*. 2018;347:141–9.
- [117] Meghana S, Kabra P. Understanding the pathway of antibacterial activity of copper oxide nanoparticles. *R Soc Chem*. 2015;5:12293–9.
- [118] Rajivgandhi G, Maruthupandy M, Muneeswaran T, Anand M, Quero F, Manoharan N, et al. Biosynthesized silver nanoparticles for inhibition of antibacterial resistance and biofilm formation of methicillin-resistant coagulase negative *Staphylococci*. *Bioorganic Chem*. 2019;89(May):103008.
- [119] Bezza FA, Tichapondwa SM, Chirwa EMN. Fabrication of monodispersed copper oxide nanoparticles with potential application as antimicrobial agents. *Sci Rep*. 2020;10:1–18.
- [120] Ebrahim-saraie HS, Heidari H, Rezaei V, Mohammad S, Mortazavi J. Promising antibacterial effect of copper oxide nanoparticles against several multidrug resistant uropathogens. *Pharm Sci*. 2018;24(September):213–8.
- [121] Su Y, Zheng X, Chen Y, Li M, Liu K. Alteration of intracellular protein expressions as a key mechanism of the deterioration of bacterial denitrification caused by copper oxide nanoparticles. *Sci Rep*. 2015;5(October):1–11.
- [122] Pi J, Yang F, Jin H, Huang X, Liu R, Yang P, et al. Selenium nanoparticles induced membrane bio-mechanical property changes in MCF-7 cells by disturbing membrane molecules and F-actin. *Bioorganic Medicinal Chem Lett*. 2013;23(23):6296–303.
- [123] Huang T, Holden JA, Heath DE, O'Brien-Simpson NM, O'Connor AJ. Engineering highly effective antimicrobial selenium nanoparticles through control of particle size. *Nanoscale*. 2019;11(31):14937–51.
- [124] Huang HK, Cheng HW, Liao CC, Lin SJ, Chen YZ, Wang JK, et al. Bacteria encapsulation and rapid antibiotic susceptibility test using a microfluidic microwell device integrating surface-enhanced Raman scattering. *Lab a Chip*. 2020;20(14):2520–8.
- [125] Jin T, He Y. Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens. *J Nanopart Res*. 2011;13(12):6877–85.
- [126] Huang L, Li DQ, Lin YJ, Wei M, Evans DG, Duan X. Controllable preparation of Nano-MgO and investigation of its bactericidal properties. *J Inorg Biochem*. 2005;99(5):986–93.
- [127] Cai L, Chen J, Liu Z, Wang H, Yang H, Ding W. Magnesium oxide nanoparticles: effective agricultural antibacterial agent against *Ralstonia solanacearum*. *Front Microbiology*. 2018;9(APR):1–19.
- [128] He C, Shi ZQ, Cheng C, Lu HQ, Zhou M, Sun SD, et al. Graphene oxide and sulfonated polyanion co-doped hydrogel films for dual-layered membranes with superior hemocompatibility and antibacterial activity. *Biomater Sci*. 2016;4(10):1431–40.

- [129] Chung NX, Limpens R, DeWeerd, C, Lesage A, Fujii M, Gregorkiewicz T. Toward practical carrier multiplication: donor/acceptor codoped Si nanocrystals in SiO₂. *ACS Photonics*. 2018;5(7):2843–9.
- [130] Bhattacharya P, Swain S, Giri L, Neogi S. Fabrication of magnesium oxide nanoparticles by solvent alteration and their bactericidal applications. *J Mater Chem B*. 2019;7:4141–52.
- [131] Hemeg HA. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *Int J Nanomed*. 2017;12:8211–25.
- [132] Cokol-Cakmak M, Bakan F, Cetiner S, Cokol M. Diagonal method to measure synergy among any number of drugs. *J Visualized Exp*. 2018;2018(136):1–10.
- [133] Aziz N, Pandey R, Barman I, Prasad R. Leveraging the attributes of mucor hiemalis-derived silver nanoparticles for a synergistic broad-spectrum antimicrobial platform. *Front Microbiology*. 2016;7(DEC):1–11.
- [134] Devi LS, Joshi SR. Antimicrobial and synergistic effects of silver nanoparticles synthesized using: soil fungi of high altitudes of Eastern Himalaya. *Mycobiology*. 2012;40(1):27–34.
- [135] Fayaz AM, Balaji K. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against *Salmonella* SP. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2010;7(10):84–8.
- [136] Golińska P, Wypij M, Rathod D, Tikar S, Dahm H, Rai M. Synthesis of silver nanoparticles from two acidophilic strains of *Pilimelia columellifera* subsp. *pallida* and their antibacterial activities. *J Basic Microbiology*. 2016;56(5):541–56.
- [137] Hari N, Thomas TK, Nair AJ. Comparative study on the synergistic action of garlic synthesized and citrate capped silver nanoparticles with β -penem antibiotics. *ISRN Nanotechnol*. 2013;137:2014–62.
- [138] Hwang I, Hwang JH, Choi H, Kim KJ, Lee DG. Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. *J Med Microbiology*. 2012;61(PART12):1719–26.
- [139] 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: Nanotechnol, Biol, Med*. 2007;3(2):168–71.
- [140] Singh R, Wagh P, Wadhwani S, Gaidhani S, Kumbhar A, Bellare J, et al. Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *Int J Nanomed*. 2013;8:4277–90.
- [141] Mazdeh S, Motamedi H, Khiavi A, Mehrabi M. Gold Nanoparticle Biosynthesis by *E. coli* and Conjugation with Streptomycin and Evaluation of its Antibacterial Effect. *Curr Nanosci*. 2014;10(4):553–61.
- [142] Payne JN, Waghwan HK, Connor MG, Hamilton W, Tockstein S, Moolani H, et al. Novel synthesis of kanamycin conjugated gold nanoparticles with potent antibacterial activity. *Front Microbiology*. 2016;7(MAY):1–10.
- [143] Shaker MA, Shaaban MI. Formulation of carbapenems loaded gold nanoparticles to combat multi-antibiotic bacterial resistance: in vitro antibacterial study. *Int J Pharmaceutics*. 2017;525(1):71–84.
- [144] Zawrah MF, El-Moez SIA. Antimicrobial activities of gold nanoparticles against major foodborne pathogens. *J Strategic Stud*. 2011;34(2):281–93.
- [145] Khashan KS, Sulaiman GM, Abdulameer FA. Synthesis and antibacterial activity of CuO nanoparticles suspension induced by laser ablation in liquid. *Arab J Sci Eng*. 2016;41(1):301–10.
- [146] Khurana C, Sharma P, Pandey OP, Chudasama B. Synergistic effect of metal nanoparticles on the antimicrobial activities of antibiotics against biorecycling microbes. *J Mater Sci Technol*. 2016;32(6):524–32.
- [147] Roy A, Parveen A, Koppalkar R, Prasad A, MVNA. Effect of nano-titanium dioxide with different antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus*. *J Biomater Nanobiotechnology*. 2010;01(01):37–41.
- [148] Ahmed FY, Aly UF, AbdEl-Baky, RM, Waly NGFM. Comparative study of antibacterial effects of titanium dioxide nanoparticles alone and in combination with antibiotics on MDR *pseudomonas aeruginosa* strains. *Int J Nanomed*. 2020;15:3393–404.
- [149] 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 da Academia Brasileira Cienc*. 2016;88:1689–98.
- [150] Patra JK, Baek KH. Antibacterial activity and synergistic antibacterial potential of biosynthesized silver nanoparticles against foodborne pathogenic bacteria along with its antioxidant and antioxidant effects. *Front Microbiology*. 2017;8(FEB):1–14.
- [151] Jyoti K, Baunthiyal M, Singh A. Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics. *J Radiat Res Appl Sci*. 2016;9(3):217–27.
- [152] Bhande RM, Khobragade CN, Mane RS, Bhande S. Enhanced synergism of antibiotics with zinc oxide nanoparticles against extended spectrum β -lactamase producers implicated in urinary tract infections. *J Nanopart Res*. 2013;15(1):1413.
- [153] Kalita S, Kandimalla R, Sharma KK, Kataki AC, Deka M, Kotoky J. Amoxicillin functionalized gold nanoparticles reverts MRSA resistance. *Mater Sci Eng C*. 2016;61:720–7.
- [154] Lai HZ, Chen WY, Wu CY, Chen YC. Potent antibacterial nanoparticles for pathogenic bacteria. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(3):2046–54.
- [155] Pradeepa Vidya SM, Mutalik S, Udaya Bhat K, Huilgol P, Avadhani K. Preparation of gold nanoparticles by novel bacterial exopolysaccharide for antibiotic delivery. *Life Sci*. 2016;153:171–9.
- [156] 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*. 2015;48(1–2):63–71.
- [157] Kaur A, Preet S, Kumar V, Kumar R, Kumar R. Synergetic effect of vancomycin loaded silver nanoparticles for enhanced antibacterial activity. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2019;176(December 2018):62–9.
- [158] Ma K, Dong P, Liang M, Yu S, Chen Y, Wang F. Facile assembly of multifunctional antibacterial nanoplatform leveraging

- synergistic sensitization between silver nanostructure and vancomycin. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(6):6955–65.
- [159] Sharma A, Bakthavatchalam YD, Gopi R, Anandan S, Verghese VP, Veeraraghavan B. Journal of Infectious Diseases and Bloodstream Infections in India. *J Infect Dis Ther*. 2016;4:4.
- [160] Ono S, Muratani T, Matsumoto T. Mechanisms of resistance to imipenem and ampicillin in enterococcus faecalis. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2005;49(7):2954–8.
- [161] Zendegani E, Dolatabadi S. The efficacy of imipenem conjugated with synthesized silver nanoparticles against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates, Iran. *Biol Trace Elem Res*. 2020;197:330–40.
- [162] Li P, Li J, Wu C, Wu Q, Li J. Synergistic antibacterial effects of β -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005;16(9):1912–7.
- [163] Ipe DS, Kumar PTS, Love RM, Hamlet SM. Silver nanoparticles at biocompatible dosage synergistically increases bacterial susceptibility to antibiotics. *Front Microbiology*. 2020;11(May):1–11.
- [164] Khatoun N, Alam H, Khan A, Raza K, Sardar M. Ampicillin silver nanoformulations against multidrug resistant bacteria. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–10.
- [165] Surwade P, Ghildyal C, Weikel C, Luxton T, Peloquin D, Fan X, et al. Augmented antibacterial activity of ampicillin with silver nanoparticles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antibiot*. 2019;72(1):50–3.
- [166] García AB, Viñuela-prieto JM, López-gonzález L, Candel FJ. Correlation between resistance mechanisms in *Staphylococcus aureus* and cell wall and septum thickening. *Infect An*. 2017;10:353–6.
- [167] Hu Q, Peng H, Rao X. Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiology*. 2016;7(October):1601.
- [168] Ramirez MS, Tolmasky ME. Amikacin: uses, resistance, and prospects for inhibition. *Molecules*. 2017;22:2267–90. doi: 10.3390/molecules22122267.
- [169] Mazur P, Skiba-Kurek I, Mrowiec P, Karczewska E, Drożdż R. Synergistic ros-associated antimicrobial activity of silver nanoparticles and gentamicin against *staphylococcus epidermidis*. *Int J Nanomed*. 2020;15:3551–62.
- [170] Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb perspect Med*. 2016;6:1–21. doi: 10.1101/cshperspect.a025320.
- [171] Ghosh S, Patil S, Ahire M, Kitture R, Kale S, Pardesi K, et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *Int J Nanomed*. 2012;7:483–96.
- [172] Batarseh KI. Anomaly and correlation of killing in the therapeutic properties of silver (I) chelation with glutamic and tartaric acids. *J Antimicrobial Chemotherapy*. 2004;54(2):546–8.
- [173] 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? *Microbiol-Sgm*. 2011;157:451–8.
- [174] Teitzel GM, Parsek MR. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiology*. 2003;69(4):2313–20.
- [175] Ferris FG, Beveridge TJ. Binding of a paramagnetic metal cation to *Escherichia coli* K-12 outer-membrane vesicles. *Fems Microbiol Lett*. 1984;24(1):43–6.
- [176] 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(6):775–83.
- [177] Zhang XW, Wu WY, Virgo N, Zou LM, Liu P, Li XK. Global transcriptome analysis of hexavalent chromium stress responses in *Staphylococcus aureus* LZ-01. *Ecotoxicology*. 2014;23(8):1534–45.
- [178] Poirier I, Hammann P, Kuhn L, Bertrand M. Strategies developed by the marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* BA3SM1 to resist metals: a proteome analysis. *Aquat Toxicol*. 2013;128:215–32.
- [179] Jelenko C. Silver Nitrate Resistant *E Coli*-Report of Case. *Ann Surg*. 1969;170(2):296–9.
- [180] 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 Resistance*. 2019;12:1985–2001.
- [181] Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;27(2–3):341–53.
- [182] Silver S, Phung LT, Silver G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2006;33(7):627–34.
- [183] Li XZ, Nikaido H, Williams KE. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag^+ and are deficient in porins. *J Bacteriol*. 1997;179(19):6127–32.
- [184] Mchugh GL, Moellering RC, Hopkins CC, Swartz MN. *Salmonella typhimurium* resistant to silver-nitrate, chloramphenicol, and ampicillin-new threat in burn units. *Lancet*. 1975;1(7901):235–40.
- [185] Hobman JL, Crossman LC. Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *J Med Microbiol*. 2015;64(2014):471–97.
- [186] 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(4):2384–92.
- [187] 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(4):1–16.
- [188] 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(1):71–7.
- [189] 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(February):1–10.
- [190] Yang Q, Cao J, Yang F, Liu Y, Chen M, Qin R, et al. Amyloid-like aggregates of bovine serum albumin for extraction of gold

- from ores and electronic waste. *Chem Eng J.* 2021;416:129066. doi: 10.1016/j.cej.2021.129066.
- [191] Khan S, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Silver nanoparticles tolerant bacteria from sewage environment. *J Environ Sci.* 2011;23(2):346–52.
- [192] 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 Science: Nano.* 2018;5(6):1386–96.
- [193] 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(1):015013.
- [194] 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 Microbiology.* 2014;5:227.
- [195] 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 Nanomed.* 2020;15:199–213.
- [196] Bruna T, Maldonado-Bravo F, Jara P, Caro N. Silver nanoparticles and their antibacterial applications. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):7202. doi: 10.3390/ijms22137202.

Silver Covalently Bound to Cyanographene Overcomes Bacterial Resistance to Silver Nanoparticles and Antibiotics

David Panáček, Lucie Hochvaldová, Aristides Bakandritsos,* Tomáš Malina, Michal Langer, Jan Belza, Jana Martincová, Renata Večeřová, Petr Lazar, Kateřina Poláková, Jan Kolařík, Lucie Válková, Milan Kolář, Michal Otyepka, Aleš Panáček,* and Radek Zbořil*

The ability of bacteria to develop resistance to antibiotics is threatening one of the pillars of modern medicine. It was recently understood that bacteria can develop resistance even to silver nanoparticles by starting to produce flagellin, a protein which induces their aggregation and deactivation. This study shows that silver covalently bound to cyanographene (GCN/Ag) kills silver-nanoparticle-resistant bacteria at concentrations 30 times lower than silver nanoparticles, a challenge which has been so far unmet. Tested also against multidrug resistant strains, the antibacterial activity of GCN/Ag is systematically found as potent as that of free ionic silver or 10 nm colloidal silver nanoparticles. Owing to the strong and multiple dative bonds between the nitrile groups of cyanographene and silver, as theory and experiments confirm, there is marginal silver ion leaching, even after six months of storage, and thus very high cytocompatibility to human cells. Molecular dynamics simulations suggest strong interaction of GCN/Ag with the bacterial membrane, and as corroborated by experiments, the antibacterial activity does not rely on the release of silver nanoparticles or ions. Endowed with these properties, GCN/Ag shows that rigid supports selectively and densely functionalized with potent silver-binding ligands, such as cyanographene, may open new avenues against microbial resistance.

1. Introduction

Antimicrobial resistance threatens the very core of modern medicine,^[1] undermining the humankind's discoveries of the last century against many routinely treated bacterial infections. According to a 2016 report by the United Nations General Assembly, it may be estimated that if bacterial resistance continues to grow at the same rate, untreatable infections caused by multidrug-resistant bacteria will become the primary cause of death by 2050.^[2] It is therefore vital to adequately address this issue systematically, or the probability of returning to the pre-antibiotic era, when a simple infection was fatal, may alarmingly increase.^[3]

Inorganic^[4–9] and carbon-based nanomaterials,^[9–12] polymers and peptides,^[13,14] as well as light-activated nanomaterials^[15,16] have emerged as promising antimicrobial agents for treatment and prevention of infectious diseases. Particularly silver colloids can inhibit growth of pathogens at very low

D. Panáček, M. Langer, Dr. K. Poláková, Prof. M. Otyepka, Prof. R. Zbořil
Regional Centre of Advanced Technologies and Materials
Czech Advanced Technology and Research Institute
Palacký University Olomouc
Křížkovského 511/8, Olomouc 779 00, Czech Republic
E-mail: radek.zboril@upol.cz

D. Panáček, L. Hochvaldová, T. Malina, M. Langer, J. Belza, J. Martincová,
Dr. A. Panáček
Department of Physical Chemistry
Faculty of Science
Palacký University Olomouc
17. listopadu 1192/12, Olomouc 771 46, Czech Republic
E-mail: ales.panacek@upol.cz

L. Hochvaldová, Dr. A. Bakandritsos, T. Malina, J. Belza, J. Martincová,
Dr. P. Lazar, Dr. J. Kolařík, L. Válková, Prof. M. Otyepka, Dr. A. Panáček
Regional Centre of Advanced Technologies and Materials
Palacký University Olomouc
Šlechtitelů 27, Olomouc 783 71, Czech Republic
E-mail: a.bakandritsos@upol.cz

Dr. A. Bakandritsos, Prof. R. Zbořil
Nanotechnology Centre
Centre of Energy and Environmental Technologies
VŠB–Technical University of Ostrava
17. listopadu 2172/15, Ostrava-Poruba 708 00, Czech Republic

Dr. R. Večeřová, Prof. M. Kolář
Department of Microbiology
Faculty of Medicine and Dentistry
Palacký University Olomouc
Hněvotínská 3, Olomouc 775 15, Czech Republic

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/advs.202003090>

© 2021 The Authors. Advanced Science published by Wiley-VCH GmbH.
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

DOI: 10.1002/advs.202003090

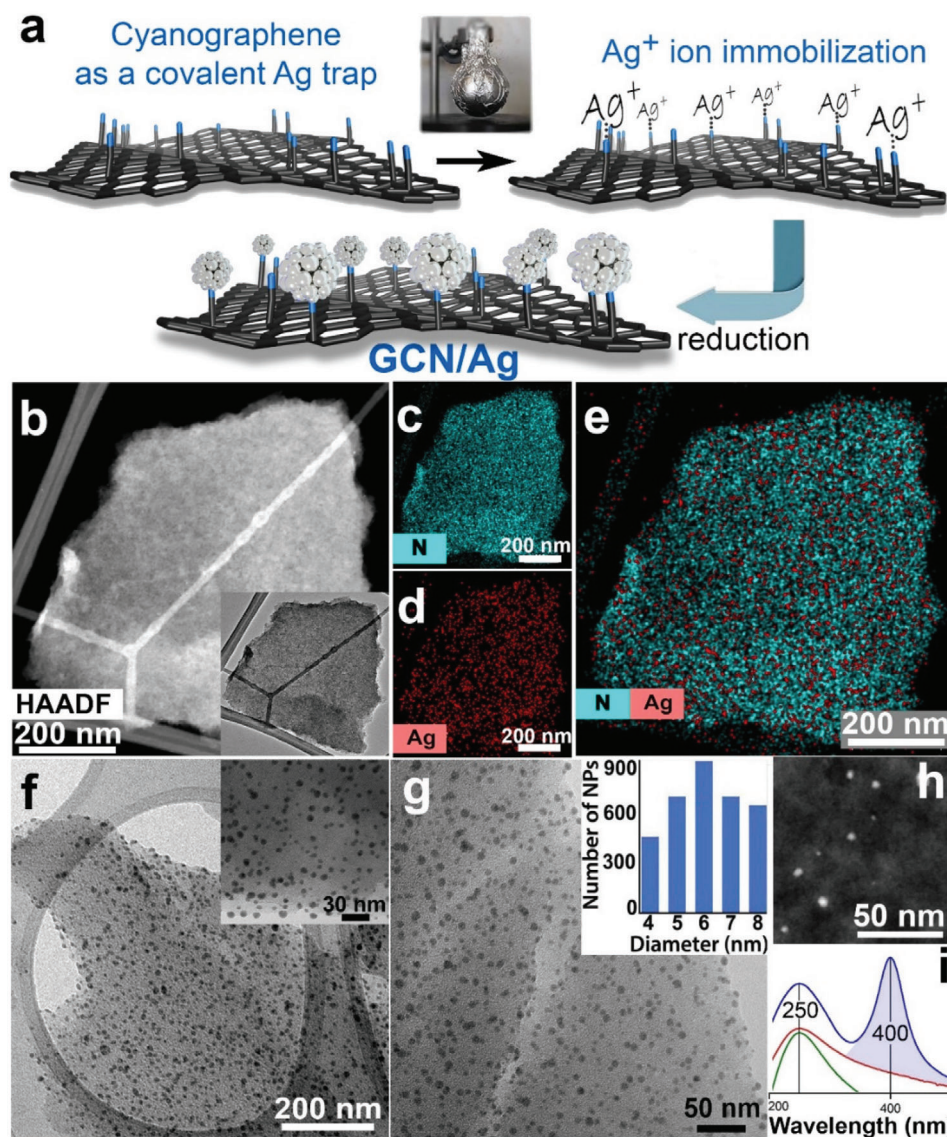


Figure 1. a) Reaction scheme for the preparation of silver nanoparticles bonded on the nitrile groups of cyanographene (GCN/Ag). b) HAADF-STEM image (and TEM image, inset) of a GCN flake after interaction with AgNO_3 . EDS chemical mapping of c) nitrogen and d) silver. e) Combined chemical mapping of nitrogen and silver on the flake shown in panel (b). f,g) TEM images of GCN/Ag and size distribution of the AgNPs (inset in panel (g)). h) HAADF-STEM image of GCN/Ag showing the AgNPs as bright spots. i) Light absorption spectra of the starting GCN (bottom green curve), the GCN/ Ag^+ precursor (middle red curve), and after reduction, the GCN/Ag product (top blue curve).

concentrations.^[17–19] However, the development of resistance even to silver nanoparticles (AgNPs) was demonstrated,^[20] whereby bacteria started to secrete a protein (flagellin) which induced coagulation of the AgNPs and reduced dramatically their antibacterial activity. Only after administration of additional molecular substances the release of flagellin was blocked and AgNPs restored their antibacterial activity. These results highlight the risk of entering another race for the discovery of anti-flagellin substances faster than the development of resistance from bacteria to them. Although methods to increase colloidal stability of AgNPs via surface modification have been applied to prevent aggregation and preserve antibacterial activity, they were insufficient against flagellin-induced aggregation.^[20] Graphene oxide (GO) has been used as a rigid support for AgNP immobi-

lization to bypass aggregation,^[10–12,21–23] but its surface is chemically inhomogeneous with many different oxygen-containing groups,^[24,25] preventing a strong and selective surface chemistry for silver binding. Furthermore, according to the hard-soft acid-base theory, oxygen functionalities are poor coordination ligands for silver.^[26,27]

To tackle such issues, we used a densely functionalized graphene (cyanographene, GCN^[28]), which proved a very efficient covalent trap for silver ions, exploiting the high coordination proclivity of nitrile groups toward silver.^[26,27] The trapping of single Ag ions allowed the high-quality purification of the GCN/ Ag^+ precursor and the subsequent reduction of only those Ag ions that remained coordinated on GCN (Figure 1a, and Methods in the Supporting Information). The strong covalent

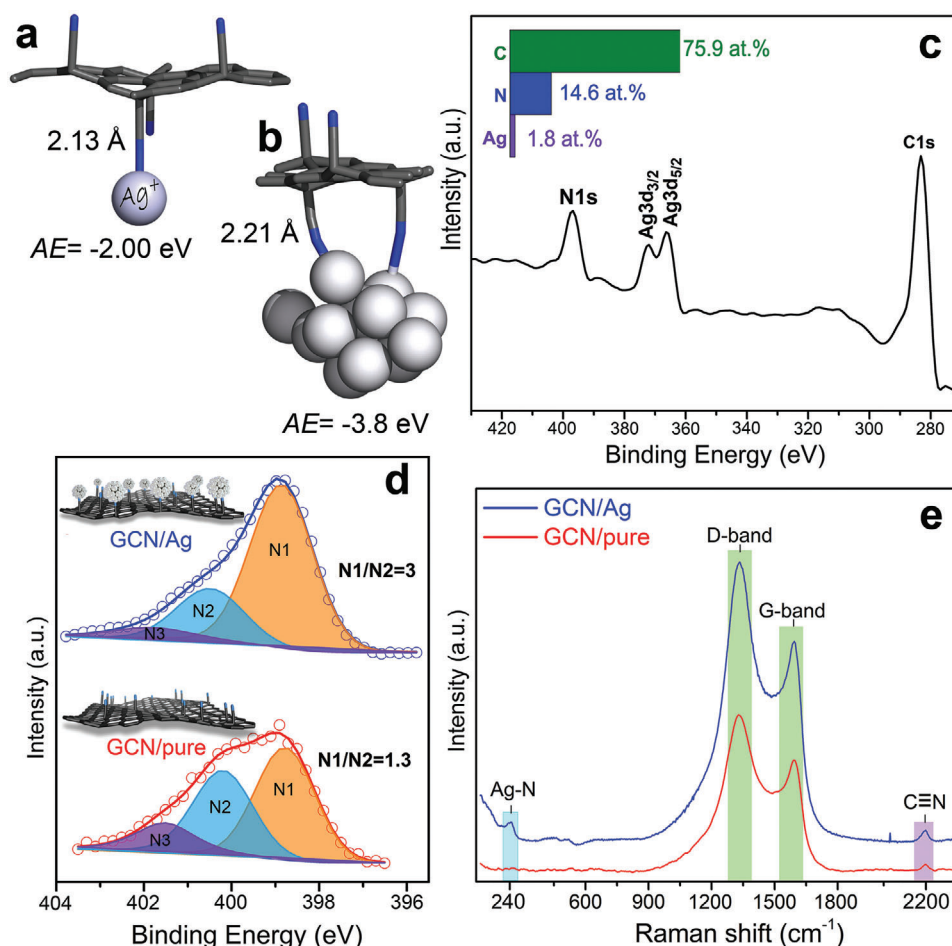


Figure 2. Theoretical models of GCN interacting a) with one silver cation and b) with a silver nanoparticle; 2.21 Å corresponds to the shorter bond. c) XPS survey spectrum of the GCN/Ag. d) Deconvoluted N1s HR-XPS of the starting GCN and the GCN/Ag product. e) Raman spectra for GCN and GCN/Ag.

immobilization afforded a material with groundbreaking properties: i) potent antibacterial activity, similar to free ionic silver, even against multidrug-resistant bacterial strains, ii) minimum bactericidal concentrations against AgNP-resistant bacterial strains 30-fold lower than free AgNPs (benchmarked under identical conditions), and iii) very low leaching of silver ions or AgNPs, ascribing very high cytocompatibility to healthy human cells, which is a very critical asset for practical applications.

2. Results and Discussion

The GCN/Ag⁺ precursor (prepared in the dark, Figure 1a) comprised flakes of GCN free from AgNPs, as high-angle annular dark-field scanning transmission electron microscopy (HAADF-STEM) imaging revealed (Figure 1b). Higher resolution images of the ionic GCN/Ag⁺ precursor (Figure S1, Supporting Information) further confirmed the absence of AgNPs and elemental chemical mapping (Figure 1c–e) evidenced the dense and homogeneous coverage of the flakes by Ag, as well as by the nitrogen atoms of the nitrile groups. After removing any unbound silver ions by thorough washing, reduction with NaBH₄ afforded the final GCN/Ag product, comprising small AgNPs (Figure 1f–h)

with diameter from 4 to 8 nm (Figure 1g, inset). Optical absorption of the GCN/Ag⁺ precursor and of GCN/Ag revealed the characteristic surface plasmon resonance of metallic AgNPs at 400 nm^[29] only after the reduction (Figure 1i), verifying the synthetic pathway (the full UV-vis. absorption spectra are available in Figure S3, Supporting Information). The Ag content in the hybrid was 13 wt%, according to atomic absorption spectroscopy analysis. A control experiment with GO, following the same synthetic protocol, resulted in large size variations of the grown AgNPs with irregular topological distribution (Figure S2, Supporting Information), highlighting the role of the GCN support.

Theoretical calculations confirmed the strong immobilization of Ag⁺ ions on GCN with adsorption energy (AE) of −2.00 eV, indicating bond formation between the Ag⁺ ion and the N atom of the nitrile groups (Figure 2a). Electron localization function of the Ag–N bond remained localized on individual atoms (Figure S4, Supporting Information). However, Mulliken and Hirshfeld charge analyses showed significant charge transfer from GCN to the 5s orbitals of Ag⁺ resulting in the fractional charge of 0.5 *e* on the Ag ion. Therefore, the Ag–N bond can be characterized as a strongly polarized covalent bond. The calculated bond length of 2.13 Å was in line with a typical N–Ag coordination

bond (2.1–2.4 Å).^[30,31] When Ag atoms aggregated into metallic AgNPs, the AE strengthened (−3.80 eV) owing to multiple bonding (Figure 2b). Silver donated electrons to GCN, because the Hirshfeld partial charge was +0.51 *e* on the AgNP, from which 0.19 *e* was localized on the silver atom bonded to nitrogen. Considering the size of the AgNPs and the coverage density of the CN groups on graphene (≈14%), it is plausible that each AgNP can establish several bonds to the nitriles and, therefore, attach very strongly to GCN (a GCN area of 10 × 14 Å may contain five nitrile groups on one side, with a mean distance of less than 1 nm).

The predicted strong interactions were verified experimentally with high-resolution X-ray photoelectron (HR-XPS) and Raman spectroscopies. XPS showed the overall composition from carbon, nitrogen, and silver (Figure 2c), while the N1s region revealed intriguing area redistribution of the N1 and N2 components after immobilization of silver (Figure 2d). In particular, the area of the lower binding energy (BE) N1 component increased significantly at the expense of the higher BE N2 component, reflecting an increase of the electron density of N atoms after their bonding with metallic silver. This was in agreement with the electron donation from AgNPs identified from the calculations, and with previous reports on BE reduction of N or O upon interaction with AgNPs.^[32,33] Raman spectroscopy (Figure 2e) more clearly confirmed such a N–Ag bonding, by the appearance of the band at 240 cm^{−1}.^[34] Theoretical calculations (see Methods and Computations in the Supporting Information) indeed showed a frequency for the N–Ag stretching vibration at 230 cm^{−1}. The nitrile groups were also evident in Raman and in Fourier transform infrared (FTIR) before and after AgNPs immobilization (Figure S5, Supporting Information), indicating their preservation after the reaction. The strong bonding was probably responsible for the formation of uniform and small-diameter AgNPs, unlike the case of the control experiment with GO (Figure S2, Supporting Information).

Recently, Panacek et al. reported that Gram-negative bacteria (which are increasingly becoming untreatable by modern antibiotics)^[35] can develop resistance even to initially highly active AgNPs.^[20] Exposure of 20 bacterial generations to subinhibitory concentrations of AgNPs induced flagellin production and aggregation/deactivation of AgNPs.^[20] Therefore, bacterial resistance even to AgNPs poses a serious threat. While the antibacterial activity of silver and silver composites range at quite low minimum inhibitory concentrations (MIC), i.e., 0.2–3.4 mg_{Ag} L^{−1} (Tables S1 and S2, Supporting Information), there are no reports for antibacterial agents against AgNP-resistant bacteria. Studies against ionic Ag⁺-resistant strains, mediated by the Ag⁺ efflux pump, reported MIC for AgNPs of 70 mg_{Ag} L^{−1}.^[36] With the focus on addressing the alarming implications of bacterial resistance,^[3] GCN/Ag was evaluated against antibiotic-susceptible, but also against multidrug- and AgNP-resistant bacteria (AgNP-resistant *Escherichia coli* and AgNP-resistant *Pseudomonas aeruginosa* were developed as recently reported;^[20] see Methods in the Supporting Information for detailed description of the bacterial strains and Table S2 (Supporting Information) for the detailed results for the eight tested bacterial strains). As shown in Figure 3a and Table S2 (Supporting Information), the MIC₁₀₀ (i.e., MIC for 100% growth inhibition) values of GCN/Ag ranged at ultralow levels, from 0.2 to 7.2 mg_{Ag} L^{−1} (or 1.8–59.7 mg L^{−1} with respect to the total GCN/Ag mass),

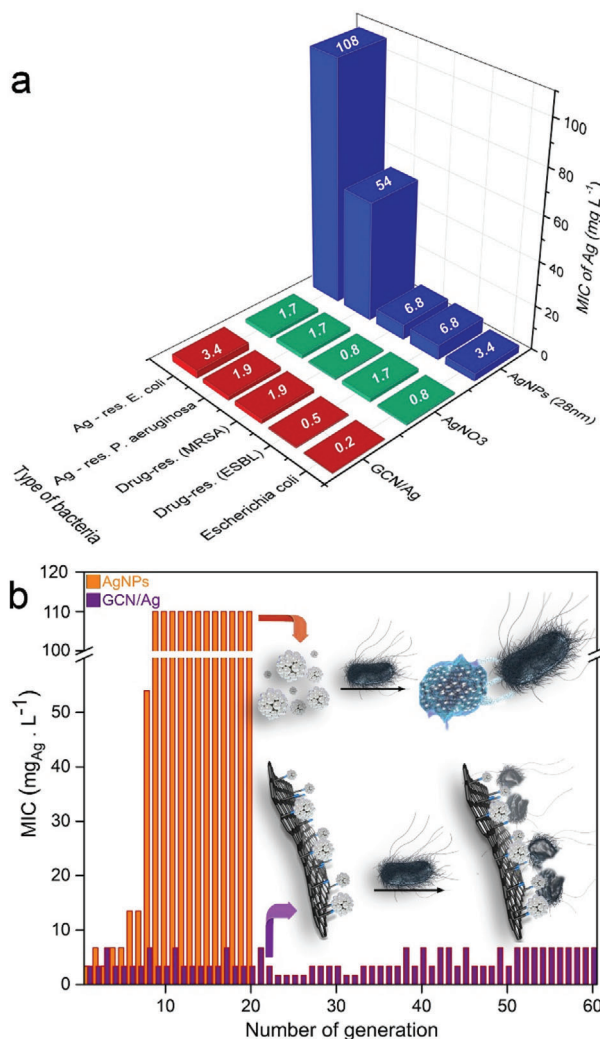


Figure 3. a) Comparative graph of MIC₁₀₀ values for GCN/Ag, colloidal silver nanoparticles (AgNPs) and ionic silver (AgNO₃) for different bacterial strains. MIC₁₀₀ values of GCN/Ag refer to the Ag content only, for appropriate comparison with AgNO₃ and AgNPs. In Table S2 (Supporting Information), MIC₁₀₀ values with respect to the total GCN/Ag mass are also available. b) *E. coli* treated for several generations (serial passages) at subinhibitory concentrations with the GCN/Ag hybrid (violet) and with colloidal AgNPs (orange). Bacteria developed resistance and inactivated AgNPs, but not GCN/Ag. The serial passages with colloidal AgNPs were performed in the frame of a previous publication^[20] from some of the authors of this work; here these data are plotted for the first time.

while pure GCN and GO did not show any antibacterial activity at concentration as high as 1880 and 1500 mg L^{−1}, respectively (Table S2, Supporting Information). AgNPs of 28 and 10 nm diameter were synthesized and evaluated under similar testing conditions. The MIC₁₀₀ values of GCN/Ag against several bacterial strains were lower than 28 nm AgNPs (Figure 3a) and similar

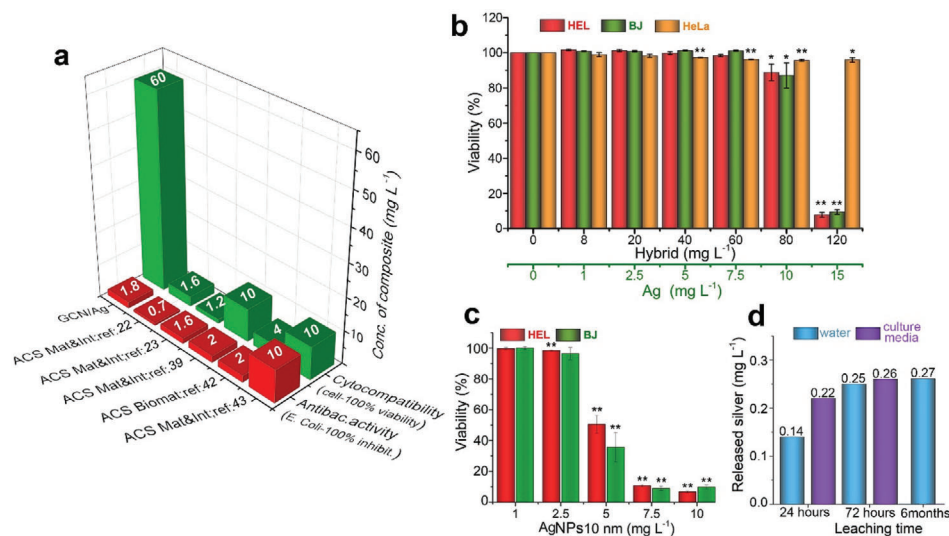


Figure 4. a) Comparative graph of the antibacterial activity and cytocompatibility of GCN/Ag in healthy human cells compared to representative examples from literature; in the latter case obtained on human cancer cell lines. Extended comparisons are also available in Table S1 (Supporting Information). b) Viability of human lung fibroblasts HEL, human skin fibroblasts BJ, and cancer HeLa cells treated with GCN/Ag, expressed in terms of hybrid (black line) and in terms of silver content (green line) ($n = 3$). c) Viability of HEL and BJ cells ($n = 3$) treated with 10 nm AgNPs. d) Leaching test of silver from GCN/Ag in water and in cell-culture medium after 24, 72 h, and six months. The concentrations on the columns correspond to 0.07%, 0.11%, 0.13%, 0.13%, and 0.14% of Ag leached from the total amount of Ag (200 mg L^{-1} of Ag) that was initially contained in GCN/Ag which was added in the solution for the leaching test. $*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.01$.

to those of ionic silver (Figure 3a) or 10 nm AgNPs (Table S2, Supporting Information). Interestingly, they remained highly potent even against severely resistant strains, such as extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *K. pneumoniae*^[37] and methicillin-resistant *S. aureus*.^[38] Impressively, GCN/Ag was ≈ 30 times more effective against AgNP-resistant bacteria than both 28 and 10 nm colloidal AgNPs and similar to AgNO₃ (Figure 3a and Table S2, Supporting Information). However, free silver ions are severely limited by their generic toxicity^[39] and are subjective to the resistance mechanisms which microorganisms developed during their 3–4 billion years of natural evolution and occasional exposure to toxic metal-rich environments.^[26] To unequivocally prove the persistence of the high antibacterial activity of GCN/Ag, serial passages^[40] were performed for 60 *E. coli* bacterial generations (Figure 3b). The MIC₁₀₀ for GCN/Ag increased only marginally, from 3.4 to 7 mg L⁻¹. When the same bacteria were treated with conventional colloidal AgNPs under the exact same conditions, *E. coli* developed resistance on the 20th generation from 3.4 to $\approx 108 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figure 3b). These results verified our hypothesis that the very strong binding of silver on GCN can bypass the key resistance mechanism (induction of aggregation) of these bacteria against AgNP colloids. GCN/Ag appears to open the doors to a so far unmet challenge, bypassing the bacterial resistance mechanisms of some of the most threatening microorganisms, such as *E. coli* and *P. aeruginosa*.^[41]

Considering the applicability of antimicrobial agents, their biocompatibility is an equally important asset, as silver exerts a generic cytotoxic effect.^[43] Therefore, the cytocompatibility of GCN/Ag was investigated with flow cytometry (using propidium iodide and calcein fluorescent probes, Supporting Information) on human skin fibroblasts, because of the potential application of antibacterial agents on skin, and on human lung fibroblasts (HEL

12469) for further establishment of the cytocompatibility profile. It was very gratifying to observe that GCN/Ag was fully tolerated by both cell lines up to 60 mg L^{-1} (or $7.5 \text{ mg}_{\text{Ag}} \text{ L}^{-1}$, Figure 4a,b), which was ≈ 4 –37 times higher than its antibacterial MIC₁₀₀ values (Figure 3a). Such a high cytocompatibility combined with potent antibacterial activity against multidrug-resistant strains and, strikingly, even against AgNP-resistant strains, may introduce new thrust in the field. This is also evident by the comparisons in Figure 4a, showing that the cytocompatibility of GCN/Ag is significantly better than that of other graphene/silver hybrids with similarly potent antibacterial activities.^[22,23,39,44,45] These works were selected because of their very low MIC₁₀₀ values and of the fine distribution of small AgNPs on the graphene sheets. It should be noted though, that in most of the reports, cancer cells (HeLa) were commonly used,^[39,44,45] which are significantly more tolerant to Ag than the healthy cell lines (Figure 4b). The latter were used in this study, as a more rigorous evaluation method. More comparisons with literature are available in Tables S1 and S3 (Supporting Information), where the differences in cell lines are also reported. The high cytocompatibility of GCN/Ag was further demonstrated by the comparison with 10 nm AgNPs colloids, whose cytocompatibility was limited to $2.5 \text{ mg}_{\text{Ag}} \text{ L}^{-1}$ (Figure 4c), as opposed to the $7.5 \text{ mg}_{\text{Ag}} \text{ L}^{-1}$ for the case of GCN/Ag (Figure 4b). Unequivocally, the high safe dose is the second key benefit of GCN/Ag, probably stemming from the strong bonding of silver on the surface of GCN.

The robust immobilization of silver on GCN was experimentally supported by TEM measurements of a GCN/Ag dispersion in water after six months of storage (Figure S7, Supporting Information), whereby immobilized AgNPs fully retained their original shape and size. Leaching tests for released silver further substantiated the strong binding, as after 72 h of storage in water or

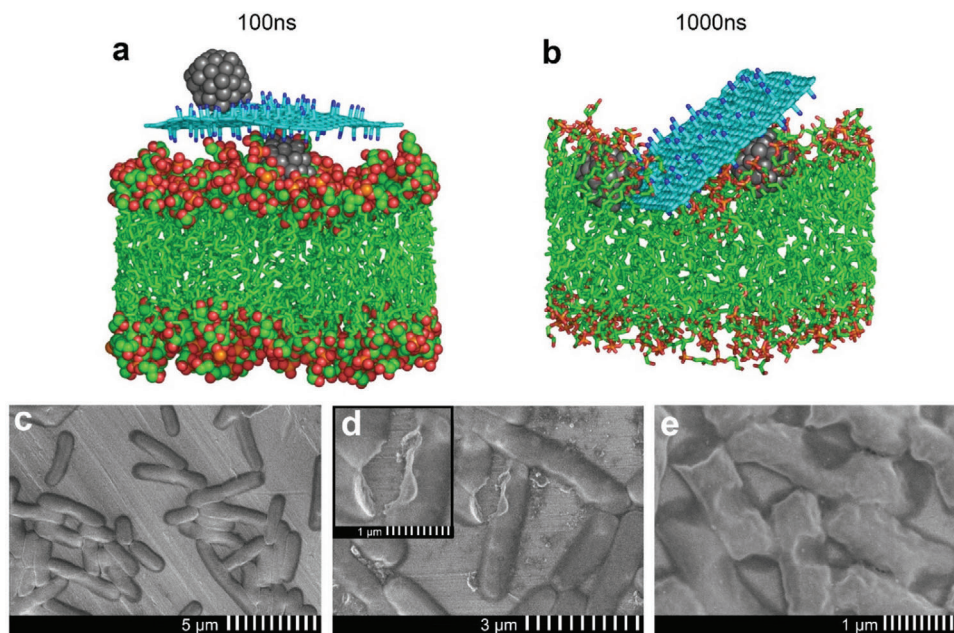


Figure 5. Snapshots taken from MD simulation at a) 100 ns and b) 1.0 μ s show the interaction of GCN/Ag with the phospholipid membrane. More snapshots are shown in Figures S9 and S10 (Supporting Information) (color coding: cyan and green – carbon; red – oxygen; blue – nitrogen; gray – silver; orange – phosphorus, water molecules, ions, and hydrogen atoms are omitted for clarity); c) SEM image of native *E. coli* and d,e) treated with GCN/Ag at subinhibitory concentration (0.2 mg mL^{-1}).

in cell culture media, leaching of silver reached 0.26 mg L^{-1} (Figure 4d), well below the toxic levels of GCN/Ag ($10\text{--}15 \text{ mg}_{\text{Ag}} \text{ L}^{-1}$, Figure 4b) or of 10 nm AgNPs colloids ($\approx 5 \text{ mg L}^{-1}$, Figure 4c). The leached amount of Ag corresponded to 0.14% from the total amount of Ag initially contained in GCN/Ag which was added in the solution for the leaching test. Even after six months of storage in water, leaching remained practically the same (0.27 mg L^{-1} or 0.14%). To investigate further the release of silver, the MIC_{100} values of GCN/Ag were compared with free AgNPs and Ag^+ ions with and without the addition of a silver-ion complexing molecule^[46] (thioglycolate, NATG, Table S4, Supporting Information). Results showed that MIC_{100} values significantly increased in presence of NATG only for the case of AgNO_3 (16 times) and for AgNPs (eight times), while for the case of GCN/Ag, the MIC_{100} increased only four times. Although this increase can also be affected by the binding of NATG on the AgNPs themselves, the comparative results corroborate the minor role of released Ag^+ ions from GCN/Ag and its different mechanism of action.

For better understanding the GCN/Ag–bacterial interface, we modeled by molecular dynamics (MD) simulations the interactions of GCN/Ag with a simplified model of bacterial plasma membrane consisting of a double layer of negatively charged 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (POPG) lipids (see the Supporting Information for more details). The hybrid stayed in contact with the membrane floating flat on its surface (Figure 5a) for 0.1 μ s without any sign of desorption, demonstrating a high affinity of the GCN/Ag to the membrane. Progressively (Figure S8, Supporting Information), GCN/Ag submerged into the polar headgroup region of POPG after 1 μ s (Figure 5b), penetrating only slightly the hydrophobic part of

the membrane, but generating a significant perturbation to its structure. MD simulations of GCN and AgNPs alone (Figure S9a,b, Supporting Information) also showed a very small extent of penetration to the hydrophobic membrane; both GCN/Ag and AgNPs were partly covered with the polar head groups (red spheres) of the lipids. On the contrary, MD simulations with graphene showed full penetration in the hydrophobic membrane compartment (Figure S9c, Supporting Information). Additional MD simulation of a mixed membrane consisted of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE):POPG in the proportion 3:1 demonstrated the same behavior as the simulation with homogeneous POPG membrane (Figures S9 and S10, Supporting Information). The above results indicated that the antibacterial activity of GCN/Ag initiates on the extracellular level, as the internalization of the whole hybrid entities is less probable owing to the strong interactions with the outer membrane layer of the cell walls.

Certainly, the binding of AgNPs, or hybrids thereof, on the cell membrane can cause a cascade of events, culminating in degradation of the cell function and production of reactive oxygen species,^[43,47] as it was also confirmed in the present case (Figure S11, Supporting Information). It is known that AgNPs bind to –SH groups of cell-membrane proteins, altering their structure and function.^[17] They also interact with the proteoglycan-rich bacterial biofilm, inhibiting its formation^[48] and altering proteoglycan expression.^[49] It is indicative that in the case of the Gram-positive bacteria, tested in the present work (Table S2, Supporting Information), which express a proteoglycan extracellular matrix, GCN/Ag remained potent (Table S2, Supporting Information). Membrane-wall damage has been suggested as a result of AgNPs binding (direct or indirect it is not known). For

instance, *E. coli* were treated with subinhibitory concentration of AgNP colloids, and scanning electron microscopy (SEM) showed the formation of pits on the bacterial walls.^[50] In the present case as well, SEM characterization of *E. coli* incubated in absence (Figure 5c) and presence of GCN/Ag at subinhibitory concentrations (Figure 5d,e), whereby the bacterial population remains alive, also revealed significant membrane damage. The observed pits were rather severe in comparison to the previous report,^[50] despite the much lower Ag concentration which was used in our case (0.2 mg L⁻¹). In the case of different antibacterial agents (i.e., carbon dots), the membrane walls presented very different morphology.^[51] Lack of significant wall damage in *E. coli* was also observed after treatment with antibacterial peptides^[52] and natural antimicrobial molecular agents.^[53,54] Therefore, the particularly defective shape of alive *E. coli* cells observed in the present case could be ascribed to the action of GCN/Ag. SEM analyses on AgNP-resistant *E. coli* and on multiresistant *S. aureus* are also available in Figures S12 and S13 (Supporting Information). It will be interesting to unveil in future the effects of protein binding of AgNPs that are already firmly grafted on a substrate (as in GCN/Ag). In such a case, the proteins' motion and function might be more restricted than when bound to free/colloidal AgNPs. This hypothesis becomes more intriguing considering that bacteria require considerably higher membrane fluidity for normal growth and function^[55,56] than eukaryotic cells,^[57] a matter that could also be related to the lower toxicity of the GCN/Ag to human cell lines.

3. Conclusions

In this work, a densely and selectively functionalized graphene was used as a trap for silver, exploiting its strong coordination with the nitrile groups of GCN. The binding energies approached values of covalent bonding, even surpassing them in case of multiple binding of one AgNP to several –CN groups, owing to the dense and homogeneous functionalization of GCN. This work also shows that bacteria which have developed resistance to AgNPs are highly susceptible on GCN/Ag. The persistence of the antibacterial activity was verified during serial passages over 60 bacterial generations (with no evidence of resistance development from the bacteria), while colloidal AgNPs lost their activity after 20 generations. Another key feature of GCN/Ag, critical for practical applications, was its very high cytocompatibility to healthy human cells in comparison to other reported hybrids, free AgNP colloids, and silver ions. This was ascribed to the strong GCN–silver interactions, which profoundly suppressed silver leaching, as theoretical calculations, modeling, and experiments confirmed. The present findings open the way to promising broad-spectrum antibacterial agents, bypassing known resistance mechanisms of microorganisms.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

The work was supported by the ERDF/ESF project “Nano4Future,” Development of pre-applied research in nanotechnology and biotechnology”

(No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000754). R.Z. and A.B. acknowledge the funding from the Czech Science Foundation, project GA CR – EXPRO, 19-27454X. M.O. acknowledges the ERC grant 2D-CHEM, No. 683024 from H2020. A.P. acknowledges Czech Science Foundation (project GA CR – 19-22720S) and The Internal Student Grant Agency of the Palacký University in Olomouc, (IGA-PrF-2021-028). Dr. Zuzana Chaloupková, Mr. Martin Petr, Mr. Ondřej Tomanec, and Ms. Jana Stráská are acknowledged for Raman spectroscopy, XPS, HRTEM, and TEM characterization of samples, respectively. The authors thank Mr. Tomáš Steklý for synthesis of cyanographene.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Keywords

antimicrobial, cytocompatibility, graphene, silver resistant

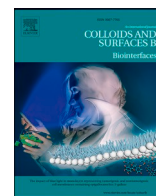
Received: August 12, 2020

Revised: February 22, 2021

Published online:

- [1] “Global action plan on antimicrobial resistance,” can be found under <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/> (accessed: March 2021).
- [2] M. E. A. de Kraker, A. J. Stewardson, S. Harbarth, *PLoS Med.* **2016**, *13*, e1002184.
- [3] S. Baker, *Science* **2015**, *347*, 1064.
- [4] S. Muzammil, S. Hayat, M. Fakhar-E-Alam, B. Aslam, M. H. Siddique, M. A. Nisar, M. Saqalein, M. Atif, A. Sarwar, A. Khurshid, N. Amin, Z. Wang, *Front. Biosci. Elite Ed.* **2018**, *10*, 352.
- [5] P. V. Baptista, M. P. McCusker, A. Carvalho, D. A. Ferreira, N. M. Mohan, M. Martins, A. R. Fernandes, *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1441.
- [6] I. de Miguel, I. Prieto, A. Albornoz, V. Sanz, C. Weis, P. Turon, R. Quidant, *Nano Lett.* **2019**, *19*, 2524.
- [7] J. Li, W. Liu, D. Kilian, X. Zhang, M. Gelinsky, P. K. Chu, *Mater. Horiz.* **2019**, *6*, 1271.
- [8] R. P. Pandey, K. Rasool, V. E. Madhavan, B. Aïssa, Y. Gogotsi, K. A. Mahmoud, *J. Mater. Chem. A* **2018**, *6*, 3522.
- [9] N. A. Travlou, M. Algarra, C. Alcohado, M. Cifuentes-Rueda, A. M. Labella, J. M. Lázaro-Martínez, E. Rodríguez-Castellón, T. J. Bandoz, *ACS Appl. Bio Mater.* **2018**, *1*, 693.
- [10] X. Zou, L. Zhang, Z. Wang, Y. Luo, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 2064.
- [11] Y. Tu, M. Lv, P. Xiu, T. Huynh, M. Zhang, M. Castelli, Z. Liu, Q. Huang, C. Fan, H. Fang, R. Zhou, *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 594.
- [12] Q. Xin, H. Shah, A. Nawaz, W. Xie, M. Z. Akram, A. Batool, L. Tian, S. U. Jan, R. Boddula, B. Guo, Q. Liu, J. R. Gong, *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1804838.
- [13] X. Li, H. Bai, Y. Yang, J. Yoon, S. Wang, X. Zhang, *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1805092.
- [14] B. S. T. Peddinti, F. Scholle, M. G. Vargas, S. D. Smith, R. A. Ghiladi, R. J. Spontak, *Mater. Horiz.* **2019**, *6*, 2056.
- [15] Y. Wang, Y. Yang, Y. Shi, H. Song, C. Yu, *Adv. Mater.* **2019**, *9*, 696.
- [16] L. Wang, X. Zhang, X. Yu, F. Gao, Z. Shen, X. Zhang, S. Ge, J. Liu, Z. Gu, C. Chen, *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1901965.

- [17] M. K. Rai, S. D. Deshmukh, A. P. Ingle, A. K. Gade, *J. Appl. Microbiol.* **2012**, 112, 841.
- [18] B. Le Ouay, F. Stellacci, *Nano Today* **2015**, 10, 339.
- [19] S. Chernousova, M. Epple, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, 52, 1636.
- [20] A. Panáček, L. Kvítek, M. Smékalová, R. Večeřová, M. Kolář, M. Röderová, F. Dyčka, M. Šebela, R. Prucek, O. Tomanec, R. Zbořil, *Nat. Nanotechnol.* **2018**, 13, 65.
- [21] G. Reina, J. M. González-Domínguez, A. Criado, E. Vázquez, A. Bianco, M. Prato, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 4400.
- [22] W. Shao, X. Liu, H. Min, G. Dong, Q. Feng, S. Zuo, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7, 6966.
- [23] S. Kellici, J. Acord, A. Vaughn, N. P. Power, D. J. Morgan, T. Heil, S. P. Facq, G. I. Lampronti, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 19038.
- [24] A. Y. S. Eng, C. K. Chua, M. Pumera, *Nanoscale* **2015**, 7, 20256.
- [25] K. P. Loh, Q. Bao, G. Eda, M. Chhowalla, *Nat. Chem.* **2010**, 8, 1456.
- [26] J. A. Lemire, J. J. Harrison, R. J. Turner, *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, 11, 371.
- [27] R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3533.
- [28] A. Bakandritsos, M. Pykal, P. Boňski, P. Jakubec, D. D. Chronopoulos, K. Poláková, V. Georgakilas, K. Čépe, O. Tomanec, V. Ranc, A. B. Bourlinos, R. Zbořil, M. Otyepka, *ACS Nano* **2017**, 11, 2982.
- [29] A. Panáček, L. Kvítek, R. Prucek, M. Kolář, R. Večeřová, N. P., V. K. Sharma, T. Nevěčná, R. Zbořil, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 16248.
- [30] C. Pettinari, F. Marchetti, S. Orbisaglia, R. Pettinari, J. Ngouné, M. Gómez, C. Santos, E. Álvarez, *CrystEngComm* **2013**, 15, 3892.
- [31] Q. Sun, Y. Bai, G. He, C. Duan, Z. Lin, Q. Meng, *Chem. Commun.* **2006**, 2777.
- [32] N. Maiti, S. Thomas, A. Debnath, S. Kapoor, *RSC Adv.* **2016**, 6, 56406.
- [33] K. J. Lee, Y.-I. Lee, I.-K. Shim, J. Joung, Y. S. Oh, *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, 304, 92.
- [34] P. Mukherjee, M. Roy, B. P. Mandal, G. K. Dey, P. K. Mukherjee, J. Ghatak, A. K. Tyagi, S. P. Kale, *Nanotechnology* **2008**, 19, 075103.
- [35] M. Perros, *Science* **2015**, 647, 6226.
- [36] H.-L. Su, S.-H. Lin, J.-C. Wei, I.-C. Pao, S.-H. Chiao, C.-C. Huang, S.-Z. Lin, J.-J. Lin, *PLoS One* **2011**, 6, e21125.
- [37] C. M. Courtney, S. M. Goodman, T. A. Nagy, M. Levy, P. Bhusal, N. E. Madinger, A. Chatterjee, *Science* **2017**, 3, e1701776.
- [38] E. Tacconelli, N. Margrini, *WHO* **2017**, 7.
- [39] S. Chen, Y. Quan, Y.-L. Yu, J.-H. Wang, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, 3, 313.
- [40] W. Kim, W. Zhu, G. L. Hendricks, D. Van Tyne, A. D. Steele, C. E. Keohane, N. Fricke, A. L. Conery, S. Shen, W. Pan, K. Lee, R. Rajamuthiah, B. B. Fuchs, P. M. Vlahovska, W. M. Wuest, M. S. Gilmore, H. Gao, F. M. Ausubel, E. Mylonakis, *Nature* **2018**, 556, 103.
- [41] P. A. Smith, M. F. T. Koehler, H. S. Girgis, D. Yan, Y. Chen, Y. Chen, J. J. Crawford, M. R. Durk, R. I. Higuchi, J. Kang, J. Murray, P. Paraselli, S. Park, W. Phung, J. G. Quinn, T. C. Roberts, L. Rougé, J. B. Schwarz, E. Skippington, J. Wai, M. Xu, Z. Yu, H. Zhang, M.-W. Tan, C. E. Heise, *Nature* **2018**, 561, 189.
- [42] EUCAST recommendations for MIC determination, can be found under the link on "Broth microdilution - EUCAST reading guide v 3.0 (1 January, 2021)." at: https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/mic_determination/ (accessed: March 2021).
- [43] T. A. Jorge de Souza, L. R. Rosa Souza, L. P. Franchi, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, 171, 691.
- [44] R. Zhao, M. Lv, Y. Li, M. Sun, W. Kong, L. Wang, S. Song, C. Fan, L. Jia, S. Qiu, Y. Sun, H. Song, R. Hao, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, 9, 15328.
- [45] J. Tang, Q. Chen, L. Xu, S. Zhang, L. Feng, L. Cheng, H. Xu, Z. Liu, R. Peng, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 3867.
- [46] B. Song, C. Zhang, G. Zeng, J. Gong, Y. Chang, Y. Jiang, *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, 604, 167.
- [47] D. A. Mosselhy, W. He, D. Li, Y. Meng, Q. Feng, *J. Nanopart. Res.* **2016**, 18, 222.
- [48] U. Klueh, V. Wagner, S. Kelly, A. Johnson, J. D. Bryers, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, 53, 621.
- [49] K. H. L. Kwan, K. W. K. Yeung, X. Liu, K. K. Y. Wong, H. o C. Shum, Y. W. Lam, S. H. Cheng, K. M. C. Cheung, M. K. T. To, *Nanomedicine* **2014**, 11, 1594.
- [50] I. Sondi, B. Salopek-Sondi, *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, 5, 245.
- [51] H. Li, J. Huang, Y. Song, M. Zhang, H. Wang, F. Lu, H. Huang, Y. Liu, X. Dai, Z. Gu, Z. Yang, R. Zhou, Z. Kang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, 10, 26936.
- [52] M. Hartmann, M. Berditsch, J. Hawecker, M. F. Ardakani, D. Gerthsen, A. S. Ulrich, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54, 3132.
- [53] P. Boonsai, P. Phuwapraisirisan, C. Chanchao, *Int. J. Med. Sci.* **2014**, 11, 327.
- [54] N. Yossa, J. Patel, D. Macarasin, P. Millner, C. Murphy, G. Bauchan, Y. M. Lo, *J. Food Process. Preserv.* **2014**, 38, 749.
- [55] K. Ito, T. Sato, T. Yura, *Cell* **1977**, 11, 551.
- [56] R. Dawaliby, C. Trubbia, C. Delporte, C. Noyon, J.-M. Ruysschaert, P. Van Antwerpen, C. Govaerts, *J. Biol. Chem.* **2016**, 291, 3658.
- [57] P. Noutsis, E. Gratton, S. Chaieb, *PLoS One* **2016**, 6, 313.



Crucial cytotoxic and antimicrobial activity changes driven by amount of doped silver in biocompatible carbon nitride nanosheets

Ladislav Svoboda^{a,b,*}, Jiří Bednář^{a,b}, Richard Dvorský^{a,b}, Aleš Panáček^c, Lucie Hochvaldová^c, Libor Kvítek^c, Tomáš Malina^{c,d}, Zuzana Konvičková^{a,e}, Jiří Henych^f, Zuzana Němečková^f, Renata Večeřová^g, Milan Kolář^g, Dalibor Matýšek^h, Zuzana Vilamová^a

^a Nanotechnology Centre, CEET, VŠB – Technical University of Ostrava, 17. listopadu 15/2172, Ostrava, 708 00, Czech Republic

^b IT4Innovations, VŠB – Technical University of Ostrava, 17. listopadu 15/2172, Ostrava, 708 00, Czech Republic

^c Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, Olomouc, 77146, Czech Republic

^d Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Palacký University, Šlechtitělská 27, Olomouc, 78 371, Czech Republic

^e ENET Centre, CEET, VŠB – Technical University of Ostrava, 17. listopadu 15/2172, Ostrava, 708 00, Czech Republic

^f Institute of Inorganic Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Husinec-Řež, 1001, 250 68, Řež, Czech Republic

^g Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Hněvotínská 3, 775 15, Olomouc, Czech Republic

^h Institute of Geological Engineering, VŠB – Technical University of Ostrava, 17. listopadu 15/2172, Ostrava, 708 00, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Carbon nitride nanosheets
Ag/g-C₃N₄
Silver nanoparticles
Antimicrobial activity
Cytotoxicity
Flow cytometry

ABSTRACT

The use of Ag-modified nanomaterials continues to attract attention in biological contamination control, their potential cytotoxicity is often overlooked. Herein, biocompatible carbon nitride is modified with 1 and 5 wt.% Ag and effects of different nanomaterial dose and Ag content on antimicrobial activity and cytotoxicity is studied. Pure Ag nanoparticles and AgNO₃ is tested for comparison, together with ten bacterial strains including pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Cytotoxicity is then investigated in three adherent and two suspension human cell lines, and results confirm that cancer adherent cell lines are the most immune lines and human cervical adenocarcinoma cells (HeLa) are more resilient than human lung adenocarcinoma cells (A549). The HeLa remains over 90 % viable even after 24 -h treatment with the highest concentration of 5%Ag/g-C₃N₄ (300 mg L⁻¹) while A549 sustained viability only up to 100 mg L⁻¹. Higher concentrations then induce cytotoxicity and A549 cell viability decreases. Our results show the importance of complementary testing of cytotoxicity by LIVE/DEAD assay using flow cytometry with more different human cell lines, which might be less immune to tested nanomaterials than HeLa and A549. Combined controls of new antibacterial agent activity tests then provide increased knowledge of their biocompatibility.

1. Introduction

Graphitic carbon nitride (g-C₃N₄) has attracted intensive attention from many scientists because of its promising practical applications such as hydrogen evolution [1–3], decomposition of harmful pollutants [4–7], photocatalytic disinfection [8–12] and biosensing applications [13–15]. Many studies already showed that g-C₃N₄ seems to be also an excellent candidate for biocompatible coatings as a wear resistant layer *in vitro* and *in vivo* for joint replacement applications due to its great wear resistant, thermal and chemical stability [16]. This material can be further exfoliated to obtain two-dimensional g-C₃N₄ nanosheets which can further enhance wear resistance of prepared composites [17,18]. It

is well known that the three-dimensional bulk g-C₃N₄ lacks high specific surface area, has fewer active sites for adsorption and photocatalytic reactions and photogenerated charge carriers have low mobility and shorter lifetime. In contrast, 2D exfoliated nano-sheeted g-C₃N₄ overcomes all these disadvantages [19,20].

The g-C₃N₄ nanosheets can be modified by different semiconductors or noble metals to enhance electron-hole separation, increase photocatalytic activity and secure antimicrobial activity [21]. In the presence of visible light, g-C₃N₄ has been used as a functional material with antimicrobial activity against bacterial strains including *Staphylococcus aureus* [22] and *Streptococcus mutans* [23]. The g-C₃N₄ antibacterial mechanisms are mostly related to generation of reactive oxygen species

* Corresponding author at: Nanotechnology Centre, CEET, VŠB – Technical University of Ostrava, 17. listopadu 15/2172, Ostrava, 708 00, Czech Republic.

E-mail address: ladislav.svoboda@vsb.cz (L. Svoboda).

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111680>

Received 13 December 2020; Received in revised form 8 February 2021; Accepted 5 March 2021

Available online 8 March 2021

0927-7765/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

under visible-light irradiation and release of M^{+} ions from noble metal nanoparticles (NPs) [24].

Although g- C_3N_4 has been used and modified to enhance its physical-chemical properties as an antimicrobial agent, very little is known about its cytotoxicity to different human cells before and after modification by Ag NPs. However, the following research has been conducted;

Zhang et al. studied ultra-thin g- C_3N_4 nanosheets as a photo-responsive nanomaterial for bioimaging. Its biocompatibility was performed on HeLa after incubation with g- C_3N_4 nanosheets for 48 h by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyltetrazolium bromide assay (MMT). Their study revealed that HeLa activity was not weakened and their normal morphology was maintained even at high $600 \mu\text{g ml}^{-1}$ g- C_3N_4 nanosheet concentration [25]. Chung et al. tested pure g- C_3N_4 nanosheets for light-induced suppression of Alzheimer's β -Amyloid ($A\beta$) aggregation. They then investigated the cytotoxicity of pure g- C_3N_4 nanosheets and Fe-, Cu- and Zn-doped g- C_3N_4 nanosheets on PC12 cells by MTT assay. This cell line was derived from a rat adrenal medulla pheochromocytoma [26]. Pure and modified g- C_3N_4 nanosheets in $0\text{--}100 \mu\text{g ml}^{-1}$ concentration induced no noticeable cell death under either light or dark conditions. Unfortunately, there remains a lack of studies focused on g- C_3N_4 cytotoxicity to different human cells before and after modification by Ag NPs. Most papers are focused only on the modification approach to enhance antimicrobial and photocatalytic properties of prepared composites but the negative consequences such as increased cytotoxicity are completely overlooked. [27–29].

This inspired us to fill the research gap on biocompatible g- C_3N_4 nanosheet and silver-modified g- C_3N_4 nanosheet cytotoxicity on three adherent and two suspension human cell lines: human cervical adenocarcinoma cells (HeLa), human lung adenocarcinoma cells (A549), human embryonic lung fibroblasts (HEL), human lymphoblastic leukemia cells (CCRF-CEM) and human monocyte leukemia cells (THP-1). Concurrently, we tested the antimicrobial activity of g- C_3N_4 and Ag/g- C_3N_4 in the dark against a wide range of bacterial strains which also included the antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. The antimicrobial activity of prepared composites was then compared also with AgNO_3 and 28 nm Ag NPs.

2. Experimental section

2.1. Reagents and materials

Melamine ($\geq 99\%$) was purchased from Sigma-Aldrich and silver nitrate (AgNO_3 , 99.8 %) was purchased from PENTA s.r.o., Czech Republic, D(+)-maltose monohydrate (p.a. purity, Riedel-de Haën, Germany), ammonia (25 % w/w aqueous solution) and sodium hydroxide (both of p.a. purity, Lachema, Czech Republic). All chemicals in this study were used as received without further purification. Deionized water was used for all prepared solutions. All cell lines were purchased from ATCC (USA) except HEL which was purchased from ECACC (Australia) and culture media for cells and their supplements was obtained from Sigma-Aldrich (USA). Calcein-AM was part of the LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity assay Kit (ThermoFisher Scientific, USA) and propidium iodide was purchased from Sigma-Aldrich (USA). Finally, Mueller-Hinton broth (Difco, Becton Dickinson) was the cultivation medium for antibacterial assays of the prepared nanocomposites.

The following standard reference strains labeled according to Czech Collection of Microorganisms (CCM, Masaryk University, Brno, Czech Republic) were used: *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Staphylococcus aureus* CCM 4223, *Escherichia coli* CCM 3954 and *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. The following antibiotic resistant bacterial strains isolated from human clinical material at the University Hospital, Olomouc in The Czech Republic were used: methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE), methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin resistant *Enterococcus faecium* (VRE), Extended Spectrum Beta-Lactamase-producing bacteria (ESBL-positive) *Escherichia coli*, colistin resistant *Enterobacter kobei* (CRE) and pan-resistant *Pseudomonas*

aeruginosa.

2.2. Preparation of g- C_3N_4

Bulk g- C_3N_4 was synthesized by thermal poly-condensation of melamine described in our previous research [30]. Briefly, 5 g of melamine was placed in a ceramic crucible with a ceramic cup and heated for 4 h in air at 550°C and 3°C min^{-1} heating rate. The sample was then naturally cooled to room temperature. The exfoliated g- C_3N_4 was prepared by further thermal exfoliation in air for 2 h at 500°C .

2.3. Modification of g- C_3N_4 nanosheets

The Ag/g- C_3N_4 nanocomposites with 1 and 5 wt.% Ag contents were prepared by photo-assisted deposition of Ag NPs on the g- C_3N_4 surface [31]. The synthesis of 1%Ag/g- C_3N_4 was conducted as follows: 99 mg of exfoliated g- C_3N_4 was placed in 25 mL deionized water and sonicated for 5 min in the dark. The appropriate amount of AgNO_3 was added to the colloid dispersion of exfoliated g- C_3N_4 and vigorously stirred by electromagnetic stirrer for the next hour in the dark. The pH of solution was 6.8. The mixture was then irradiated for 10 min by 416 nm 10 W LED. A slightly grey-colour replaced the initial light yellow in the dispersion after irradiation. This indicated Ag NP creation. The final nanocomposites were washed four times in deionized water and collected by centrifugation. The final Ag/g- C_3N_4 nanocomposite was obtained by freeze-drying and it is denoted XAg/g- C_3N_4 , where X = 1 wt.%, and 5 wt.% gives Ag amount.

2.4. Synthesis of colloidal silver NPs

Ag NPs were prepared by the well-established modified Tollens process based on the reduction of $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ complex cation by D-maltose in pH 11.5 alkaline media [32,33]. The initial reagent concentrations in the reaction system were as follows: $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ AgNO_3 , $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ammonia, $9.6 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH, and $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ D-maltose provided the reducing agent. The prepared colloidal silver NPs dispersions were used without further modification or stabilization.

2.5. Materials characterization

X-ray powder diffraction patterns were collected by Bruker D8 Advance diffractometer (Bruker AXS). $\text{CuK}\alpha$ 1.54060 Å λ radiation was used and detection was performed by the LynxEye fast position sensitive detector.

Powder sample morphology was studied by Nova NanoSEM 450 scanning electron microscope (SEM-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 5 kV accelerating voltage in high-vacuum mode equipped with CBS detector to enhance material contrast in the samples.

Scanning/transmission electron microscope (S/TEM) Talos F200X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was combined with HRTEM and TEM imaging with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) to study Ag NP distribution and particle size in the Ag/g- C_3N_4 composites. Samples were measured on a silicon oxide copper grid.

The optical absorption of powder samples was obtained by measuring UV–vis diffuse reflectance spectra (DRS) by UV-2600 spectrophotometer (IRS-2600Plus - Shimadzu, Japan). Spectra were recorded in diffuse reflectance mode and transformed to equivalent Kubelka-Munk units.

The FLS920 Spectrometer (Edinburgh Instrument Ltd, UK) obtained the photoluminescence spectra of the powdered g- C_3N_4 sample and both Ag/g- C_3N_4 composites. The spectrometer was equipped with a 450 W Xenon lamp (Xe900). The excitation wavelength was set at 325 nm.

The amount of silver immobilized on g- C_3N_4 sheets was measured using atomic absorption spectroscopy (AAS), on a ContrAA 300 (Analytik Jena AG, Germany) atomic absorption spectrophotometer with

flame atomizer. For AAS measurements, Ag/g-C₃N₄ composites was added into a solution of nitric acid (2 % w/w) and sonicated for 10 min in order to quantitatively dissolve silver. After that silver content was analyzed after g-C₃N₄ separation using syringe filter. The determined silver concentrations in Ag/g-C₃N₄ nanocomposites were applied to calculate Ag-related minimum inhibitory concentrations.

2.6. Test of antimicrobial activity

The prepared nanocomposites' antimicrobial activity was tested by standard dilution method. This enables determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) which inhibits growth of the tested bacterial strain in the dark. Nanocomposite 1 g L⁻¹ water suspensions were used for antimicrobial testing. This was performed in microtiter plates where tested samples were diluted by culture medium in 2–128 geometric progression (Mueller Hinton Broth, Difco, France). The medium was inoculated with the tested bacteria at 10⁵ to 10⁶ CFU mL⁻¹ concentration and incubated for 24 h at 37 °C. Assessing of antimicrobial activity was performed according to standard testing protocols (CLSI, EUCAST) and the MIC of both nanocomposites and Ag-related (with respect to the concentration of silver only) values were determined as the lowest concentrations of the tested substance that visibly inhibits the growth of microorganisms. The same assay was used to test the antibacterial activity of the AgNO₃ solution and colloidal Ag NPs. These were 108 mg L⁻¹ Ag in both the stock solution and dispersion. The MIC determination is a qualitative assay and the estimated error was of the order of magnitude of the values. All the experiments were performed in triplicate.

2.7. Cytotoxicity assessments

The following cell lines were employed for cytotoxicity assessment. Three adherent cell lines; human cervical adenocarcinoma cells (HeLa), human lung adenocarcinoma cells (A549) and human embryonic lung fibroblasts (HEL) and two suspension cell lines; human lymphoblastic leukemia cells (CCRF-CEM) and human monocyte leukemia cells (THP-1).

The cells were cultivated at 37 °C under 5 % CO₂ atmosphere. The cell culture media were: HeLa cells, DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose, supplemented with L-Glutamine (2 mmol dm⁻³), 10 % FBS and PenStrep (5000 U penicillin, 5 mg streptomycin/mL); A549 cells, MEM (1X) - Minimum Essential Medium + Gluta-MAXTM enriched by Earle's salts, FBS (10 %) and PenStrep (5000 U penicillin, streptomycin 5 mg mL⁻¹); CCRF-CEM and THP-1 cells, RPMI-1640 supplemented with L-Glutamine (2 mmol dm⁻³), FBS (10 %) and PenStrep (5000 U penicillin, streptomycin 5 mg mL⁻¹) and finally for HEL cells Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) supplemented with FBS (10 %), L-glutamine (2 mmol dm⁻³), non-essential amino acids (1%) and sodium bicarbonate (0.2 %).

The LIVE/DEAD assay was performed by BD FACSVerse flow cytometer (BD Biosciences, USA). The cells were initially seeded in a 96-well plate at 10,000 cells/well density. They were then treated with 10, 25, 50, 75, 100, 200 and 300 mg L⁻¹ g-C₃N₄ composites (g-C₃N₄, 1% Ag/g-C₃N₄ and 5%Ag/g-C₃N₄) and incubated for 24 h. We collected the supernatant, washed the cells with phosphate buffer solution (PBS; 0.1 mol dm⁻³), detached the cells with 0.25 % EDTA and resuspended cells after 5 min in 150 µL culture medium to a final volume of 300 µL.

There is adequate information on all cells in our samples, because no volume was discarded during preparation. The cells were then incubated with propidium iodide (PI, 10 mg L⁻¹) and calcein-AM (50 µmol dm⁻³ diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO)) for 30 min in the dark. Finally, the fluorescence signal was measured on 2 channels of the flow cytometer (red: ex. 488/em. 700 nm and green: ex. 488/em. 527 nm). PI intercalated the DNA of dead cells with ruptured membranes, and active esterases in live cells catalyzed non-fluorescent calcein-AM to highly fluorescent calcein. This enabled distinction of live and dead cell

populations. Finally, untreated cells were used as negative control (NC) and heat-killed cells incubated in 60 °C for 30 min before measurement formed the positive control (PC). The concentration of stock solutions was only 1 mg mL⁻¹, and therefore we used an additional amount to reach the final concentration of 300 mg L⁻¹. There was only 70 % of the culture media in samples treated with 300 mg L⁻¹ compared to the negative control, so volume controls (VC) were added to determine if this inconsistency affected cell viability. Here, we added the same volume of solvent from ultra-pure water stock solution to the culture media that we used to achieve 300 mg L⁻¹ concentration, and additional controls were then employed to avoid nanomaterial interference with measurements.

3. Results and discussion

3.1. Photo-assisted synthesis of Ag/g-C₃N₄

The g-C₃N₄ nanosheets were dispersed in aqueous solution and sonicated in the dark for 5 min to deagglomerate nanosheets. An appropriate amount of AgNO₃ was then dissolved and stirred for 1 h. During the first phase of synthesis the dark condition was necessary to prevent photo-reduction of Ag⁺ to Ag⁰ NPs by UV light [34,35]. In the dark conditions, positively charged Ag⁺ ions are attracted to the negatively charged surface of g-C₃N₄ [36]. Composite formed by utilizing this first step (electrostatic attraction forces) occurs to be more stable and particle sizes of thus created Ag NPs are even smaller without undesirable formation of large Ag aggregates according to our previous research [31]. The second phase involved irradiation of g-C₃N₄ colloid dispersion with already adsorbed Ag⁺ ions on its surface. Here, 10-minute irradiation reduced Ag⁺ to metallic Ag⁰ NPs and the final Ag/g-C₃N₄ nanocomposites were created. The reduction process was achieved by the following Eq. 1 and Eq. 2:



3.2. Materials characterization

3.2.1. X-ray diffraction

Both pure and Ag-doped g-C₃N₄ materials were successfully prepared. Fig. 1 depicts all XRD patterns, and these show the two main g-C₃N₄ peaks located at 2θ at approximately 10.9° and 27.8°. These correspond to the g-C₃N₄ crystal planes: lattice planes parallel to c-axis (100) and stacking conjugated aromatic systems in a layered structure (002) [37]. The sharp peak located at 2θ 10.9° corresponds to a distance

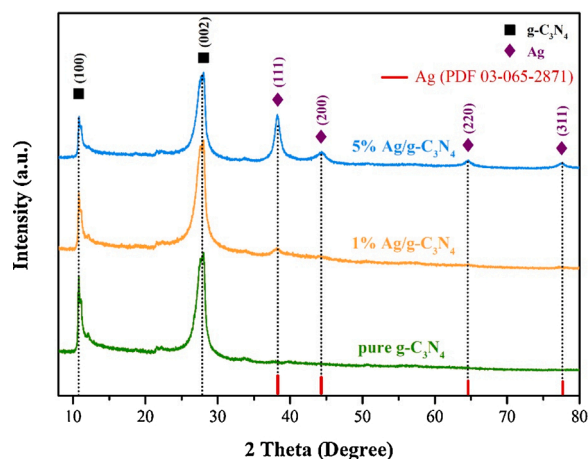


Fig. 1. XRD patterns of pure g-C₃N₄ nanosheets and Ag/g-C₃N₄ nanocomposites with different Ag content.

($d_{100} = 0.81$ nm) of tri-s-triazine units.

The distance (d_{100}) is slightly above the size of tris-s-triazine unit (ca. 0.73 nm), indicative that the intra-planar separation of tris-s-triazine packing, such as hole-to-hole distance of nitride pores is slightly enlarged. Further, interlayer distance ($d_{002} = 0.32$ nm) is lower than in the case of bulk g-C₃N₄ ($d = 0.33$ nm) [38]. This strongly indicates that the formed carbon nitride structure is exfoliated into carbon nitride nanosheets containing denser structure, which could not be further exfoliated during the last thermal treatment [19].

The peaks located at approximately 2 θ 38.1°, 44.3°, 64.4° and 77.4° correspond to the crystal planes of face-centred cubic Fm3m metallic silver structure indexed as (111), (200), (220) and (311), respectively (PDF 03–065-2871). The XRD patterns confirm unchanged g-C₃N₄ crystal structure, and also that different Ag NP amounts are successfully deposited on the g-C₃N₄ surface.

3.2.2. Electron microscopy analysis

The SEM and TEM provided extensive information on pure g-C₃N₄ nanosheet morphology before and after modification with Ag NPs. The analytic images show that the g-C₃N₄ structural appearance resembles the crinkles on the *Tremella* sponge (Fig. 2 a,b).

The SEM images depict that the mesopores created during exfoliation were preserved even after Ag NP modification, and Fig. 2c and d highlight the 1% and 5%Ag/g-C₃N₄ nanocomposites. These have clearly different Ag NP amounts. The 5%Ag/g-C₃N₄ sample has more and larger Ag NP aggregates on the g-C₃N₄ surface than the 1% sample. However, there is also a large number of very small Ag NPs in both samples, and their particle size distribution was therefore estimated from TEM images (Fig. S1).

The average particle size of the Ag NPs in 1%Ag/g-C₃N₄ ranged from 2–6 nm and the 5% moiety ranged from 3–21 nm. Fig. 3a-c shows TEM images of the 5%Ag/g-C₃N₄ with detailed structure and Ag NPs distribution on the g-C₃N₄ surface. Fig. 3d-e depict Ag and g-C₃N₄ HRTEM images with 0.234 nm lattice spacing (111), 0.204 nm (002) for Ag NPs and 0.304 nm for the g-C₃N₄ plane (002) [37].

Finally, Fig. 3 f-i highlight 5%Ag/g-C₃N₄ elemental mapping. These results show that it is relatively difficult to distribute Ag NPs

homogeneously on the g-C₃N₄ surface and prevent large Ag agglomerates. Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) then revealed Ag composition distribution in both samples.

This confirmed that the 1% and 5%Ag/g-C₃N₄ spectra correspond to carbon and nitrogen rich compounds with different amounts of silver (Fig. S2). It also confirms the presence of Ag, C and N elements in all samples without any additional impurities. A small amount of O, Si and Cu elements was detected from measurements on a silicon oxide copper grid. The Ag weight percentage in both composites was calculated theoretically at 1 and 5 wt% and quantitatively analyzed at 1.04 and 4.98 wt%, respectively.

3.2.3. Optical properties

Fig. 4 (a) shows prepared samples' UV-vis absorption spectra. The g-C₃N₄ nanosheet and Ag/g-C₃N₄ nanocomposite band gap energy was estimated from the Tauc plot [39]. This energy remained unchanged after modification by 1 wt.% Ag NPs, and a slight shift was observed with higher amounts of Ag. The conduction and valence bands positions were calculated by Eqs. 3 and Eq. 4:

$$E_{VB} = \chi - E_0 + 0.5E_{bg} \quad (3)$$

$$E_{CB} = E_{VB} - E_{bg} \quad (4)$$

where χ is the electro-negativity of g-C₃N₄ (4.72 eV), E_{VB} is the valence band potential, E_{CB} is the conduction band potential, E_{bg} is the band gap energy estimated from the Tauc plot, and E_0 is the energy of free electrons (4.5 V vs NHE) [40]. Here, the g-C₃N₄ nanosheet and 1%Ag/g-C₃N₄ band positions were determined at -1.23 eV (E_{VB}) and +1.67 eV (E_{CB}) and the 5% at -1.22 eV (E_{VB}) and +1.66 eV (E_{CB}). The 5%Ag/g-C₃N₄ absorption in the visible light region was slightly enhanced after placing Ag NPs on the g-C₃N₄ surface. This was due to the effect of the localized Ag NPs surface plasmon resonance (LSPR) [41].

Schematic diagram of Tauc plot shows that the influence of presented Ag NPs is also evident as a broad band starting from 1.5 up to 2.9 eV reaching its absorbance maximum in the region between 2.5–2.76. This corresponds to localized surface plasmon resonance (LSPR) of Ag NPs with particle sizes below 23 nm [42] and accords with TEM size

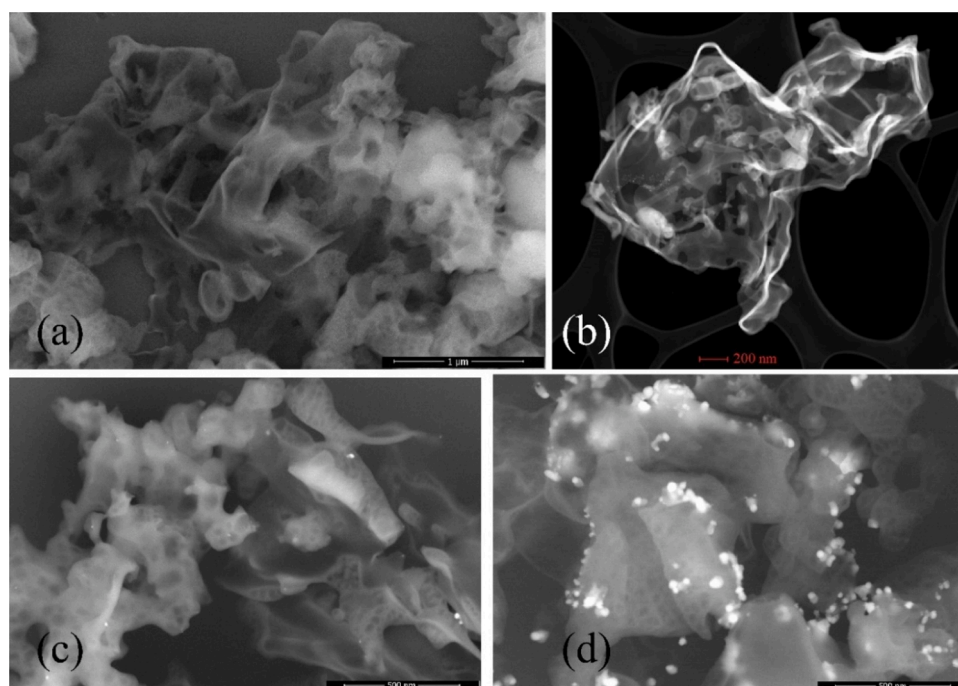


Fig. 2. (a) SEM and (b) STEM g-C₃N₄ nanosheet images. (c) SEM images of 1%Ag/g-C₃N₄ and (d) 5%Ag/g-C₃N₄ nanocomposites. Scale bar on Fig. 2. (a) 1 μ m, (b) 200 nm, (c) 500 nm and (d) 500 nm.

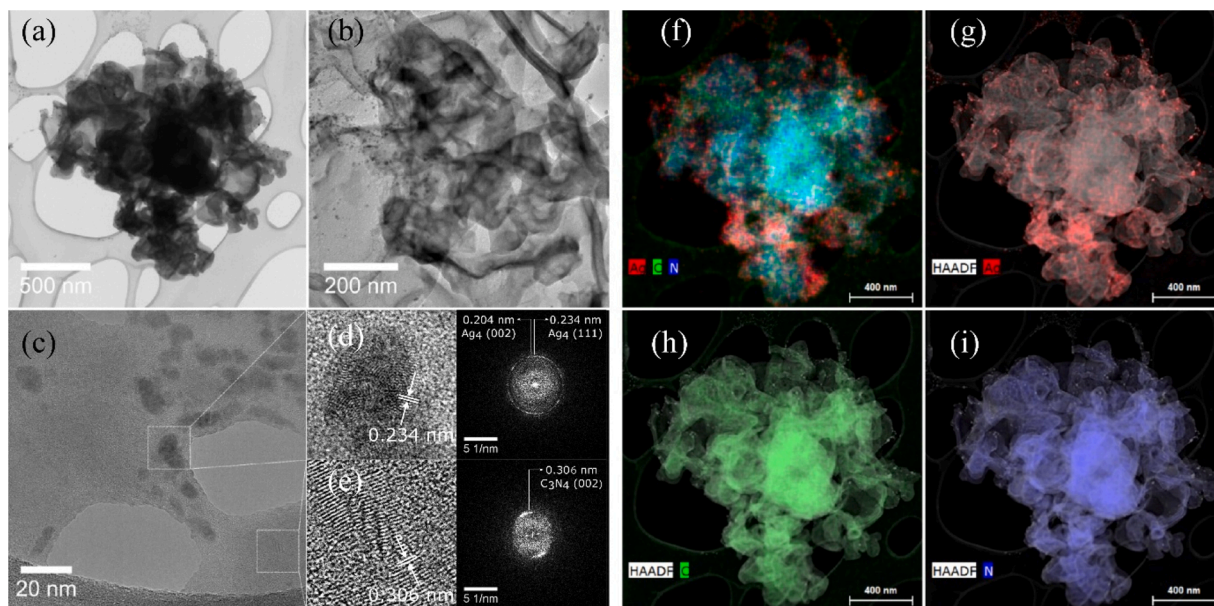


Fig. 3. TEM images of 5%Ag/g-C₃N₄: (a) low and (b) high-magnification TEM images (c); HRTEM images of Ag and g-C₃N₄ with electron diffraction patterns and lattice fringes (d),(e). EDS elements with overlapping Ag, C and N images (f); Ag (g), C (h) and N (i) element mapping.

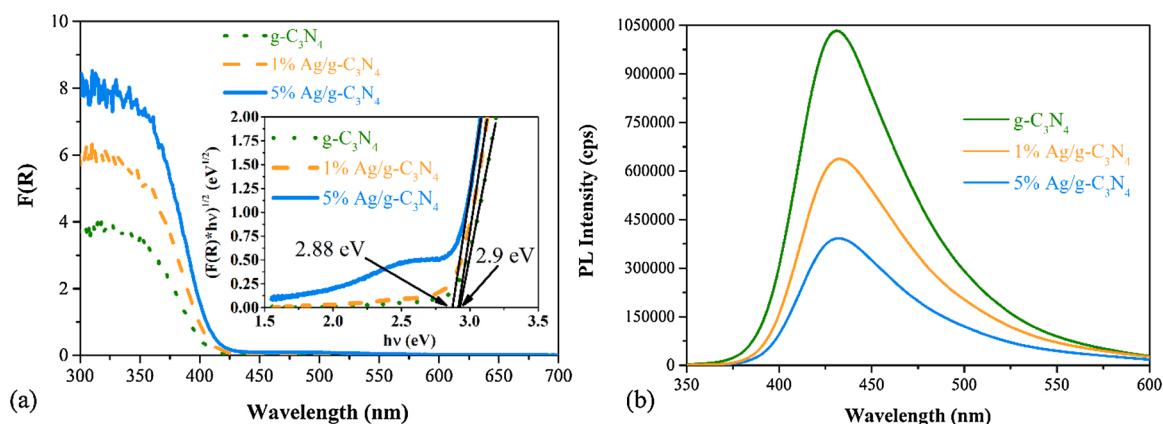


Fig. 4. (a) UV-vis absorption spectra and Tauc plot inset with the estimated band gap energy and (b) PL spectra of the g-C₃N₄ nanosheets and Ag/g-C₃N₄ composites.

results (Fig. S1).

The photo-luminescence (PL) spectra provides insight into the g-C₃N₄ and Ag NP inter-connection. Fig. 4(b) identifies the PL spectra of g-C₃N₄ nanosheets and the 1% and 5%Ag/g-C₃N₄ composites, where all samples have a main emission broad band with a maximum at approximately 432 nm. This corresponds to recombination of the photo-generated electrons and holes in the g-C₃N₄ nanosheets [43]. Both Ag/g-C₃N₄ composites have weaker emission intensity than the pure g-C₃N₄ nanosheets. The decrease in PL spectra intensity following modification with Ag NPs was caused by a decrease in radiative recombination probability of photo-generated electrons and g-C₃N₄ holes. This was due to silver's ability to act as a sink for electrons through the created Ag/g-C₃N₄ hetero-junction [44]. The weaker PL intensity in the 5%Ag/g-C₃N₄ composite indicates the higher Ag NP number and greater electron-hole separation processes [45].

3.2.4. Antibacterial activity

The antimicrobial effects against antibiotic sensitive and resistant bacteria were evaluated in the dark. These effects were assessed for pure g-C₃N₄, Ag/g-C₃N₄ nanocomposites, AgNO₃ solution and colloidal Ag NPs. This prevented g-C₃N₄ photo-activation and the creation of reactive oxygen species. The antibacterial efficiency of the synthesized

nanocomposites was evaluated by the standard dilution micro-method. This determined MIC values which visibly inhibited bacterial growth. Gram-positive and Gram-negative bacterial strains comprising standard reference strains susceptible to conventional antibiotics and those with high antibiotic resistance were selected for the test. The resultant MIC values confirmed that the tested Ag/g-C₃N₄ nanocomposites had high antibacterial effect against both susceptible and antibiotic-resistant bacteria. These included the multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. The high antimicrobial activity was proven for all tested nanocomposites, and the 1% and 5%Ag/g-C₃N₄ MIC values ranged from 15.6–500 mg L⁻¹ depending on sample testing with silver or microorganisms (Table 1). Pure g-C₃N₄ nanosheets exhibited no antibacterial activity for any tested microorganism at the highest tested concentration in the dark. Finally, the antibacterial results herein could help increase their use in both medicine and the environment.

The results also highlight the differences between the MIC values relative to sensitive and resistant bacteria. The most effective growth inhibition concentration of 1%Ag/g-C₃N₄ against sensitive strains *E. faecalis* and *S. aureus* was 250 mg L⁻¹, while the lower value of 125 mg L⁻¹ was recorded against *E. coli* and *P. aeruginosa*. The 5%Ag/g-C₃N₄ nanocomposite had higher efficiency than the 1%Ag/g-C₃N₄ sample.

Table 1

Minimum inhibitory concentrations^a of g-C₃N₄ nanosheets, Ag/g-C₃N₄ nanocomposites, AgNO₃ solution, colloidal Ag NPs and Ag-related (values with respect to the mass of the Ag only) MIC values of Ag/g-C₃N₄ nanocomposites.

Bacterial strain	Minimum inhibitory concentrations (mg L ⁻¹)				
	g-C ₃ N ₄	1%Ag/g-C ₃ N ₄ /Ag related ^b	5%Ag/g-C ₃ N ₄ /Ag related ^b	AgNO ₃	Ag NPs
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	–	250/(1.9)	62.5/(3.2)	6.75	13.5
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM4223	–	250/(1.9)	62.5/(3.2)	3.38	13.5
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	–	125/(0.95)	62.5/(3.2)	3.38	1.69
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	–	125/(0.95)	15.6/(0.81)	1.69	3.38
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	–	250/(1.9)	31.2/(1.62)	3.38	6.75
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	–	250/(1.9)	31.2/(1.62)	6.75	13.5
<i>Enterococcus faecium</i> (VRE)	–	250/(1.9)	31.2/(1.62)	6.75	13.5
ESBL-positive <i>Escherichia coli</i>	–	500/(3.8)	62.5/(3.2)	6.75	6.75
<i>Enterobacter kobei</i> (CRE)	–	500/(3.8)	62.5/(3.2)	3.38	13.5
panresistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	250/(1.9)	31.2/(1.62)	1.69	3.38

^a The MIC determination is a qualitative assay and the estimated error was of the order of magnitude of the values; (n = 3).

^b Values refer to the mass of Ag/g-C₃N₄ nanocomposites and values in parentheses refer to the MIC values with respect to the mass of the Ag only, according to its content in the nanocomposite.

MIC values of 5%Ag/g-C₃N₄ nanocomposite against *E. faecalis*, *S. aureus* and *E. coli* strains were identical 62.5 mg L⁻¹ and against *P. aeruginosa* were recorded at the value of 15.6 mg L⁻¹.

In contrast, MIC values of the synthesized nanocomposites were different against resistant bacterial strains. MIC value equal to 250 mg L⁻¹ of 1%Ag/g-C₃N₄ was determined against *S. epidermidis*, MRSA, *Enterococcus faecium* (VRE) and pan-resistant *P. aeruginosa* strains, while ESBL-positive *E. coli* and *Enterobacter kobei* CRE were inhibited at the concentration of 500 mg L⁻¹. Also 5%Ag/g-C₃N₄ nanocomposite showed different MIC values against resistant bacteria in comparison with sensitive strains. MRSA, *Enterococcus faecium* (VRE) and pan-resistant *P. aeruginosa* were inhibited at the concentration of 31.2 mg L⁻¹ and ESBL-positive *Escherichia coli* and *Enterobacter kobei* CRE at 62.5

mg L⁻¹, respectively. The MIC values varied for different bacterial strains, including both antibiotic sensitive and resistant, because of their different susceptibility to Ag NPs, as it this was solely observed also for colloidal Ag NPs.

While better antimicrobial activity from lower MIC value is apparent in nanocomposites with higher Ag content, the Ag-related values (determined from the amount of silver contained in the nanocomposite), i.e. the MIC values related to Ag are comparable for both nanocomposites. The nanocomposites' antimicrobial activity is therefore determined solely by silver nanoparticle content in respective nanocomposite. The Ag-related MIC values were slightly better in comparison with MIC values of AgNO₃ solution and the 28 nm colloidal silver NPs synthesized by the modified Tollens process but not coated to the nanocomposite. The Ag-related MIC values determined herein ranged from 0.81 to 3.8 mg L⁻¹ of silver depending on the tested bacterial strain (Table 1). The MIC values were higher for AgNO₃ and Ag NPs in water dispersion, and these ranged from 1.69 to 13.5 mg L⁻¹. Fig. 5a clearly highlights that the prepared Ag/g-C₃N₄ nanocomposites had higher MIC values than pure Ag NPs. Nevertheless, comparison of Ag-related MIC values reveals that the prepared nanocomposite with 5 wt.% Ag was more effective than pure colloidal Ag NPs for all bacterial strains except *E. coli* CCM 3954 (Fig. 5b).

The higher effect of Ag NPs deposited on the g-C₃N₄ surface compared to pure Ag NPs may be related to particle size because this significantly influences antimicrobial activity. 'The smaller the Ag NPs the higher the antimicrobial activity' is due to higher surface area of smaller silver NPs resulting in stronger chemical and biological interactions with biomolecules on one side and to higher release of toxic Ag⁺ cation on other side as it was reported in many scientific works [46–48]. At the same time, the nanocomposites have high antibacterial efficiency due to the strongly coated Ag NPs on the g-C₃N₄ nanosheet surface that results in high aggregation stability of silver NPs. Deposition and strong bounding of silver NPs to g-C₃N₄ surface prevents aggregation of silver NPs which increase antibacterial activity. In contrast, the free Ag nanoparticles in water dispersion may aggregate, and thus lose antibacterial activity during cultivation of the bacterial suspension [49].

3.2.5. Cytotoxicity of g-C₃N₄ nanosheets and Ag/g-C₃N₄ nanocomposites

For cytotoxicity assessment of g-C₃N₄ nanosheets and Ag/g-C₃N₄ nanocomposites, the viability of CCRF-CEM, THP-1, HEL, HeLa and A549 cells after 24 h of incubation with materials was evaluated using flow cytometry with LIVE/DEAD assay.

The nanosheets exhibited no cytotoxicity because all cell lines at all tested concentrations retained 90 % viability (Fig. 6 a). However, while CCRF-CEM cell viability remained at 90 % for 10 and 25 mg L⁻¹ at 1%

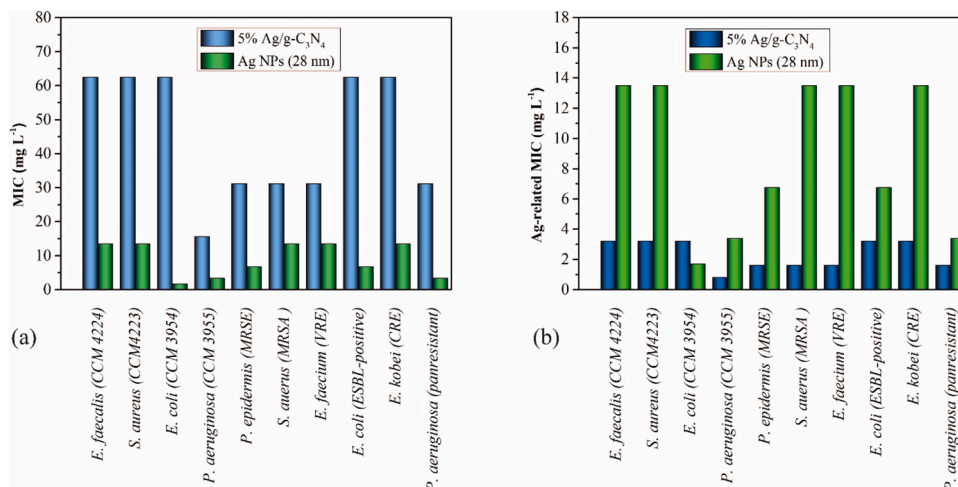


Fig. 5. Comparison of (a) MIC and (b) Ag-related MIC values of 5%Ag/g-C₃N₄ nanocomposite and colloidal Ag NPs.

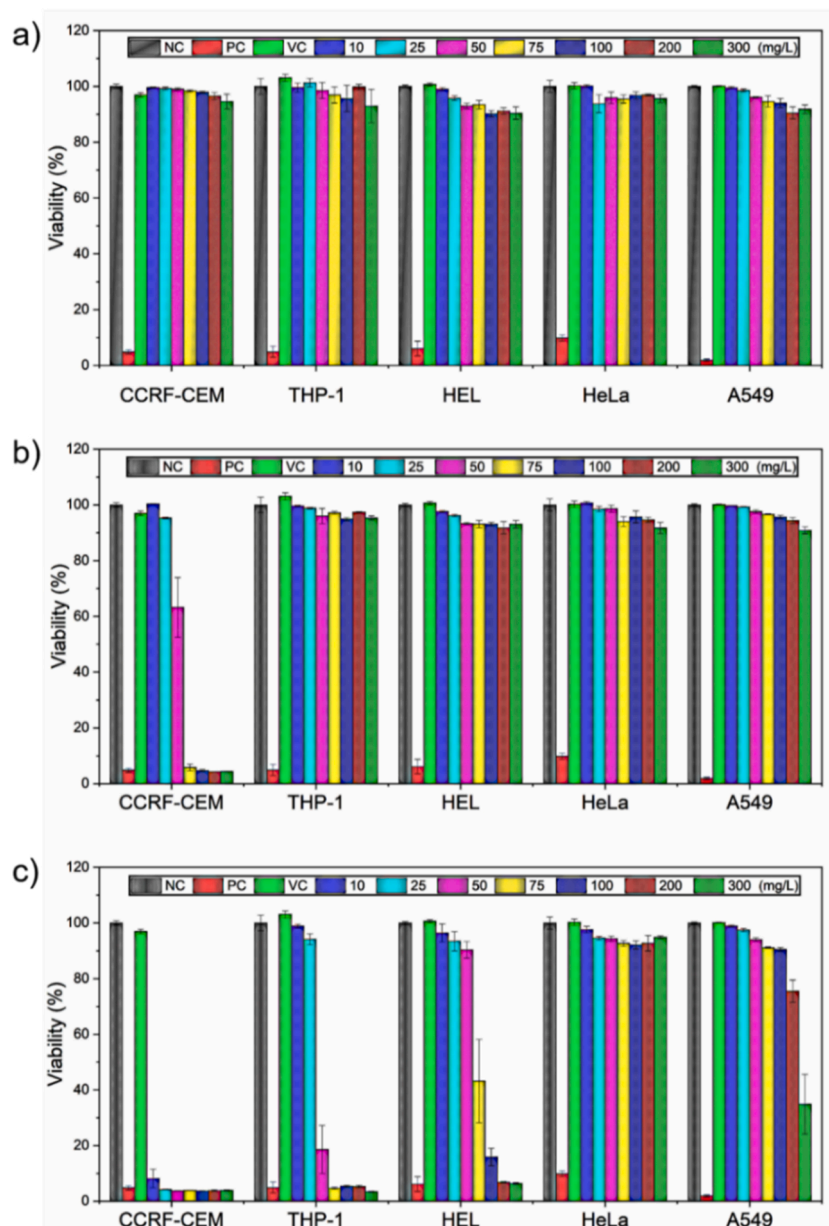


Fig. 6. Viability of CCRF-CEM, THP-1, HEL, HeLa and A549 cells treated with various concentrations of a) g-C₃N₄, b) 1%Ag/g-C₃N₄ and c) 5%Ag/g-C₃N₄ for 24 h. Results were normalized for negative control to have viability of 100 %. NC – negative control; PC – positive control; VC – volume control.

Ag/g-C₃N₄, viability began to decrease and samples treated with 50 mg L⁻¹ of 1%Ag/g-C₃N₄ had only 63 % viability after 24 h (Fig. 6 b).

Here, all CCRF-CEM sample cells had less than 10 % viability and were dead at higher concentrations. The nanocomposite cell-lines viability differed greatly at 5%Ag/g-C₃N₄, (Fig. 6 c). Cells in suspension were clearly more sensitive than adherent cells, but there were also differences between specific cell lines. All CCRF-CEM sample cells died even when treated with minimal 10 mg L⁻¹ concentration, while the THP-1 cells retained over 90 % viability until 25 mg L⁻¹ treatment. Treatment at higher 5%Ag/g-C₃N₄ resulted in the death of all THP-1 sample cells. HEL cells, as representatives of healthy adherent cell lines, were the most susceptible to 5%Ag/g-C₃N₄. Treatment with 75 mg L⁻¹ 5%Ag/g-C₃N₄ caused significant decrease in their viability, and exposure to higher concentrations induced death in all HEL sample cells.

Cancer adherent cell lines were the most immune lines in this study. Here, the HeLa cells were more resilient than A549 cells because their viability remained over 90 % even after 24-h treatment with the highest 5 %–300 mg L⁻¹ Ag/g-C₃N₄ concentration. In contrast, the A549

samples maintained this level only in concentrations up to 10 mg L⁻¹ and the level then decreased with induced cytotoxicity. There was no loss of viability in different culture media volumes. Our results stress the importance of using multiple cellular lines in new antibacterial agent cytotoxicity tests because this reveals their general bio-compatibility. The Zhang et al. and Chung et al. cytotoxicity results previously mentioned must therefore be interpreted with caution because they experimented on only one cancer cell line [25,26]. In addition, they both employed MTT assay for viability assessment. Although there are no reports of g-C₃N₄ potential interference in the literature, carbon nano-materials are well known for their strong interference in assays using spectroscopic detection [50–52]. These papers also mentioned interference controls, and therefore we consider LIVE/DEAD assay using flow cytometry and additional controls as a more suitable option for precise cytotoxicity results.

4. Conclusion

We successfully prepared and characterized pure g-C₃N₄ and Ag-modified g-C₃N₄ nanocomposites using diverse experimental techniques. We then verified 1% Ag content with corresponding Ag particle size from 2 to 6 nm, and 5 wt.% from 3 to 21 nm. We also proved that thus prepared Ag-modified materials gives us smaller Ag NPs, which are more antimicrobial effective (Ag-related MIC) than pure 28 nm Ag NPs. We further demonstrated that it is crucial to involve multiple cellular lines in testing. The suspension and adherent cell-line responses and the sensitivity of healthy and cancer cell lines can differ. For example, cancer lines are usually more resilient. We then identified important viability in the two suspension cell lines and two cancer adherent cell lines treated with Ag/g-C₃N₄ nanocomposites. This confirms that each cell line behaves differently; concentrations non-toxic for THP-1 cells can be lethal to the CCFR-CEM cell-line. In conclusion, our results highlight the advantages of complementary cytotoxicity testing of new antibacterial agents and to count also with drawback such as enhanced cytotoxicity of previously non-toxic and biocompatible material such as g-C₃N₄. This inclusion of multiple human cell lines in cytotoxicity assays is therefore highly recommended because it provides research-inspiring information on both antibacterial agents and cell-line bio-compatibility.

CRediT authorship contribution statement

Ladislav Svoboda: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Funding acquisition. **Jiří Bednář:** Validation, Investigation. **Richard Dvorský:** Formal analysis, Funding acquisition. **Ales Panáček:** Methodology, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Funding acquisition. **Lucie Hochvaldová:** Investigation. **Libor Kvítek:** Methodology, Validation, Supervision. **Tomáš Malina:** Methodology, Investigation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Zuzana Konvičková:** Investigation. **Jiří Henych:** Investigation, Validation. **Zuzana Němečková:** Investigation. **Renata Večeřová:** Methodology, Investigation. **Milan Kolář:** Methodology, Validation. **Dalibor Matýsek:** Investigation, Validation. **Zuzana Vilamová:** Investigation.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the IT4Innovations national supercomputing center - path to exascale project (project No. EF16_013/0001791) Ministry of Education, Youth and Sports, by the student project SP2020/15 of VSB-Technical University of Ostrava, by project Gamma PP1 No. TP01010036 by Technology Agency of the Czech Republic, by project GA CR - 19-22720S of the Czech Science Foundation, by the ERDF project "Development of Pre-Applied Research in Nanotechnology and Biotechnology" (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007323) and by the project in the OP RDE grant number CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000753 and by Doctoral grant competition VŠB TU-Ostrava grant number CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016945 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and the support from the Internal Grant Agency of the Palacký University Olomouc (projects No. IGA_PrF_2021_028 and IGA_LF_2021_022), by the Research Infrastructure NanoEnvicZ, of the Ministry of Education, Youth and Sports of Czech Republic (No. LM2018124) and by the project No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_049/0008441 "Innovative therapeutic methods of musculoskeletal system in accident surgery" within the Operational Programme Research, Development and Education financed by the European Union and from the state budget of the Czech Republic.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111680>.

References

- [1] S. Cao, J. Yu, g-C₃N₄-based Photocatalysts for Hydrogen Generation, *J. Phys. Chem. Lett.* 5 (2014) 2101–2107, <https://doi.org/10.1021/jz500546b>.
- [2] Q. Tay, P. Kanhere, C.F. Ng, S. Chen, S. Chakraborty, A.C.H. Huan, T.C. Sum, R. Ahuja, Z. Chen, Defect engineered g-C₃N₄ for efficient visible light photocatalytic hydrogen production, *Chem. Mater.* 27 (2015) 4930–4933, <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.5b02344>.
- [3] L. Yang, J. Huang, L. Shi, L. Cao, Q. Yu, Y. Jie, J. Fei, H. Ouyang, J. Ye, A surface modification resultant thermally oxidized porous g-C₃N₄ with enhanced photocatalytic hydrogen production, *Appl. Catal. B Environ.* 204 (2017) 335–345, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.11.047>.
- [4] S. Zhang, Y. Liu, P. Gu, R. Ma, T. Wen, G. Zhao, L. Li, Y. Ai, C. Hu, X. Wang, Enhanced photodegradation of toxic organic pollutants using dual-oxygen-doped porous g-C₃N₄: mechanism exploration from both experimental and DFT studies, *Appl. Catal. B Environ.* 248 (2019) 1–10, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2019.02.008>.
- [5] Y. Li, Z. Ruan, Y. He, J. Li, K. Li, Y. Yang, D. Xia, K. Lin, Y. Yuan, Enhanced photocatalytic H₂ evolution and phenol degradation over sulfur doped meso/macroporous g-C₃N₄ spheres with continuous channels, *Int. J. Hydrogen Energy* 44 (2019) 707–719, <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.10.124>.
- [6] J. Singh, P. Kumari, S. Basu, Degradation of toxic industrial dyes using SnO₂/g-C₃N₄ nanocomposites: role of mass ratio on photocatalytic activity, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 371 (2019) 136–143, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.11.014>.
- [7] M. Reli, L. Svoboda, M. Šihor, I. Troppová, J. Pavlovský, P. Praus, K. Kočí, Photocatalytic decomposition of N₂O over g-C₃N₄/WO₃ photocatalysts, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25 (2018) 34839–34850, <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0723-6>.
- [8] J. Deng, J. Liang, M. Li, M. Tong, Enhanced visible-light-driven photocatalytic bacteria disinfection by g-C₃N₄-AgBr, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 152 (2017) 49–57, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.003>.
- [9] P. Yu, X. Zhou, Y. Yan, Z. Li, T. Zheng, Enhanced visible-light-driven photocatalytic disinfection using AgBr-modified g-C₃N₄ composite and its mechanism, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 179 (2019) 170–179, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.074>.
- [10] C. Zhang, Y. Li, D. Shuai, W. Zhang, L. Niu, L. Wang, H. Zhang, Visible-light-driven, water-surface-floating antimicrobials developed from graphitic carbon nitride and expanded perlite for water disinfection, *Chemosphere* 208 (2018) 84–92, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.163>.
- [11] C. Zhang, Y. Li, W. Zhang, P. Wang, C. Wang, Metal-free virucidal effects induced by g-C₃N₄ under visible light irradiation: statistical analysis and parameter optimization, *Chemosphere* 195 (2018) 551–558, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.122>.
- [12] Y. Li, C. Zhang, D. Shuai, S. Naraginti, D. Wang, W. Zhang, Visible-light-driven photocatalytic inactivation of MS2 by metal-free g-C₃N₄: virucidal performance and mechanism, *Water Res.* 106 (2016) 249–258, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.10.009>.
- [13] R. Zou, X. Teng, Y. Lin, C. Lu, Graphitic carbon nitride-based nanocomposites electrochemiluminescence systems and their applications in biosensors, *TrAC Trends Anal. Chem.* 132 (2020) 116054, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116054>.
- [14] B. Çakıroğlu, J. Chauvin, A. Le Goff, K. Gorgy, M. Özcar, M. Holzinger, Photoelectrochemically-assisted biofuel cell constructed by redox complex and g-C₃N₄ coated MWCNT bioanode, *Biosens. Bioelectron.* 169 (2020) 112601, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112601>.
- [15] X. Liu, Q. Wang, J. Chen, X. Chen, W. Yang, Ultrasensitive electrochemiluminescence biosensor for the detection of tumor exosomes based on peptide recognition and luminol-AuNPs@g-C₃N₄ nanoprobe signal amplification, *Talanta* 221 (2021) 121379, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121379>.
- [16] Q. Zhu, B. Qiu, H. Duan, Y. Gong, Z. Qin, B. Shen, M. Xing, J. Zhang, Electron directed migration cooperated with thermodynamic regulation over bimetallic NiFeP/g-C₃N₄ for enhanced photocatalytic hydrogen evolution, *Appl. Catal. B Environ.* 259 (2019) 118078, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2019.118078>.
- [17] L. Zhang, G. Li, Y. Guo, H. Qi, Q. Che, G. Zhang, PEEK reinforced with low-loading 2D graphitic carbon nitride nanosheets: High wear resistance under harsh lubrication conditions, *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 109 (2018) 507–516, <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2018.04.002>.
- [18] S. Li, C. Duan, X. Li, M. Shao, C. Qu, D. Zhang, Q. Wang, T. Wang, X. Zhang, The effect of different layered materials on the tribological properties of PTFE composites, *Friction* 8 (2020) 542–552, <https://doi.org/10.1007/s40544-019-0276-4>.
- [19] L. Svoboda, P. Praus, M.J. Lima, M.J. Sampaio, D. Matýsek, M. Ritz, R. Dvorský, J. L. Faria, C.G. Silva, Graphitic carbon nitride nanosheets as highly efficient photocatalysts for phenol degradation under high-power visible LED irradiation, *Mater. Res. Bull.* 100 (2018) 322–332, <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2017.12.049>.
- [20] L. Ma, H. Fan, J. Wang, Y. Zhao, H. Tian, G. Dong, Water-assisted ions in situ intercalation for porous polymeric graphitic carbon nitride nanosheets with

- superior photocatalytic hydrogen evolution performance, *Appl. Catal. B Environ.* 190 (2016) 93–102, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.03.002>.
- [21] P. Praus, J. Lang, A. Martaus, L. Svoboda, V. Matějka, M. Kormunda, M. Šihor, M. Reli, K. Koci, Composites of BiVO₄ and g-C₃N₄: synthesis, properties and photocatalytic decomposition of azo dye AO7 and nitrous oxide, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 29 (2019) 1219–1234, <https://doi.org/10.1007/s10904-019-01085-4>.
- [22] P. Xia, S. Cao, B. Zhu, M. Liu, M. Shi, J. Yu, Y. Zhang, Designing a 0D/2D S-Scheme heterojunction over polymeric carbon nitride for visible-light photocatalytic inactivation of Bacteria, *Angew. Chemie Int. Ed.* 59 (2020) 5218–5225, <https://doi.org/10.1002/anie.201916012>.
- [23] I.M. Gindri, D.A. Siddiqui, P. Bhardwaj, L.C. Rodriguez, K.L. Palmer, C.P. Frizzo, M. A.P. Martins, D.C. Rodrigues, Dicationic imidazolium-based ionic liquids: a new strategy for non-toxic and antimicrobial materials, *RSC Adv.* 4 (2014) 62594–62602, <https://doi.org/10.1039/C4RA00906K>.
- [24] S. Kang, W. Huang, L. Zhang, M. He, S. Xu, D. Sun, X. Jiang, Moderate bacterial etching allows scalable and clean delamination of g-C₃N₄ with enriched unpaired electrons for highly improved photocatalytic water disinfection, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10 (2018) 13796–13804, <https://doi.org/10.1021/acsami.8b00007>.
- [25] X. Zhang, X. Xie, H. Wang, J. Zhang, B. Pan, Y. Xie, Enhanced Photoresponsive Ultrathin Graphitic-Phase C₃N₄ Nanosheets for Bioimaging, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 18–21, <https://doi.org/10.1021/ja308249k>.
- [26] Y.-J. Chung, B. Il Lee, J.W. Ko, C.B. Park, Photoactive g-C₃N₄ nanosheets for light-induced suppression of alzheimer's β -Amyloid aggregation and toxicity, *Adv. Healthc. Mater.* 5 (2016) 1560–1565, <https://doi.org/10.1002/adhm.201500964>.
- [27] M.E. Khan, T.H. Han, M.M. Khan, M.R. Karim, M.H. Cho, Environmentally sustainable fabrication of Ag@ g-C₃N₄ nanostructures and their multifunctional efficacy as antibacterial agents and photocatalysts, *ACS Appl. Nano Mater.* 1 (2018) 2912–2922, <https://doi.org/10.1021/acsanm.8b00548>.
- [28] M.J. Muñoz-Batista, O. Fontelles-Carceller, M. Ferrer, M. Fernández-García, A. Kubacka, Disinfection capability of Ag/g-C₃N₄ composite photocatalysts under UV and visible light illumination, *Appl. Catal. B Environ.* 183 (2016) 86–95, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2015.10.024>.
- [29] Z. Li, J. Wang, K. Zhu, F. Ma, A. Meng, Ag/g-C₃N₄ composite nanosheets: synthesis and enhanced visible photocatalytic activities, *Mater. Lett.* 145 (2015) 167–170, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.01.058>.
- [30] L. Svoboda, R. Škuta, V. Matějka, R. Dvorský, D. Matýšek, J. Henych, P. Mančík, P. Praus, Graphene oxide and graphitic carbon nitride nanocomposites assembled by electrostatic attraction forces: synthesis and characterization, *Mater. Chem. Phys.* 228 (2019) 228–236, <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.02.077>.
- [31] L. Svoboda, R. Dvorsky, J. Bednář, D. Matýšek, M. Pomiklová, Influence of different preparation methods of silver-modified carbon nitride on the photocatalytic activity towards indigo carmine dye, *Mater. Sci. Forum.* 990 (2020) 133–138, <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.990.133>.
- [32] A. Panáček, L. Kvítek, R. Prucek, M. Kolář, R. Večeřová, N. Pizárová, V.K. Sharma, T. Nevečrná, R. Zboril, Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 16248–16253, <https://doi.org/10.1021/jp063826h>.
- [33] L. Kvítek, R. Prucek, A. Panáček, R. Novotný, J. Hrbáč, R. Zboril, The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 1099–1105, <https://doi.org/10.1039/B417007E>.
- [34] G.A. Filip, B. Moldovan, I. Baldea, D. Olteanu, R. Suharoschi, N. Decea, C. M. Cismaru, E. Gal, M. Cenariu, S. Clichici, L. David, UV-light mediated green synthesis of silver and gold nanoparticles using Cornelian cherry fruit extract and their comparative effects in experimental inflammation, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 191 (2019) 26–37, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.12.006>.
- [35] K.J. Kadhim, I.H. Hilal, Study the radiation time effect of synthesis silver nanoparticles by photo reduction method, *World Sci. News.* (2016) 220–231.
- [36] B. Zhu, P. Xia, W. Ho, J. Yu, Isoelectric point and adsorption activity of porous g-C₃N₄, *Appl. Surf. Sci.* 344 (2015) 188–195, <https://doi.org/10.1016/j.apusc.2015.03.086>.
- [37] P. Praus, L. Svoboda, M. Ritz, I. Troppová, M. Šihor, K. Koci, Graphitic carbon nitride: synthesis, characterization and photocatalytic decomposition of nitrous oxide, *Mater. Chem. Phys.* 193 (2017) 438–446, <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2017.03.008>.
- [38] X. Wang, K. Maeda, A. Thomas, K. Takanabe, G. Xin, J.M. Carlsson, K. Domen, M. Antonietti, A metal-free polymeric photocatalyst for hydrogen production from water under visible light, *Nat. Mater.* 8 (2009) 76–80, <https://doi.org/10.1038/nmat2317>.
- [39] J. Tauc, Optical properties and electronic structure of amorphous Ge and Si, *Mater. Res. Bull.* 3 (1968) 37–46, [https://doi.org/10.1016/0025-5408\(68\)90023-8](https://doi.org/10.1016/0025-5408(68)90023-8).
- [40] K. Dai, L. Lu, C. Liang, Q. Liu, G. Zhu, Heterojunction of facet coupled g-C₃N₄/surface-fluorinated TiO₂ nanosheets for organic pollutants degradation under visible LED light irradiation, *Appl. Catal. B Environ.* 156–157 (2014) 331–340, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2014.03.039>.
- [41] V. Amendola, O.M. Bakr, F. Stellacci, A study of the surface plasmon resonance of silver nanoparticles by the discrete dipole approximation method: effect of shape, size, structure, and assembly, *Plasmonics* 5 (2010) 85–97, <https://doi.org/10.1007/s11468-009-9120-4>.
- [42] V. Kravets, Z. Almemar, K. Jiang, K. Culhane, R. Machado, G. Hagen, A. Kotko, I. Dmytruk, K. Spendier, A. Pinchuk, Imaging of biological cells using luminescent silver nanoparticles, *Nanoscale Res. Lett.* 11 (2016) 30, <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1243-x>.
- [43] J. Tong, L. Zhang, F. Li, M. Li, S. Cao, An efficient top-down approach for the fabrication of large-aspect-ratio g-C₃N₄ nanosheets with enhanced photocatalytic activities, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 23532–23537, <https://doi.org/10.1039/C5CP04057D>.
- [44] L.-X. Su, Q. Lou, C.-X. Shan, D.-L. Chen, J.-H. Zang, L.-J. Liu, Ag/Nanodiamond/g-C₃N₄ heterostructures with enhanced visible-light photocatalytic performance, *Appl. Surf. Sci.* 525 (2020) 146576, <https://doi.org/10.1016/j.apusc.2020.146576>.
- [45] Z. Sun, X. Zhang, X. Dong, X. Liu, Y. Tan, F. Yuan, S. Zheng, C. Li, Hierarchical assembly of highly efficient visible-light-driven Ag/g-C₃N₄/kaolinite composite photocatalyst for the degradation of ibuprofen, *J. Mater.* 6 (2020) 582–592, <https://doi.org/10.1016/j.jmat.2020.04.008>.
- [46] G.A. Sotiriou, S.E. Pratsinis, Antibacterial activity of nanosilver ions and particles, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 5649–5654, <https://doi.org/10.1021/es101072s>.
- [47] Z. Xiu, Q. Zhang, H.L. Puppala, V.L. Colvin, P.J.J. Alvarez, Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles, *Nano Lett.* 12 (2012) 4271–4275, <https://doi.org/10.1021/nl301934w>.
- [48] Z. Lu, K. Rong, J. Li, H. Yang, R. Chen, Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24 (2013) 1465–1471, <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4894-5>.
- [49] C. Mao, Y. Xiang, X. Liu, Z. Cui, X. Yang, K.W.K. Yeung, H. Pan, X. Wang, P.K. Chu, S. Wu, Photo-Inspired Antibacterial Activity and Wound Healing Acceleration by Hydrogel Embedded with Ag/AgCl/ZnO Nanostructures, *ACS Nano* 11 (2017) 9010–9021, <https://doi.org/10.1021/acs.nano.7b03513>.
- [50] K.J. Ong, T.J. MacCormack, R.J. Clark, J.D. Ede, V.A. Ortega, L.C. Felix, M.K. M. Dang, G. Ma, H. Fenniri, J.G.C. Veinot, G.G. Goss, Widespread nanoparticle-assay interference: implications for nanotoxicity testing, *PLoS One* 9 (2014), e90650, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090650>.
- [51] A.L. Holder, R. Goth-Goldstein, D. Lucas, C.P. Koshland, Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays, *Chem. Res. Toxicol.* 25 (2012) 1885–1892, <https://doi.org/10.1021/tx3001708>.
- [52] R. Guadagnini, B. Halamoda Kenzaoui, L. Walker, G. Pojana, Z. Magdolenova, D. Bilanica, M. Saunders, L. Juillerat-Jeanneret, A. Marcomini, A. Huk, M. Dusinska, L.M. Fjellsbø, F. Marano, S. Boland, Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests, *Nanotoxicology* 9 (2015) 13–24, <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.829590>.

ARTICLE



<https://doi.org/10.1038/s41467-021-20989-9>

OPEN

Microthermal-induced subcellular-targeted protein damage in cells on plasmonic nanosilver-modified surfaces evokes a two-phase HSP-p97/VCP response

Martin Mistrik^{1,6}, Zdenek Skrott^{1,6}, Petr Muller², Ales Panacek³, Lucie Hochvaldova³, Katarina Chroma¹, Tereza Buchtova¹, Veronika Vandova², Libor Kvitek³ & Jiri Bartek^{1,4,5}

Despite proteotoxic stress and heat shock being implicated in diverse pathologies, currently no methodology to inflict defined, subcellular thermal damage exists. Here, we present such a single-cell method compatible with laser-scanning microscopes, adopting the plasmon resonance principle. Dose-defined heat causes protein damage in subcellular compartments, rapid heat-shock chaperone recruitment, and ensuing engagement of the ubiquitin-proteasome system, providing unprecedented insights into the spatiotemporal response to thermal damage relevant for degenerative diseases, with broad applicability in biomedicine. Using this versatile method, we discover that HSP70 chaperone and its interactors are recruited to sites of thermally damaged proteins within seconds, and we report here mechanistically important determinants of such HSP70 recruitment. Finally, we demonstrate a so-far unsuspected involvement of p97(VCP) translocase in the processing of heat-damaged proteins. Overall, we report an approach to inflict targeted thermal protein damage and its application to elucidate cellular stress-response pathways that are emerging as promising therapeutic targets.

¹Laboratory of Genome Integrity, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic. ²Regional Centre for Applied Molecular Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic. ³Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc, Czech Republic. ⁴Danish Cancer Society Research Center, Copenhagen, Denmark. ⁵Division of Genome Biology, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Science for Life Laboratory, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. ⁶These authors contributed equally: Martin Mistrik, Zdenek Skrott. ✉email: martin.mistik@upol.cz; jb@cancer.dk

Exposure of cells and tissues to elevated temperatures is routinely used in research on protein thermal stability profiling, thermal therapies, treatments of accidental burns, and proteinopathies involving an accumulation of defective proteins. At the cellular level, the thermal damage primarily impairs proteins, causing their unfolding, aggregation, amyloidogenesis, and denaturation, phenomena particularly implicated in the pathobiology of Alzheimer's disease (AD), Huntington disease, Parkinson disease, amyotrophic lateral sclerosis and amyloidosis¹. Accumulation of defective proteins is also among the hallmarks of cancer with potentially causative roles, and cellular mechanisms of protein quality control represent anticancer therapeutic targets, as exemplified by clinically applicable inhibitors of the ubiquitin–proteasome system (UPS)².

Studying responses to thermal damage of proteins on the level of a single living cell or even subcellular level represents a significant challenge due to the lack of available methods allowing precise and fast delivery of the heat to the target structure at the micrometer scale. The temperature elevation is currently achieved by heating the cell culture media using various heat sources such as a water bath, an incubator with a pre-set target temperature, or by various energy emitters, including microwaves, ultrasound, and infra-red lamps and lasers³. However, such approaches have severe limitations, including, but not limited to: (i) a significant time delay in achieving the desired temperature as the media must be heated primarily; (ii) spatial restrictions as the whole cultivation vessel, or at least its large part is inevitably exposed to the heat; and (iii) overall precision issues including the inability to target selected single cells or subcellular compartments, thereby limiting the type of biological questions one can address.

Currently, the function of cellular chaperones is studied mainly by biochemical approaches under in vitro non-physiological conditions, mostly based on model substrates and simplified peptides, leaving the role and regulation of chaperones under physiological conditions of intact cell largely unexplored. Dramatic differences between cells and test tube should be taken into consideration, such as molecular crowding (300–400 mg ml^{−1} of proteins in cells), presence of other (macro)molecules, or increased interactions between macromolecules leading to changes in protein aggregation or folding⁴. Moreover, the findings from biochemical experiments are challenging to validate in cellular experiments due to a lack of appropriate methods. Thus, some basic questions regarding the function of chaperones in cells, including their recruitment kinetics to the substrates, remain unanswered.

The emerging field of plasmonic nanoparticles (NPs) has opened, besides other possibilities, a way for localized thermal therapy due to the efficient and tunable photothermal properties. When illuminated by light, free electrons localized on the NP surface become excited, and the local electron cloud is asymmetrically distributed over the whole NP. This distribution produces a coulombic restoring force between positively charged nuclei and negatively charged electrons from the conduction band, which leads to collective oscillation of the electron cloud on the particle surface called localized surface plasmon (LSP). The localized surface plasmon resonance (LSPR) occurs if the frequency of the incident light matches the frequency of LSP oscillation. As a result, the light is absorbed much more efficiently and generates localized and highly amplified electric fields in the proximity of the NP surface^{5,6}. Absorption of light by NPs may be non-radiatively relaxed and simultaneously converted to heat energy. Surface plasmon resonance depends on many parameters of the NPs, including size, shape, composition, surface coatings, dielectric properties of the metal NP and the environment^{6–8}. Importantly, the absorption and scattering frequency of plasmonic NPs can be selectively changed by adjusting the

morphology and the structure of the NPs and tuned to be located in the desired wavelength. Silver NPs can be easily tailored to possess an intense SPR band at a suitable wavelength region, enabling them to produce heat after the irradiation with appropriate laser and makes them an excellent candidate for a photothermal therapeutic agent. Plasmon NPs convert energy from the light to heat immediately and efficiently, allowing localized heating of the surrounding environment^{9–11}.

In an attempt to remedy the lack of suitable techniques for inflicting targeted protein damage in live human cells, we exploit here the properties of the plasmonic nanosilver-modified surfaces as a cell culture substrate. The approach that we developed, and examples of its applications to study molecular pathways highly relevant for biomedicine, are presented below.

Results

Plasmon-coated cultivation surface as a tool for heat micro-irradiation. We adopted the NPs technology to directly focus the heat on the individual cells or subcellular compartments within a micrometer scale. The method is based on modified microscopic cell culture plates, pre-coated by a layer of anisotropic silver NPs allowing excitation through targeted irradiation by conventional lasers used in the laser scanning microscopes (LSM) and allowing controllable heating. The deposition of NPs with suitable plasmonic properties on the cultivation surface is based on the layer-by-layer self-assembly technique, which facilitates the binding of negatively charged silver NPs using positively charged thin polymeric film deposited on the surface of the cultivation plate (Fig. 1a). For this purpose, water dispersion of anisotropic silver NPs of various crystallinity and shapes such as spheres, plates, rods, and triangles (Supplementary Fig. 1a, b), were synthesized by a two-step reduction method, showing the typical UV/VIS absorption spectrum (Supplementary Fig. 1c). Next, the prepared NPs were coated on the bottom of standard cell culture 24-well plates, which were pre-coated by a thin polymeric film consisting of polyacrylic acid (PAA) and poly(diallyl dimethylammonium chloride) (PDPA) polyions, thereby ensuring higher wettability and strong electrostatic binding ability of silver NPs, respectively¹².

Notably, such modified cultivation surface is chemically stable, optically transparent, and fully compatible with standard tissue culture methods, including cell adherence, cell viability and growth (Supplementary Fig. 1e–g). The photothermal effect and heat emission of the plasmonic modified cultivation surface after irradiation with the LSM laser is detectable within the LWIR spectrum (7.5–14 μm) by thermal imaging (Fig. 1b and Supplementary Fig. 1h).

To analyze the ability of the modified surface to induce microthermal damage of proteins in live cells, we employed a human reporter U-2-OS cell line expressing a GFP-tagged HSP70 protein (Heat shock protein 70). HSP70 is the central cellular chaperone involved in the processing of unfolded or aggregated proteins⁴. Immediately (within 8 s) after the laser exposure, HSP70-GFP accumulated at the micro-thermal damage sites, forming the laser path's precise pattern demonstrating proximate recognition of heat-damaged proteins by HSP70 in cells (Fig. 1c). The HSP70-GFP signal within the damaged areas changed over time positionally, and also the intensity decreased within a few minutes, indicating dynamic processing (Supplementary Video 1). HSP70 interacting partners, E3 ubiquitin ligase CHIP, and co-chaperone HOP⁴ were also rapidly recruited to the sites of thermal damage with similar signal kinetics as HSP70 (Fig. 1c). Importantly, the same chaperone response was observed in another human reporter cell line (H1299) and on different plasmon layer-modified cell culture plates, thereby attesting to

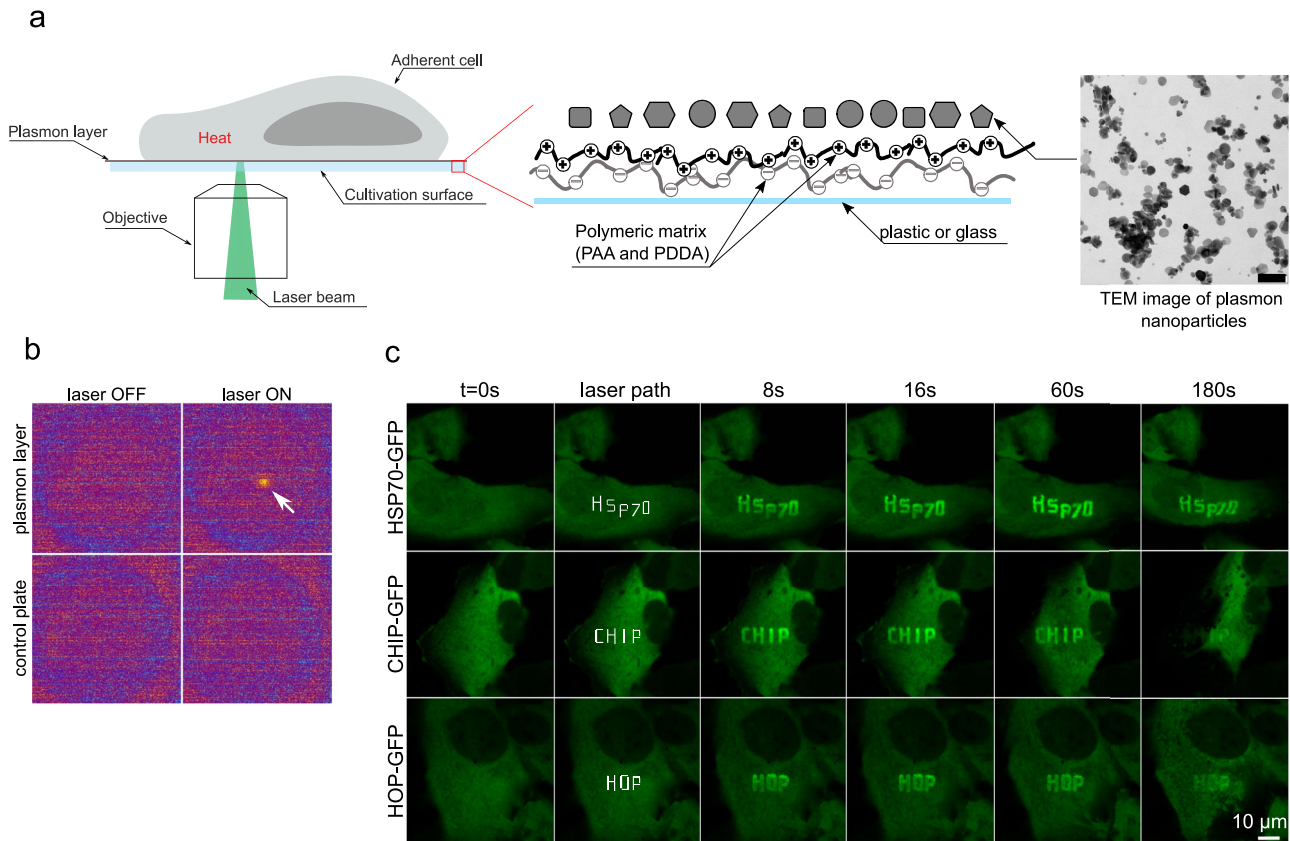


Fig. 1 Plasmonic cultivation surface activated by a laser of appropriate wavelength induces microthermal damage. **a** Schematic representation of the concept of microthermal damage inflicted on cellular proteins. The cell culture plate surface is modified by a thin polymeric film consisting of PAA (polyacrylic acid) and PDDA (poly(diallyl dimethylammonium chloride)) for the efficient binding of plasmonic silver NPs. Plasmon NPs convert energy from light (laser) immediately and efficiently to heat, enabling direct focusing of the heat on subcellular regions. **b** Thermal imaging shows emitted heat detected in the LWIR spectrum in plasmon-modified cell culture plate wells activated by 561 nm laser. **c** Recruitment of various GFP-tagged heat shock-related proteins to micro-heated regions in U-2-OS cells grown on a plasmon-modified Ibidi plate. Microheated regions were exposed to 561 nm laser (power 15%). The defined laser path is shown in white. Cells were followed in time. Representative results from two experiments. Scale bars = 10 μ m, for TEM micrograph 100 nm.

the method's universal applicability (Supplementary Fig. 2a, b). Another chaperone involved in the processing of heat-damaged proteins, HSP90, was less prominent but also detectable within the damaged sites (Supplementary Fig. 2c, d).

To rule out the possibility that the observed protein damage and cellular response might also involve the direct damaging effect of plasmon activating laser, we performed an additional control experiment. The plasmon layer was partially scratched from the cultivation surface using a pipet tip, which is also visible using transmission light microscopy (Supplementary Fig. 3). Importantly, only those cellular areas which are in direct contact with the plasmon layer, but not those in contact with the adjacent scratched surface, revealed the typical HSP70 protein response upon exposure to the plasmon activating laser (Supplementary Fig. 3).

Compatibility of the method with quantitative readouts.

Overall, the presented approach enables a so-far unprecedented analysis of the function and kinetics of chaperones or other factors involved in the processing of damaged proteins. In combination with a software-based ROI analysis, this setup also allows precise quantification of the process in time (Fig. 2a, b, and Supplementary Fig. 4a). The microthermal damage can also be induced by an adaptation of the so-called 'laser stripe' (laser micro-irradiation) approach, which is commonly used in the field of DNA damage^{13,14}. By this technique, dozens of cells can be

simultaneously and uniformly exposed to co-linear laser stripes of damaged chromatin containing DNA double-strand breaks, forming an easily recognizable pattern¹³. We adapted this approach and the HSP70-GFP reporter for characterization of dose-response aspects of our method. Indeed, the dosing can be precisely controlled to trigger responses ranging from relatively faint and transient recruitment of HSP70-GFP to stripes, up to clearly visible stripes persisting for several minutes, by adjusting the laser power (Fig. 2c). Importantly, these experiments do not require any specialized laser equipment as the real energy hitting the plasmon layer corresponds to values 0.23, 0.38 and 0.48 mW, respectively. Alternatively, the total emitted heat can also be increased by changing the number of laser exposure cycles with a fixed laser power (Supplementary Fig. 4b). These data confirm that the method does not require any unusual equipment, and generates predictably reproducible results in a dose-dependent manner.

Real-time kinetics and structural requirements of HSP70 recruitment.

As stated above, the current knowledge about chaperone function is based mainly on biochemical experiments with purified components under rather artificial conditions. HSP70 is known to form oligomeric structures, and recently, various oligomeric structures were proposed^{15,16}. Yet, the relevance of HSP70 dimerization is not fully understood, and it has not been studied in the context of live cells.

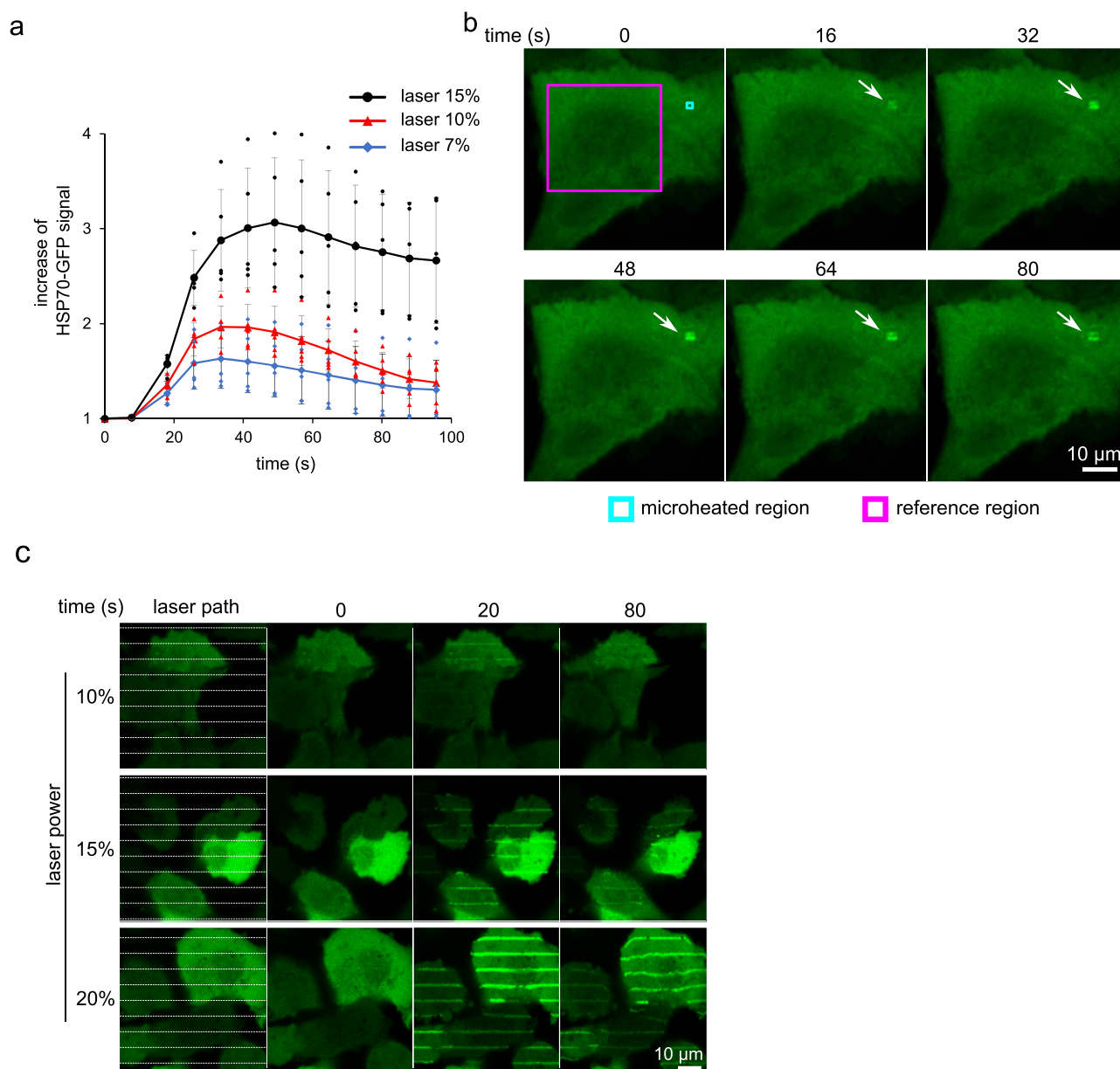


Fig. 2 Demonstration of dose-response dependence and quantification of the cellular response. **a** ROI-based quantitative analysis of the kinetics of HSP70-GFP recruitment to micro-heated proteins and the dependence of the process on the laser power used for plasmon layer activation (mean, SD, $n = 5$ cells). **b** Representative images depicting the evolution of the HSP70-GFP signal in the micro-heated ROI (white arrow, $n = 5$ cells). **c** H1299 cells grown on a plasmon-modified Ibidi plate expressing HSP70-GFP were exposed to collinear laser stripes of different laser power. The laser dose-response correlates with stronger and longer-persisting HSP70-GFP signals. Representative results from two experiments. Scale bars = 10 μ m. Source data are provided as a Source Data file for Fig. 2a.

To assess the contribution of the HSP70 dimerization for its function, we employed three *HSP70* mutants known to impair the protein function in vitro^{17,18}, which have however so far not been tested in cells. Using the thermal micro-irradiation approach, we observed that, compared to the positive control of wild-type HSP70-GFP, the mutation that impairs the HSP70's binding ability to client substrates (V438F) strongly abrogated the recruitment to micro-heated regions. This outcome was consistent with the expected mode of HSP70 recruitment to damage sites through recognition of the substrates, and it further attested to the suitability of our approach for addressing physiologically relevant questions. Also, the mutation affecting HSP70's ATPase activity (T204A), robustly impaired the recruitment of the respective mutant HSP70-GFPs

to the localized damaged proteins. Importantly, the subtle mutations (N540A, E543A) that impair the dimerization of HSP70 robustly inhibited the recruitment as well (Fig. 3a). These results reveal critical roles of the ATPase activity and dimerization, respectively, for proper recruitment of HSP70 to client substrates. Furthermore, these results further validate the applicability of our method for precision analyses of chaperone activity in the cellular context. These data also demonstrate that the observed recruitment to the lesion site does not reflect any potential unspecific method artefact but rather reflects HSP70's physiological ability to bind denatured proteins actively, in an acute manner, on-demand dictated by the cellular context under heat-inflicted damage in live human cells.

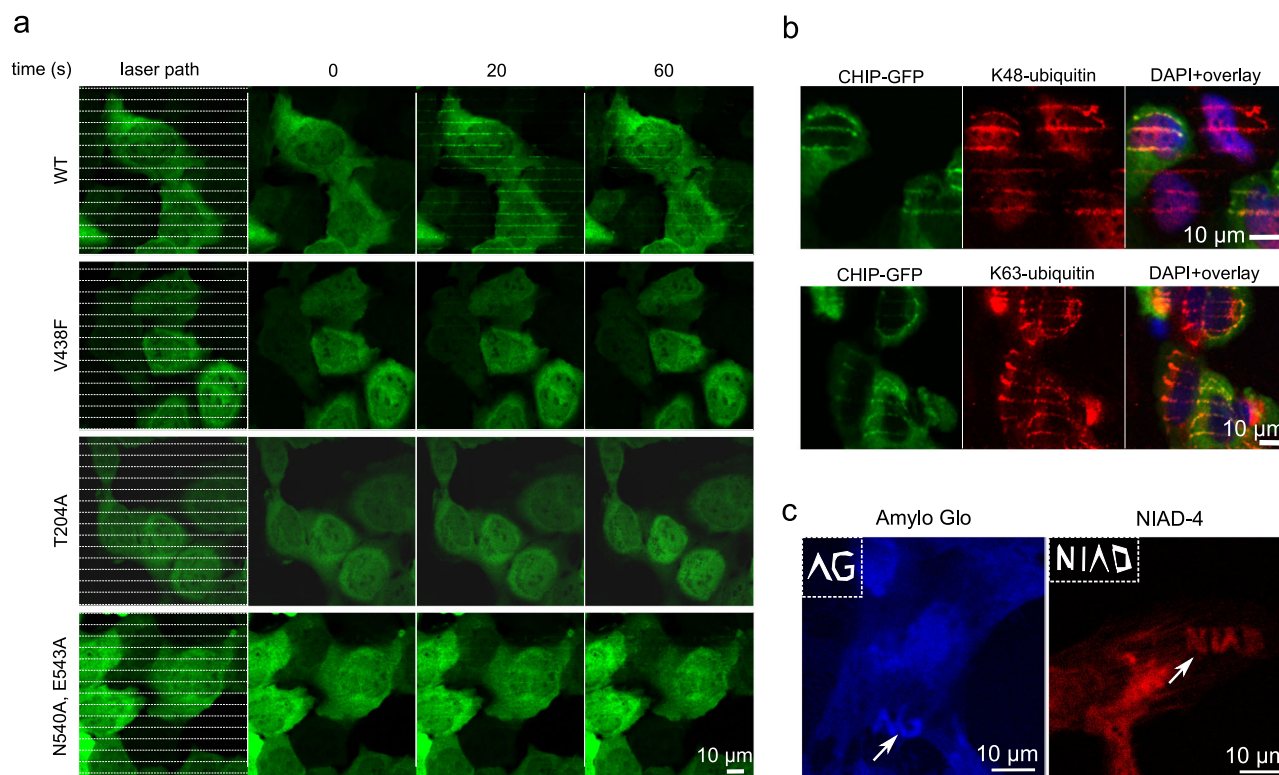


Fig. 3 Impaired recruitment of several HSP70 mutants and characterization of proteins damaged by micro-heating. **a** U-2-OS cells grown on a plasmon-modified Ibidi plate expressing HSP70-GFP variants were micro-heated by laser stripes and followed in time, revealing impaired recruitment to micro-heated regions of the indicated HSP70 mutants, compared to wild-type (WT) HSP70 control. **b** U-2-OS CHIP-GFP cells were micro-heated in the form of colinear stripes, fixed and processed for immunofluorescence analysis of the accumulation of K48- and K63-ubiquitinated proteins. **c** Detection of amyloid aggregates by NIAD-4 and AmyloGlo dyes in U-2-OS cells in microheated regions. The defined laser path is shown in the upper left corner of each image. All panels show representative results from two experiments. Scale bars = 10 μm.

Thermally damaged proteins are ubiquitinated and processed by p97 translocase. To provide further insights into the cellular response to micro-thermally damaged proteins and assess the method's compatibility with immunofluorescence, we next immunostained the exposed cells for ubiquitin. Using immunofluorescence, we observed a clear co-localization of the thermally damaged sites with signals from antibodies, specifically recognizing K48- and K63-ubiquitinated proteins (Fig. 3b). Such K48-linked ubiquitination of the damaged protein indicates ongoing processing by the UPS, while the K63-ubiquitin is mainly associated with pathway signaling or autophagy¹⁹, suggesting a potential involvement of additional mechanisms. Furthermore, we also tested specific fluorescent dyes recognizing unfolded or aggregated proteins. For example, NIAD-4 dye, commonly used as a detection reagent for β -sheet structures of AD-associated amyloid plaques, highlights the micro-heated proteins. Another dye accumulated within the thermally micro-irradiated regions is Amylo Glo (Fig. 3c), used for detecting amyloids. Thus, the amyloidogenesis of damaged proteins and the formation of β -sheets is induced within heated regions, consistent with previous publications reporting that heat stress triggers amyloid formation^{20,21}.

To elucidate the subsequent fate of the heat-damaged proteins, we considered their noticeable positional stability. It is well established that certain proteins dedicated to proteasomal degradation, which are part of insoluble cellular structures, require initial processing by p97 (VCP – Valosin Containing Protein, p97) as demonstrated for Endoplasmic reticulum-, chromatin-, or mitochondria-associated protein degradation²². Yet, any potential role of p97 in the processing of thermally

damaged proteins has remained unexplored. To investigate whether p97 is involved in handling heat-damaged proteins, we first analysed the recruitment of GFP-tagged p97 to thermally damaged sites. Indeed, we observed the accumulation of p97-GFP within the micro heated areas a few minutes after irradiation and the persistence there for around 20 min (Fig. 4a). We further validated this response for endogenous p97 in human cells using immunofluorescence, and confirmed co-localisation of p97 with accumulated GFP-ubiquitin (Fig. 4b). For a more in-depth mechanistic insight, we pretreated the cells with the UAE1 (Ubiquitin-activation enzyme 1) inhibitor (MLN7243), which is capable of blocking nearly all cellular ubiquitinations²³. Under the UAE1-inhibited conditions, we observed complete prevention of p97-GFP recruitment, indicating that ongoing ubiquitinations are required for the localisation of p97 within the heat-damaged sites (Fig. 4c). Interestingly, a specific inhibitor of ATPase activity of p97 (CB-5083)²⁴ also suppressed the recruitment of p97 to heat-damaged proteins (Fig. 4c), revealing that intact ATPase activity is required for proper accumulation of p97 within the heated subcellular regions.

To further study the active role of p97 in processing the heat-damaged proteins, we next studied a GFP-ubiquitin reporter cell line under p97 inhibition. In mock-treated cells, the GFP-ubiquitin was recruited to the micro heated regions within 5 min and persisted for up to 10 min. In contrast, cells pretreated with CB-5083 displayed stronger and longer-persisting GFP-ubiquitin signals within micro heated areas (at least for 20 min) (Fig. 4d). These data indicate direct and rate-limiting involvement of p97 in the proper processing kinetics of ubiquitinated proteins damaged by heat. We further confirmed these results under additional

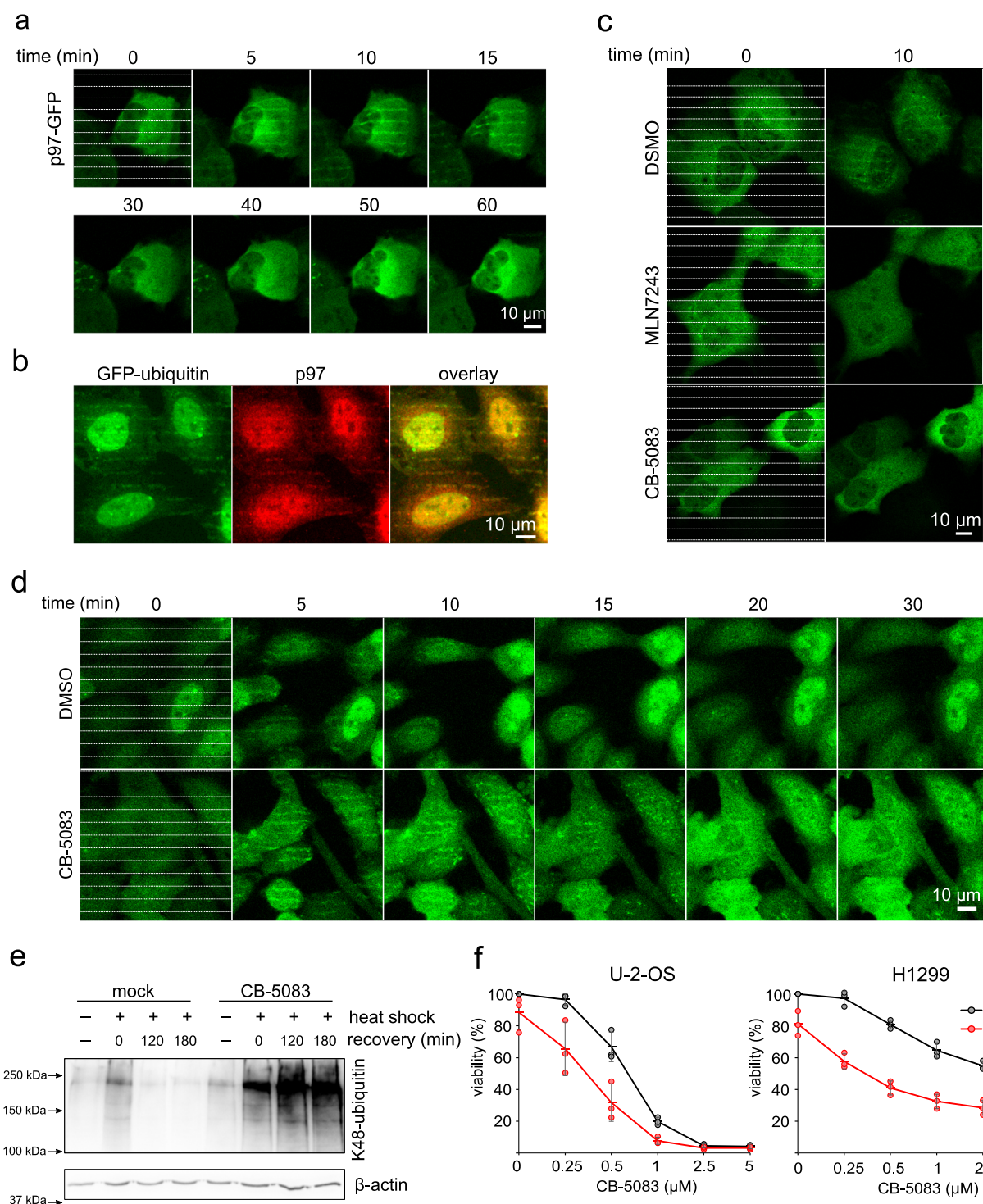


Fig. 4 p97 is recruited to thermally damaged proteins. **a** U-2-OS cells expressing p97-GFP grown on a plasmon-modified TPP plate were micro-heated by laser stripes and followed in time, revealing the kinetics of accumulation of p97-GFP in micro-heated regions. Representative results from three experiments. **b** U-2-OS cells expressing GFP-ubiquitin were micro-heated in the form of collinear stripes, fixed and processed for immunofluorescence analysis of the accumulation of endogenous p97 protein. Representative results from three experiments. **c** Pretreatment by UAE1 inhibitor MLN7243 (5 μ M for 30 min) or p97 inhibitor CB-5083 (5 μ M for 30 min) suppress recruitment of p97-GFP to micro-heated regions in the form of collinear stripes, which are visible only in mock-treated cells. Representative results from three experiments. **d** Inhibition of p97 by CB-5083 (5 μ M for 30 min) increased the accumulation and persistence of GFP-ubiquitin in micro-heated regions in the form of collinear stripes compared to the mock-treated control in U-2-OS cells stably expressing GFP-ubiquitin. Representative results from three experiments. **e** p97 inhibitor CB-5083 (5 μ M) increased the accumulation and persistence of K48-ubiquitinated proteins in insoluble cell fraction after heat shock (30 min at 43 °C). Cells were recovered at 37 °C for indicated times and cell pellets were analysed by WB. Representative results from two experiments. **f** Cell viability analysis after heat shock pulse (4 h at 42 °C) and recovery at 37 °C for 24 h (mean, SD from three independent experiments). Scale bars = 10 μ m. Source data are provided as a Source Data file for Fig. 4e, f.

settings, based on a standard experimental approach used for the heat shock induction. We treated cells with CB-5083 or mock and then exposed the whole cell population to a 43 °C heat-shock pulse using a pre-warmed water bath, after which the cells were allowed to recover at 37 °C for different periods of time. Western blot analysis of insoluble cell fractions confirmed the involvement of p97 translocase in the processing of heat-damaged proteins. Indeed, CB-5083-mediated inhibition of p97 caused a more robust and persisting accumulation of K48-ubiquitinated proteins, that otherwise dynamically disappeared in mock-treated cells during recovery at 37 °C (Fig. 4e). Moreover, using a similar experimental setup, we confirmed that the cytotoxic effect of a heat shock pulse was significantly enhanced in cells with inhibited p97 (Fig. 4f), indicating a contribution of p97 to better survival of cells exposed to thermal insults.

UPS compensates for the processing of thermally damaged proteins under HSP70 malfunction. Our data from the recruitment dynamics of various responsive factors suggest two temporally distinct, and potentially linked or cooperating mechanisms involved in processing thermally damaged proteins. The initial, more acute mechanism involves immediate action of cellular chaperones and co-chaperones, represented primarily by HSP70, involving also HSP90, CHIP and HOP. The second, delayed and more durable mechanism, involves UPS, characterized by massive poly-ubiquitination and recruitment of the p97 translocase. To gain more insight into any potential orchestration within this two-wave cellular heat stress response, we evaluated the effect of HSP70 impairment by the established chemical inhibitor of HSP70, VER155008^{21,25}. First, to validate the direct impact of VER155008 on HSP70 function in cells, we compared the HSP70 recruitment to damaged proteins in control and treated cells. VER155008 did not abrogate recruitment of HSP70 but rather resulted in prolonged HSP70 persistence at the heat damage sites, indicating inefficient chaperone-mediated processing of unfolded proteins, recognized, yet not further processed under HSP70 activity inhibitor treatment (Fig. 5a). To investigate the effect of HSP70 activity on the ubiquitination of damaged proteins, we then titrated damage intensity to the level at which the chaperones accomplished all the processing, i.e., without the apparent need for the subsequent involvement of p97. Under such settings, no GFP-ubiquitin signal was detectable. In contrast, under the same mild damaging conditions in cells with impaired HSP70 function (treated by VER155008), the accumulation of GFP-ubiquitin signal became detectable (Fig. 5b). Consistently, while under such mild conditions and proficient HSP70 response (mock treatment) p97-GFP did not recruit to sites of damage, in the VER155008-treated cells p97-GFP formed clearly visible stripes along the heat damaged subcellular areas (Fig. 5c). These results indicate that under a relatively mild heat damage conditions, the UPS pathway components including ubiquitin and p97, seem to provide a back-up compensatory role in case the primary chaperones (HSP70) are not fully operational. Furthermore, this two-wave mechanism becomes fully engaged, as a temporally coordinated cellular response, under conditions when the initial HSP-mediated pathway becomes overwhelmed by the severity of the damage.

Discussion

Our present study describes a highly versatile method suitable for induction and monitoring of cellular responses to conditions that lead to unfolded, aggregated proteins and β -sheet amyloids, aspects highly relevant for both basic and translational research on cellular protein quality control and its malfunction in a range of neurodegenerative disorders and cancer. First, we designed and

validated plasmonic silver NPs modification of various cell cultivation microscopic plates. Such products enable the researchers thermal micro-irradiation of small subcellular regions and concomitant monitoring of both the overall fate, and particularly the heat-triggered intracellular events in adherently growing cells using standard LSM. Notably, the laser equipment required to apply this method does not demand any uncommon or highly specialized setups with regard to the laser power. Also, the wavelengths needed for the plasmon layer activation do not have to be strictly 561 nm as used in this study, given that the plasmon layer's absorption peak covers more laser types used in the diverse LSM-type laboratory microscopes.

In addition to the method itself, we applied this approach to study behavior of selected protein chaperones in the physiological context of live cells in a spatiotemporally-controlled manner and at the level of unprecedented detail. Indeed, the information about the substrate recruitment kinetics in real time, and the effect of some of the functional mutants of one of the most studied protein chaperons - HSP70 (including the requirement for intact substrate recognition, ATPase and dimerization domains, respectively) are now revealed owing to the method described here. We also aimed at obtaining more insights into the characteristics, and particularly the further processing of the thermally damaged proteins. One of the important contributions of our study to the field are the results revealing the recruitment kinetics and variable residence time of the heat shock factors at the damage sites in a heat dose-dependent manner. Furthermore, apart from confirming that heat damage induces protein β -sheet amyloidogenesis in cells, we now report that the heat-damaged proteins are not only recognized by specific chaperons but can be further modified by poly-ubiquitylation and processed by the p97/VCP translocase pathway. The latter two-phase scenario is valid for more severe damage or conditions of chaperone insufficiency. Surprisingly, both types of the poly-Ub chains (K48- and K63-linked) are present at the same time within the heat-damaged subcellular sites, implying that a coordinated action of multiple E3 ubiquitin ligases is to be expected, likely linked to further processing by different protein-maintenance pathways, an intriguing concept that should inspire further work in this area, now amenable for experimentation thanks to the technique we report.

From the available literature on yeast and bacteria, it is known that in the processing of cellular protein aggregates, HSP70 cooperates with AAA+ (ATPase associated with diverse cellular activities) family members such as HSP104 disaggregase. However, such disaggregase is apparently lacking in metazoans²⁶. In this study using human cells, we discovered the involvement of the AAA+ translocase p97 in the processing of heat-damaged proteins. P97/VCP is an established component of the UPS machinery and generally protein quality control, promoting the degradation of ER-, mitochondria- or chromatin-associated proteins²². Despite mutations in the p97 gene are associated with various neurodegenerative diseases accompanied by accumulation of protein aggregates, the function of p97 in processing heat-damaged and aggregated proteins has not been studied²⁷. We show that p97 becomes recruited into the heat-damaged sites in the ubiquitin- and its own ATPase activity-dependent manner. The involvement of p97 becomes evident under more severe heat damage conditions, or in case the function of HSP70 is compromised (Fig. 6). After the p97 chemical blockade, we confirmed a substantial impact on the ubiquitin signal persistence within the heat-damage areas. Interestingly, the ubiquitin signal's disappearance was delayed, rather than completely blocked after p97 inhibition, suggesting that over time, spontaneous deubiquitylation of the damaged proteins or processing by alternative mechanisms such as autophagy or chaperone-mediated protein

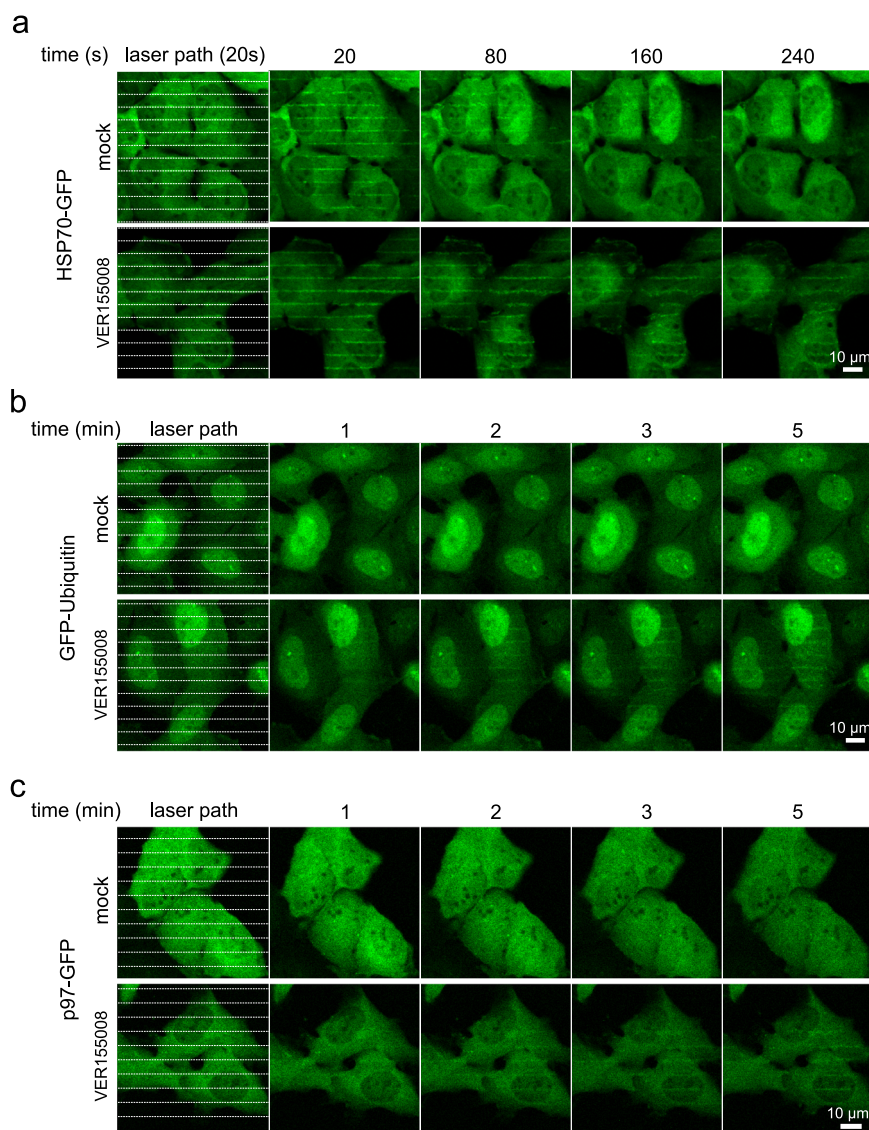


Fig. 5 The effect of HSP70 inhibition on recruitment of HSP70, ubiquitin and p97 translocase. **a** Pretreatment by HSP70 inhibitor (VER155008, 20 μ M for 30 min) increases the persistence of HSP70-GFP in micro-heated regions. **b** Inhibition of HSP70 by VER155008 (20 μ M for 30 min) promotes ubiquitination of heat-damaged proteins detected by GFP-ubiquitin reporter. **c** Inhibition of HSP70 by VER155008 (20 μ M for 30 min) increases the recruitment of p97-GFP to micro-heated regions. All panels show representative results from three experiments.

repair may further join this complex cellular response. Broadly analogous with multiple-pathway involvement associated with vital cellular responses to insults such as DNA damage or oxidative stress^{28,29}, our current results further attest to the biological significance of a multifaceted cellular response to thermal damage. This emerging concept is further supported by our result reported here, that experimental inhibition of the ubiquitin/p97 arm of the response exacerbates cytotoxicity of the otherwise well-tolerated degree of thermal damage.

Overall, we present a versatile methodology that may be broadly applicable in life sciences, including diverse screening strategies to search for chemical or cellular modulators of chaperone function, and generally in both basic/mechanistic and translational biomedical research. Application of this approach allowed us to provide insights into the molecular mechanisms of cellular responses to thermal damage in real time, including temporal orchestration of complementary stress-response pathways. Last but not least, our study raises multiple questions that should inspire further research dedicated to the processing of damaged cellular proteins, an essential aspect of cellular biology

with broad implications for neurodegenerative, prion-associated, and other life-threatening diseases.

Methods

Synthesis of plasmonic NPs. A step-by-step protocol describing the synthesis of plasmonic NPs can be found at Protocol Exchange³⁰. Water dispersion of anisotropic silver NPs (108 mg/L) was synthesized by two-step reduction process, involving partial reduction of the $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ complex cation by sodium borohydride in the first step resulting in the formation of the silver nuclei, which were subsequently in the second step grown up by the reduction using weak reduction substance, e.g., hydrazine. All the reaction components were, at the laboratory temperature (23 $^{\circ}\text{C}$), stirred continuously with a magnetic stirrer. Initially, 5 mL of aqueous silver nitrate (0.005 M), 1.25 mL of ammonia solution (0.1 M), 1.25 mL sodium citrate (1% w/w) and 13.425 mL distilled water were added into a 50 mL beaker and stirred while adding reducing agents. The reduction was initiated by the addition of 0.075 mL of sodium borohydride (0.001 M), which resulted in a reduction of silver complex cation, the formation of small NPs (seeds), and a change of the dispersion color to light yellow. Finally, 4 mL of hydrazine solution (0.05 M) was rapidly added into the dispersion of silver seeds under vigorous stirring, resulting in the growth of the seeds into final and stable silver anisotropic NPs followed by a change of the color of the dispersion from light yellow to typical purple. The final reaction concentrations of all the reaction components were as follows: silver nitrate $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; ammonia $5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; citrate

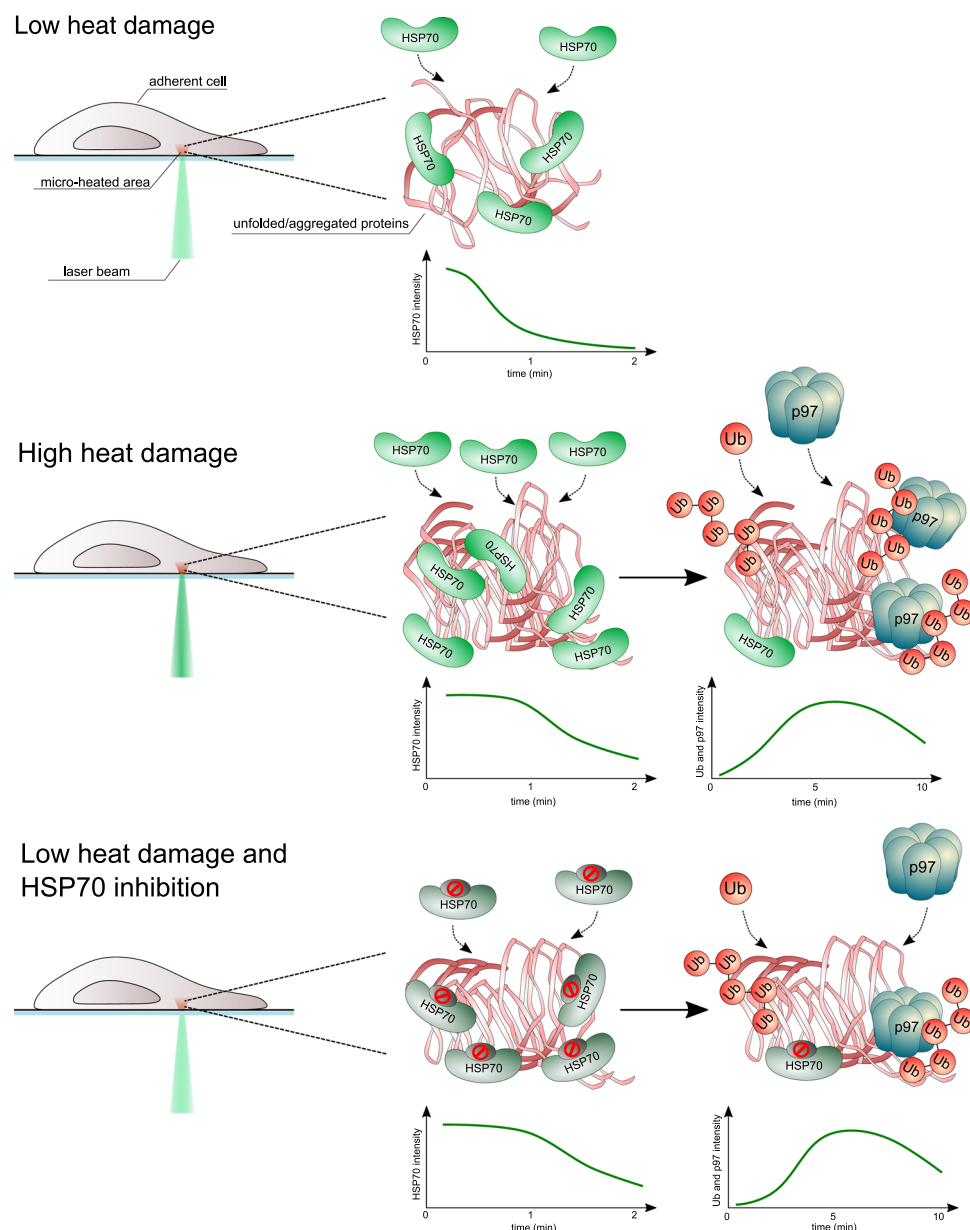


Fig. 6 Schematic representation of the cellular two-wave response to micro-heat damage. The intensity of micro-heat damage can be manipulated by laser power and defined regions enable detailed cellular response analysis. In case of low damage, the immediately recruited chaperones (such as HSP70, Heat shock protein 70) process the thermally damaged proteins within a minute and the activity of UPS is not needed. HSP70 persists for a longer time and ubiquitination (Ub) of damaged proteins is initiated in case of severe heat damage, followed by p97 recruitment and processing. In the case of HSP70 malfunction (inhibition), even low heat damage triggers ubiquitination and p97 recruitment as a compensatory response.

0.05% (w/w), sodium borohydride 3×10^{-6} mol dm^{-3} and hydrazine 8×10^{-3} mol dm^{-3} as a reducing agent. This way, prepared silver NPs were used for NP deposition on the cultivation surface. However, other plasmonic NPs with different shapes and optical properties (LSPR) can be prepared via the same method, but changing the ratio between citrate and hydrazine, using different amount of citrate varying from 0.25 to 4 ml (1% w/w) and adjusting the total volume to 25 ml. By this approach, the silver NPs with plasmon peak within the range of 440–725 nm can be synthesized. The prepared NPs have a negative surface charge ($\zeta = -38$ mV).

Deposition of silver NP on cell culture plates with plastic surfaces. A step-by-step protocol describing the deposition of silver NP can be found at Protocol Exchange³⁰. Silver NPs prepared by the above-mentioned method were subsequently coated onto the bottom of functionalized Ibidi 24-well plates (u-Plate, Ibidi, cat.n.: 82406), Greiner CELLSTAR® 96-well plates (Sigma, cat. n.: M0562) or TPP 24-well plates (TPP, cat. n.: 92424). The plates were first functionalized by 1% PAA (Sigma Aldrich) solution followed by 1% poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA) (Sigma Aldrich) solution for 2 h each to coat them by thin polymeric film consisting of two layers of oppositely charged polyelectrolytes

(PAA and PDDA). After 4 h of the treatment, wells were washed with distilled water to remove non-bonded polymers and filled with the dispersion of silver NPs. Silver NPs were bonded within 45 min to thin polymeric PAA_PDDA film deposited on well surface through the electrostatic interactions between negatively charged silver NPs and positively charged PDDA forming the top layer of the thin polymeric film. In the end, wells were washed with distilled water to remove unbonded NPs and air-dried.

Deposition of silver NP on cell culture plates with glass surface. A step-by-step protocol describing the deposition of silver NP can be found at Protocol Exchange³⁰. Due to the fact that the glass surface is already negatively charged, the modification with negatively charged PAA as described above for plastic bottoms was skipped. Instead, the glass surface (Cellvis glass-bottom plates, P24-1.5H-N) was cleaned and activated by the piranha solution ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$, 7:3) for 15 min, followed by washing with distilled water. After that, the plates were functionalized by 1% poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA) (Sigma Aldrich) solution for 2 h to coat them by thin polymeric PDDA film. After the treatment, wells were washed with distilled water to remove non-bonded polymer and filled with the

dispersion of silver NPs. Silver NPs were bonded within 45 min to thin polymeric PDDA film deposited on well surface through the electrostatic interactions between negatively charged silver NPs and positively charged PDDA forming the top layer of the thin polymeric film. In the end, wells were washed with distilled water to remove unbonded NPs and air-dried.

Plasmids, cloning. All coding sequences were cloned by Gateway recombination technology (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The full coding sequences of human Hsp70 (HSPA1A, UniProt ID: P0DMV8-1), CHIP (STUB1, UniProt ID: Q9UNE7-1) and HOP (STIP1, UniProt ID: P31948-1) were cloned into PB-EF1a-N-EmGFP-PURO-GW-Dest vector containing an N-terminal GFP tag. Hsp70 point mutants were prepared by QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's manual. Following primers were used to create Hsp70 mutants: GACAACCAACCCGGTTCCTGATCCAGGTGTAC and GTACACCTGGATCAGGAACCCGGTGGTGTGTC for V438F, TGGCGGGGCGCCTTCGACGTG and CACGTGGAAGCGCCCGCCGCCA for T204A and GTGTCAGCCAAGCGCCCTGGCGTCTACGCCTTC and GAAGGCGTAGGACGCCAGGGCGGCCTTGCTGACAC for N540A, E543A.

Cell culture and transfection. Human osteosarcoma U-2-OS and human lung cancer H1299 cell lines (both from ATCC) were used for all studies. Cells were maintained in DMEM media (Lonza) supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich). The Piggy Bac transposon system (PB) has been used to generate a stable expression of GFP fused proteins. A total of 10^5 cells were transfected using Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with 1800 ng of transposon plasmid and 200 ng of transposase plasmid. Cells were selected in the same media supplemented with puromycin 5 µg/ml (InvivoGen, San Diego, CA). Flow cytometry and cell sorting (FACS Aria-III, Becton Dickinson) was used to enrich cell populations with optimal GFP expression. U-2-OS expressing GFP-ubiquitin reporter and U-2-OS expressing p97-GFP were previously described³¹.

Cell viability. Cells were seeded on the original control multi-well plate (Greiner) or a plate modified by the plasmon NPs layer. Twenty-four hours after seeding, the cell viability was analyzed by XTT assay (Applchem) according to the manufacturer's instructions. XTT solution was added to the medium and incubated for 30–60 min, and then the dye intensity was measured at the 475 nm wavelength using a spectrometer (TECAN, Infinite M200PRO). To analyse the viability after heat shock, the cells were seeded on TPP 96-well plate. The next day, the cells were treated by CB-5083 or mock and placed in a water bath pre-heated to 42 °C for 4 h and then put back to cell culture incubator with standard conditions. Cell viability was analysed by XTT assay 24 h later.

Microscopy and microthermal damage induction. A step-by-step protocol describing the microthermal damage induction can be found at Protocol Exchange³⁰. For the visualization and delivery of the microthermal damage, we used a Zeiss Axioimager Z.1 platform equipped with an LSM780 module for confocal laser scanning microscopy (CLSM). Used objectives included Zeiss objectives Alpha Plan-APOCHROMAT 40x water immersion for the Ibidi plates and glass-bottom plates, and LD Plan-NEOFLUAR 40x/0.6 Korr for the TPP plates. CLSM setup included argon 488 nm and 355 nm lasers for visualization. For the plasmon layer activation, we used exclusively 561 nm 20 mW solid-state laser. The power range hitting the plasmon layer corresponded to 0.16–2.41 mW; exact values are stated in the main text (see also details of laser power measurements below). The laser irradiation times were defined by the pixel dwell time and the total irradiation time. For the FRAP-like experiments where irradiation ROI was pre-defined, the pixel dwell time was fixed at 100 µs, and the whole irradiation time was dependent on the size of the ROI (~18–26 s for letter-like ROIs and 2 s for the square ROIs). For the stripping approach, the pixel dwell time was fixed at 709 µs, and the total irradiation time was 0.85 s for one irradiation cycle resulting in 32 colinear stripes across the one microscopic field. See also ref. ¹³ for details for setting up the laser stripping approach in LSM. All laser irradiations and acquisitions were performed using the Zeiss Zen 11 software.

Measurement of the laser power. PT-9610 optometer with PD-2D Laser Power Detector (Gigahertz-Optik) was used to obtain the values describing the laser power in watts hitting the plasmon layer. The optometer was set for 561 nm wavelength, and the detector was placed instead of the microscopic plate. Irradiation of the sensor was performed by 561 nm solid-state laser via the same objectives as used for the micro-irradiation process. The values were recorded at continuous laser mode at different laser power setups. Exact values for Alpha Plan-APOCHROMAT 40x water immersion objective were: 0.16 mW (7% laser power), 0.23 mW (10% laser power), 0.38 (15% laser power), 0.48 (20% laser power), 2.41 mW (100% laser power). The exact value for LD Plan-NEOFLUAR 40x/0.6 Korr objective was: 1.27 mW (100% laser power).

Quantitative ROI analysis. The analysis was performed by the Zeiss Zen 11 software employing an internal plugin for bleaching and FRAP (Fluorescence

recovery after photobleaching) analysis³¹. Control region (not exposed to the plasmon activating laser) was used for correction of baseline fluorescence and its potential change in time during acquisition and comparison with the microheated region (exposed to the plasmon activating laser). The data were exported to the Microsoft Excel 2016 and the increase of HSP70-GFP signal was calculated according to formula: increase of HSP70-GFP intensity = $(\text{mean}_{\text{Microheated region}(t=x)} - \text{mean}_{\text{Reference region}(t=x)}) / (\text{mean}_{\text{Microheated region}(t=0)} - \text{mean}_{\text{Reference region}(t=0)})$.

Immunofluorescence and dye staining. Cells were fixed 5 min after microthermal damage with 4% formaldehyde for 15 min at room temperature, washed with PBS, and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 5 min. After PBS washes, the cells on the plastic inserts were immunostained with primary antibody for 1 h at room temperature (anti-K48-ubiquitin, Apu2, Merck Millipore; anti-K63-ubiquitin, Apu3, Merck Millipore; anti-VCP, Abcam, ab11433), followed by PBS washes and staining with Alexa Fluor 568-conjugated secondary antibody for 60 min at room temperature. Nuclei were visualized by DAPI staining at room temperature for 2 min. For the beta-aggregates visualization, NIAD-4 (Sigma) dye was directly added to culture media (300 nM), and aggregates were detected in live cells after laser irradiation. AmyloGlo staining was performed according to the manufacturer's instruction (Biosensis). Briefly, cells were irradiated by the 561 nm laser, fixed with formaldehyde for 15 min at room temperature, washed with PBS, and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 5 min and washed. Next, the slide was incubated with 70% ethanol for 5 min, washed with distilled water, and stained with 1X AmyloGlo reagent for 15 min, followed by quick washes in 0.9% saline and distilled water.

Thermal camera imaging. The thermal camera (Therm-App®, Opgal Optronic Industries Ltd.) was placed in an in-house built holder keeping the camera at an ~5-cm distance from the top of the culture plate. The camera's germanium objective was manually focused on the bottom of a single well. The whole assembly was placed inside the Zeiss Axioimager Z.1 platform equipped with LSM780 module for confocal laser scanning microscopy (CLSM) (see Supplementary Fig. 1h for the setup). The bottom of the well's inner surface was focused and exposed to the 561 nm laser working in the continuous mode while the thermal camera was used to acquire thermograms.

Western blotting. U2OS cells were seeded at 0.7×10^6 cells per 6 cm dish for 24 h before the experiment. P97 inhibitor- (CB-5083; 5 µM; Selleckchem) or Mock-treated cells were exposed to 43 °C for 30 min in a water bath. Subsequently, dishes with cells were moved to an incubator with a standard set up of 37 °C and 5% CO₂. The cell lysates of pellet fraction were collected in time (0-, 2-, 3 h) by a quick wash with 0.5% Triton X-100 followed by resuspension in 1× Laemmli sample buffer. Equal amounts of cell lysates were separated by SDS-PAGE on hand casted gels and then transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked in Tris-buffered saline containing 5% milk and 0.1% Tween 20 for 1 h at room temperature, and then incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: anti-ubiquitin lys48-specific (1:1000; Merck Millipore, clone Apu2), anti-β-actin (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, sc-47778), followed by detection with secondary antibodies: goat anti-mouse IgG-HRP (GE Healthcare), goat anti-rabbit (GE Healthcare). Bound secondary antibodies were visualized by ELC detection reagent (Thermo Fisher Scientific) and images were recorded by an imaging system equipped with a CCD camera (ChemIDoc, Image Lab 6.1 software, Bio-Rad).

Characterization of plasmonic NPs. The synthesized water dispersion of silver anisotropic NPs and the deposited layer of silver anisotropic NPs were characterized by transmission electron microscopy (TEM) using a JEM 2010 TEM instrument (Jeol, Japan). In the case of water dispersion, a droplet of the sample with a silver concentration of 108 mol dm⁻³ was deposited on a carbon-coated copper grid and dried in a vacuum drier at 25 °C for 1 h. In the case of the silver NPs layer, carbon-coated copper grids were used and modified in the same way as cultivation plates. For this analysis, the carbon-coated copper grid was put in an Eppendorf tube and functionalized by PAA solution followed by poly(diallyldimethylammonium chloride) solution for 2 h each in order to coat them by the thin polymeric film. After 4 h of the treatment, carbon-coated grids were washed with distilled water in Eppendorf tube to remove non-bonded polymers and after that, Eppendorf tubes were filled with a dispersion of silver NPs. Silver NPs were bonded within 45 min to thin polymeric film deposited on carbon-coated copper grids and followed by washing with distilled water to remove un-bonded NPs and dried in a vacuum drier at 25 °C for 1 h. UV-vis spectra of silver NP dispersions were recorded on a Specord S 600 (Analytic Jena, Germany) spectrophotometer. Dispersions of silver anisotropic NPs were 10 times diluted prior to the measurements and layers of silver anisotropic NPs deposited on the cultivation plates were used as they were prepared. Zeta potential of silver NPs in water dispersion was obtained by electrophoretic mobility measurements using Zetasizer NanoZS (Malvern, UK).

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. Source data are provided with this paper.

Received: 26 August 2020; Accepted: 7 January 2021;

Published online: 29 January 2021

References

- Hartl, F. U. Protein misfolding diseases. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 21–26 (2017).
- Deshaies, R. J. Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy. *BMC Biol.* **12**, 94 (2014).
- Guin, D., Gelman, H., Wang, Y. & Gruebele, M. Heat shock-induced chaperoning by Hsp70 is enabled in-cell. *PLoS ONE* **14**, e0222990 (2019).
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. & Ulrich Hartl, F. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 323–355 (2013).
- Kim, M., Lee, J. & Nam, J. Plasmonic photothermal nanoparticles for biomedical applications. *Adv. Sci.* **6**, 1900471 (2019).
- Mayer, K. M. & Hafner, J. H. Localized surface plasmon resonance sensors. *Chem. Rev.* **111**, 3828–3857 (2011).
- Xue, C. & Mirkin, C. A. pH-switchable silver nanoprisms growth pathways. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **46**, 2036–2038 (2007).
- Haes, A. J., Stuart, D. A., Nie, S. & Van Duyne, R. P. Using solution-phase nanoparticles, surface-confined nanoparticle arrays and single nanoparticles as biological sensing platforms. *J. Fluoresc.* **14**, 355–367 (2004).
- Jiang, K., Smith, D. A. & Pinchuk, A. Size-dependent photothermal conversion efficiencies of plasmonically heated gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **117**, 27073–27080 (2013).
- Plech, A., Kotaidis, V., Grésillon, S., Dahmen, C. & von Plessen, G. Laser-induced heating and melting of gold nanoparticles studied by time-resolved x-ray scattering. *Phys. Rev. B* **70**, 195423 (2004).
- Govorov, A. O. & Richardson, H. H. Generating heat with metal nanoparticles. *Nano Today* **2**, 30–38 (2007).
- 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.* **60**, 1215–1218 (2006).
- Mistrik, M. et al. Cells and stripes: a novel quantitative photo-manipulation technique. *Sci. Rep.* **6**, 19567 (2016).
- Lukas, C., Falck, J., Bartkova, J., Bartek, J. & Lukas, J. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat. Cell Biol.* **5**, 255–260 (2003).
- Morgner, N. et al. Hsp70 forms antiparallel dimers stabilized by post-translational modifications to position clients for transfer to Hsp90. *Cell Rep.* **11**, 759–769 (2015).
- Mayer, M. P. & Gierasch, L. M. Recent advances in the structural and mechanistic aspects of Hsp70 molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **294**, 2085–2097 (2019).
- Trcka, F. et al. Human stress-inducible Hsp70 has a high propensity to form ATP-dependent antiparallel dimers that are differentially regulated by cochaperone binding. *Mol. Cell. Proteom.* **18**, 320–337 (2019).
- Vandova, V. et al. HSPA1A conformational mutants reveal a conserved structural unit in Hsp70 proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1864**, 129458 (2020).
- Komander, D. & Rape, M. The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 203–229 (2012).
- Audas, T. E. et al. Adaptation to stressors by systemic protein amyloidogenesis. *Dev. Cell* **39**, 155–168 (2016).
- Frottin, F. et al. The nucleolus functions as a phase-separated protein quality control compartment. *Science* **365**, 342–347 (2019).
- Meyer, H., Bug, M. & Bremer, S. Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat. Cell Biol.* **14**, 117–123 (2012).
- Hyer, M. L. et al. A small-molecule inhibitor of the ubiquitin activating enzyme for cancer treatment. *Nat. Med.* **24**, 186–193 (2018).
- Anderson, D. J. et al. Targeting the AAA ATPase p97 as an approach to treat cancer through disruption of protein homeostasis. *Cancer Cell* **28**, 653–665 (2015).
- Schlecht, R. et al. Functional analysis of Hsp70 inhibitors. *PLoS ONE* **8**, e78443 (2013).
- Mogk, A., Bukau, B. & Kampina, H. H. Cellular handling of protein aggregates by disaggregation machines. *Mol. Cell* **69**, 214–226 (2018).
- Tang, W. K. & Xia, D. Mutations in the human AAA+ chaperone p97 and related diseases. *Front. Mol. Biosci.* **3**, 79 (2016).
- Jackson, S. P. & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071–1078 (2009).
- Sies, H., Berndt, C. & Jones, D. P. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 715–748 (2017).
- Mistrik, M. et al. Protocol for subcellular targeted microthermal protein damage in cells cultivated on plasmonic nanosilver-modified surfaces. *Protoc. Exch.* <https://doi.org/10.21203/rs.3.pex-1314/v1> (2021).
- Skrött, Z. et al. Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4. *Nature* **552**, 194–199 (2017).

Acknowledgements

The study was supported by MEYS CR: (Large RI Project LM2018129 - Czech-BioImaging), ERDF (project No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001775), ENOCH project (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868), and project CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000754, Grant agency of the Czech Republic: GACR 20-28685S, GACR 19-03796S and GACR 19-22720S, Technology Agency of the Czech Republic: TN01000013, Ministry of Health of the Czech Republic (MMCI, 00209805), Danish Cancer Society (R204-A12617-B153), Danish Council for Independent Research (DFF-7016-00313), Danish National Research Foundation (DNRF125 - project CARD), Swedish Research Council (VR-MH 2014-46602-117891-30), and Lundbeck Fonden (R266-2017-4289).

Author contributions

M.M., J.B., and Z.S. designed experiments, which were performed by M.M. and Z.S. A.P., L.H., and L.K. prepared and characterized plasmonic nanoparticle-modified surfaces. P.M. and V.V. prepared reporter cell lines. K.C. performed western blot analysis. T.B. performed cell viability tests. M.M., Z.S., P.M., A.P., and J.B. discussed and interpreted the results. M.M., Z.S., A.P., and J.B. wrote the manuscript, which was approved by all authors.

Competing interests

M.M., Z.S., L.H., A.P., L.K., and J.B. are inventors of the pending patent application (European Patent Office, application number EP20198904.3; patent applicants: Palacky University in Olomouc, Czech Republic). The patent application covers preparation of plasmon-modified cultivation surfaces and usage of thereof for induction of microthermal damage. The remaining authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20989-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.M. or J.B.

Peer review information *Nature Communications* thanks Anatoliy Pinchuk and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

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

Autoreferát 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

Uchazeč:

Mgr. Lucie Hochvaldová

Školitel:

doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

Oponenti:

doc. Ing. Mgr. Kateřina Peterek Dědková, Ph.D.

prof. Ing. Blahoslav Maršálek, CSc

Místo a termín obhajoby:

9.6.2023, 9:00, Katedra Fyzikální chemie 3.031

S disertační prací a posudky se lze seznámit na studijním oddělení u Mgr. Martiny Karáskové.

Autorka této disertační práce během svého doktorského studia prováděla vlastní výzkum, opakovaně vyjela na zahraniční stáž, podílela se 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 potencované antibioterapie v léčbě závažných bakteriálních infekcí – studie in vitro a in vivo

2022, DSGC-2021-0120 Light-assisted in vitro therapy using plasmonic materials (IGRÁČEK, UP)

Účast na konferencích a seminářích

- Konference „Antibiotics, Antimicrobials & Resistance“ (poster) - „Bacterial resistance to silver nanoparticles“ (říjen 2019, Řím, IT)
- Kurz infračervené spektroskopie „Měření vibračních spekter“ (leden 2020, Praha)
- Kurz „Základy FT-IR spektroskopie a práce s programem Omnic“ (březen 2020, Praha)
- Konference a letní škola „Nanotechnology 2020“ (poster) – „Potential of silver nanoparticles in biological applications“ (červenec 2020, Soluň, GR)
- XXIX International Materials Research Congress (prezentace) – „Silver nanoparticles in antibacterial therapy and other medical applications“ (srpen 2021, Cancun, MEX)
- NanoBioTech konference (poster, snap prezentace) – „Plasmonic nanosilver-modified surfaces for microthermal-induced protein damage in cells (listopad 2021, Montreux, CH)
- NanoInBio konference a letní škola (poster) – „Silver modified surfaces as a platform for basic research and other medical applications“ (květen 2022, Guadeloupe, FR)
- IUVSTA workshop (poster) – „Synthesis of silver and gold nanoparticles with tunable plasmonic properties and their deposition on cultivation plates“ (červen 2022, Guimaraes, PT)
- Mezinárodní Sjezd chemiků (poster) – „Plasmonic nanosilver-modified surfaces for photothermal therapy“ (září 2022, Olomouc, ČR)
- NanoMed (poster) – „Nanofabrication of tuneable plasmonic noble metal nanoparticles and their subsequent formation onto cultivation plates used in photothermal therapy“ (říjen 2022, Atény, GR)
- NanoBioMed (poster) – „Silver modified surfaces for photothermal therapy“ (listopad 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	39
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	39
Language	Czech

TEORETICKÁ ČÁST	8
1. Úvod do problematiky	8
2. Příprava nanočástic	10
3. Antibakteriální terapie.....	11
4. Antibakteriální účinky nanočástic	12
5. Bakteriální rezistence vůči účinkům nanočástic	13
6. Cytotoxické účinky nanočástic	14
7. Využití fototermálních účinků nanočástic	15
VÝSLEDKY A DISKUSE	16
8. Příprava a stabilizace nanočástic	16
9. Antibakteriální aktivita testovaných nanočástic	18
10. Indukce rezistence a její mechanismy	21
11. Testování společného účinku.....	25
12. Nanočástice stříbra ve fototermální terapii.....	29
13. Cytotoxicita nanočástic.....	31
ZÁVĚR	33
PŘÍLOHY	36
LITERATURA.....	37

TEORETICKÁ ČÁST

1. Úvod do problematiky

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, nebo na následné studium jejich různorodých fyzikálně-chemických vlastností a jejich aplikaci v široké škále výzkumných oblastí.¹ Unikátní fyzikálně-chemické vlastnosti vycházející z velké plochy povrchu částic a z velkého poměru povrchových ku objemovým atomům 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}

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 rámci této práce bude pozornost zaměřena převážně na využití nanočástic v biologických a medicínských aplikacích, převážně pak v antibakteriální a fototerminální terapii.

V současné době představuje nárůst počtu bakteriálních infekcí vyvolaných (způsobených) bakteriemi rezistentními vůči běžně využívaným antibiotikům velký terapeutický problém, a 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 a 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 medicínální praxe.

2. Příprava nanočástic

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. Nanočástice stříbra jsou nejčastěji 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.^{4,5} Redoxní potenciál a molekulární struktura redukčního činidla ovlivňují rychlost tvorby zárodků nové fáze, schopnost a rychlost adsorpce na povrch rostoucí částice, a tím tedy i výslednou velikost částic. Silné redukční činidlo (např. tetrahydridoboritan sodný) má vysokou redukční rychlost, dochází tedy k velkému stupni přesycení a tvorbě velkého množství zárodků a tvorbě menších částic.⁶ Při využití slabého redukčního činidla (např. citronan sodný) jsou pak získávány poněkud větší nanočástice s širší velikostní distribucí.⁷

K přípravě nanočástic lze dále 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. V druhém kroku syntézy musí být vždy použito slabé redukční činidlo (citronan sodný, hydrazin nebo například kyselina askorbová), které z hlediska reakční kinetiky upřednostňuje redukci 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.^{8–11}

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.^{12–15}

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, polaritě, 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.^{16–18}

3. Antibakteriální terapie

I přes rostoucí znalosti ve všech oblastech medicíny a značném pokroku v diagnostice a terapii představují bakteriální infekce vážný terapeutický problém. 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.¹⁹ 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.²⁰ 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.

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.^{21,22} 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 savčím buňkám (BJ, NIH, buněčné linie 3T3).^{23–25} 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.^{24–28}

4. Antibakteriální účinky nanočástic

Antimikrobní aktivita nanočástic stříbra byla laboratorně potvrzena množstvím publikací^{29–34} a k této problematice byl sepsán nejeden souhrnný článek.^{35–37} Baktericidní účinek nanočástic stříbra závisí na několika faktorech, jako je tvar, velikost, krystalinita, pH, dávka, doba kontaktu, povrchová úprava a povrchový náboj.³⁸ 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.^{39–41} Velký vliv na antimikrobiální aktivitu má také morfologie částic, 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.^{42,43} 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.^{39,44}

5. Bakteriální rezistence vůči účinkům nanočástic

Je třeba zdůraznit, že vývoj a šíření bakteriální rezistence je přirozený proces, kterému nelze zcela zabránit, a s ohledem na neustálé změny bakteriálního genomu a schopnost bakterií přizpůsobit se negativním podmínkám se předpokládá, že bakterie budou schopny čelit i antibakteriálním účinkům nanomateriálů. 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.

U Gram-negativních bakterií byla doposud popsána rezistence k nanočásticím stříbra v důsledku relativně jednoduchých genomických změn,⁴⁵ ale i rezistence, která není způsobena změnami v bakteriální DNA. 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.⁴⁶ Indukce bakteriální rezistence opakovaným působením subinhibičních koncentrací u Gram-pozitivních bakterií byla zatím popsána jen málo a byla spojena s mutacemi genů zapojených do syntézy nukleotidů, obrany proti oxidačnímu stresu a změnami v metabolismu cysteinu.^{47,48}

Nejčastějším mechanismem rezistence je obecně eflux, nebo redukce toxických iontů, a vytvoření extracelulární bariéry (např. extracelulární polymerní látky biofilmu), která zabraňuje vstupu iontů do buňky a brání jim před stresem vyvolaným toxickými kovy.^{49–53} Dle dostupných informací, Panáček a kol. byli jediní, kteří se nově vybudovaný mechanismus rezistence pokoušeli překonat. Tvorbu flagelinu (zapříčiňujícího bakteriální rezistenci) se jim nakonec podařilo potlačit přidávkou extraktu z kůry granátového jablka, který zabránil agregaci nanočástic a nanočástice si tak dokázaly zachovat své antibakteriální vlastnosti.⁴⁶

6. Cytotoxické účinky nanočástic

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, 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.

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.^{54,55} 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 toxičtější než stejné nanočástice s o něco větší velikostí.^{56–58} Tvar částic také ovlivňuje cytotoxicitu a mechanismus buněčného příjmu, přičemž například v práci Stoeher a kol., sférické nanočástice na rozdíl od nanodrátů nevykazovali vůči buňkám A549 žádné toxické účinky.⁵⁹ 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.^{60–62}

7. Využití fototermálních účinků nanočástic

Nanočástice stříbra absorbují a rozptylují světlo s mimořádnou účinností, a přítomnost nanočástic tedy vede k zesílení intenzity lokálního elektromagnetického pole a část vyzářena energie se uvolní ve formě tepla.^{63,64}

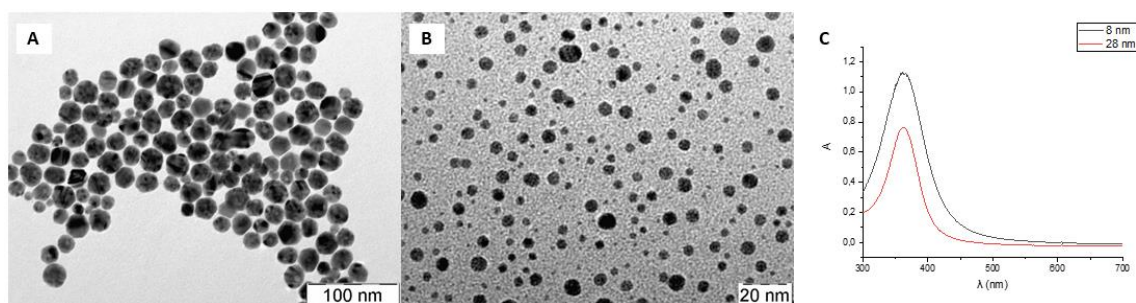
Dosavadní studie *in vitro* a *in vivo* potvrzují, že fototermální terapie je účinná při eradikaci řady nádorových buněčných linií.^{65,66} Nanočástice stříbra různých tvarů byly využívány nejen k léčbě rakoviny prsu,⁶⁷ ale i vaječníků⁶⁸ buněčných linií karcinomu kůže⁶⁹ a likvidaci nádorových buněk plic⁷⁰ a prostaty, kde fototermální terapie zvýšila antioxidační aktivitu, indukovala apoptózu, inhibovala angiogenezi, snížila histologické změny v prostatě potkanů a zlepšila biokompatibilitu životně důležitých orgánů.⁷¹

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 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,⁷² 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 biomedicíně.⁷³

VÝSLEDKY A DISKUSE

8. Příprava a stabilizace nanočástic

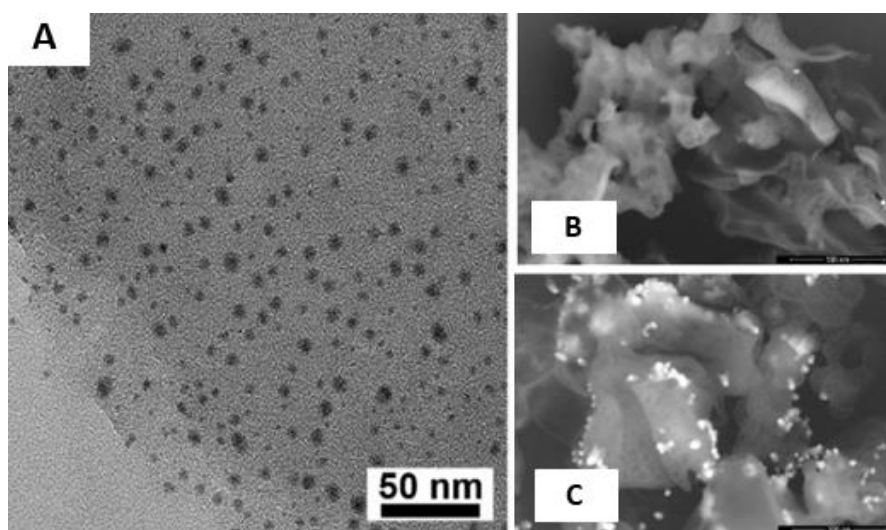
V rámci disertační práce byly připraveny nanočástice stříbra a jejich kompozity, jež byly následně charakterizovány a testovány pro jejich možné využití v antibakteriální a fototermální terapii. Základními nanočásticemi používanými v rámci výzkumné práce byly nanočástice stříbra připravené redukcí maltózou (Ag28) a tetrahydridoboritanem sodným (borohydridem, Ag8). 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. Tetrahydridoboritan sodný je silné redukční činidlo a v jeho přítomnosti docházelo k tvorbě více zárodků, a tedy menších částic (8 nm), což bylo taktéž potvrzeno na základě TEM snímků (Obrázek 1A, 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 1C).



Obrázek 1. Snímky nanočástic stříbra z transmisního elektronového mikroskopu připravené redukcí maltózou (A), tetrahydridoboritanem sodným (B) a jejich absorpční spektra (C).

Kromě řady stabilizačních činidel byly nanočástice stabilizovány imobilizací na povrch grafenového derivátu a na vrstvy nitridu uhlíku, jež sloužily k pevnému navázání nanočástic, jež jim znemožnilo spojování a 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 silným redukčním činidlem tetrahydridoboritanem sodným, čímž byl získán konečný produkt GCN/Ag sestávající se z malých nanočástic stříbra o velikosti 4 až 8 nm (Obrázek 2A).¹⁴ Dalším vrstevnatým materiálem, na jehož povrch byly imobilizovány stříbrné nanočástice, byl nitrid uhlíku. Příprava tohoto materiálu vycházela z nanovrstvy g-C₃N₄ 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 g-C₃N₄.¹⁵ Druhá fáze přípravy zahrnovala 10minutové ozáření (416 nm, 10 W LED) g-C₃N₄ s již adsorbovanými Ag⁺ ionty, které byly vlivem záření redukovány na stříbrné nanočástice a mohl tak vzniknout nanokompozit Ag/ g-C₃N₄ (Obrázek 2B, C). Takto připravené nanočástice stříbra jsou pevně vázány na povrch, netvoří agregáty a zůstávají tak stabilní.



Obrázek 2. (A) TEM snímky GCN/Ag a distribuce velikosti částic (C)⁷⁴ (B) SEM snímky nanokompozitů 1% Ag/g-C₃N₄ a C) 5% Ag/g-C₃N₄. Měřítko 500 nm.¹⁵

9. 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

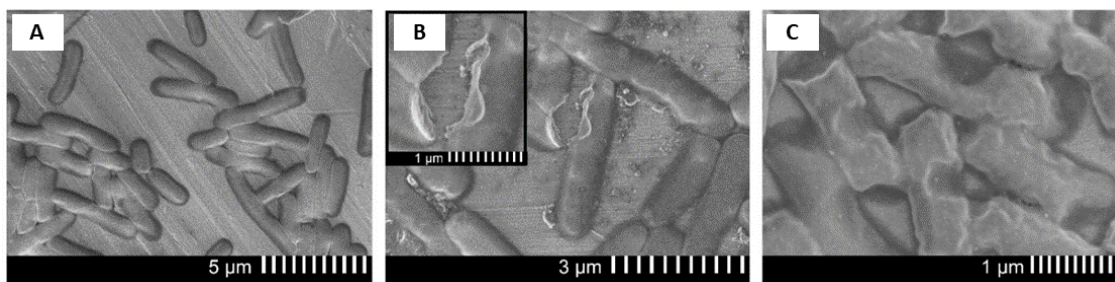
Vysoká antibakteriální aktivita nanočástic stříbra různých velikostí, tvarů a povrchových modifikací byla v minulosti široce studována a byla popsána v celé řadě vědeckých publikací, jež jsou v krátkosti popsány v rámci teoretické části této práce. Námi získané výsledky pro různě velké nanočástice (Ag8, 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.^{39–41} 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.^{75,76}

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 nanesených 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.^{77,78} 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.^{79–82}

Mechanismus antibakteriálního účinku

Velkou devízou stříbrných nanočástic je jejich víceúrovňový (multimodální) mechanismus účinku, kdy nanočástice stříbra působí na bakteriální buňku hned několika mechanismy současně. 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. Mimo mechanismu účinku založený na produkci ROS, jež byla v přítomnosti grafenového derivátu značně navýšena, tak bylo předpokládáno i poškození bakteriální stěny a membrány v důsledku vazby stříbrných nanočástic na jejich povrch, což bylo potvrzeno na základě snímků ze skenovací elektronové mikroskopie (Obrázek 3), jež poukázala na tvorbu děr, takzvaných „pits“ na bakteriální stěně.



Obrázek 3. A) SEM snímek bakterie *E. coli* a snímky bakterií (B, C) vystavených účinkům GCN/Ag v subinhibiční koncentraci (0,2 mg/L).¹⁴

10. 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. 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.

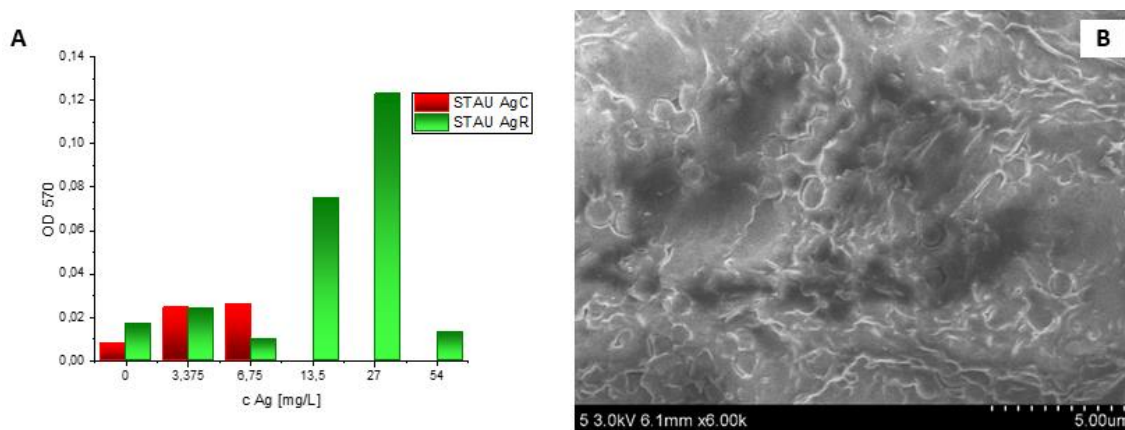
Rezistence vůči nanočásticím stříbra byla už dříve v rámci naší skupiny indukována u Gram-negativní bakterie *E. coli* a *P. aeruginosa*. Rychlost tvorby rezistence bakterií u Gram-pozitivního kmene *S. aureus* byla o něco pomalejší a ve srovnání s Gram-negativní *E. coli* se vyvíjela v pozdějších kultivačních krocích, ale do dvacátého kroku si byly všechny testované bakterie vůči účinkům nanočástic stříbra schopny vytvořit rezistenci. Spolu se zvyšováním MIC docházelo u obou bakterií ke změně zbarvení, vzniku sraženiny na dně jamky mikrotitrační destičky a posunu absorpčního spektra k delším vlnovým délkám. 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.^{30,32,33} Z těchto výsledků i z výsledků publikovaných Panáčkem a kol.⁴⁶ 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.

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.⁴⁶ 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.^{52,83,84} 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.⁸⁵ 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.^{86,87} 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 Christensenovu⁸⁸ metodu. V rámci Christensenovy metody bylo množství biofilmu produkovaného citlivou a rezistentní bakterií stanovováno na základě měření optické hustoty po obarvení biofilmu krystalovou violetí (CV). V přítomnosti nanočástic stříbra v nižších koncentracích (pod jejich příslušnou MIC) produkují citlivé i rezistentní kmeny nízké a přibližně stejné množství biofilmu. Při vyšších koncentracích, v intervalu 13,5 až 27 mg/L, se bakterie ve snaze eliminovat vysokou koncentrací nanočástic stříbra, brání svým nově vyvinutým mechanismem rezistence, kterým je tedy v tomto případě zvýšená produkce bakteriálního biofilmu, jež výrazně roste s rostoucí koncentrací nanočástic v systému (Obrázek 4).



Obrázek 4. A) Optická hustota (při 570 nm) biofilmu obarvená krystalovou violetí, a to v závislosti na množství nanočástic stříbra přítomných při kultivaci. (B) SEM snímky rezistentního *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^{89–91}, a také vzhledem k tomu, že PGRE byl použit k potlačení rezistence bakterií vůči nanočásticím stříbra u *E. coli*.⁴⁶ Díky tomuto přístupu tak může 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 obou mechanismů bakteriální rezistence.

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,⁴⁶ se nabízí možnost stabilizace částic pevným navázáním na povrch nanostrukturního substrátu, a využití kyanografen-stříbrného (GCN/Ag) nanokompozitu u něž nebyla pozorována nadměrná produkce biofilmu a lze ho tak využít jako materiál překonávající nově vytvořenou rezistenci vůči účinkům nanočástic stříbra u bakteriálního kmene *S. aureus*, ale zároveň i tu dříve indukovanou u bakteriálního kmene *E. coli* a *P. aeruginosa*.

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. 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.

11. 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.⁹² 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.⁹³

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 2) 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 nejnížší, nejvyšší a průměrné frakční inhibiční koncentrace (FIC) stanové pro každou dvojici antibiotikum-GCN/Ag.

Tabulka 2. 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)

Každé z antibiotik testovaných v rámci tohoto výzkumu patří do jiné třídy antibiotik a působí na bakterie jiným mechanismem.⁹⁴ 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, jež zvyšuje propustnost bakteriálních buněk, což umožňuje gentamicinu dosáhnout jeho intracelulárního cílového místa.

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,⁹⁵ 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.⁹⁶ 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,⁹⁵ 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.

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 rezistentním 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.

12. Nanočástice stříbra ve fototermální terapii

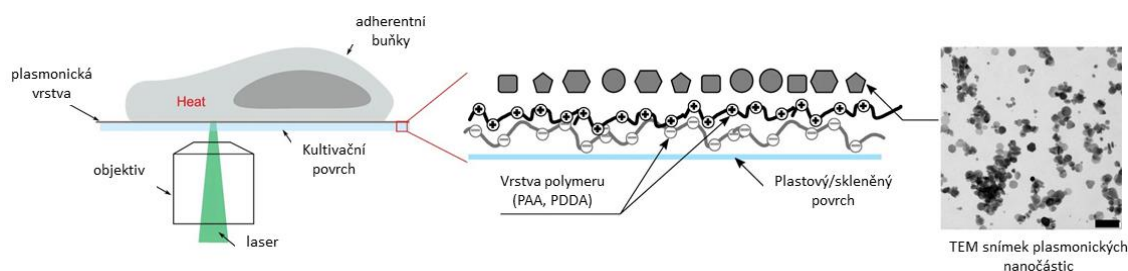
Fototermální účinek nanočástic stříbra byl v rámci tohoto výzkumu používán k cílenému poškození proteinů v buňkách kultivovaných na plazmonických nanočásticích stříbra nanesených ve formě vrstvy na kultivačních destičkách. Povrch mikrotitračních destiček byl modifikován vrstvou anizotropních stříbrných nanočástic, které po ozáření lasery používanými ve skenovacích mikroskopech umožnily 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 5A), tedy i různých optických vlastností projevujících se různou polohou maxima v UV-VIS absorpčním spektru (Obrázek 5B, C). 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.



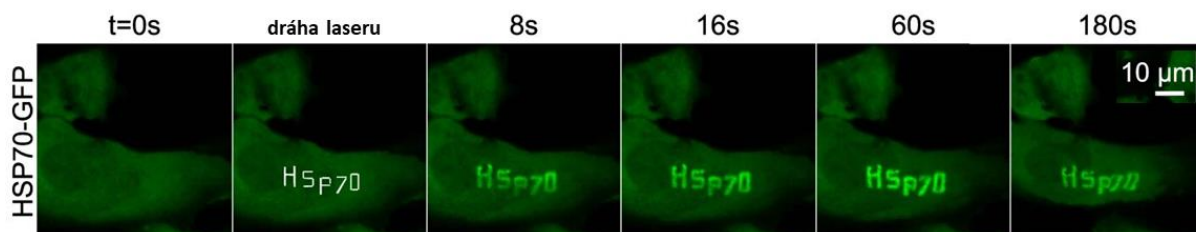
Obrázek 5. TEM snímky anizotropních částic stříbra používaných pro depozici na destičku (B, vzorek 5). Vodné disperse anizotropních nanočástic stříbra (B) a jejich absorpční spektra (C)

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 6) 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).⁹⁷ V tomto případě byly vybrány částice s maximem povrchové plasmonové rezonance, co nejbližše 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 6. 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.

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.⁹⁸ 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 7)



Obrázek 7. Zapojení 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.

13. 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),⁹⁹ 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.²³ 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.

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), což je přibližně 4 až 37krát více než jeho antibakteriální hodnoty MIC (Tabulka 1) a vykazuje tak tedy malou cytotoxicitu.¹⁴

Životaschopnost buněk g-C₃N₄ a nanokompozitů Ag/g-C₃N₄ byla taktéž po 24hodinové inkubaci s materiály hodnocena pomocí průtokové cytometrie na buňkách CCFR-CEM, THP-1, HEL, HeLa a A549. Samotné nanovrstvy nitridu uhlíku nevykazovaly cytotoxicitu pro žádnou z buněčných linií ani při nejvyšší testované koncentraci (300 mg/L) a všechny buňky si zachovaly 90 % životaschopnost 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 %.

Životaschopnost buněčných linií po vystavení nanokompozitu 5 % Ag/g-C₃N₄, 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.

ZÁVĚR

V rámci disertační práce byly redukcí stříbrných iontů různě silnými redukčními činidly připraveny nanomateriály na bázi stříbra s rozdílnými velikostmi. 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 přidavkem 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. Převezení 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.

PŘÍLOHY

Abstract: Silver-based nanomaterials with different sizes were prepared and their antibacterial activity was tested. Silver nanoparticles coated on cyanographene surface (GCN/Ag) performed the highest antimicrobial activity, which was caused by high production of reactive oxygen species and damage to the cell wall and bacterial membrane. In addition to the antibacterial effect of the graphene hybrid alone, the joint effect in combination with antibiotics that have lost their effectiveness against resistant strains and differ in their mechanism of action has also been studied. 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. Possible emergence of bacterial resistance to this material to secure a long-term use of this alternative was tested. By gradually exposing the bacterium to low concentrations of silver nanoparticles, resistance was induced in *S. aureus* and was manifested by destabilisation of the particles and the formation of aggregates. The aggregation was caused by biofilm formation, which was the newly formed mechanism of resistance and was later overcome by addition of pomegranate rind extract or by binding of the nanoparticles to the 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 the 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 the nanoparticles.

LITERATURA

- 1** Bleeker, E. A. J. *et al. Regulatory Toxicology and Pharmacology* 65, 119–125 (2013)
- 2** Ni, B. *et al. Advanced Science* 2, (2015)
- 3** Viñes, F. *et al. Chemical Society Reviews* 43, 4922–4939 (2014)
- 4** Almatroudi, A. *Open Life Sciences* 15, 819–839 (2020)
- 5** Naik, A. N. *et al. Physical Chemistry Chemical Physics* 21, 4193–4199 (2019)
- 6** Thanh, N. T. K. *et al. Chemical Reviews* 114, 7610–7630 (2014)
- 7** Agnihotri, S. *et al. RSC Adv* 4, 3974–3983 (2014)
- 8** Helmlinger, J. *et al. RSC Adv* 6, 18490–18501 (2016)
- 9** Ranzoszek-Soliwoda, K. *et al. Journal of Nanoparticle Research* 19, (2017)
- 10** Wang, L. *et al. Mater Lett* 233, 184–187 (2018)
- 11** Agnihotri, S. *et al. RSC Adv* 4, 3974–3983 (2014)
- 12** Liu, J. *et al. Chemical Society Reviews* 45, 2308–2326 (2016)
- 13** Jaworski, S. *et al. Nanoscale Res Lett* 13, (2018)
- 14** Panáček, D. *et al. Advanced Science* 2003090, 3–10 (2021)
- 15** Svoboda, L. *et al. Colloids and surfaces B-Biointerfaces* 202, (2021)
- 16** Hotze, E. M. *et al. J Environ Qual* 39, 1909–1924 (2010)
- 17** Béltéky, P. *et al. Int J Nanomedicine* 14, 667–687 (2019)
- 18** Panáček, A. *et al. Chemistry of Materials* 26, 1332–1339 (2014)
- 19** O’neil Jim. (2016)
- 20** CDC. (2019)
- 21** Wang, L. *et al. International Journal of Nanomedicine* 12, 1227–1249 (2017)
- 22** Slavin, Y. N. *et al. Journal of Nanobiotechnology* 15, (2017)
- 23** Panáček, A. *et al. Biomaterials* 30, 6333–6340 (2009)
- 24** Panáček, A. *et al. Molecules* 21, 1–17 (2016)
- 25** Panáček, A. *et al. Colloids Surf B Biointerfaces* 142, 392–399 (2016)
- 26** Hwang, I. sok *et al. J Med Microbiol* 61, 1719–1726 (2012)
- 27** Saratale, G. D. *et al. J Clust Sci* 28, 1709–1727 (2017)
- 28** Carrizales, M. *et al. Antibiotics* 7, 1–13 (2018)
- 29** Franci, G. *et al. Molecules* 20, 8856–8874 (2015)
- 30** Kvítek, L. *et al. Journal of Physical Chemistry C* 112, 5825–5834 (2008)
- 31** Li, W. R. *et al. BioMetals* 24, 135–141 (2011)
- 32** Panáček, A. *et al. Journal of Physical Chemistry B* 110, 16248–16253 (2006)
- 33** Sivera, M. *et al. PLoS One* 9, (2014)
- 34** Suchomel, P. *et al. PLoS One* 10, (2015)
- 35** Ahmad, A. S. *et al. Materials Science for Energy Technologies* 3, 756–769 (2020)
- 36** Qing, Y. *et al. International Journal of Nanomedicine* 13, 3311–3327 (2018)
- 37** Siddiqi, K. S. *et al. Journal of Nanobiotechnology* 16, (2018)
- 38** Tripathi, N. *et al. ACS Applied Bio Materials* 5, 1391–1463 (2022)
- 39** Abbaszadegan, A. *et al. J Nanomater* (2015)
- 40** Jeong, Y. *et al. Advances in Materials Science and Engineering* 2014, (2014)

- 41 Raza, M. A. *et al. Nanomaterials* 6, (2016)
- 42 Ferrag, C. *et al. Colloids Surf B Biointerfaces* 197, (2021)
- 43 Cheon, J. Y. *et al. Int J Nanomedicine* 14, 2773–2780 (2019)
- 44 Phanjom, P. *et al. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 8, (2017)
- 45 Graves, J. L. *et al. Front Genet* 5, (2015)
- 46 Panáček, A. *et al. Nat Nanotechnol* 13, 65–71 (2018)
- 47 Valentin, E. *et al. Nanoscale* 12, 2384–2392 (2020)
- 48 Elbehiry, A. *et al. Microbiologyopen* 8, (2019)
- 49 Teitzel, G. M. *et al. Appl Environ Microbiol* 69, 2313–2320 (2003)
- 50 Pereira, S. *et al. Microbiology (N Y)* 157, 451–458 (2011)
- 51 Ferris, F. G. *et al. FEMS Microbiol Lett* 24, 43–46 (1984)
- 52 Yang, Y. *et al. Environ Sci Technol Lett* 2, 221–226 (2015)
- 53 Khan, S. *et al. Journal of Environmental Sciences* 23, 346–352 (2011)
- 54 Zhang, T. *et al. Yonsei Medical Journal* 55, 283–291 (2014)
- 55 Akter, M. *et al. Journal of Advanced Research* 9, 1–16 (2018)
- 56 Wang, X. *et al. Small* 10, 385–398 (2014)
- 57 Gliga, A. R. *et al. Part Fibre Toxicol* 11, (2014)
- 58 Recordati, C. *et al. Part Fibre Toxicol* 13, (2016)
- 59 Stoehr, L. C. *et al. Part Fibre Toxicol* 8, (2011)
- 60 Mohanta, Y. K. *et al. Oxid Med Cell Longev* (2022)
- 61 Miethling-Graff, R. *et al. Toxicology in Vitro* 28, 1280–1289 (2014)
- 62 Sapkota, K. *et al. J Clust Sci* 28, 1605–1616 (2017)
- 63 Wang, L. *et al. Advanced Functional Materials* 30, (2020)
- 64 Zhang, Y. X. *et al. RSC Advances* 7, 45129–45144 (2017)
- 65 Fernandes, N. *et al. Biomaterials Science* 8, 2990–3020 (2020)
- 66 Lv, Z. *et al. Advanced Healthcare Materials* 10, (2021)
- 67 Thompson, E. A. *et al. International Journal of Hyperthermia* 30, 312–323 (2014)
- 68 Boca-Farcu, S. *et al. Mol Pharm* 11, 391–399 (2014)
- 69 Shivashankarappa, A. *et al. J Drug Target* 27, 434–441 (2019)
- 70 Boca, S. C. *et al. Cancer Lett* 311, 131–140 (2011)
- 71 Marghani, B. H. *et al. Life Sci* 291, (2022)
- 72 Hartl, F. U. *Annual Reviews Biochemistry* 86, 21–26 (2017)
- 73 Mistrik, M. *et al. Nat Commun* 12, (2021)
- 74 Hochvaldová, L. *et al. Sci Rep* 12, (2022)
- 75 Wang, X. *et al. Polymer Bulletin* 55, 105–113 (2005)
- 76 Sarwar, S. *et al. Nanomedicine* 12, 1499–1509 (2016)
- 77 Swasey, S. M. *et al. Sci Rep* 5, (2015)
- 78 Molleman, B. *et al. Environ Sci Nano* 4, 1314–1327 (2017)
- 79 Tacconelli, E. *et al. Lancet Infect Dis* 18, 318–327 (2018)
- 80 Khalil, O. *et al. Worlds Veterinary Journal* 10, 514–524 (2020)

- 81** Alqahtani, M. A. *et al. Sci Rep* 10, (2020)
- 82** Hamida, R. S. *et al. Front Bioeng Biotechnol* 8, (2020)
- 83** Salas-Orozco, M. *et al. Journal of Nanomaterials* 2019, (2019)
- 84** Jacqueline, C. *et al. Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69, (2014)
- 85** Black, C. E. *et al. Surgical Clinics of North America* 90, 1147–1160 (2010)
- 86** Venkatesan, N. *et al. Future Microbiology* 10, 1743–1750 (2015)
- 87** Craft, K. M. *et al. MedChemComm* 10, 1231–1241 (2019)
- 88** Christensen, G. D. *et al. J Clin Microbiol* 22, 996–1006 (1985)
- 89** Meléndez, P. A. *et al. Phytomedicine* 13, 272–276 (2006)
- 90** Braga, L. C. *et al. J Ethnopharmacol* 96, 335–339 (2005)
- 91** Panáček, A. *et al. Colloids Surf B Biointerfaces* 110, 191–198 (2013)
- 92** EUCAST. (2021)
- 93** Hochvaldová, L. *et al. Nanotechnol Rev* 11, 1115–1142 (2022)
- 94** Kırmusaoğlu, S. *et al. in Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods* (IntechOpen, 2019)
- 95** Röderova, M. *et al. Front Microbiol* 7, 1–12 (2017)
- 96** Trevizol, J. S. *et al. J Exp Clin Microbiol* 1, 8–11 (2018)
- 97** Zhao, S. *et al. Mater Lett* 60, 1215–1218 (2006)
- 98** Kim, Y. E. *et al. Annual Review of Biochemistry* 82, 323–355 (2013)
- 99** Kovács, D. *et al. International Journal of Molecular Sciences* 23, (2022)