

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**FOTODYNAMICKÁ INAKTIVACE MIKROORGANISMŮ
(AZA)FTALOCYANINOVÝMI FOTOSENSITIZÉRY**

Bc. Pavlína Holmanová

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Klára Konečná Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala svému vedoucímu diplomové práce RNDr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D. za vedení práce, odborné rady a ochotu při konzultacích. Velké poděkování patří také mé konzultantce RNDr. Kláře Konečné Ph.D. mimo jiné za naplánování experimentální části práce, pomoc s interpretací výsledků a psychickou podporu. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za trpělivost, všeobecnou podporu a zázemí, které mi při studiu poskytuje.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 10. 5. 2021

Bc. Pavlína Holmanová

Obsah

1. OBSAH

2. ABSTRAKT	8
3. ABSTRACT	10
4. ÚVOD	12
5. TEORETICKÁ ČÁST.....	13
5.1 Charakteristika antimikrobní fotodynamické terapie.....	13
5.1.1 Princip fotodynamické terapie	14
5.1.1.1 Fotoreakce typu I a II, lokalizace účinku	15
5.2 Obecná charakteristika fotosensitizerů	16
5.2.1 Fotosensitizerý jsou endogenního i exogenního původu	16
5.2.2 Ideální vlastnosti fotosensitizerů využitelných pro fotodynamickou terapii	17
5.2.3 Typy fotosensitizerů dle chemické struktury.....	18
5.2.3.1 Tři generace fotosensitizerů	18
5.2.3.2 Charakteristika fotosensitizerů odvozených od struktury ftalocyaninu	19
5.3 Využití fotosensitizačních reakcí.....	21
5.3.1 Fotosensitizace v nádorové terapii.....	21
5.3.2 Fotodynamická inaktivace mikroorganismů.....	23
5.3.2.1 Biofilm jakožto příčina rezistence mikroorganismů.....	23
5.3.2.2 Potencionální vývoj rezistencí vůči aPDT	25
6. CÍLE PRÁCE	27
7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
7.1 Testovací mikroorganismy.....	28
7.1.1 Meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>	28
7.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
7.1.3 <i>Candida albicans</i>	29
7.2 Pomůcky, přístroje a materiál.....	30
7.2.1 Použité reagentie a kulturační půdy	30
7.2.2 Pracovní pomůcky	33

7.2.3	Pracovní přístroje.....	33
7.3	Kultivace mikroorganismů.....	34
7.4	Příprava buněčné suspenze, koncentrační řady testovaných fotosensitizerů a následné ozáření.....	34
7.5	Metody detekce životaschopnosti mikrobiálních agens po interakci s testovanou látkou	35
7.5.1	Hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C .	35
7.5.2	Výsevová metoda	38
7.5.3	Určení metabolické aktivity mikroorganismů – Alamar Blue assay	39
8.	VÝSLEDKY.....	41
8.1	Fotosensitizer P44	41
8.1.1	Vyhodnocení aktivity P44 vůči meticilin rezistentní bakterii <i>Staphylococcus aureus</i>	41
8.1.1.1	Doba ozáření - 15 minut	41
8.1.1.2	Doba ozáření - 30 minut	43
8.1.1.3	Určení vlastní antibakteriální aktivity P44 (bez ozáření) na meticilin rezistentní bakterii <i>Staphylococcus aureus</i>	45
8.1.2	Vyhodnocení aktivity P44 vůči bakterii <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
8.1.2.1	Doba ozáření - 15 minut	47
8.1.2.2	Doba ozáření - 30 minut	48
8.1.2.3	Určení vlastní antibakteriální aktivity P44 (bez ozáření) na bakterii <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
8.1.3	Vyhodnocení aktivity P44 vůči kvasince <i>Candida albicans</i>	51
8.1.3.1	Doba ozáření - 15 minut	51
8.1.3.2	Doba ozáření - 30 minut	53
8.1.3.3	Určení vlastní antifungální aktivity P44 (bez ozáření) na kvasinku <i>Candida albicans</i>	55
8.2	Fotosensitizer HK18.....	57
8.2.1	Vyhodnocení aktivity HK18 vůči meticilin rezistentní bakterii <i>Staphylococcus aureus</i>	57
8.2.1.1	Doba ozáření - 15 minut	57
8.2.1.2	Doba ozáření - 30 minut	59
8.2.1.3	Určení vlastní antibakteriální aktivity HK18 (bez ozáření) na meticilin rezistentní bakterii <i>Staphylococcus aureus</i>	61
8.2.2	Vyhodnocení aktivity HK18 vůči bakterii <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62
8.2.2.1	Doba ozáření - 15 minut	62

8.2.2.2	Doba ozáření - 30 minut	64
8.2.2.3	Určení vlastní antibakteriální aktivity HK18 (bez ozáření) na <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66
8.2.3	Vyhodnocení aktivity HK18 vůči kvasince <i>Candida albicans</i>	67
8.2.3.1	Doba ozáření - 15 minut	67
8.2.3.2	Doba ozáření - 30 min.....	69
8.2.3.3	Určení vlastní antimykotické aktivity HK18 (bez ozáření) na <i>Candida albicans</i>	71
8.3	Fotosensitizer P42	72
8.3.1	Vyhodnocení aktivity P42 vůči meticilin rezistentní bakterii <i>Staphylococcus aureus</i>	72
8.3.1.1	Doba ozáření - 15 minut	72
8.3.1.2	Doba ozáření - 30 minut	74
8.3.1.3	Určení vlastní antibakteriální aktivity P42 (bez ozáření) na meticilin rezistentní bakterii <i>Staphylococcus aureus</i>	76
8.3.2	Vyhodnocení aktivity P42 vůči bakterii <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	77
8.3.2.1	Doba ozáření - 15 minut	77
8.3.2.2	Doba ozáření - 30 minut	79
8.3.2.3	Určení vlastní antibakteriální aktivity P42 (bez ozáření) na bakterii <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	82
8.3.3	Vyhodnocení aktivity P42 vůči kvasince <i>Candida albicans</i>	84
8.3.3.1	Doba ozáření - 15 minut	84
8.3.3.2	Doba ozáření - 30 minut	86
8.3.3.3	Určení vlastní antifungální aktivity P42 (bez ozáření) na kvasinku <i>Candida albicans</i>	88
8.4	Fotosensitizer ZIP300	90
8.4.1	Vyhodnocení aktivity ZIP300 vůči meticilin rezistentní bakterii <i>Staphylococcus aureus</i>	90
8.4.1.1	Doba ozáření - 15 minut	90
8.4.1.2	Doba ozáření - 30 minut	92
8.4.1.3	Určení vlastní antibakteriální aktivity ZIP300 (bez ozáření) na meticilin rezistentní bakterii <i>Staphylococcus aureus</i>	94
8.4.2	Vyhodnocení aktivity ZIP300 vůči bakterii <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95
8.4.2.1	Doba ozáření - 15 minut	95
8.4.2.2	Doba ozáření - 30 minut	96
8.4.2.3	Určení vlastní antibakteriální aktivity ZIP300 (bez ozáření) na bakterii <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99

8.4.3	Vyhodnocení aktivity ZIP300 vůči kvasince <i>Candida albicans</i>	101
8.4.3.1	Doba ozáření - 15 minut	101
8.4.3.2	Doba ozáření - 30 minut	103
8.4.3.3	Určení vlastní antifungální aktivity ZIP300 (bez ozáření) na kvasinku <i>Candida albicans</i>	105
8.5	Methylenová modř	107
	Vyhodnocení aktivity Methylenové modři vůči meticilin rezistentní bakterii <i>Staphylococcus aureus</i>	107
8.5.1.1	Doba ozáření - 15 minut	107
8.5.1.2	Doba ozáření - 30 minut	109
8.5.1.3	Určení vlastní antibakteriální aktivity Methylenové modři (bez ozáření) na meticilin rezistentní bakterii <i>Staphylococcus aureus</i>	112
8.5.2	Vyhodnocení aktivity Methylenové modři vůči bakterii <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 113	
8.5.2.1	Doba ozáření - 15 min.....	113
8.5.2.2	Doba ozáření - 30 min.....	115
8.5.2.3	Určení vlastní antibakteriální aktivity Methylenové modři (bez ozáření) na bakterii <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	117
8.5.3	Vyhodnocení aktivity Methylenové modři vůči kvasince <i>Candida albicans</i> 118	
8.5.3.1	Doba ozáření - 15 min.....	118
8.5.3.2	Doba ozáření - 30 min.....	120
8.5.3.3	Určení vlastní antifungální aktivity Methylenové modři, bez ozáření, na kvasinku <i>Candida albicans</i>	122
9.	DISKUSE	124
10.	ZÁVĚRY	130
11.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	131
12.	POUŽITÁ LITERATURA.....	132

2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Autor: Bc. Pavlína Holmanová

Školitel: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Název diplomové práce: Fotodynamická inaktivace mikroorganismů (aza)ftalocyaninovými fotosensitizéry

Cíl práce: Cílem této práce bylo provést optimalizaci metodických přístupů pro hodnocení antimikrobní aktivity vybraných (aza)ftalocyaninových fotosensitizérů (PSs) *in vitro*. Dále pak u kandidátních látek vyjádřit jejich *in vitro* antimikrobní aktivitu vůči třem klinicky významným patogenům. Jmenovitě jsou to: gram pozitivní bakterie meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), gram negativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (PA) a kvasinka *Candida albicans* (CA).

Metody: Mikroorganismy byly inkubovány s danými PSs, které byly následně odmyty, a mikroorganismy s navázanými PSs byly ozářeny po dobu 15 či 30 min. Paralelně byla stanovena i vlastní antimikrobní aktivita studovaných látek bez ozáření. K určení případné minimální baktericidní koncentrace (MBC)/minimální fungicidní koncentrace (MFC) byly použity tři různé metodické přístupy. K hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu byl použit přístroj Bioscreen C. Byla také použita metodika pro hodnocení metabolické aktivity s využitím resazurinu. Poslední zavedenou metodou pro hodnocení antimikrobní aktivity studovaných látek byla výsevová metoda.

Výsledky: Z vybraných čtyř kandidátních látek vykazovala nejslibnější antimikrobní potenciál amfifilní kationická látka s pracovním označením P42. Stanovená aktivita vůči SA činila $MBC \leq 0,01 \mu M$, vůči PA byla určena $MBC = 20 \mu M$ a vůči CA vykazovala látka P42 aktivitu $MBC = 0,5 \mu M$. Především s ohledem na technickou náročnost a také možnosti hodnocení, byl jako nezpůsobilejší metodický přístup pro *in vitro* screening antimikrobních aktivit PSs určen ten, který je založený na mapování růstové dynamiky.

Závěr: Celý svět se potýká se závažným problémem týkající se fenoménu mikrobiální rezistence. Jak sama Světová zdravotnická organizace uvádí, pokud nedojde k efektivnímu

řešení tohoto problému, v blízké budoucnosti lze očekávat velmi závažné socio-ekonomické dopady ve společnosti. Jeden z alternativních přístupů terapie infekčních onemocnění zahrnuje antimikrobní fotodynamickou terapii, s užitím látek zvaných PSs. V rámci této práce byla provedena pilotní studie antimikrobní aktivity čtyř kandidátních, nových PSs, z nichž tři vykazaly slibný účinek na bakteriální kmen MRSA, jedna látka rovněž navíc vykazala slibný účinek na kvasinku CA, a jedna látka vykazala slibný účinek na všechny tři testované mikrobiální kmeny.

Klíčová slova: antimikrobní fotodynamická terapie, (aza)ftalocyaninové fotosensitizéry, dynamika mikrobiálního růstu, metabolická aktivita, výsevová metoda

3. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Author: Bc. Pavlína Holmanová

Supervisor: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Consultant: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Title of diploma thesis: Photodynamic inactivation of microorganisms using (aza)phthalocyanine photosensitisers

Background: This work is aimed to optimize methodological approaches for the evaluation of the antimicrobial activity of selected representative (aza)phthalocyanine photosensitizers (PSs) *in vitro*. In addition, the *in vitro* antimicrobial activity of candidate PSs was evaluated against three clinically important pathogens. Namely, gram positive methicillin resistant bacterium *Staphylococcus aureus* (MRSA), gram negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* (PA), and yeast *Candida albicans* (CA) were included in the study.

Methods: Microorganisms were incubated with the selected PSs, which were subsequently washed away, and microorganisms with bound PSs were irradiated for 15 or 30 min. At the same time, the intrinsic antimicrobial activities of the studied compounds without irradiation were determined as well. Three different methodological approaches were used to evaluate the minimum bactericidal concentration (MBC)/minimum fungicidal concentration (MFC). The Bioscreen C instrument was used for an assessment of the dynamics of microbial growth. A methodology for the evaluation of metabolic activities using resazurin was also included. The third method for evaluating the antimicrobial activity of the studied compounds was the spread plate technique.

Results: Of the selected four candidate compounds, the most promising antimicrobial potential showed the amphiphilic cationic compound with the working designation P42. The determined activity against SA was $MBC \leq 0,01 \mu M$, against PA was $MBC = 20 \mu M$, and against CA a compound P42 showed activity $MBC = 0,5 \mu M$. Especially, concerning the technical complexity and evaluation options for screening *in vitro* antimicrobial activities of PSs, the methodical approach consisted of mapping of growth dynamics was recognized to be the most suitable.

Conclusions: The whole world is facing a severe problem related to the phenomenon of microbial resistance. As the World Health Organization states, if this problem is not addressed effectively, severe socio-economic impacts can be expected shortly.

One alternative approach for the treatment of infectious diseases involves antimicrobial photodynamic therapy, using a drugs called PSs. In this work, a pilot study of the antimicrobial activity of four novel candidate compounds was performed. In three of them, promising activity against the bacterial strain MRSA was revealed. One tested compound also showed a promising effect against the yeast CA, and one compound showed a promising effect against all three microbial strains.

Key words: antimicrobial photodynamic therapy, (aza)phthalocyanine photosensitizers, dynamics of microbial growth, metabolic activity, spread plate method

4. ÚVOD

Neustálé zneužívání antimikrobních preparátů má za následek antimikrobní rezistenci, což je v současné době velký celosvětový problém, kterým se zabývá i Světová zdravotnická organizace. Jedním z možných řešení je hledání alternativní terapie (Salameh *et al.* 2015).

Vhodným přístupem může být například i antimikrobní fotodynamická terapie (aPDT, antimicrobial photodynamic therapy) (Cieplik *et al.* 2018).

aPDT pomocí fotosenzitizerů (PSs, photosensitizers) v principu spočívá ve vazbě netoxické látky, která je následně aktivována viditelným světlem. Díky ozáření PSs dojde ke vzniku reaktivních forem kyslíku, které v konečném důsledku prostřednictvím oxidačního stresu vedou k neselektivní destrukci mikroorganismu (Aveline, 2001; Tim, 2015).

Díky svému neselektivnímu přístupu je velmi nepravděpodobné, že by si mikroorganismy byly schopny vyvinout nějaký mechanismus rezistence vůči tomuto typu terapie. A právě proto může být aPDT vhodným alternativním přístupem v řešení celosvětového problému antimikrobní rezistence (Cieplik *et al.*, 2018; Maisch, 2015; Salameh *et al.*, 2015; Wainwright *et al.*, 2017).

Teoretická část této práce je zaměřena především na úvod do problematiky týkající se aPDT, dále jsou zmíněny typy PSs a využití fotosensitizačních reakcí obecně. Práce také zběžně pojednává o problematice mikrobiálních biofilmů a jejich rezistenci, a zmíněny jsou rovněž možnosti terapeutického řešení infekcí sdružených s tvorbou biofilmu prostřednictvím aPDT.

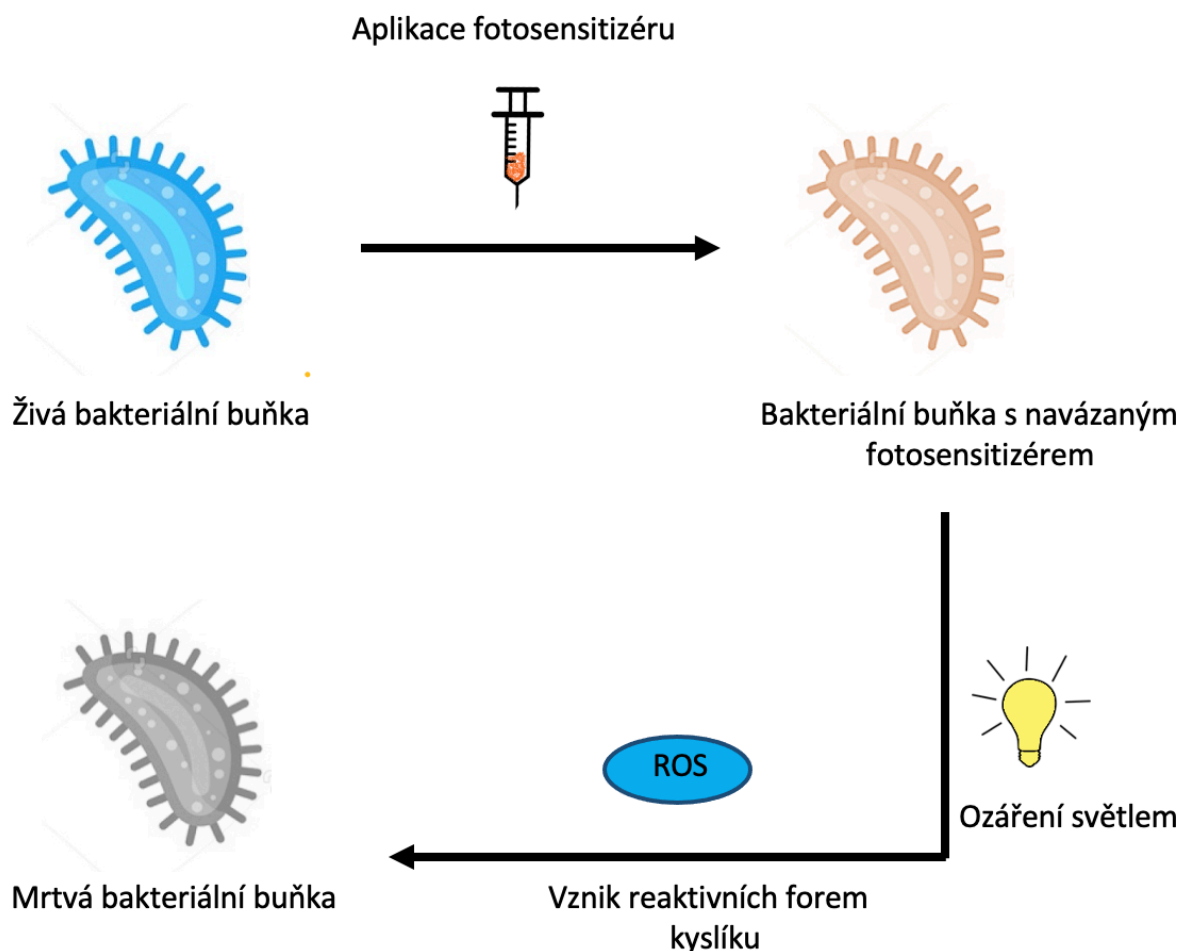
V experimentální části práce byly optimalizovány metodické přístupy pro hodnocení aktivity kandidátních (aza)ftalocyaninových PSs vůči třem klinicky významným mikroorganismům ze skupiny grampozitivních bakterií (G+): meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, gramnegativních bakterií (G–): *Pseudomonas aeruginosa* a kvasinek: *Candida albicans*. Studované látky byly syntetizovány na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové ve skupině pana prof. Zimčíka. Konkrétně byla hodnocena antimikrobní aktivita látek s pracovním označením P44, HK18, P42, ZIP300 a pro komparace námi dosažených výsledků s publikovanými studiemi bylo do testování zavedeno komerčně dostupné tricyklické barvivo – methylenová modř. Paralelně s testováním antimikrobní aktivity PSs po světlené expozici byla pro všechny studované látky stanovena i toxicita kandidátních látek bez ozáření (vlastní toxicita).

5. TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Charakteristika antimikrobní fotodynamické terapie

aPDT je terapie zaměřená proti mikroorganismům skládající se z podání samo o sobě netoxické molekuly fotosenzitizeru (PS, photosensitiser) a její následné aktivaci viditelným světlem (Tim, 2015).

Aktivace PS spočívá v podstatě v absorpci světla chromoforem této molekuly, což vede k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species). V mikrobiální buňce se tak v důsledku působení ROS zahájí složité biochemické procesy vedoucí ke změně či ztrátě biologické aktivity, které v konečném důsledku mohou prostřednictvím oxidačního stresu způsobit neselektivní zničení mikroorganismů, jak je znázorněno na zjednodušeném schématu na Obrázku 1 (Aveline, 2001; Tim, 2015).



Obrázek 1: Schématické znázornění antimikrobní fotodynamické terapie. ROS – reaktivní formy kyslíku.

5.1.1 Princip fotodynamické terapie

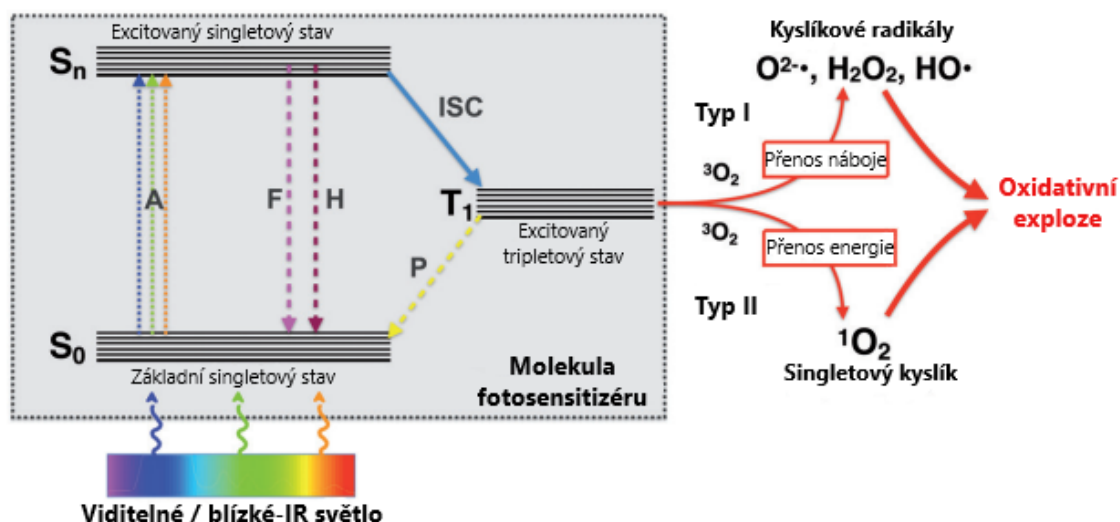
Princip fotodynamické terapie (PDT, photodynamic therapy) je založen na kombinaci tří složek. První složkou je netoxická molekula PS, dále pak světlo spektrálního rozsahu vhodné pro vybuzení PS do excitovaného stavu a v poslední řadě zde figuruje složka v podobě molekulárního kyslíku ($^3\text{O}_2$) (Wainwright, 1998; Wainwright *et al.*, 2017).

Mechanismus PDT podrobněji znázorňuje Jablonského diagram (Obrázek 2). PS absorbuje foton, čímž se dostává ze svého základního singletového stavu (S_0) do excitovaného singletového stavu (S_n). PS poté může energii ztratit přes vnitřní konverze emitováním fotonu ve formě fluorescence či tepla, čímž se vrátí na S_0 . Nebo může být přeměněn takzvaným mezisystémovým přechodem (ISC, intersystem crossing) na stabilnější excitovaný tripletový stav (T_1). Z tohoto stavu se PS může vrátit do S_0 buď emisí fotonu ve formě fosforescence, nebo generováním ROS. Tvorba ROS může probíhat dvěma základními procesy – tzv. fotoreakce typu I a II (Alves, *et al.*, 2014; Babtista *et al.*, 2017; Cieplik *et al.*, 2018; Maisch *et al.*, 2007; Wainwright *et al.*, 2017).

V případě mechanismu typu I se náboj (elektrony) přenesou na okolní substrát, čímž vznikne superoxidový aniontový radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$), který může dále podlehnout dismutaci a dát tak vznik peroxidu vodíku (H_2O_2), což je prekurzor vysoce reaktivních hydroxylových radikálů ($\text{HO}\cdot$), které z peroxidu vodíku vznikají Fentonovou reakcí (Alves, *et al.*, 2014; Babtista *et al.*, 2017; Cieplik *et al.*, 2018; Maisch *et al.*, 2007; Wainwright *et al.*, 2017).

V případě mechanismu typu II je energie (ale bez náboje) přenesena přímo na $^3\text{O}_2$ v základním stavu, což vede ke vzniku singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$), který je mnohem reaktivnější než běžný tripletový kyslík a pro svoji reaktivitu je také zařazován mezi ROS (Alves, *et al.*, 2014; Babtista *et al.*, 2017; Cieplik *et al.*, 2018; Maisch *et al.*, 2007; Wainwright *et al.*, 2017).

Po takovémto cyklu absorpce a generování ROS je PS opět v S_0 a je připraven k absorpci nového fotonu a generování dalších ROS. To znamená, že PSs se obvykle během fotochemických reakcí nespotřebovávají. Jedna molekula PS tak může generovat tisíce molekul ROS. Poměr obou fotodynamických mechanismů je jedinečný pro každý PS a závisí na příslušné chemické struktuře (Alves, *et al.*, 2014; Babtista *et al.*, 2017; Cieplik *et al.*, 2018; Maisch *et al.*, 2007; Wainwright *et al.*, 2017).



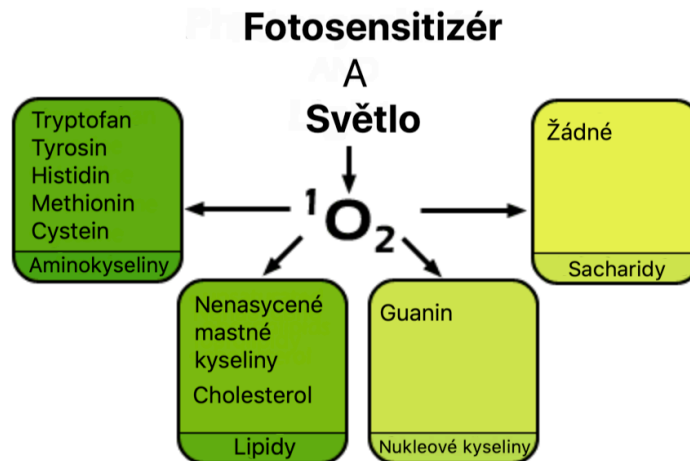
Obrázek 2: Zjednodušený modifikovaný Jablonského diagram. S_0 – základní singletový stav, S_n – excitované singletové stavy, A – absorbovaný foton, F – emitovaný foton ve formě fluorescence, H – teplo, ISC – mezisystémový přechod, T_1 – excitovaný tripletový stav, P – emitovaný foton ve formě fosforescence. Převzato a upraveno z Cieplik *et al.*, 2018.

5.1.1.1 Fotoreakce typu I a II, lokalizace účinku

Mnoho důležitých reakcí s různými PSs probíhá dle mechanismu typu II. 3O_2 je relativně nereaktivní a je tedy schopen se rychle šířit přes širokou škálu biologických prostředí včetně buněčných membrán, které většinou pro mnoho látek působí jako bariéra. Oproti tomu 1O_2 , vznikající fotoreakcí typu II z 3O_2 , reaguje s lipidy a proteiny, čímž se omezuje schopnost difúze na velké vzdálenosti. Biologické struktury, s nimiž 1O_2 dobře reaguje, jsou uvedeny na Obrázku 3. Fotoreakce typu II tedy ovlivňuje biologické substráty pouze ve velmi krátké vzdálenosti od PSs (cca 0,02 – 0,15 μM) (Oleinick, 2011; Babtista *et al.*, 2017).

U fotoreakce typu I vzniká $HO\cdot$, který je vysoce reaktivní a typicky tak interaguje s první molekulou, se kterou se setká. To omezuje účinek reakce I. typu přímo na místo, kde je $HO\cdot$ generován (Oleinick, 2011; Babtista *et al.*, 2017).

Tato omezená vzdálenost působení ROS znamená, že lokalizace molekul PSs je klíčová pro případné biologické účinky. Ku příkladu lipofilní PS bude mít tendenci akumulovat se v membránách buněk, a po interakci s fotony spíše způsobí reakci s molekulami v membráně buněk než s molekulami v buněčné cytoplasmě. Podobný lokalizační jev je využíván i u PSs využívaných pro fotodynamickou terapii nádorů, kde je žádoucí, aby se PSs (a především PDT efekt) lokalizovaly především v maligní tkáni (Oleinick, 2011; Babtista *et al.*, 2017).



Obrázek 3: Reaktivita fotosensitizerů s biologickými strukturami skrze singletový kyslík, který snadno reaguje s mnoha biologickými substráty. ¹O₂ – singletový kyslík, Převzato a upraveno z: Oleinick, 2011.

5.2 Obecná charakteristika fotosensitizerů

5.2.1 Fotosensitizery jsou endogenního i exogenního původu

PSs mohou být jak endogenního, tak exogenního původu. K endogenním PSs řadíme molekuly jako jsou například porfyriny, bilirubin nebo chlorofyl. Tyto molekuly se přirozeně vyskytují v živých organismech, ale nejsou jim nijak nebezpečné, respektive jejich potencionální fotochemické účinky nejsou patrné. Je tomu tak proto, že koncentrace těchto endogenních PSs jsou příliš nízké, nebo proto že jejich molekuly jsou izolovány v komplexech, které inhibují fotochemické reakce (Oleinick, 2011).

Endogenní PSs je ale možno potencovat, aby k fotosensibilizaci došlo. Uvedme příklad protoporfyrinu IX (PpIX), což je běžný meziprodukt v biosyntetických drahách vedoucích k produkci hemoglobinu a myoglobinu. Za normálních podmínek jsou koncentrace volného PpIX příliš nízké na to, aby vyvolaly fotosensibilizaci. Pokud je ale v organismu nadbytek kyseliny 5-aminolevulové (ALA), nebo pokud je normální metabolická cesta narušena, PpIX se může hromadit a dojde tak k fotosensibilizaci. Narušení této metabolické cesty je hlavní příčinou skupiny onemocnění známých jako porfyrie. Mezi klinické příznaky porfyrie patří mimo jiné erytém, puchýře a zjizvení světlu vystavené kůže (Kakoullis, 2018; Oleinick, 2011).

Exogenní PSs jsou pro daný organismus, v němž mohou působit, cizí. Do této skupiny patří jak přírodní produkty (například z rostlin), tak uměle syntetizované látky. Jedná se o

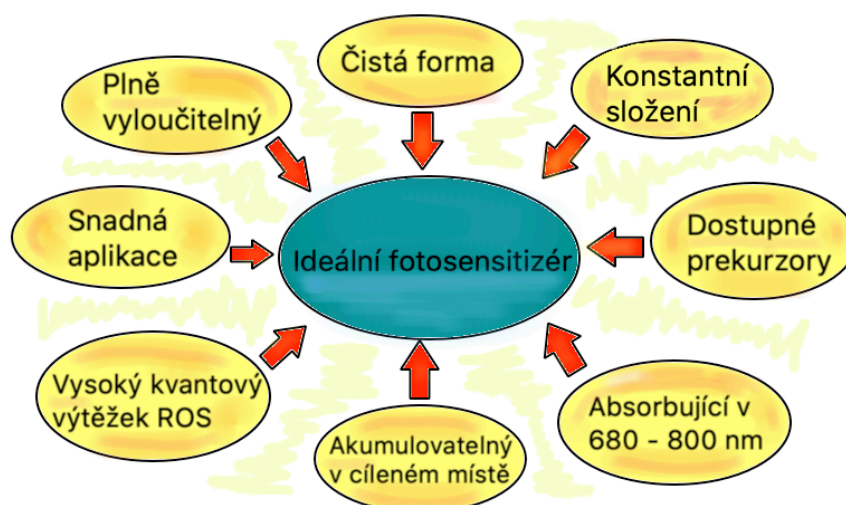
širokou škálu barviv a biomolekul, které byly připraveny pro lékařské, zemědělské či jiné účely (Oleinick, 2011).

5.2.2 Ideální vlastnosti fotosensitizerů využitelných pro fotodynamickou terapii

Klíčovou charakteristikou každého z PSs je jeho schopnost přednostně se akumulovat v nemocné tkáni/cílovém mikroorganismu a generováním ROS vyvolat požadovaný biologický účinek. Ideální PS pro PDT by měl splňovat následující kritéria, která jsou také pro lepší přehled znázorněna na Obrázku 4.

- 1) Dostupnost v čisté formě se známým a konstantním chemickým složením.
- 2) Syntéza z dostupných prekurzorů a snadná reprodukce.
- 3) Vysoký kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$ a dalších ROS.
- 4) Silná absorpce v červené (a blízké infračervené) oblasti elektromagnetického záření (680–800 nm) s vysokým molárním absorpčním koeficientem (ϵ_λ).
- 5) Účinná akumulace v cíleném mikroorganismu/nádorové tkáni a nízká toxicita bez ozáření.
- 6) Stabilita a rozpustnost v tělních tekutinách, snadná aplikace do těla injekcí (případně jinými metodami).
- 7) Plné odstranění z těla po ukončené léčbě.

(Josefsen *et al.*, 2008; Ormond *et al.*, 2013; Pushpan *et al.*, 2002)



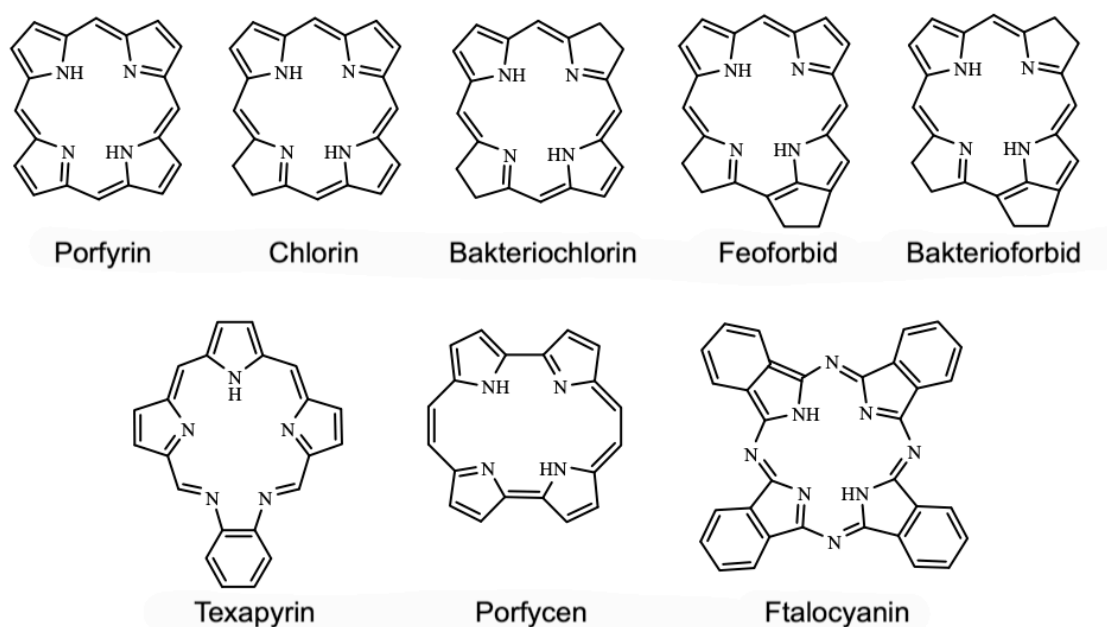
Obrázek 4: Schematické znázornění vlastností ideálního fotosensitizeru. ROS – reaktivní formy kyslíku.

5.2.3 Typy fotosenzitizérů dle chemické struktury

PSs využívané pro fotodynamickou terapii mají rozsáhlý systém konjugovaných dvojných vazeb a absorbují světlo ve viditelné oblasti spektra, což z nich dělá barevné sloučeniny. PSs lze obecně rozdělit na porfyrinoidní a neporfyrinoidní sloučeniny.

Mezi porfyrinoidní PSs patří porfyriny, chloriny, feoforbidy, bakteriofeoforbidy, texafyriny, ftalocyaniny (Pc) apod. Základní struktury některých porfyrinoidních fotosenzitizérů jsou uvedeny na Obrázku 5 (Ormond *et al.*, 2013).

Mezi neporfyrinoidní PSs se řadí antrachinony, fenothiaziny, xantheny, cyaniny, kurkuminoidy atd. Nejstudovanější PSs pro aPDT jsou především porfyrinoidní sloučeniny včetně chlorinů, bakteriochlorinů, Pc a dalších souvisejících struktur (Ormond *et al.*, 2013)



Obrázek 5: Základní struktury porfyrinoidních fotosenzitizérů. Převzato a upraveno z: Ormond *et al.*, 2013.

5.2.3.1 Tři generace fotosenzitizérů

PSs vhodné pro PDT lze klasifikovat na základě jejich chemického původu a struktury (viz výše) nebo dle jejich zařazení do generací. Běžně jsou kategorizovány do tří generací.

5.2.3.1.1 První generace fotosenzitizérů

Do první generace PSs patří především derivát hematoporfyrinu, který je registrován pod názvem Photofrin®. Tento PS se skládá z dimerů a oligomerů hematoporfyrinu izolovaného z hemu odstraněním centrálního atomu železa, který podstoupil další úpravy.

Photofrin® má ale jistá omezení zahrnující nízkou vlnovou délku vhodnou pro aktivaci (408 nm a 510 nm), nízký ϵ_λ , nutnost aplikace vysoké dávky PS a dlouhé přetrvání v organismu. I přes tyto nedostatky ale stále patří mezi jeden z nepoužívanějších PS (Zimčík *et al.*, 2004; Derosa, 2002).

5.2.3.1.2 Druhá generace fotosensitizerů

Druhá generace PSs zahrnuje především látky ze skupiny porfyrinů a s nimi příbuzné chloriny a bakteriochloriny, dále také PSs ze skupiny Pc a jejich derivátů. Jedná se o látky chemicky čisté s vyšší vlnovou délkou nutnou pro aktivaci (Zimčík *et al.*, 2004; Derosa, 2002).

Chloriny jsou stále úspěšnější a mohly by brzy překonat porfyriny využívané pro léčbu nádorů plic, jícnu, žaludku apod. Zejména látky registrované pod obchodními názvy Bremachlorin® a Temoporfin® se jeví jako nejúčinnější PSs druhé generace.

Pc jsou také velice perspektivními PSs, hlavně díky vyššímu absorpčnímu maximu (670–700 nm) a vyššímu ϵ_λ . Na druhou stranu jsou ale méně rozpustné ve vodě a některých organických rozpouštědlech, což vede k jejich agregaci a ztrátě aktivity – proto je nutná jejich modifikace (Zimčík *et al.*, 2004; Derosa, 2002).

5.2.3.1.3 Třetí generace fotosensitizerů

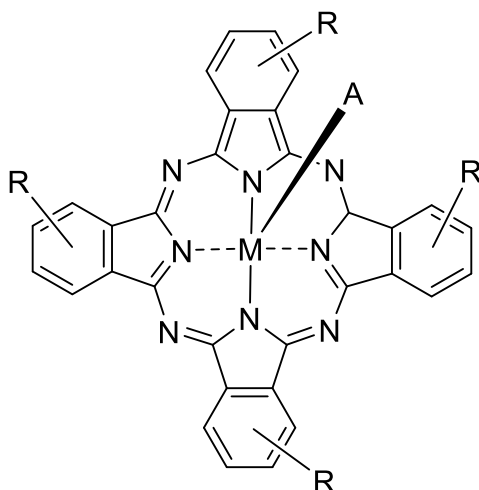
Do třetí generace patří látky vzniklé konjugací PSs druhé generace s různými biologickými molekulami, jako jsou například monoklonální protilátky. Díky tomu pak může docházet k cílené distribuci léčiva v organismu. (Zimčík *et al.*, 2004).

5.2.3.2 Charakteristika fotosensitizerů odvozených od struktury ftalocyaninu

Pc a azaftalocyaniny (AzaPc, Azaphthalocyanine) mají široké strukturní vlastnosti, díky čemuž mají poměrně široké spektrum využití. Byly úspěšně testovány a používány jako PSs pro různé lékařské aplikace, především pro léčbu nádorů a nemaligních stavů prostřednictvím PDT, dále také jako prostředek k aPDT. (Da Silva *et al.*, 2018; Lovell, 2012; Zhang, 2017).

5.2.3.2.1 Ftalocyaninové fotosensitizerů

Pc jsou aromatické makrocyclické sloučeniny podobající se svojí strukturou přírodním porfyrinům, v přírodě se ale nenacházejí a jsou čistě syntetické. Tyto PSs se skládají ze čtyř isoindolových jednotek, které jsou spojeny azomethinovými můstky v polohách 1 a 3. Obecná struktura Pc je znázorněna na Obrázku 6 (Claessens *et al.*, 2008; Bian *et al.*, 2017; Váchová, 2017).

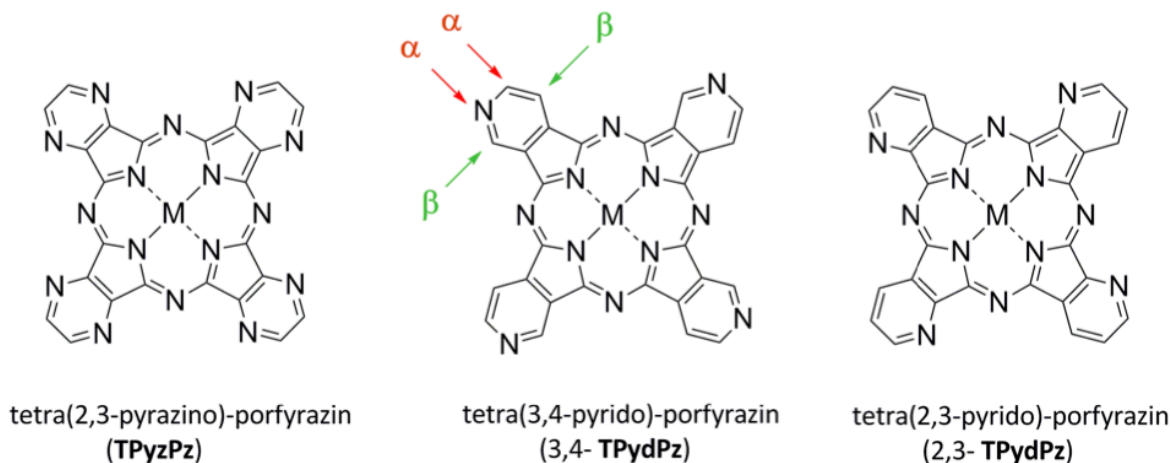


Obrázek 6: Obecná struktura ftalocyaninového fotosenzitizéru. M – centrální kovový iont (např.: Al, Zn, Pd či Si); R – periferní substituenty; A – axiální substituent (v případě, že M je např. Al či Si).

První syntetizovaný Pc neobsahoval centrální atom kovu (2HPc). Vznikl roku 1907 jako vedlejší produkt při přípravě kyanobenzamidu (Braun *et al.*, 1907). Pc s centrálním kovovým iontem vznikl později při reakci 1,2-dibrombenzenu a kyanidu měďného v pyridinu. Vedlejším produktem této reakce byl měďnatý komplex Pc (De Diesbach *et al.*, 1927). Na základě charakteristické barvy prvních syntetizovaných Pc zavedl Sir Reginald Linstead označení těchto sloučenin jako ftalocyaniny. Název je odvozený z řečtiny, kde *naphtha* znamená petrolej a *cyanine* tmavě modrý (Linstead, 1933). Linstead také později se svojí vědeckou skupinou určili planární strukturu Pc a navrhli postup syntézy z ftalonitrilu, jenž se dodnes jeví jako nejvhodnější prekurzor (Dent *et al.*, 1934; McKeown, 1998).

5.2.3.2.2 Azaftalocyaninové fotosenzitizéry

Náhradou atomu uhlíku ve struktuře Pc atomem dusíku získáme AzaPc. Benzenové kruhy tak mohou být nahrazeny například pyraziny za vzniku tetrapyrazinoporfyrazinu či pyridiny za vzniku tetrapyridoporfyrazinu, přičemž dusík tak může být v pozici α či β , jak je znázorněno na Obrázku 7 (Lukyanets, 2012).



Obrázek 7: Příklady azaftalocyaninových fotosenzitizérů. Převzato z: Váchová, L., 2017.

5.3 Využití fotosensitizačních reakcí

Fotosensitizační reakce do značné míry ovlivňují lidské životy. Mimo jiné jsou tyto reakce využívány i v syntetické chemii, kde usnadňují výrobu produktů, které by bylo bez těchto reakcí mnohem obtížnější a nákladnější vyrobit (Oleinick, 2011).

5.3.1 Fotosensitizace v nádorové terapii

Pro léčbu nádorů není mnohdy radikální chirurgický zákrok vhodný. Radiační terapie a chemoterapie nemusí být vždy dostatečně účinná a souvisí s nimi řada nežádoucích účinků. Proto je vhodné zavádět nové léčebné přístupy, mezi které patří i proces označovaný jako PDT. Přímý fototoxický účinek PDT na nádorové buňky spočívá v ireverzibilním narušení specifických cílů, jako jsou například buněčné membrány a organely. Je zde ale důležité selektovat účinek pouze na nádorovou tkáň. Spoléhá se mimo jiné na vyšší fotosensitivitu a obecně pozměněné vlastnosti nádorové tkáně (Kou, 2017; Buytaert, 2007).

Některé PSs používané pro PDT jsou zadržovány maligními tkáněmi mnohem déle než v normálních tkáních. Další možností, jak dosáhnout selektivity je osvětlení pouze maligního nádoru a tím se dosáhne jeho selektivní destrukce. To se může podpořit například u kožních lézí lokální aplikací ALA, což je prekurzor přirozeného PS PpIX (více v kapitole 6.2). Léze je poté ozářena a následně dochází k selektivní destrukci, jak je znázorněno na Obrázku 8 (Kou, 2017; Oleinick, 2011).



Obrázek 8: Fotodynamická terapie nádorů kůže. Horní obrázek: maligní kožní léze nad číslem 3 před aplikací fotosensitizeru. Prostřední obrázek: léze bezprostředně po ozáření laserem (630 nm). Narušené maligní buňky – zčervenání. Spodní obrázek: zčervenání ustupuje a zůstávají pouze normální kožní buňky. Převzato z: Oleinick, 2011.

Existuje i možnost specificky zasáhnout cévní zásobování nádoru pomocí PDT. V tomto případě se PS aplikuje intravenózně a po velmi krátké době, kdy PS ještě nestihl opustit krevní řečiště, je selektivně ozářeno místo s abnormálním cévním zásobením nádorové tkáně, čímž dojde k její destrukci.

U každého PS a konkrétního nádoru je ale nutné přesně definovat parametry intenzity světla, dobu ozáření, dávku a načasování PS tak, aby se dosáhlo nejefektivnější odpovědi na PDT nádoru (Oleinick, 2011).

5.3.2 Fotodynamická inaktivace mikroorganismů

Vzhledem k tomu, že v dnešní době roste počet patogenů rezistentních vůči běžně používaným antibiotikům (ATB) či antimykotikům, je aPDT jedním z alternativních přístupů k řešení tohoto problému, a to bez dalšího rizika indukce rezistence mikroorganismů (Cieplik, 2017). Boj s antibiotickou rezistencí je celosvětově tak závažný, že si ho dokonce jako jeden ze svých prioritních cílů stanovila mimo jiné i Světová zdravotnická organizace (WHO, World Health Organization) (Salameh, 2015). Obecně platí, že aPDT je nejefektivnější u lokalizovaných infekcí, a to na snadno přístupných částech těla, kde není problém s aplikací světla. V dnešní době je ale s pomocí endoskopů a zařízení z optických vláken přístupná pro místní aplikaci PS a následné ozáření většina oblastí těla, jako je například ucho, nos, ústní dutina, gastrointestinální trakt, urogenitální trakt či plíce (Cieplik, 2017; Wainwright *et al.*, 2017).

5.3.2.1 Biofilm jakožto příčina rezistence mikroorganismů

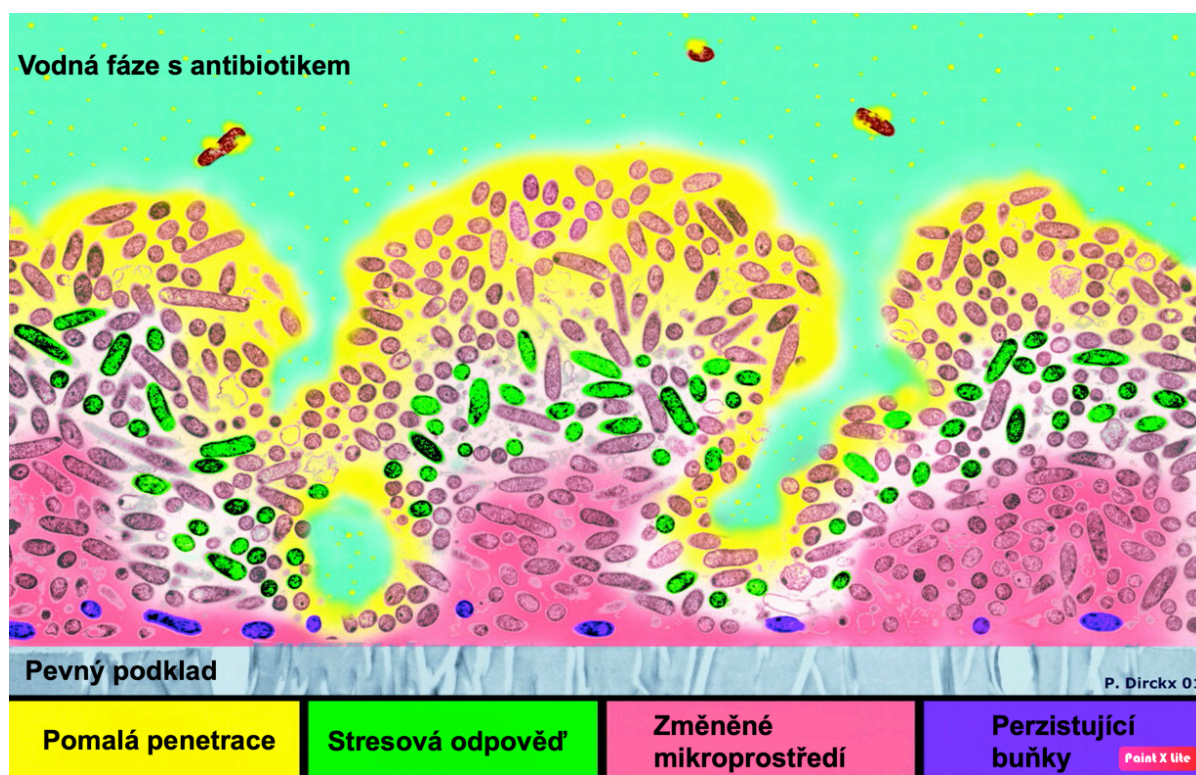
Biofilm je komplexní společenství mikroorganismů ukotvených na živé či neživé povrchy poskytující jejím participantům řadu výhod. Mikroorganismy v těchto uskupeních obecně mnohem výrazněji odolávají nepříznivým vnějším vlivům. Pokud dochází k porovnávání citlivosti mikroorganismů přítomných v biofilmech s jejich planktonickou formou života, tak mikroorganismy tvořící biofilm vykazují pozoruhodně nižší citlivost vůči antimikrobním látkám. S ohledem na tuto skutečnost jsou pak infekce asociované s tvorbou biofilmové biomasy klinickou výzvou a jednou z možných nových léčebných strategií by mohla být právě aPTD (Mah *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 2001).

5.3.2.1.1 Mechanismy rezistence mikrobiálních biofilmů

Mechanismy rezistence mikroorganismů tvořících biofilm spočívají mimo jiné v pomalé penetraci antimikrobních látek skrze extracelulární polymerní substanci, což je dynamická struktura složená především z glykolipidů, polysacharidů, extracelulární DNA, bílkovin, minerálů a vody, kterou si mikroorganismy dokážou sami syntetizovat (Santos *et al.*, 2018).

Dalším mechanismem může být také pozměněné mikroprostředí uvnitř biofilmu, rozdílná stresová odpověď buněk mikroorganismů a tvorba subpopulace tzv. perzistujících buněk. Na Obrázku 9 jsou názorně uvedeny výše zmíněné mechanismy rezistence biofilmu.

Kombinace těchto čtyř hlavních hypotéz pravděpodobně určuje celkovou odolnost mikrobiálních biofilmů. (Chambless *et al.*, 2006).



Obrázek 9: Mechanismy rezistence biofilmů. Převzato a upraveno z: Chambless *et al.*, 2006.

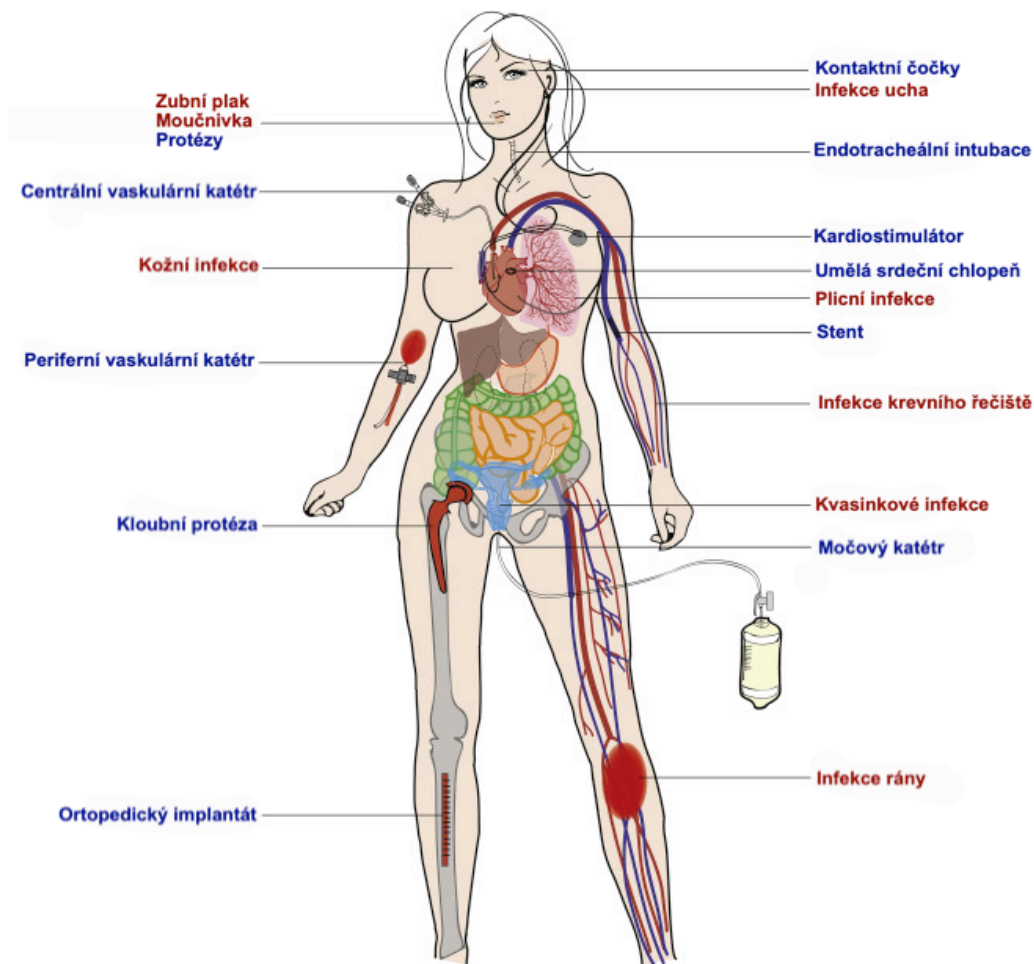
5.3.2.1.2 Problematika rezistentních mikrobiálních biofilmů

Tvorba mikrobiálních biofilmů je poměrně velkým klinickým problémem, neboť se odhaduje, že za více než 60 % všech infekcí způsobených mikroorganismy stojí právě biofilmy, a to včetně nozokomiálních infekcí (Busscher *et al.*, 2012; Lewis, 2001).

Častými biofilmovými infekcemi jsou různé dentální infekce vzniklé na základě zubního plaku, infekce kůže, infekce močových cest či středního ucha. Dále pak mezi infekce sdružené s tvorbou mikrobiálních biofilmů patří infekční endokarditida, či infekce spojené s různými implantáty nebo katétry. Některé příklady infekcí sdružených s tvorbou biofilmu jsou uvedeny na Obrázku 10 (Choy *et al.*, 2008, Lewis, 2001; Marsh *et al.*, 2000; Zimmerli *et al.*, 2004).

Za výše zmíněné biofilmové infekční onemocnění jsou zodpovědné mikroorganismy, jako jsou např.: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* či *Enterococcus faecalis*. Tyto bakterie navíc vykazují stále vyšší rezistenci na

širokou škálu ATB (Cieplik *et al.*, 2017; Laxminarayan *et al.*, 2016). Za původce mykotických infekcí, u kterých se vyskytuje problém s rezistencí, považujeme například zástupce rodu *Candida* a *Aspergillus* (Perlin *et al.*, 2017).



Obrázek 10: Příklady infekcí sdružených s tvorbou mikrobiálního biofilmu. Červeně jsou uvedeny konkrétní infekce. Modře jsou uvedeny různé katetry a implantáty, na kterých často dochází k formování biofilmu. Převzato a upraveno z: Gulati *et al.*, 2016.

5.3.2.2 Potencionální vývoj rezistencí vůči aPDT

Vývoj rezistence u patogenů je pravděpodobnější u léčebných přístupů, které jsou zaměřeny pouze proti jedné cílové struktuře. Jedná se o takzvaný princip „key-lock“, na kterém fungují antibiotika či většina antiseptik. V tomto případě patogeny dříve či později překonají antimikrobní výzvu konkrétními mutacemi, expresí efluxních pump nebo zvýšenou regulací v podobě zvýšené exprese enzymů, které souvisejí s mikrobiální obranou (Maillard, 2002; Maisch, 2015; Mc Donnell *et al.*, 1999; Wainwright *et al.*, 2017).

Jak je ale pojednáváno výše, v případě aPDT se jedná spíše o neselektivní přístup, zaměřený prostřednictvím ROS na více cílů. Je tak velmi nepravděpodobné, že by byly mikroorganismy schopny vyvinout si rezistenci vůči tomuto typu terapie (Maisch, 2015; Wainwright *et al.*, 2017).

5.3.2.2.1 Studie zabývající se indukcí rezistence vůči aPDT

Studium vývoje rezistence mikroorganismů se obecně provádí aplikací subletálních dávek daných léčebných modalit a následnou kultivací přeživších mikroorganismů v opakovaných cyklech. Existují i studie zabývající se rezistencí patogenů vůči aPDT (Alves *et al.*, 2014). Například Lauro a kol. ve své studii z roku 2002 prokázali, že *Aggregatibacter actinomyces-temcomitans* a *Peptostreptococcus micros* nejsou schopni vyvinout detekovatelnou rezistenci vůči aPDT s polylysinovými konjugáty s porfycenem po 10 opakovaných cyklech částečné inaktivace s následnou kultivací přeživších bakterií. aPDT navíc neovlivnila citlivost mikrobů vůči různým třídám antibiotik (Lauro *et al.*, 2002).

Pedigo a kol. publikovali v roce 2009 studii, která se zabývá bakteriemi *Escherichia coli* a *Styphilococcus aureus* (v případě stafylokoka šlo o kmeny citlivé i rezistentní na ATB). Zkoumali zde vývoj rezistence vůči opakované léčbě aPDT s methylenovou modří jakožto PS. U žádného z těchto bakteriálních druhů ke vzniku rezistence nedošlo. U *E. coli* bylo provedeno 11 kultivačních cyklů s expozicí PS v sub-inhiničním množství, u *Staphylococcus aureus* bylo provedeno dokonce 25 cyklů (Pedigo *et al.*, 2009). Tavares a kol. dosáhli ve své studii z roku 2010 stejného výsledku s kmeny *Vibrio fischeri* a *Escherichia coli* po 10 cyklech s trikationickým porfyrinovým derivátem Tri-Py-Me-PF (Tavares *et al.*, 2010).

Je ale potřeba mít na paměti, že tyto studie mají jistá omezení. Byly provedeny na mikroorganismech v planktonické formě *in vitro*. Tyto patogeny ale *in vivo* upřednostňují přisedlý režim biofilmu. Riziko rozvoje rezistence je tak potenciaálně vyšší, například díky horizontálnímu přenosu genů (Boles *et al.*, 2004; Marsh *et al.*, 2011).

Na druhou stranu je ale známo, že mikroorganismy se stanou rezistentní na konkrétní antimikrobní látku, pokud jsou trvale vystaveny sub-inhibičním dávkám v průběhu delšího časového horizontu. aPDT je ale navržena jako relativně krátká léčebná procedura, tudíž je velmi pravděpodobné, že léčbou prostřednictvím aPDT nevzniká rezistence na tuto terapii a ani nedochází k indukcí vzniku rezistence vůči ATB (Cieplik *et al.*, 2017).

6. CÍLE PRÁCE

- Zavedení metodiky vedoucí ke stanovení antimikrobní aktivity kandidátních PSs vůči vybraným klinicky významným mikroorganismům ze skupiny G+ bakterií (meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*), G- bakterií (*Pseudomonas aeruginosa*) i kvasinek (*Candida albicans*).
- Do testování zařadit 4 kandidátní látky, které byly syntetizovány na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv, ve skupině pana prof. Zimčíka na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové (P44, HK18, P42, ZIP300) a pro srovnání také zavést komerčně dostupnou methylenovou modř.
- Po expozici mikrobiálních buněk PSs a následném ozáření zavést hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C.
- Po expozici mikrobiálních buněk PSs a následném ozáření zavést metodiku, Alamar Blue Assay, vedoucí k určení metabolické aktivity mikroorganismů.
- Zavést konfirmační přístup pro hodnocení aktivity v podobě výsevové metody.
- Pomocí výše zmíněných metodických přístupů určit MBC/MFC daných PSs pro vybrané mikrobiální agens.
- Stanovení toxicity kandidátních látek bez ozáření (určení vlastní antimikrobní aktivity bez světelné expozice).
- Porovnání vlivu antimikrobního účinku PS v závislosti na délce světelné expozice (15 a 30 minut).

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Testovací mikroorganismy

Pro testování anti-infekční aktivity látek byl vybrán jeden mikrobiální zástupce ze skupiny G+ bakterií, druhý ze skupiny G– bakterií a třetí testovací mikrobiální kmen byl vybrán z mykotických agens. Z důvodu později plánovaných záměrů byly voleny mikrobiální kmeny s vysokou klinickou významností, které často vyvolávají infekční onemocnění sdružené s tvorbou mikrobiálních biofilmů.

7.1.1 Meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

Meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) je G+ kok shlukující se do hroznů. Jedná se o původce nejzávažnějších infekcí mezi G+ bakteriemi. V současné době je MRSA zodpovědný dokonce za 10krát více infekcí než všechny multirezistentní G– patogeny. Infekce způsobené MRSA jsou provázeny vysokou morbiditou, což je celosvětový problém. WHO nedávno klasifikovala MRSA jako jeden z dvanácti prioritních patogenů ohrožující lidské zdraví. Způsobuje především kožní infekce, ale například i zápal plic, sepsi a další. MRSA je také významný nozokomiální patogen. V nemocnicích se rozšířil hlavně kvůli používání širokospektrých ATB. MRSA má také schopnost přežít na biotickém i abiotickém povrchu ve formě biofilmu, což je další z důvodů jeho stále se zvyšující patogenity. Vzhledem k výše zmíněným faktům, jako je rezistence na některá antibiotika, rychlé šíření v nemocničním prostředí aj., je vhodné hledat další alternativní přístupy pro léčbu infekcí, které způsobuje (Centers for Disease Control and Prevention, 2019; Craft *et al.*, 2019; Green *et al.*, 2012).

Pro experimenty v této diplomové práci byl využit referenční bakteriální kmen *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (CCM 4750).

7.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (PA) je G– tyčka způsobující klinicky nejzávažnější infekce mezi G– bakteriemi. Jedná se o oportunního patogena. Pseudomonádové infekce jsou časté u pacientů s popáleninami, cystickou fibrózou, akutní leukémií či transplantovanými orgány. PA je stejně jako MRSA nozokomiální patogen a je také schopna tvořit biofilm. Je prokázáno, že PA v biofilmu může vykazovat až 1000krát násobně nižší míru citlivosti (odolává až

1000krát násobkům MIC odpovídající pro planktonickou formu) vůči ATB, než je tomu u planktonických buněk. Mezi nejzávažnější infekce, které PA způsobuje patří například otitida, endoftalmitida, endokarditida, meningitida, pneumonie, infekce močového měchýře, infekce ran či sepse (Bodey *et al.*, 1983; Mah *et al.*, 2003; Mulcahy *et al.*, 2014). U nozokomiálních kmenů dochází k poměrně rychlému rozvoji rezistence na ATB, je proto vhodné hledat další léčebné postupy vedoucí k úspěšné eliminaci tohoto infekčního agens. (Mulcahy *et al.*, 2014)

Pro experimenty v této diplomové práci byl využit referenční bakteriální kmen *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (CCM 3955).

7.1.3 *Candida albicans*

Candida albicans (CA) je přirozenou součástí lidského mikrobiomu. Vyskytuje se především na kůži a na povrchu sliznic (sliznice střeva, dutiny ústní či pochvy), kde žádné problémy nezpůsobuje. Pokud se ale naruší mikrobiální rovnováha nebo se CA dostane na atypické lokalizace v těle, dojde k infekci. V rámci skupiny blastosporických mykotických agens, tedy kvasinek, je CA klinicky nejzávažnějším původcem infekcí. Kandidové infekce jsou velkým problémem především u imunokompromitovaných osob. CA může způsobit například sepsi, ke které se váže významná mortalita. Jedná se také o nejběžnější druh kvasinky způsobující nozokomiální infekce (Centers for Disease Control and Prevention, 2020; Ruhnke, 2006).

V současné době existuje relativně málo tříd antifungálních léků, což již samo o sobě omezuje terapeutické možnosti lékařů. Tyto možnosti jsou navíc dále snižovány a omezovány vznikem antifungální rezistence. Začala se dokonce objevovat rezistence CA proti flukonazolu, což je lék volby při orofaryngeální kandidóze u pacientů s AIDS. Problém týkající se rozvoje a šíření rezistence se tak netýká pouze bakteriálních agens, proto je na místě hledat další alternativní terapeutické postupy také pro léčbu mykotických infekcí. (Cannon *et al.*, 2007; Lambrechts *et al.*, 2005).

Pro experimenty v této práci byl použit referenční kvasinkový kmen *Candida albicans* ATCC 24433 (CCM 8320).

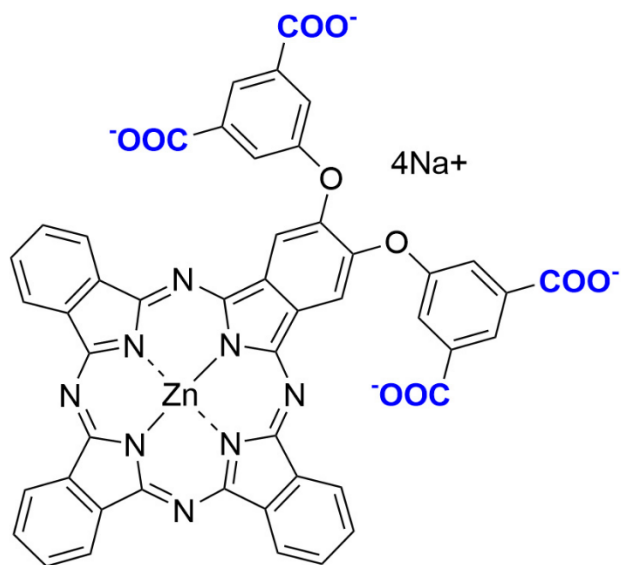
7.2 Pomůcky, přístroje a materiál

7.2.1 Použité reagensie a kultivační půdy

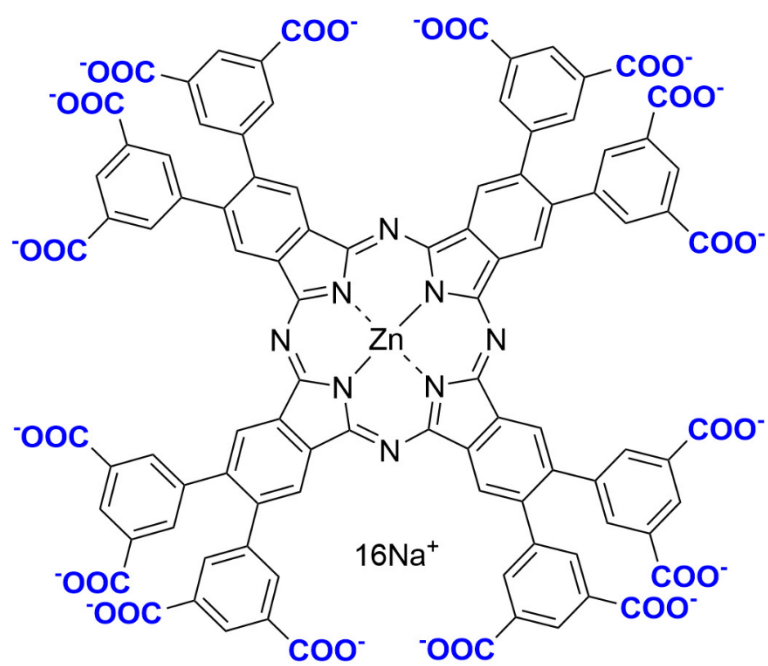
- studované PSs:
 - ftalocyanin P44-COONa (dále jen „P44“; amfifilní anionická látka)
 - ftalocyanin HK18-COONa (dále jen „HK18“; hydrofilní anionická látka)
 - ftalocyanin P42-1Zn-Me (dále jen „P42“; amfifilní kationická látka)
 - azaftalocyanin ZIP300-ZnMe (dále jen „ZIP300“; hydrofilní kationická látka)
 - fenothiazinové barvivo methylenová modř (MB, Methylene blue), Sigma-Aldrich, USA (chemická struktura viz Obrázek 15)

Studované látky s pracovním označením P44, HK18, P42, ZIP300 byly syntetizovány na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv, ve skupině pana prof. Zimčíka. Jednotlivé chemické struktury těchto fotosensitizerů jsou znázorněny na Obrázcích 11–14.

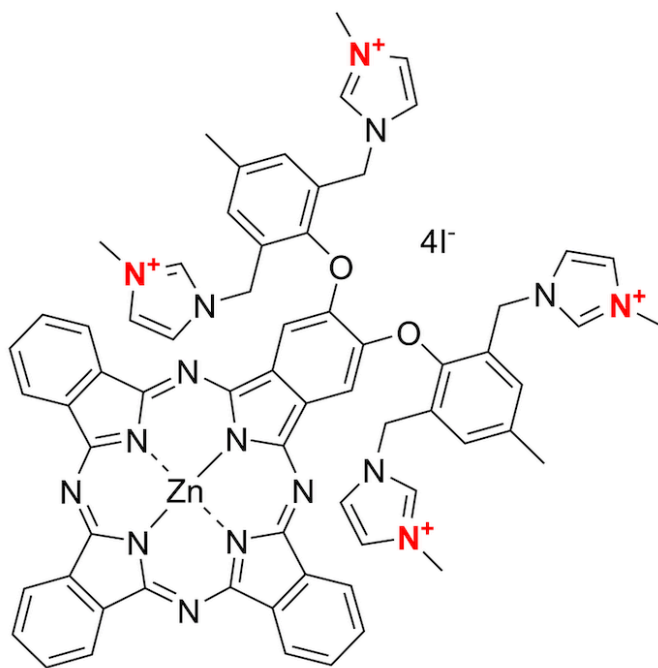
- Soyabean Casein Digest Medium (trypton-sójové médium), HiMedia, Indie
- Phosphate buffered saline (PBS, fosfátový pufr), pH 7,4, Sigma-Aldrich, USA
- Mueller-Hinton agary (pro kultivaci bakterií), připraveny a poskytnuty pracovníky Oddělení mikrobiologie a imunologie, Katedry biologických a lékařských věd, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové
- Sabouraud agary (pro kultivaci kvasinek), připraveny a poskytnuty pracovníky Oddělení mikrobiologie a imunologie, Katedry biologických a lékařských věd, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové



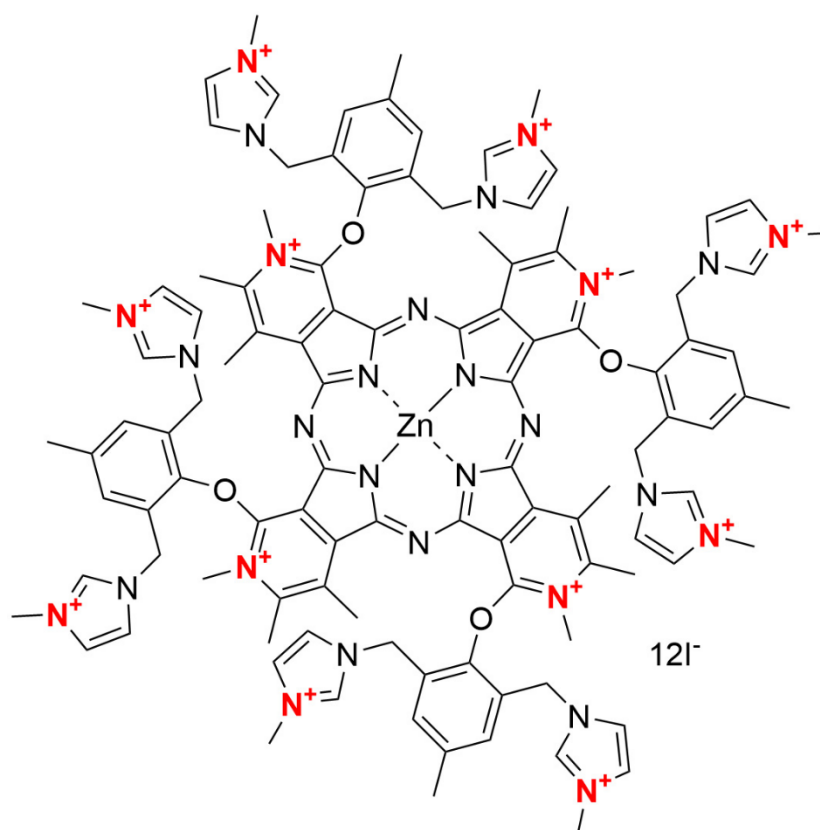
Obrázek 11: Chemická struktura fotosenzitizéru P44.



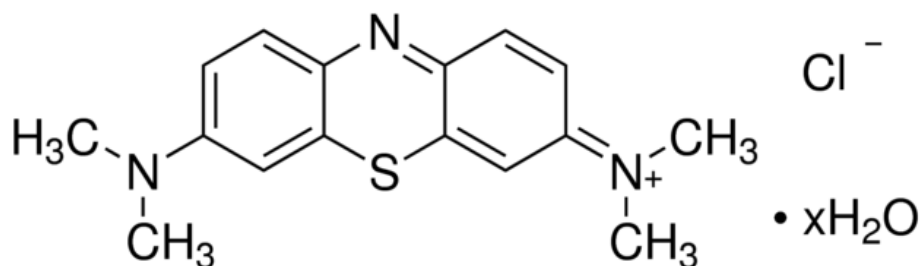
Obrázek 12: Chemická struktura fotosenzitizéru HK18.



Obrázek 13: Chemická struktura fotosenzitivátoru P42.



Obrázek 14: Chemická struktura fotosenzitivátoru ZIP300.



Obrázek 15: Chemická struktura methylenové modři.

7.2.2 Pracovní pomůcky

- Sterilní mikrotitrační destičky s víčkem, 96 jamek, Gamedium, Česká republika
- Sterilní mikrotitrační destičky s víčkem, 96 jamek, TPP, Švýcarsko
- Sterilní Honeycomb destičky, Oy Growth Curves, Finsko
- Jednorázové očkovací kličky, Gamedium, Česká republika
- Zkumavky PP typ Falcon (50 ml), sterilní, Verkon, Česká republika
- Sterilní mikrozskumavky, plastové, různý rozsah, Eppendorf, Německo
- Stojany na mikrozskumavky, Gamedium, Česká republika
- Automatické pipety, různý rozsah, Eppendorf, Německo
- Sterilní špičky, plastové, různý rozsah, Eppendorf, Německo

7.2.3 Pracovní přístroje

- Laminární box Esco Class II type A2, Esco Micro Pte. Ltd., Singapur
- Bioscreen C MBR, Oy Growth Curves, Finsko
- Denzitometr McFarland typ DEN-1, Biosan Ltd., Lotyšsko
- Vortex M52 Minishaker IKA, P-LAB, Česká republika
- Termostat Binder WTB, Fisher Scientific, Německo
- Centrifuga Rotatna s výkyvným rotorem,
- Třepací termobox Titramax 1000 s inkubátorem 1000, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Německo
- Synergy HTX Multi-Mode Microplate reader, BioTek, USA
- 450 W xenonová lampa s vodním a high-pass filtrem OG570, Newport, USA

7.3 Kultivace mikroorganismů

Jednotlivé kmeny mikroorganismů (MRSA, PA a CA) byly zaočkovány na příslušné agary a kultivovány přes noc v termostatu. Poté byly z agarů jednotlivě zaočkovány do tekutého trypton-sójového média a kultivovány 2 h v termoboxu za mírného třepání za účelem dosažení exponenciální růstové fáze. Následně byly suspenze mikroorganismů (MO) stočeny v centrifuze po dobu 8 minut v centrifuze při 4500 ×g.

7.4 Příprava buněčné suspenze, koncentrační řady testovaných fotosensitizerů a následné ozáření

Mikrobiální peleta získaná centrifugací se resuspendovala v PBS do požadované optické denzity (OD):

- MRSA: OD 0,5 McFarland units – tj. cca 10^8 CFU/ml
- PA: OD 0,5 McFarland units – tj. cca 10^8 CFU/ml
- CA: OD 2,5 McFarland units – tj. cca 10^7 CFU/ml

Asepticky v laminárním boxu byla připravena ředící řada studovaných fotosensitizerů ve sterilním PBS ve dvojnásobné koncentraci, než činila finální koncentrace v rámci experimentů. Finální koncentrační řada pro látky P44, HK18, P42 a ZIP300 byla primárně stanovena na: 0,1 - 0,5 - 1 - 5 - 10 - 20 - 50 μ M. Dle průběžných výsledků ale byla v některých případech tato řada upravena. Pro MB byla volená finální koncentrační řada: 5 - 10 - 20 - 100 - 500 μ M, která byla také později upravena. Konkrétní hodnoty jsou poté uvedeny ve výsledkové části pro každý PS.

Mikrobiální suspenze jednotlivých MO se poté přidala po 700 μ l k předem připravené koncentrační řadě studovaných PSs v PBS, jejich objem v jedné mikrozkuhavce byl 700 μ l. Výsledný objem v rámci každé testované koncentrace fotosensitizeru tak byl 1400 μ l. Byla použita i kontrola pozitivního nárůstu (dále jen „pozitivní kontrola“; PK), což jsou mikroorganismy bez vlivu PSs (700 μ l PBS a 700 μ l suspenze MO). Následovala inkubace jednotlivých koncentračních řad studovaných PSs s MO a pozitivních kontrol po dobu 30 minut při 37 °C.

Zcela zásadní pro experimentální práci bylo, aby PSs nebyly aktivovány světlem dříve, než bylo žádoucí, proto se pracovalo v částečně zatemněné místnosti, v prostoru s pouhým zbytkovým světlem.

Po inkubaci se provedlo odstranění nenavázaného PS centrifugací při 4500 \times g, po dobu 8 minut při laboratorní teplotě a následným promytím PBS (2 \times). Jednotlivé koncentrace PSs s MO se poté v triplicátech pipetovaly po 200 μ l na jamku do dvou sterilních mikrotitračních destiček (jedna destička pro ozařování, pracovní označení „light“ a druhá pro určení vlastní antimikrobní aktivity látek bez ozáření, pracovní označení „dark“). „Light“ destička se ozařovala 15 minut xenonovou lampou ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²) nebo 30 minut ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²). „Dark“ destička se po stejnou dobu nechala ve tmě.

7.5 Metody detekce životaschopnosti mikrobiálních agens po interakci s testovanou látkou

7.5.1 Hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C

Jedním z parametrů, který odráží počet mikroorganismů je OD mikrobiální suspenze. Pravdou je, že OD není přímým odrazem počtu životaschopných mikrobů, v této veličině se odráží jak počet mrtvých, tak i živých mikroorganismů. Nicméně v rámci našeho experimentálního uspořádání, založeném na tzv. „recovery“ metodě, je detekován přírůstek životaschopné mikrobiální biomasy v čase, který je odrazem aktivity životaschopných mikrobů (Oy Growth Curves Ab Ltd, 2009).

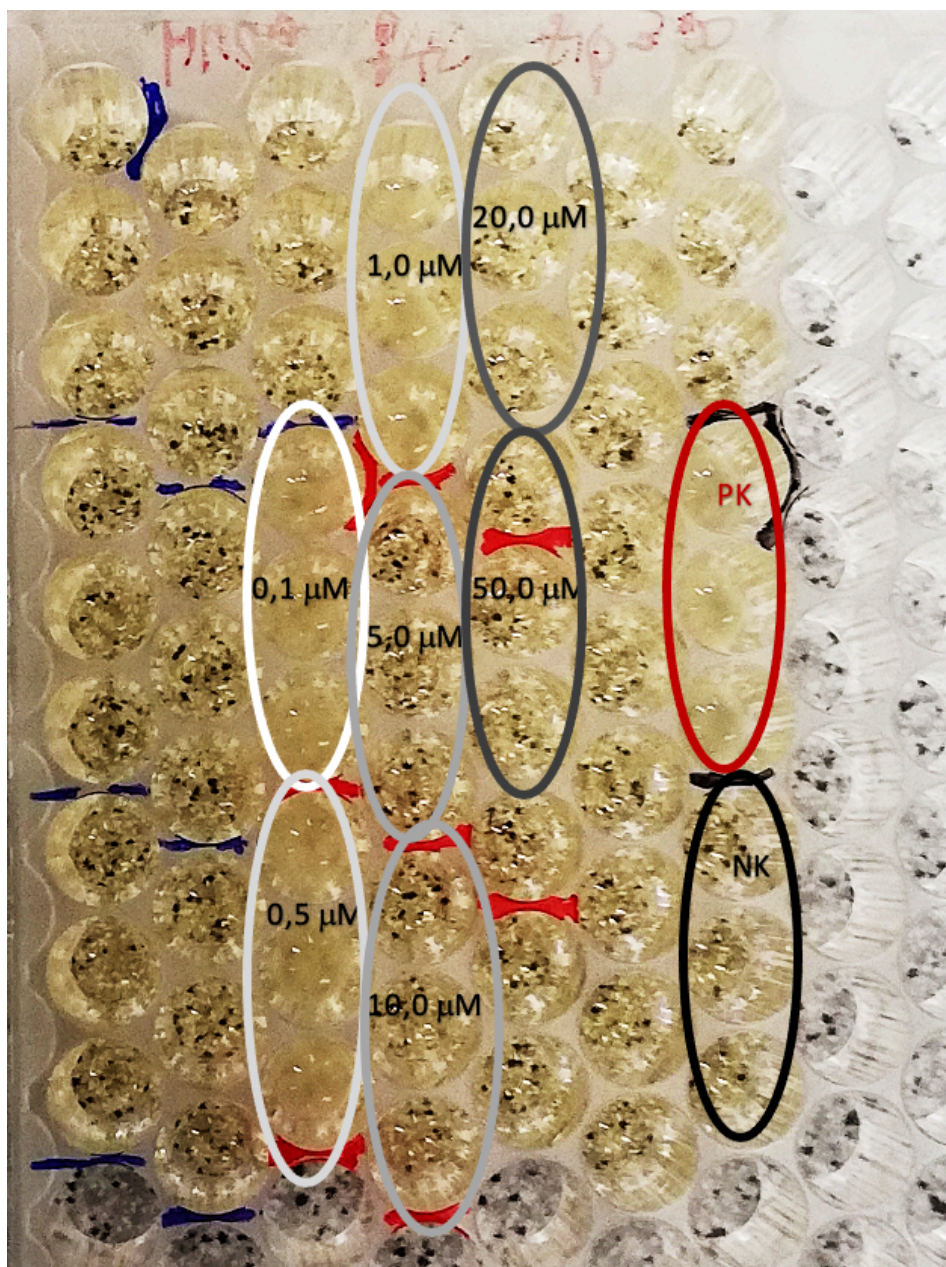
Pomocí přístroje Bioscreen C byl mapován růst testovacích mikrobiálních kmenů po interakci se studovanou látkou a ozářením po určité době v časových intervalech 30 minut, po dobu minimálně 12 hodin.

Tento přístup umožňuje vyhodnotit koncentraci studované látky, která vede k absolutnímu cidnímu efektu (ve vzorku není zaznamenán žádný nárůst OD) a dále umožňuje studovat vliv na růst mikrobiálních entit po expozici testované látky v sub-inhibičním množství. Při této metodě je ale nutné zohlednit, že i jedna bakterie/kvasinka, které zde poskytneme vhodné podmínky v rámci tzv. „recovery“ prostředí, je schopna se množit a tím způsobit nárůst OD. Hodnota MBC je definována jako koncentrace antimikrobní látky vedoucí

k cidnímu působení, který se odrazí v úbytku životaschopných agens z $\geq 99,9$ % ve srovnání s počátečním inokulem (Oy Growth Curves Ab Ltd, 2009).

V našem případě nás tento experimentální přístup vymezuje na přísnější kritérium hodnocení, tedy na určení cidního efektu se 100% úbytkem životaschopných mikrobů.

Do sterilní honeycomb destičky se napipetovalo po 180 μ l Soyabean media na jamku a přidalo se 20 μ l mikrobiální suspenze po ozáření z „light“ destičky („dark“ destička nebyla touto metodou měřena). Opět se pracovalo v triplicátech. Takto připravená destička byla kultivována po dobu minimálně 12 hodin v přístroji Bioscreen C, při teplotě 37 °C, s měřením OD při 540 nm v 30minutových časových intervalech. Pro ilustraci je na Obrázku 16 uvedena Honeycomb destička s MRSA po interakci se ZIP300 a následným ozáření 15 min po proměření prostřednictvím přístroje Bioscreen C .



Obrázek 16: Snímek Honeycomb destičky po proběhlé kultivaci bakteriálního kmene meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA; 37 °C, 20 h) v přístroji Bioscreen C. MRSA byla kultivována pod vlivem různých koncentrací fotosenzitizeru ZIP300, aktivovaného 15 min ozářením (450W xenonová lampa Newport s vodním a high-pass filtrem OG570 ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²)). Vliv jednotlivých koncentrací na růst bakteriálního kmene byl testován v triplicátech (ohrazení jamek elipsou). PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu fotosenzitizeru. NK – negativní růstová kontrola (médium bez obsahu mikroorganismu).

7.5.2 Výsevová metoda

Princip této metody spočívá ve stanovení počtu životaschopných buněk neboli CFU (jednotky tvořící kolonie; z angl. colony forming units) pomocí postupného ředění počátečního inokula a následného výsevu reprezentativních alikvotů na živná média. Výsevová metoda je charakteristická svou (časovou) náročností provedení a pracností. V rámci naší studie byla využita především pro potvrzení výsledků získaných předchozím metodickým přístupem (Microbial Growth and Control, 2014).

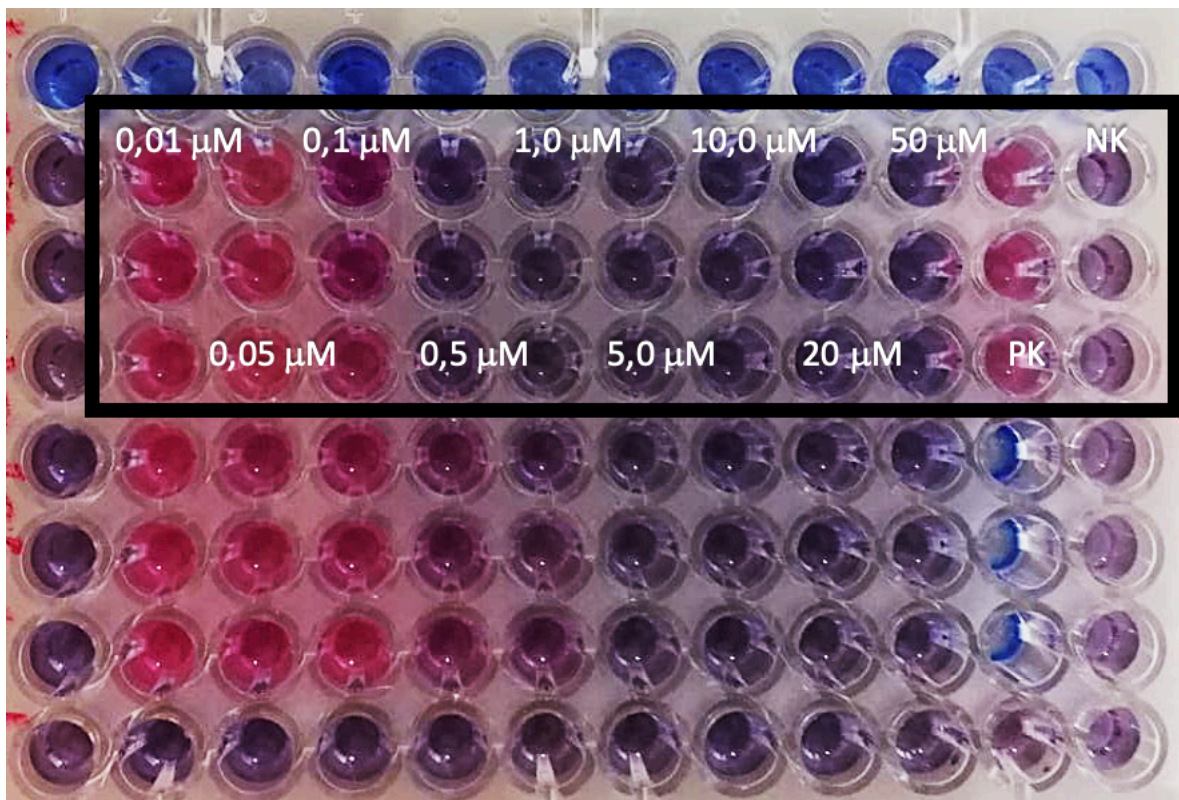
Pro výsevovou metodu bylo provedeno ředění mikrobiálních suspenzí v PBS z „light“ i „dark“ destiček. V rámci každého triplikátu byla volena jedna jamka, ze které se převedlo 5 μ l suspenze mikroorganismů do mikrozkušavky s předpipetovaným objemem 1495 μ l PBS. Poté se provedl výsev po 10 μ l na příslušné agary. V případě MRSA a PA kmenů se provedl výsev na Mueller-Hinton agary, v případě CA kmene na Sabouraud agary. Výsev z „light“ destiček byl proveden klasickým rozočkováním, abychom byli případně schopni spočítat CFU a výsev z „dark“ destiček byl proveden tzv. „spot“ výsevovou metodou (nanesených 10 μ l se již dále nerozočkovávalo), CFU jsme v rámci úspory času v tomto případě již nepočítali.

Byla hodnocena MBC $\geq 99,9$ % (% úbytek životaschopných mikroorganismů ve srovnání s počátečním inokulem). S ohledem na velikost počátečního inokula pak bylo na základě výpočtů pro kmeny MRSA a PA stanoveno kritérium hodnocení, „cut-off“, maximálně 3 CFU, což odpovídalo 99,9 % MBC. V případě CA kmene by se v případě MFC $\geq 99,9$ % na základě výpočtů s ohledem na velikost počátečního inokula neměla objevit žádná CFU.

7.5.3 Určení metabolické aktivity mikroorganismů – Alamar Blue assay

Alamar Blue (AB) je netoxický fluorescenční indikátor životaschopnosti, přesněji tedy metabolické aktivity buněk. Princip této metody spočívá v přeměně modrého zbarvení rezazurinu metabolicky aktivními (živými) buňkami na růžový resorufin. Roztok AB se přidává k mikrobiálním suspenzím, následně probíhá inkubace při teplotě 37 °C a poté je proměřena fluorescence (Ex 530-560 nm/Em 590 nm). Určitým úskalím této metody v mikrobiologii může být ale fakt, že mikroorganismy mají schopnost perzistence (dormance), což je stav, kdy nejsou metabolicky aktivní, a přesto jsou plně životaschopné (Peeters *et al.*, 2008).

V rámci tohoto metodického přístupu bylo z jednotlivých jamek „light“ i „dark“ destiček odebráno po 160 µl z každé jamky a objem jamek byl doplněn 180 µl trypton-sójovým médiem. Celkový objem v jedné jamce pak činil 200 µl. Destičky byly inkubovány po dobu 7 hodin v termostatu ve tmě, při teplotě 37 °C. Po inkubaci se přidalo 20 µl barviva AB na jamku a destičky se dále inkubovaly po dobu 30 minut ve tmě, při teplotě 37 °C. Fluorescenční signál byl měřen pomocí multidetekčního readeru, Synergy HTX Multi-Mode Microplate reader, při excitační vlnové délce 528 nm a emisní vlnové délce 585 nm. V rámci metody byly zavedeny jak PK (bakterie v kultivačním médiu bez interakce se studovaným PSs), tak i samotné kultivační médium, pro určení nespecifického fluorescenčního signálu. Pro ilustraci je na Obrázku 17 uvedena destička s PA po interakci s P42 a následným ozářením 30 minut po přidání AB, kultivaci a proměření pomocí multidetekčního readeru.



Obrázek 17: Studium vlivu různých koncentrací fotosenzitizéru P42 na metabolickou aktivitu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* s dobou ozáření 30 minut. (450W xenonová lampa Newport s vodním a high-pass filtrem OG570 ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²)). PK – pozitivní růstová kontrola, NK – negativní růstová kontrola, růžové zbarvení obsahu jamky – metabolicky aktivní bakterie, modrofialové zbarvení obsahu jamky – metabolicky inaktivní bakterie.

8. VÝSLEDKY

8.1 Fotosensitizer P44

Koncentrační řada u obou dob ozáření (15 a 30 min) byla stejná, tedy:

0,1 - 0,5 - 1 - 5 - 10 - 20 - 50 μM .

8.1.1 Vyhodnocení aktivity P44 vůči meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus*

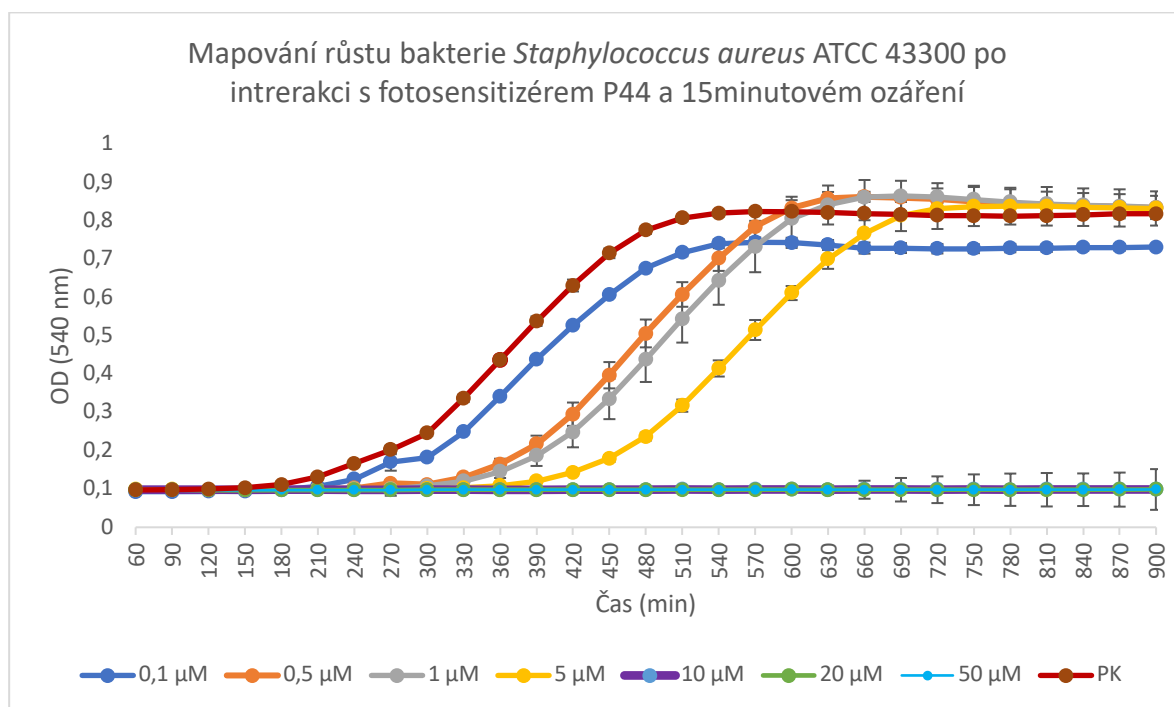
8.1.1.1 Doba ozáření - 15 minut

Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C a také na základě vizuálního hodnocení bylo prokázáno, že při koncentracích 10 μM , 20 μM a 50 μM nedošlo k nárůstu mikrobiální biomasy a v příslušných jamkách nebyl detekován zákal (Obrázek 18). S ohledem na to, že jde o metodický přístup tzv. „recovery“ metodu, byla na jejím základě odečítána vždy hodnota MBC. V tomto případě je MBC rovna koncentraci 10 μM .

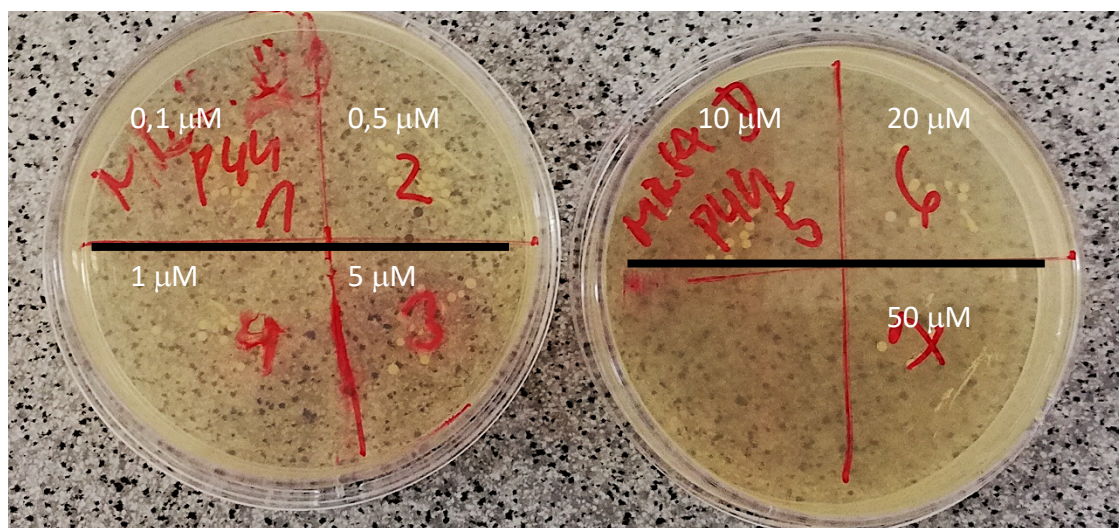
Obrázek 18 ukazuje posloupný nárůst (což je reflektováno změnou OD), případnou stagnaci růstu mikroorganismu pod vlivem různých koncentrací PS. Jak je také patrné z Obrázku 18, v případě sub-inhibiční mikrobicidní koncentrace (sub-MBC), odpovídající $1/2$ MBC, tedy $\text{sub-MBC}=0.5\times\text{MBC}$, došlo k opoždění v přechodu z lag růstové fáze do logaritmické/exponenciální fáze o cca 3,5 hodiny (210 minut). Lze tedy konstatovat, že tato sub-inhibiční koncentrace se poměrně výrazně odrazí v rámci post-antimikrobního efektu. V případě $1/10$ MBC ($\text{sub-MBC}=0.1\times\text{MBC}$) a $1/20$ MBC ($\text{sub-MBC}=0.05\times\text{MBC}$) pak došlo k téměř totožnému opoždění v nárůstu odpovídající cca 2 hodinám. V případě $1/100$ MBC ($\text{sub-MBC}=0,01\times\text{MBC}$) pak došlo k nevýraznému posunu, maximálně o 30 minut.

Určení metabolické aktivity MRSA pro fotosensitizer P44 a dobu ozáření 15 není uvedeno. Pro hodnocení byl volen původně zamýšlený metodický přístup (mikrobiální suspenze v PBS, expozice testovanou látkou a ozáření, přidání metabolického indikátoru), který nevykázal spolehlivost (nebyla detekována metabolická aktivita pozitivní růstové kontroly).

Získané výsledky byly potvrzeny výsevovou metodou viz Obrázek 19. Nárůst byl ale do jisté míry patrný ve všech výsech.



Obrázek 18: Vliv různých koncentrací P44 na meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 s dobou ozařování 15 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola; OD – optická denzita.



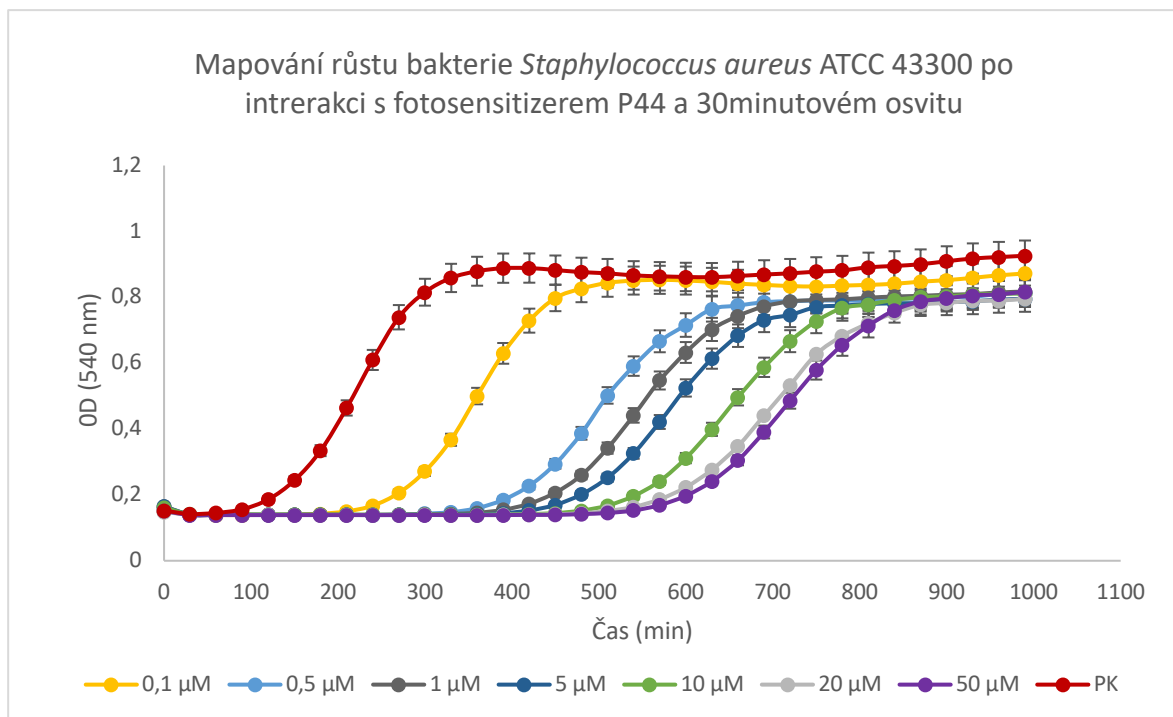
Obrázek 19: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi fotosenzitizeru P44, po ozáření 15 minut (450W xenonová lampa Newport s vodním a high-pass filtrem OG570 ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²)) byl proveden výsev na kulturační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu, při 37 °C byl následně hodnocen nárůst.

8.1.1.2 Doba ozáření - 30 minut

V případě ozařování po dobu 30 min nebyla na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C hodnota MBC v rámci rozmezí testovaných koncentrací látky stanovena – viz Obrázek 20. Stejný výsledek byl zaznamenán po vizuální inspekci destičky, ve všech jamkách došlo ke zjevnému nárůstu bakteriální biomasy, která se projevila zákalem. Jak je znázorněno na Obrázku 20, v případě cílové koncentrace 50 μM a 20 μM došlo k posunu v nástupu do exponenciální fáze ve srovnání s pozitivní kontrolou o cca 7 hodin (420 min). V případě nejnižší zvolené testované koncentrace odpovídající 0,1 μM pak šlo o posun 2,5 hodiny (150 minut). To je výrazně delší doba post-antimikrobního efektu odpovídající 5-násobku doby po expozici světelného záření v porovnání s dobou ozařování 15 min.

V případě hodnocení výsledků pomocí AB bylo zjištěno, že v případě koncentrace odpovídající 10, 20 a 50 μM došlo k výrazné inhibici v metabolické aktivitě (přesahující 95 %), o čemž vypovídá Tabulka 1. S ohledem na předpokládaný mechanismus účinku PS pak lze vyvozovat, že metabolická aktivita může přímo odrážet životaschopnost testovacích mikroorganismů. V našem metodickém uspořádání jsme detekovali metabolickou aktivitu po cca 7 hodinách (420 min) v rámci „recovery“ metody. Jak je patrné z Obrázku 20, pozitivní kontrola dosahuje v tomto intervalu pozdní exponenciální fáze/počátku stacionární fáze. V daném časovém intervalu pak bakterie pod vlivem koncentrací 10, 20 a 50 μM nevykazují růst, což přímo koreluje s hodnotami určenými touto metodou. Jak je patrné v Tabulce 1, sub-inhibiční koncentrace 0,1 μM vede k vyššímu nárůstu metabolické aktivity o cca 14 % oproti PK. U ostatních hodnocených sub-inhibičních koncentrací tento nárůst nebyl zaznamenán.

Získané výsledky byly confirmovány výsevovou metodou viz Obrázek 21. Nárůst v tomto případě nebyl patrný od 5 μM koncentrace.

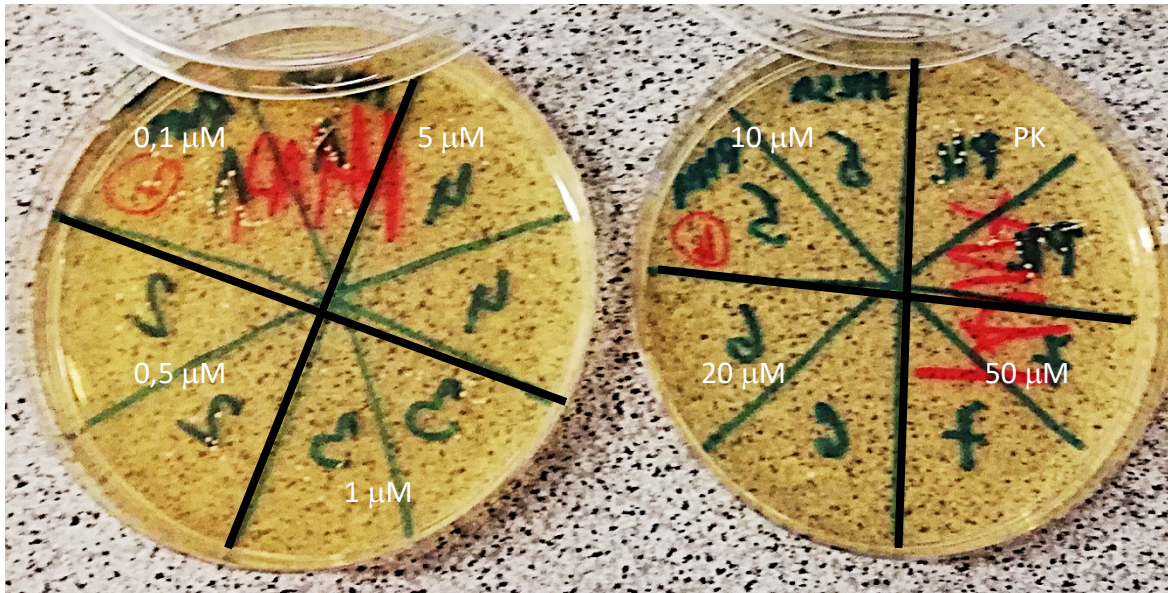


Obrázek 20: Vliv různých koncentrací P44 na meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, s dobou ozařování 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola, OD – optická denzita.

Tabulka 1: Vliv různých koncentrací fotosenzitizeru P44 na metabolickou aktivitu meticilin rezistentní bakterie *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, s dobou ozáření 30 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrahování průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztahované vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztahované vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

P44 - MRSA - Light	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM	50 µM	PK
Průměrná hodnota RFU	15350,33	10723,00	10157,67	4586,67	3851,33	3530,00	3501,00	13855,00
% metabolické aktivity *	113,71%	69,75%	64,38%	11,46%	4,47%	1,42%	1,14%	100,00%
% inhibice **	-13,71%	30,25%	35,62%	88,54%	95,53%	98,58%	98,86%	0%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 21: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi fotosensitizeru P44, po ozáření 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu při 37 °C byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu fotosensitizeru.

8.1.1.3 Určení vlastní antibakteriální aktivity P44 (bez ozáření) na meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus*

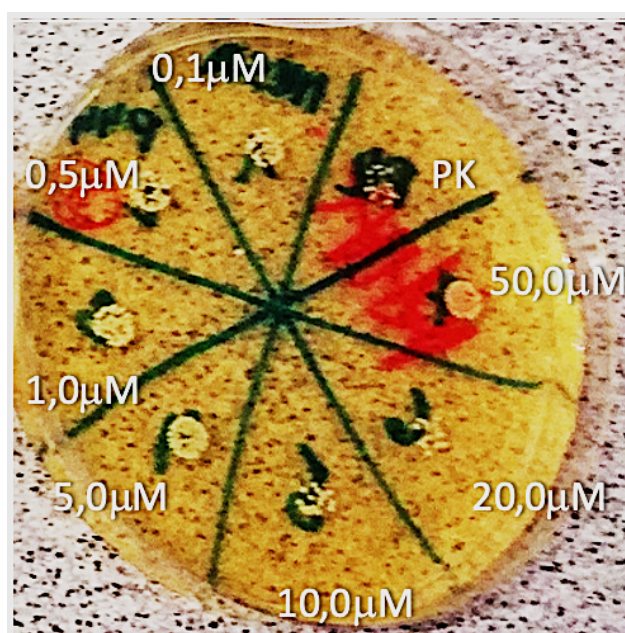
Pro P44 a bakteriální kmen MRSA byla hodnocena vlastní antibakteriální aktivita bez ozáření pomocí AB. Jak z Tabulky 2 vyplývá, vlastní antibakteriální aktivita látky P44 bez ozáření v souvislosti s MRSA nebyla prokázána. Naopak po interakci bakteriálního kmene a P44 bez ozáření došlo spíše k potenciaci metabolické aktivity, která zřejmě mohla být odrazem také potenciace růstu bakteriální biomasy (nebylo hodnoceno v rámci této studie).

Tyto výsledky byly confirmovány výsevovou metodou viz Obrázek 18., která vesměs potvrdila výsledky naměřené v rámci metody AB.

Tabulka 2: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru P44 na metabolickou aktivitu meticilin rezistentní bakterie *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 bez ozáření. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

P44 - MRSA - Dark	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	15730,33	16859,00	21168,67	19108,00	15806,33	15539,33	18637,00	14695,00
% metabolické aktivity *	108,92%	118,85%	156,78%	138,64%	109,59%	107,24%	134,50%	100,00%
% inhibice **	-8,92%	-18,85%	-56,78%	-38,64%	-9,59%	-7,24%	-34,50%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 22: Snímek petriho misky s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene meticilin rezistentní bakterie *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi P44, bez ozáření byl proveden výsev („spot“ výsevovou metodou) na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu, při 37 °C byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu fotosensitizeru.

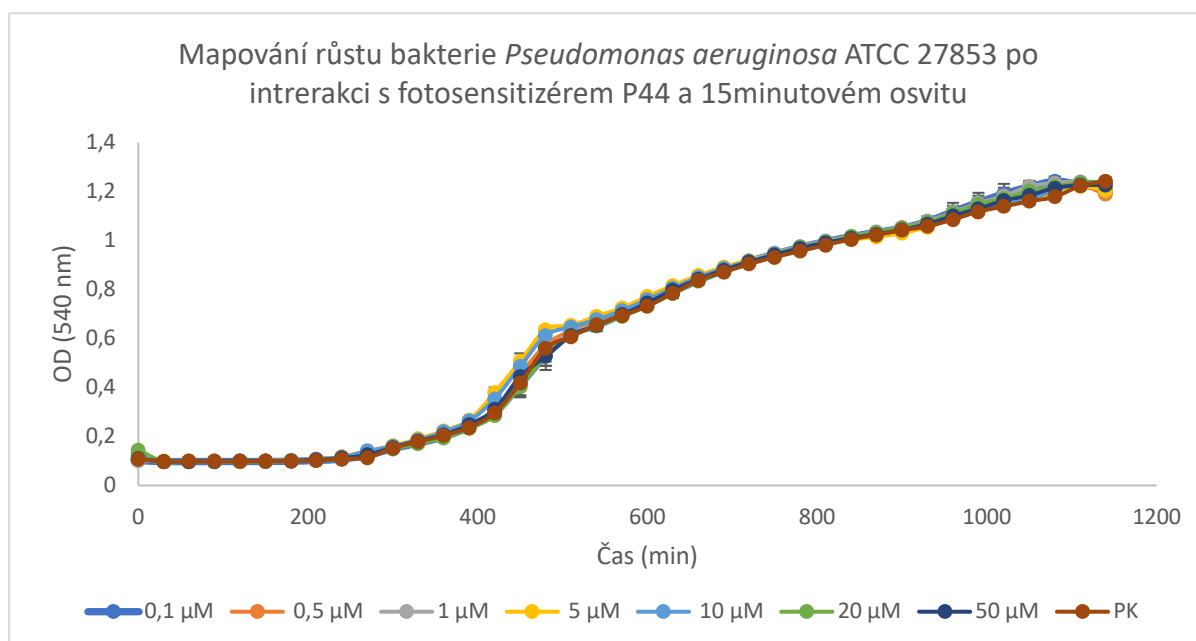
8.1.2 Vyhodnocení aktivity P44 vůči bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

8.1.2.1 Doba ozáření - 15 minut

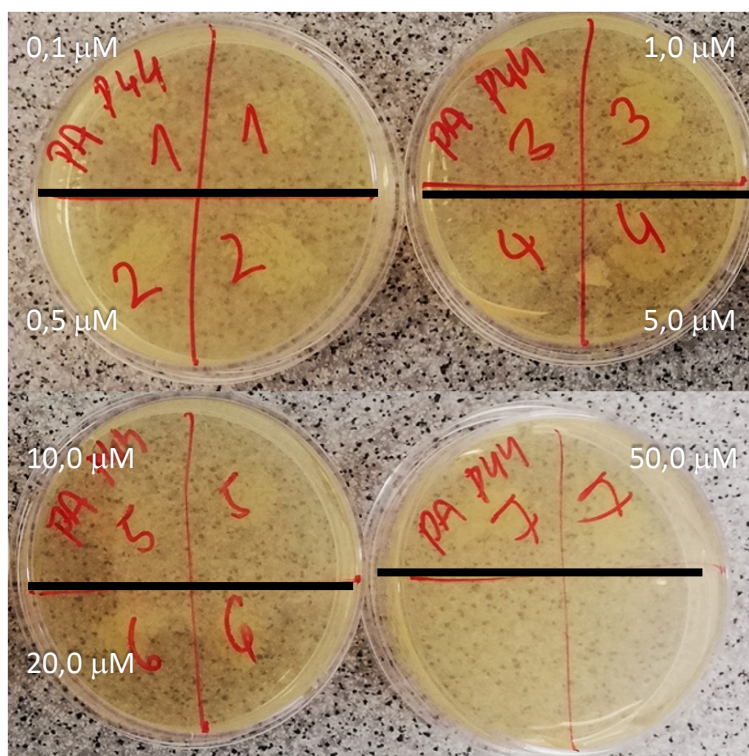
Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C, hodnota MBC v rámci testovaného rozmezí koncentrací fotosensitizeru P44 po době ozáření 15 min nemohla být stanovena – viz Obrázek 23. Stejný výsledek byl zaznamenán po vizuální inspekci destičky, ve všech jamkách došlo ke zjevnému nárůstu bakteriální biomasy, která se projevila zákalem. Jak je zřejmé z Obrázku 23, nebyla zaznamenána jakákoliv antibakteriální aktivita studované látky vůči kmenu bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, a to ve všech testovaných koncentracích.

Určení metabolické aktivity bakterie PA pro P44 a dobu ozáření 15 min pomocí AB není uvedeno. Pro hodnocení byl volen původně zamýšlený metodický přístup (mikrobiální suspenze v PBS, expozice testovanou látkou a ozáření, přidání metabolického indikátoru), který nevykázal spolehlivost (nebyla detekována metabolická aktivita pozitivní růstové kontroly).

Získané výsledky byly potvrzeny výsevovou metodou, která je po vizuální inspekci potvrdila, jak znázorňuje Obrázek 24. Na všech výsech agarů je bez rozdílu patrný nárůst bakterií, který se na plotnách projevuje viditelnými koloniemi tvořícími souvislou vrstvu.



Obrázek 23: Vliv různých koncentrací fotosensitizeru P44 na *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, s dobou ozařování 15 min ($\lambda > 570$ nm, $12,4$ mW/cm², 15 min, $11,2$ J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola; OD – optická denzita.



Obrázek 24: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi P44 a následném 15 min ozařování ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu, při 37 °C byl následně hodnocen nárůst.

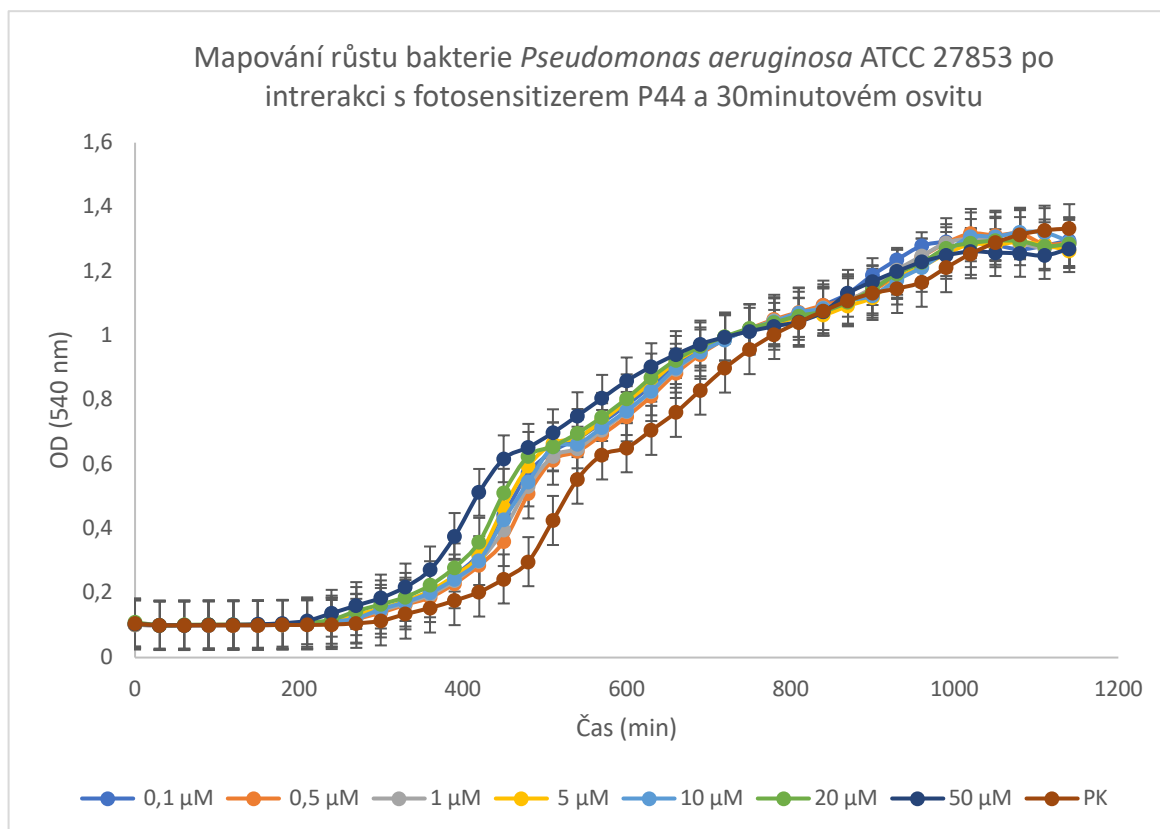
8.1.2.2 Doba ozáření - 30 minut

Základním předpokladem, ze kterého se vycházelo v navazujících experimentech bylo, že prodloužení doby ozáření by mělo vést k navýšení antibakteriální aktivity. Jak je patrné na Obrázku 25, kde jsou vyhodnocena data získaná prostřednictvím „recovery“ metody, ve srovnání s předchozími výsledky nedošlo k navýšení aktivity, dokonce byla zaznamenána progresse růstu ve srovnání s PK– bakterie PA pod vlivem testované látky po ozáření vykazovaly rychlejší nástup z lag růstové fáze do exponenciální fáze, než tomu bylo u PK. Zjevně tyto sub-inhibiční koncentrace fotosensitizeru P44 vedly k nabuzení bakteriálního metabolismu, který podpořil vyšší obrat v nárůstu bakteriální biomasy.

Zpracovaná data z AB plně podpořila poznatek získaný v rámci předchozího šetření, jak vyplývá z Tabulky 3. Ani nejvyšší koncentrace P44, odpovídající 50 μ M nebyla postačující jak k inhibici růstu, tak k inhibici metabolismu bakterie. Tyto sub-inhibiční koncentrace vedou k výraznému navýšení metabolické aktivity. V případě nejvyšší testované koncentrace pak

dochází k navýšení metabolické aktivity o téměř 45 % ve srovnání PK, která zahrnuje bakterie neexponované testovanou látkou.

Tyto výsledky získané „recovery“ metodou (Bioscreen C) a AB byly potvrzeny konfirmační výsevovou metodou viz Obrázek 26.

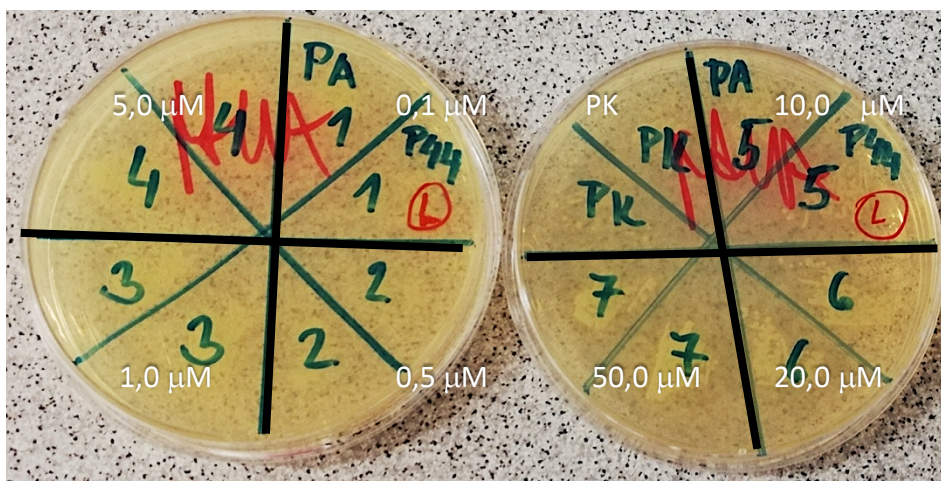


Obrázek 25: Vliv různých koncentrací P44 na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 s dobou ozařování 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola, OD – optická denzita.

Tabulka 3: Vliv různých koncentrací fotosensitizeru P44 na metabolickou aktivitu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, s dobou ozařování 30 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplicátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztahené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztahené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

P44 - PA - Light	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM	50 µM	PK
Průměrná hodnota RFU	16616,67	15103,33	15903,67	17555,00	16040,67	18204,67	21428,33	10883,00
% metabolické aktivity *	178,84%	158,11%	169,07%	191,69%	170,95%	200,59%	244,76%	100,00%
% inhibice **	-78,84%	-58,11%	-69,07%	-91,69%	-70,95%	-100,59%	-144,76%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 26: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi P44 a následném 30 min ozařování ($\lambda > 570 \text{ nm}$, $12,4 \text{ mW/cm}^2$, 30 min, $22,4 \text{ J/cm}^2$) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu fotosenzitizéru.

8.1.2.3 Určení vlastní antibakteriální aktivity P44 (bez ozáření) na bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

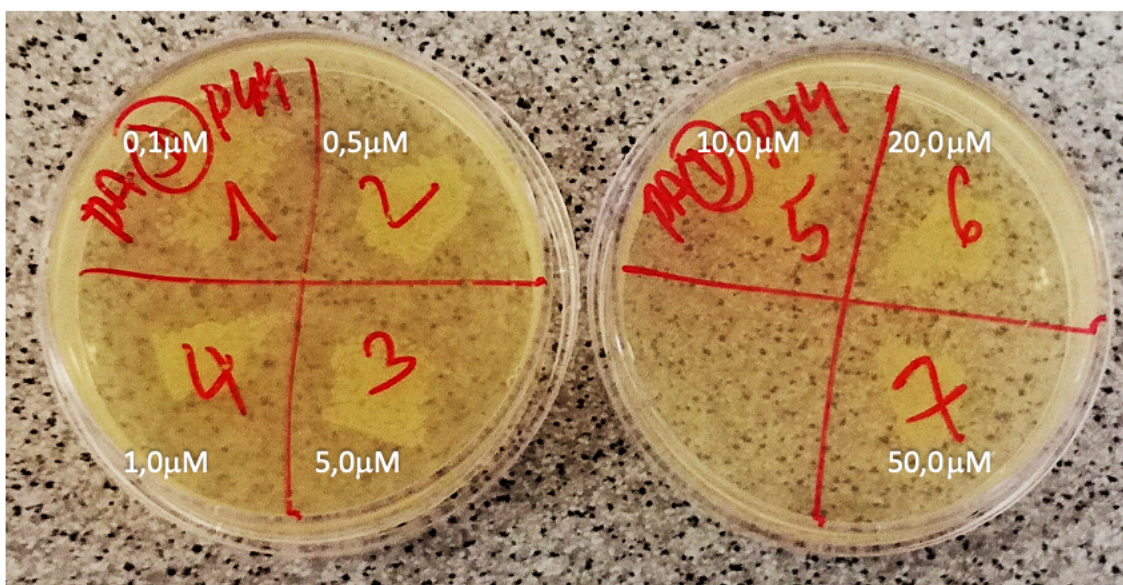
Podobně jako u bakteriálního kmene MRSA a P44 i zde byla určována vlastní antibakteriální aktivita vůči bakterii PA pomocí AB. Jak je zjevné z Tabulky 4, látka P44 nevykazuje toxicitu bez ozáření, tedy vlastní antibakteriální aktivitu bez aktivace světlem. Naopak P44 bez ozáření spíše potencoval růst obdobně jako tomu bylo v případě kmene MRSA, o čemž vypovídají záporné hodnoty v % inhibice.

Tyto výsledky byly potvrzeny výsevovou metodou viz Obrázek 27, která vesměs potvrdila výsledky naměřené pomocí AB. Na všech výsečích agarů je bez rozdílu patrný nárůst bakterií, který se na plotnách projevuje viditelnými koloniemi tvořícími souvislou vrstvu.

Tabulka 4: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru P44 na metabolickou aktivitu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 bez ozáření. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assay. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

P44 - PA - Dark	0,1 μ M	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	20 μ M	50 μ M	PK
Průměrná hodnota RFU	16910,67	14802,33	17163,67	17626,33	16810,33	19711,67	22555,67	12674,33
% metabolické aktivity *	146,14%	122,95%	148,92%	154,01%	145,04%	176,95%	208,23%	100,00%
% inhibice **	-46,14%	-22,95%	-48,92%	-54,01%	-45,04%	-76,95%	-108,23%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 27: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi P44 bez ozáření byl proveden výsev na kulturační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu při 37 °C byl následně hodnocen nárůst.

8.1.3 Vyhodnocení aktivity P44 vůči kvasince *Candida albicans*

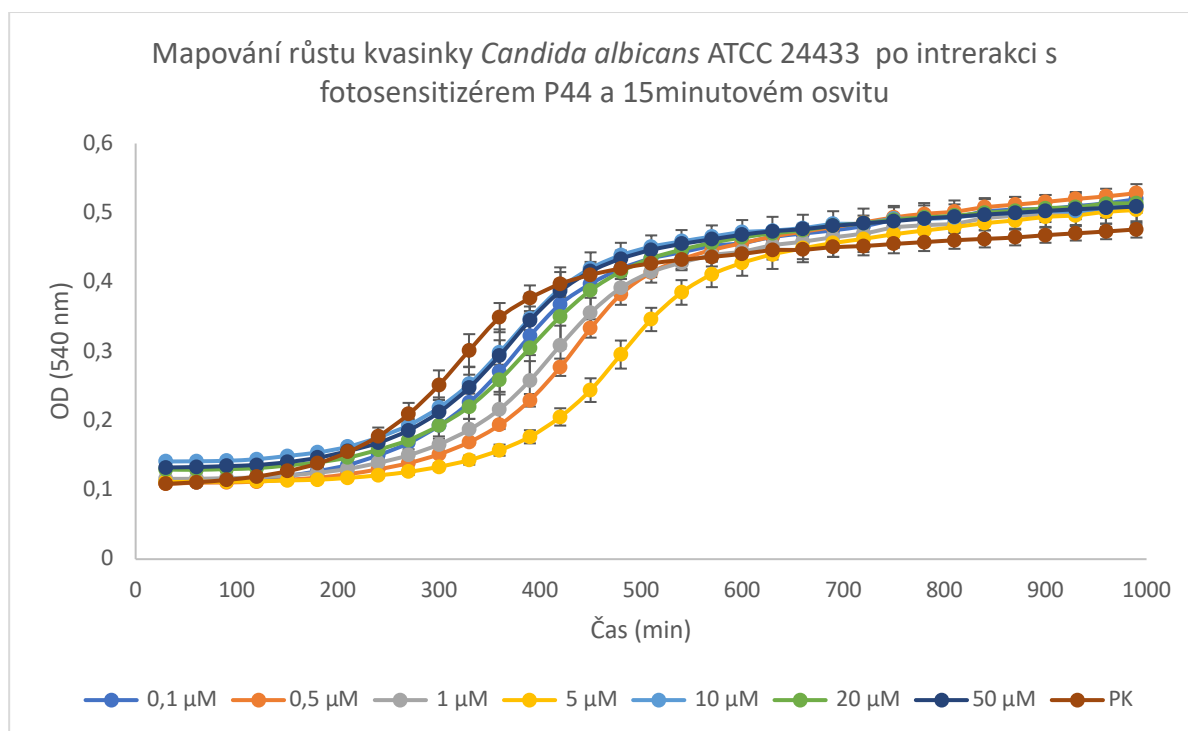
8.1.3.1 Doba ozáření - 15 minut

Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C („recovery“ metoda) nebylo možné stanovit hodnotu MFC v rámci testovaného rozmezí koncentrací P44 po 15 min ozařování – viz Obrázek 28. Stejný výsledek byl zaznamenán po vizuální inspekci destičky, ve všech jamkách došlo ke zjevnému nárůstu kvasinkové biomasy, která se projevila zákalem. Jak je zřejmé z Obrázku 28, v případě cílové koncentrace 5 μ M došlo k nejvyššímu posunu v nástupu do exponenciální fáze ve srovnání s PK, a to cca o 3

hodiny (180 minut). V případě nejvyšší zvolené testované koncentrace 50 μM nedošlo k posunu v nástupu do exponenciální fáze ve srovnání s PK.

Data získaná pomocí AB plně podpořila poznatek získaný v rámci předchozího šetření, jak vyplývá z Tabulky 5. I námi nejvyšší koncentrace P44 (50 μM) nebyla postačující ani k inhibici růstu, ani inhibici metabolismu kvasinky. K nejvyššímu procentu inhibice došlo při koncentraci P44 odpovídající 5 μM , což odpovídá výše uvedeným výsledkům zaznamenaných „recovery“ metodou. Pokles růstu zde byl přibližně o 67 % vůči PK.

Tyto výsledky získané „recovery“ metodou a AB byly potvrzeny konfirmační výsevovou metodou, která je po vizuální inspekci potvrdila, jak znázorňuje Obrázek 29. Na všech výsečích agarů je patrný nárůst kvasinky CA. Nejméně CFU narostlo na výsečích s 0,5 μM P44, což odpovídá výše uvedeným výsledkům.

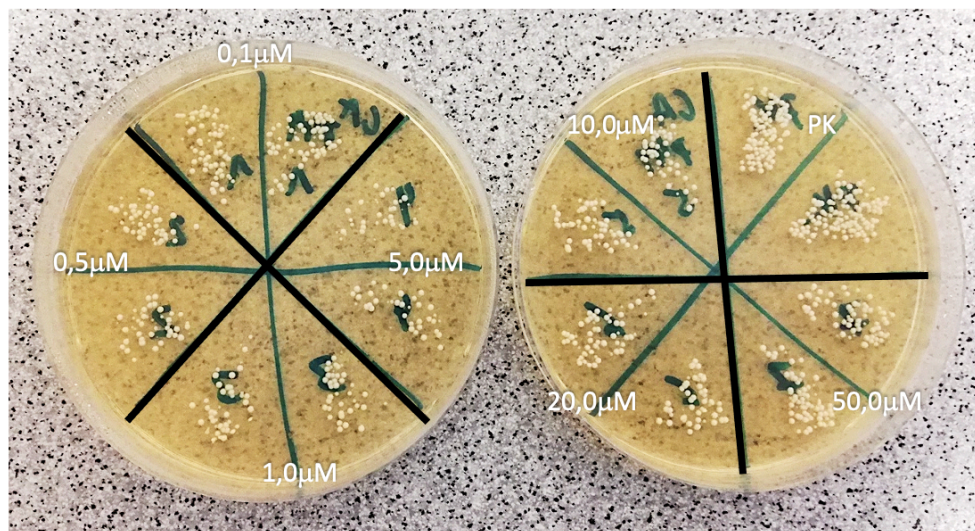


Obrázek 28: Vliv různých koncentrací P44 na kvasinku *Candida albicans* ATCC 24433, s dobou ozařování 15 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola; OD – optická denzita.

Tabulka 5: Vliv různých koncentrací fotosensitizeru P44 na metabolickou aktivitu kvasinky *Candida albicans* ATCC 24433, s dobou ozařování 15 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrahování průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

P44 - CA - Light	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	12522,33	8545,33	8049,33	5920,67	6550,67	6362,00	7345,33	15463,67
% metabolické aktivity *	79,54%	51,30%	47,78%	32,67%	37,14%	35,80%	42,78%	100,00%
% inhibice **	20,46%	48,70%	52,22%	67,33%	62,86%	64,20%	57,22%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 29: Snímek petriho misek se Sabouraud agarem a nárůstem kvasinkového kmene *Candida albicans* ATCC 24433. Po inkubaci kvasinkového kmene s P44 a následném 15 min ozařování ($\lambda > 570 \text{ nm}$, $12,4 \text{ mW/cm}^2$, 15 min , $11,2 \text{ J/cm}^2$) byl proveden výsev na kulturační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu kvasinek bez vlivu fotosensitizeru

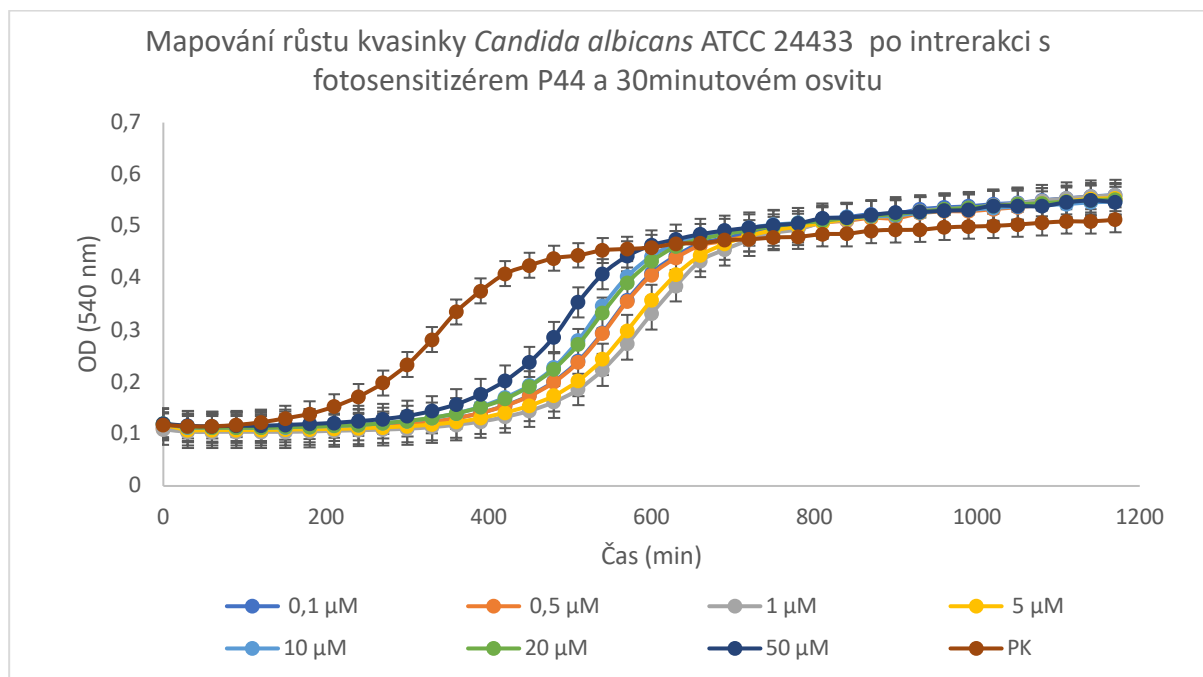
8.1.3.2 Doba ozáření - 30 minut

V případě ozařování po dobu 30 minut nebylo možné na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C hodnotu MFC v rámci testovaných koncentrací stanovit – viz Obrázek 30. Stejný výsledek byl zaznamenán po vizuální inspekci destičky – ve všech jamkách došlo ke zjevnému nárůstu kvasinkové biomasy, která se projevila zákalem. Jak vyplývá z Obrázku 30, došlo u všech koncentrací fotosensitizeru P44 k jistému posunu v nástupu do exponenciální fáze růstu v porovnání s PK, a to přibližně o 3,5 hodiny (220 minut). K největšímu posunu v nástupu z lag růstové fáze do exponenciální fáze růstu ve srovnání s PK došlo v případě koncentrace $1 \mu\text{M}$ a $5 \mu\text{M}$ téměř shodně o cca 4 hodiny

(240 minut). V případě 5 μM koncentrace (nejúspěšnější v rámci 15 min ozařování) došlo o prodloužení v nástupu do exponenciální fáze růstu o 1 hodinu v porovnání s expozicí světelného záření po dobu 15 min.

Data získaná metodou AB podpořila poznatek získaný v rámci předchozího šetření. Nejvyšší koncentrace P44 (50 μM) nebyla postačující ani k inhibici růstu, ani inhibici metabolismu kvasinky. Podobně jako u 15 min ozařování, i zde na základě dat z Tabulky 6 vyplývá, že k nejvyššímu procentu inhibice došlo při koncentraci P44 = 5 μM . Pokles metabolické aktivity zde byl přibližně o 74,5 % vůči PK. Při porovnání 0,5 μM koncentrace v rámci 15 a 30 min ozařování vyplývá, že při 30 min ozařování došlo k inhibici o 7,5 % více, což koreluje s daty získanými prostřednictvím přístroje Bioscreen C.

Tyto výsledky získané prostřednictvím přístroje Bioscreen C a AB byly potvrzeny konfirmační výsevovou metodou, která je po vizuální inspekci potvrdila viz Obrázek 31.

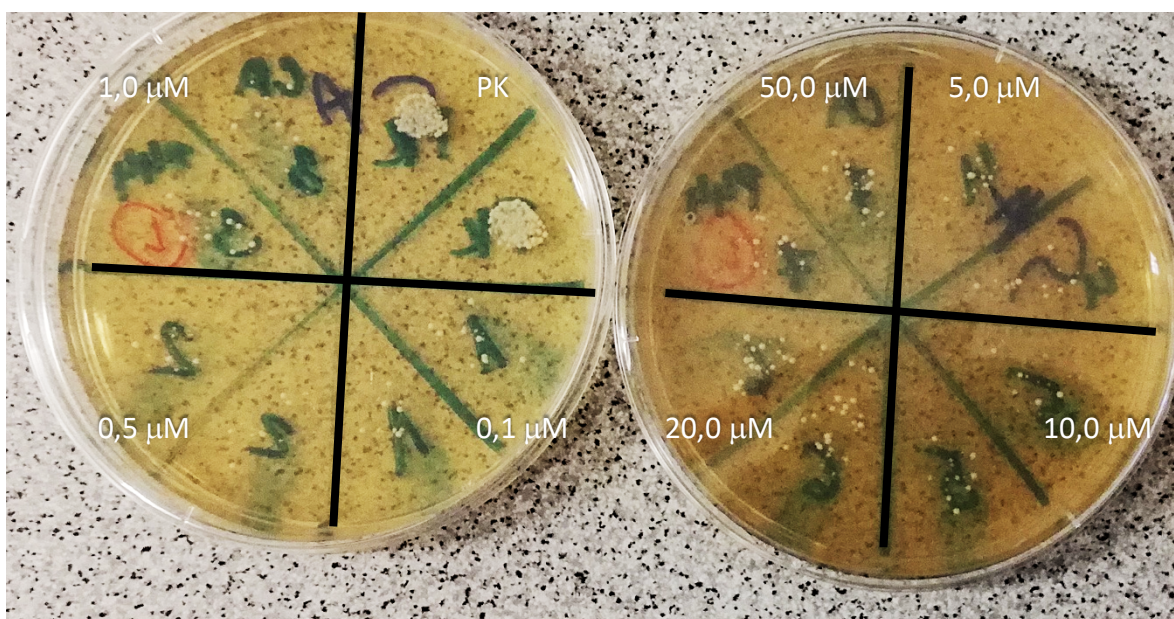


Obrázek 30: Vliv různých koncentrací P44 na kvasinku *Candida albicans* ATCC 24433, s dobou ozařování 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) stanovený stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola, OD – optická denzita.

Tabulka 6: Vliv různých koncentrací fotosensitizeru P44 na metabolickou aktivitu kvasinky *Candida albicans* ATCC 24433, s dobou ozáření 30 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

P44 - CA - Light	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	8707,33	7560,33	7442,67	6149,33	6207,00	6285,33	6457,00	14669,00
% metabolické aktivity *	47,68%	37,71%	36,68%	25,43%	25,93%	26,61%	28,11%	100,00%
% inhibice **	52,32%	62,29%	63,32%	74,57%	74,07%	73,39%	71,89%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 31: Snímek petriho misek se Sabouraud agarem a nárůstem kvasinkového kmene *Candida albicans* ATCC 24433. Po inkubaci kvasinkového kmene s P44 a následném 30 min ozáření ($\lambda > 570 \text{ nm}$, $12,4 \text{ mW/cm}^2$, 30 min , $22,4 \text{ J/cm}^2$) byl proveden výsev na kulturační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu kvasinek bez vlivu fotosensitizeru

8.1.3.3 Určení vlastní antifungální aktivity P44 (bez ozáření) na kvasinku *Candida albicans*

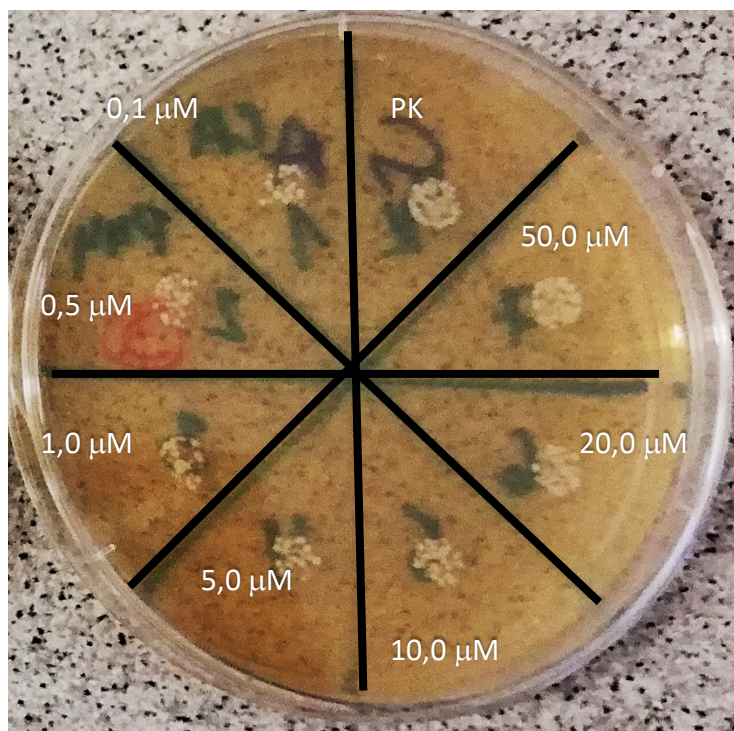
Podobně jako u bakteriálního kmene MRSA a PA po interakci s fotosensitizerem P44 byla určována vlastní antibakteriální aktivita studované látky bez expozice světlem. I v případě kvasinky CA byla určována vlastní antifungální aktivita bez ozáření prostřednictvím AB. Jak je zjevné z Tabulky 7, látka P44 nevykazuje vlastní antifungální aktivitu bez ozáření. Naopak fotosensitizer P44 bez ozáření spíše potencoval růst obdobně jako tomu bylo v případě bakteriálních kmenů MRSA a PA, o čemž vypovídají záporné hodnoty v % inhibice.

Tyto výsledky byly také confirmovány výsevovou metodou, která vesměs potvrdila výsledky naměřené v rámci metody AB viz Obrázek 32.

Tabulka 7: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru P44 na metabolickou aktivitu kvasinky *Candida albicans* ATCC 24433 bez ozáření. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescence pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

P44 - CA - Dark	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	17590,33	14339,67	14453,00	14679,00	14991,00	15765,33	13719,67	12976,00
% metabolické aktivity *	139,16%	111,53%	112,50%	114,42%	117,07%	123,65%	106,26%	100,00%
% inhibice **	-39,16%	-11,53%	-12,50%	-14,42%	-17,07%	-23,65%	-6,26%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 32: Snímek petriho misky se Sabouraud agarem a nárůstem kvasinkového kmene *Candida albicans* ATCC 24433. Po interakci kvasinkového kmene s různými koncentracemi P44 bez ozáření byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu při 37 °C byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu fotosensitizeru.

8.2 Fotosensitizer HK18

Koncentrační řada u obou dob ozařování (15 a 30 min) byla stejná, tedy: 0,1 - 0,5 - 1 - 5 - 10 - 20 - 50,0 μM .

8.2.1 Vyhodnocení aktivity HK18 vůči meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus*

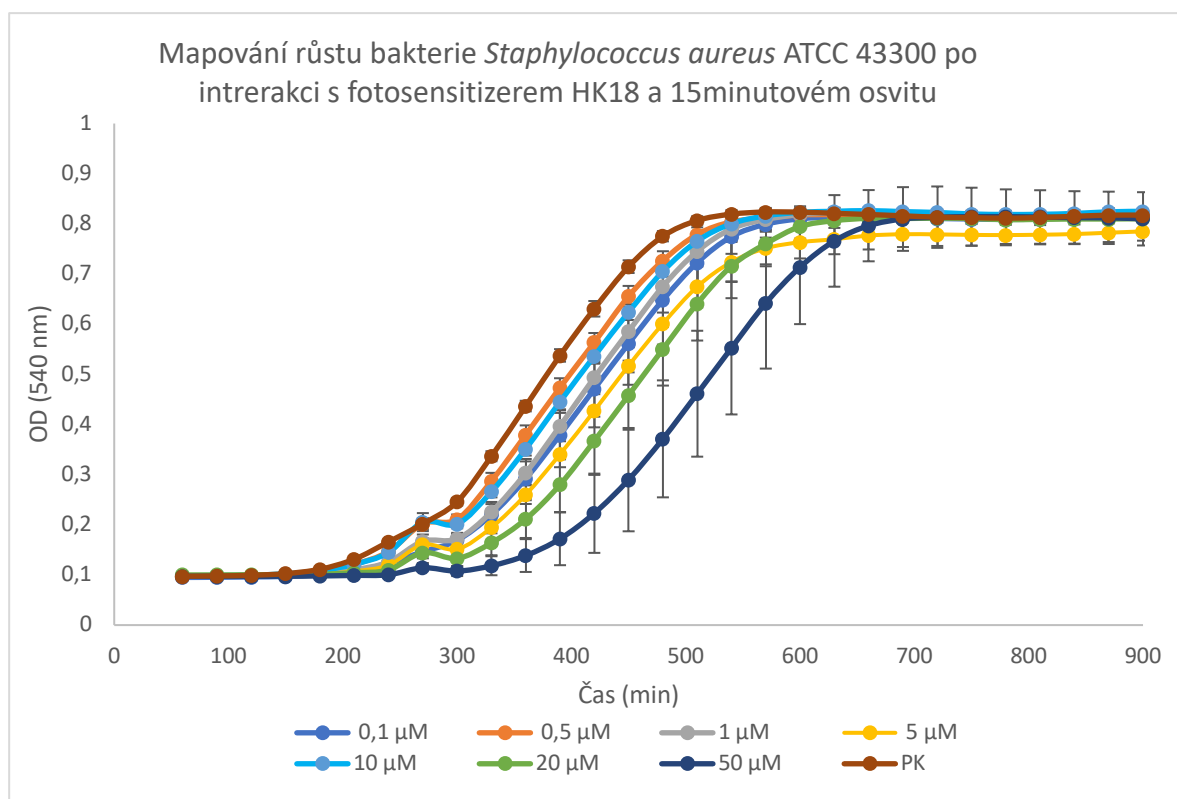
8.2.1.1 Doba ozáření - 15 minut

Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu nebylo možné v případě ozařování po dobu 15 min hodnotu MBC stanovit – viz Obrázek 33. Stejný výsledek byl zaznamenán po vizuální inspekci destičky – ve všech jamkách došlo ke zjevnému nárůstu bakteriální biomasy, která se projevila zákalem.

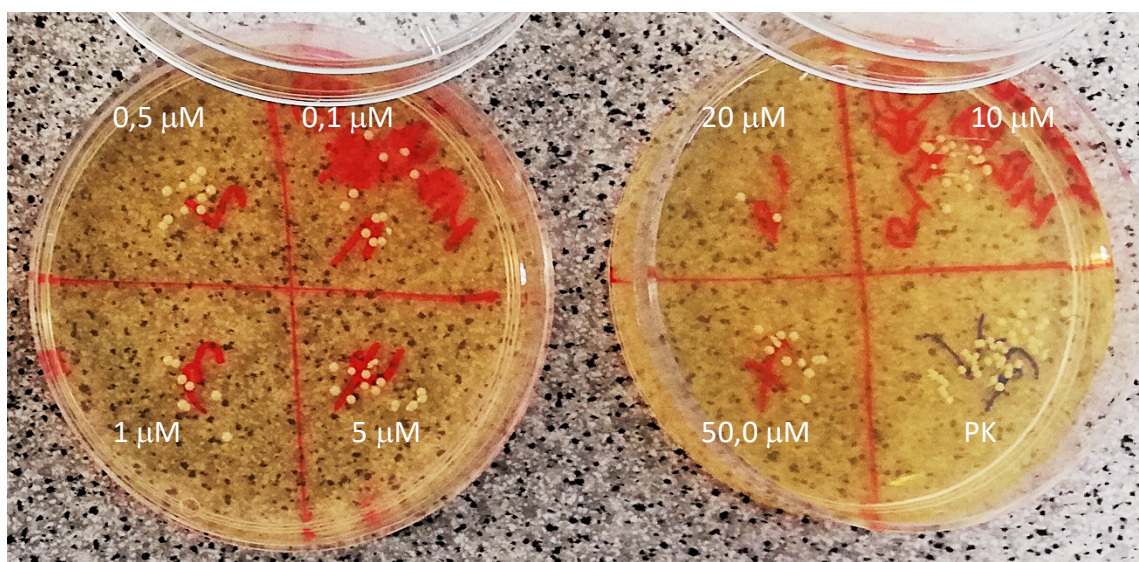
Jak je znázorněno na Obrázku 33, v případě cílové koncentrace 50 μM došlo ke zpoždění přechodu z lag růstové fáze do logaritmické, exponenciální fáze ve srovnání s PK o více než 2 hodiny (140 minut).

Určení metabolické aktivity MRSA pro fotosensitizer HK18 a dobu ozáření 15 min pomocí AB není uvedeno. Pro hodnocení byl volen původně zamýšlený metodický přístup (mikrobiální suspenze v PBS, expozice testovanou látkou a ozáření, přidání metabolického indikátoru), který nevykázal spolehlivost (nebyla detekována metabolická aktivita pozitivní růstové kontroly).

Získané výsledky byly ale confirmovány výsevovou metodou, která je po vizuální inspekci potvrdila viz Obrázek 34.



Obrázek 33: Vliv různých koncentrací HK18 na meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, s dobou ozáření 15 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola, OD – optická denzita.



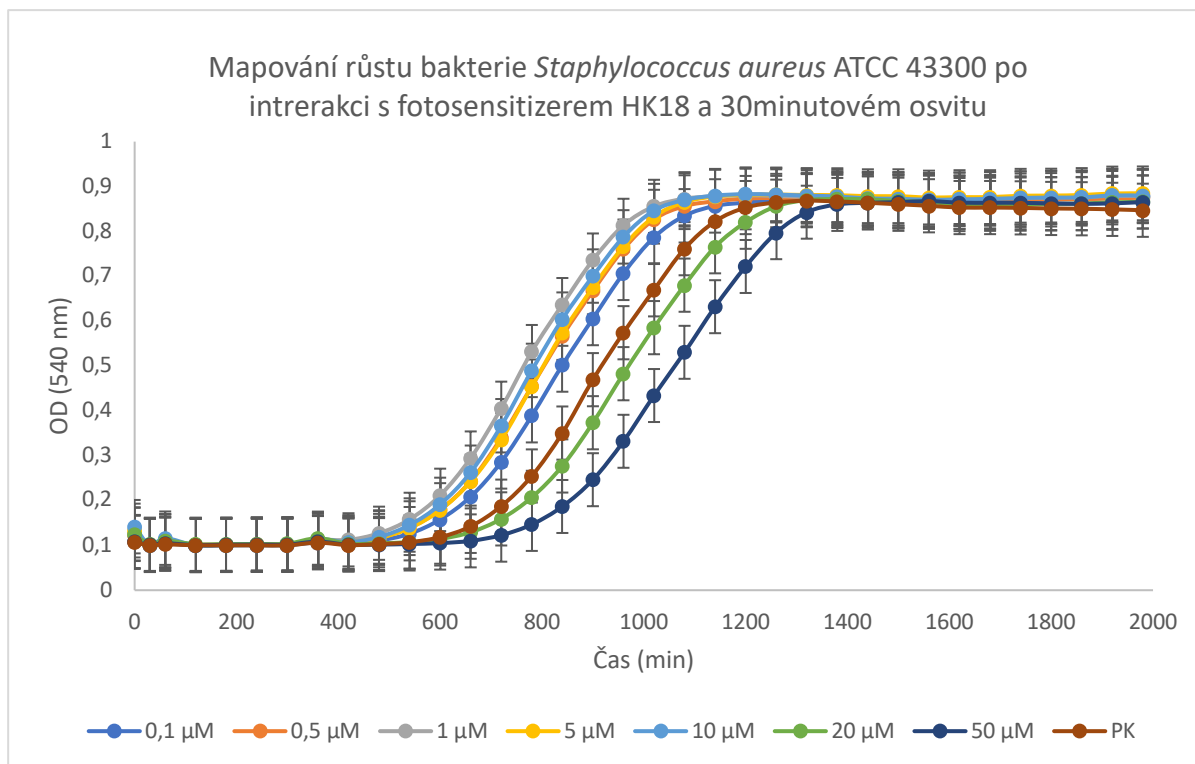
Obrázek 34: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi fotosenzitizeru HK18, po ozáření 15 minut (450W xenonová lampa Newport s vodním a high-pass filtrem OG570 ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²)) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu, při 37 °C byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu fotosenzitizeru.

8.2.1.2 Doba ozáření - 30 minut

Jak je patrné z Obrázku 35, ve srovnání s předchozími výsledky získanými při době ozařování 15 min nedošlo k navýšení aktivity, dokonce byla zaznamenána progrese růstu ve srovnání s PK. MRSA pod vlivem některých koncentrací HK18 (0,1, 0,5, 1, 5 a 10 μM) po 30 min ozařování vykazoval rychlejší nástup z lag růstové fáze do exponenciální fáze, než tomu bylo u PK. Zjevně tyto sub-inhibiční koncentrace fotosensitizeru HK18 vedly k nabuzení bakteriálního metabolismu, který podpořil vyšší obrat v nárůstu bakteriální biomasy. Naopak, při koncentraci 50 μM došlo ke zpoždění přechodu z lag růstové fáze do exponenciální fáze ve srovnání s PK přibližně o 2,5 hodiny (150 minut). Což je, překvapivě v rámci této koncentrace, téměř srovnatelný výsledek s dobou ozařování 15 min.

Data získaná metodou AB plně podpořila poznatek získaný v rámci předchozího šetření. Jak je patrné v Tabulce 8, sub-inhibiční koncentrace odpovídající 0,1, 0,5, 1, 5 a 10 μM vedou k vyššímu nárůstu metabolické aktivity, což přímo koreluje s daty naměřenými pomocí přístroje Bioscreen C. V případě koncentrace odpovídající 50 μM došlo k poměrně výrazné inhibici v metabolické aktivitě (přesahující 88 %).

Výsledky získané prostřednictvím přístroje Bioscreen C a AB byly potvrzeny konfirmační výsevovou metodou, která je potvrdila, jak znázorňuje Obrázek 36. Na všech výsečích agarů, odpovídajících stoupající koncentraci HK18 je patrný nárůst MRSA. Nejnižší nárůst CFU byl zaznamenán u koncentrace 50 μM HK18, což odpovídá výše uvedeným výsledkům.



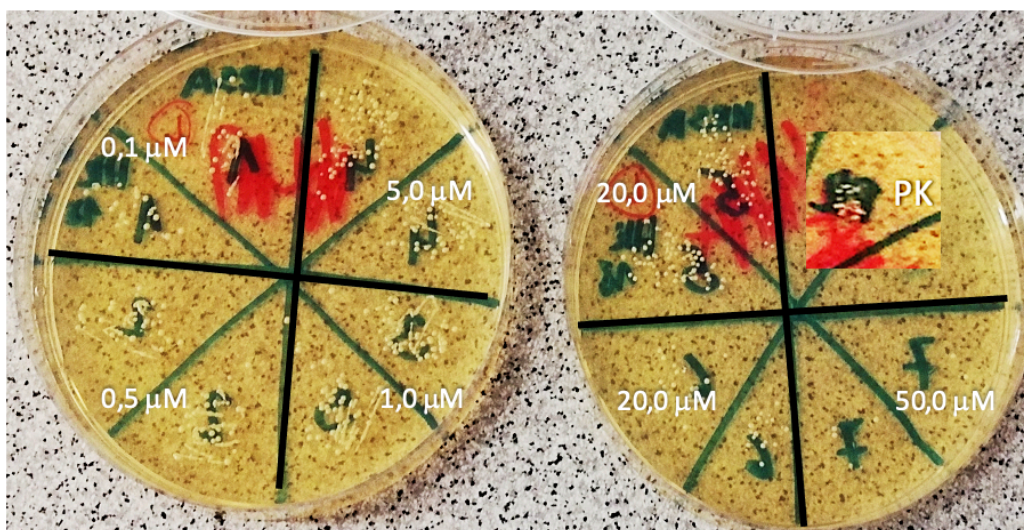
Obrázek 35: Vliv různých koncentrací HK18 na meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, s dobou ozařování 15 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola, OD – optická denzita.

Tabulka 8: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru HK18 na metabolickou aktivitu meticilin rezistentní bakterie *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 s dobou ozáření 30 minut.

Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

HK18 - MRSA - Light	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM	50 µM	PK
Průměrná hodnota RFU	19904,33	19709,00	20833,33	18670,33	16996,67	8597,33	4541,33	13855,00
% metabolické aktivity *	156,98%	155,12%	165,80%	145,25%	129,35%	49,56%	11,03%	100,00%
% inhibice **	-56,98%	-55,12%	-65,80%	-45,25%	-29,35%	50,44%	88,97%	0%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 36: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi fotosensitizeru HK18, po ozáření 30 minut (450W xenonová lampa Newport s vodním a high-pass filtrem OG570 ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²)) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu, při 37 °C byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu fotosensitizeru.

8.2.1.3 Určení vlastní antibakteriální aktivity HK18 (bez ozáření) na meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus*

Pro HK18 a bakteriální kmen MRSA byla také hodnocena vlastní antibakteriální aktivita bez ozáření pomocí AB. Jak z Tabulky 9 vyplývá, vlastní toxicita látky HK18 bez ozáření v souvislosti s MRSA nebyla prokázána. Naopak HK18 bez ozáření spíše potencoval metabolickou aktivitu, o čemž vypovídají záporné hodnoty v % inhibice.

Tyto výsledky byly potvrzovány výsevovou metodou viz Obrázek 37, která vesměs potvrdila výsledky naměřené v rámci metody AB.

Tabulka 9: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru HK18 na metabolickou aktivitu meticilin rezistentní bakterie *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 bez ozáření. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplicátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescence pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

HK18 - MRSA - Dark	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM	50 µM	PK
Průměrná hodnota RFU	17005,67	19249,33	18661,00	17863,00	20562,33	18001,67	14809,67	14695,00
% metabolické aktivity *	120,14%	139,89%	134,71%	127,69%	151,44%	128,91%	100,82%	100,00%
% inhibice **	-20,14%	-39,89%	-34,71%	-27,69%	-51,44%	-28,91%	-0,82%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 37: Snímek petriho misky s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi HK18, bez ozáření byl proveden výsev („spot“ výsevovou metodou) na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu při 37 °C byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu fotosensitizeru.

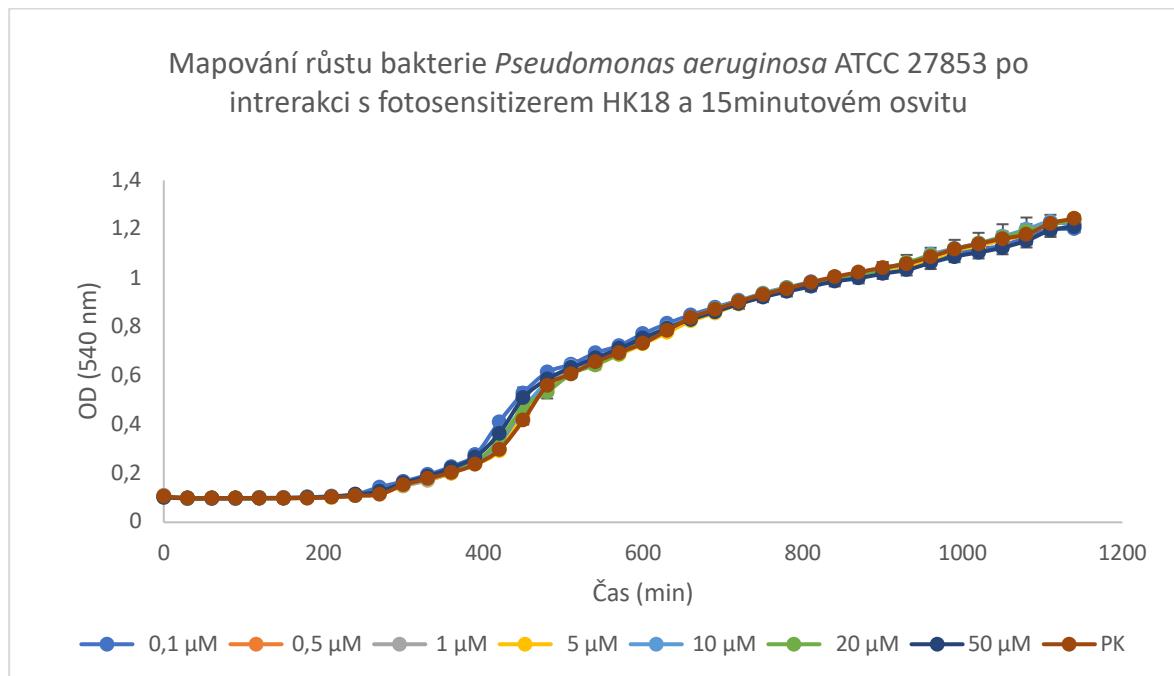
8.2.2 Vyhodnocení aktivity HK18 vůči bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

8.2.2.1 Doba ozáření - 15 minut

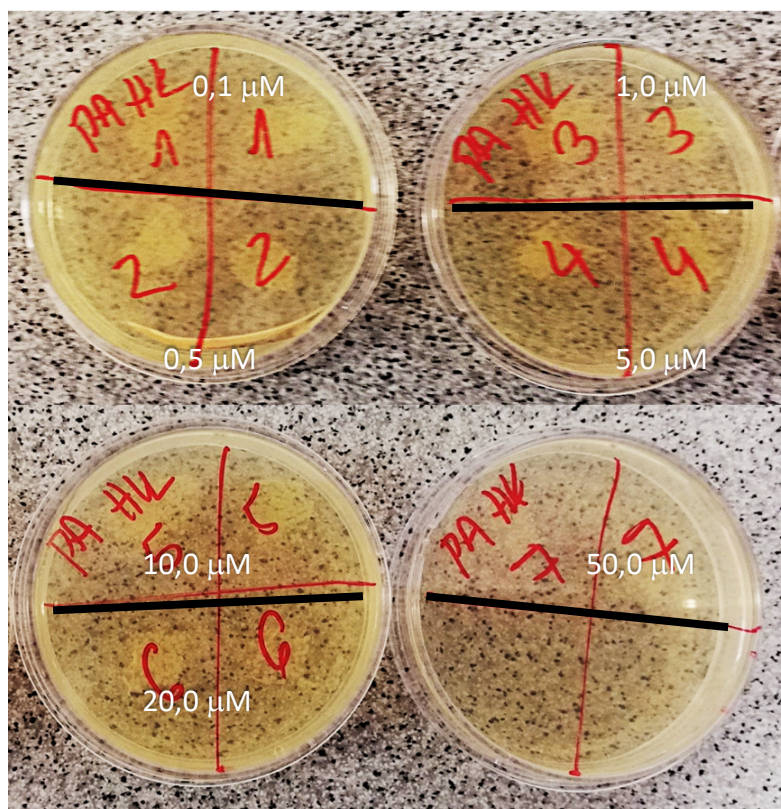
Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C, nebylo možné hodnotu MBC v rámci testovaného rozmezí koncentrací HK18 po době ozáření 15 min stanovit – viz Obrázek 38. Stejný výsledek byl zaznamenán po vizuální inspekci destičky, ve všech jamkách došlo ke zjevnému nárůstu bakteriální biomasy, která se projevila zákalem. Jak je zřejmé z Obrázku 38, nebyla zaznamenána jakákoliv antibakteriální aktivita studované látky vůči kmenu bakterie PA, a to ve všech testovaných koncentracích.

Určení metabolické aktivity PA pro HK18 a dobu ozáření 15 min pomocí AB není uvedeno. Pro hodnocení byl volen původně zamýšlený metodický přístup (mikrobiální suspenze v PBS, expozice testovanou látkou a ozáření, přidání metabolického indikátoru), který nevykázal spolehlivost (nebyla detekována metabolická aktivita pozitivní růstové kontroly).

Získané výsledky byly confirmovány výsevovou metodou, která je potvrdila, jak znázorňuje Obrázek 39. Na všech výsech agarů je bez rozdílu patrný nárůst bakterií, který se na plotnách projevuje viditelnými koloniemi tvořícími souvislou vrstvu.



Obrázek 38: Vliv různých koncentrací fotosenzitizeru HK18 na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, s dobou ozařování 15 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola; OD – optická denzita.



Obrázek 39: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi HK18 a ozáření 15 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu při 37 °C byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu fotosensitizeru.

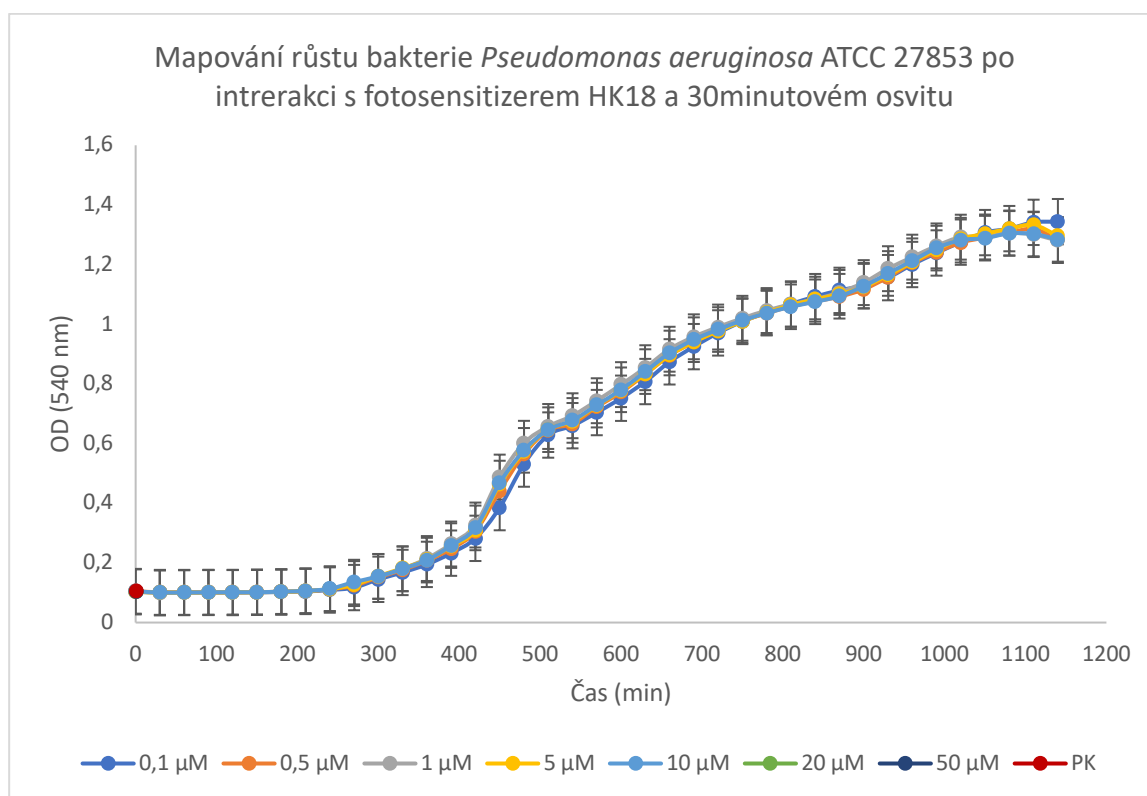
8.2.2.2 Doba ozáření - 30 minut

Ani v případě ozáření po dobu 30 min nebylo možné na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C hodnotu MBC v rámci testovaných koncentrací stanovit – viz Obrázek 40. Stejný výsledek byl zaznamenán po vizuální inspekci destičky, ve všech jamkách došlo ke zjevnému nárůstu bakteriální biomasy. Jak je zřejmé z Obrázku 40, nebyla zaznamenána jakákoliv antibakteriální aktivita studované látky vůči kmenu bakterie PA a to ve všech testovaných koncentracích. Tento graf se téměř neliší od Obrázku 38 (ozáření 15 min). Lze tedy soudit, že na růst PA neměla vliv koncentrace HK18 ani doba ozáření.

Data naměřená metodou AB plně korelovala s poznatky získanými v rámci předchozího šetření. Jak vyplývá z Tabulky 10, ani zde nejvyšší koncentrace HK18, která odpovídá 50 μ M nebyla postačující ani k inhibici růstu, ani inhibici metabolismu bakterie. Tyto sub-inhibiční koncentrace vedou naopak k výraznému navýšení metabolické aktivity. PA

vystavené kterékoli koncentraci fotosensitizeru HK18 byly v průměru přibližně o 90 % metabolicky aktivnější než PK, která zahrnuje bakterie neexponované testovanou látkou.

Tyto výsledky byly confirmovány výsevovou metodou – viz Obrázek 41 – která potvrdila výsledky naměřené metodou AB. Na jednotlivých výsečích agaru je patrný nárůst bakterií, který se na plotnách projevuje viditelnými koloniemi tvořícími souvislou vrstvu.

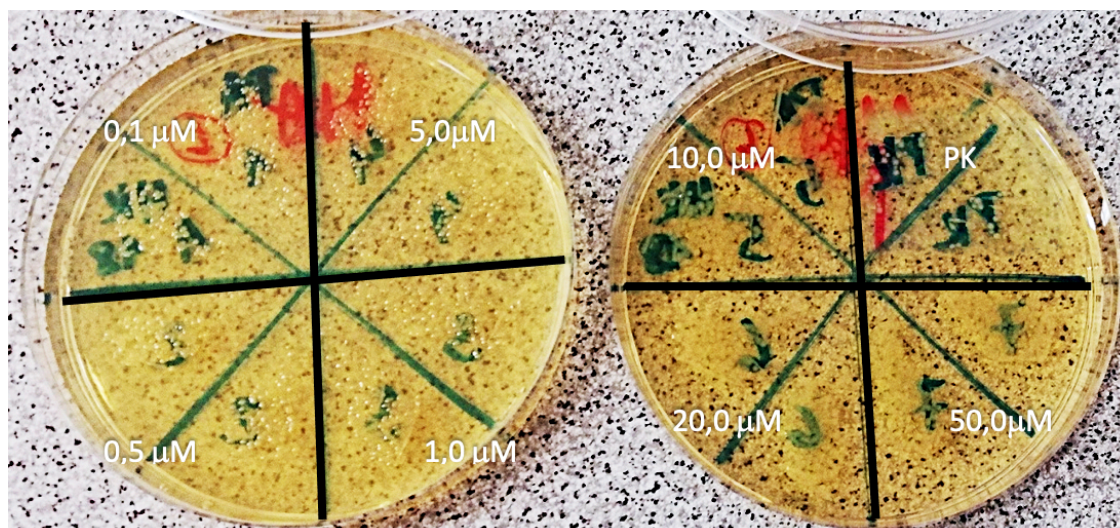


Obrázek 40: Vliv různých koncentrací fotosensitizeru HK18 na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, s dobou ozáření 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola; OD – optická denzita

Tabulka 10: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru HK18 na metabolickou aktivitu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 s dobou ozáření 30 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplicátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

HK18 - PA - Light	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM	50 µM	PK
Průměrná hodnota RFU	16709,00	18196,67	19336,00	16842,33	18065,00	16830,33	18028,33	10883,00
% metabolické aktivity *	180,10%	200,48%	216,09%	181,93%	198,68%	181,77%	198,18%	100,00%
% inhibice **	-80,10%	-100,48%	-116,09%	-81,93%	-98,68%	-81,77%	-98,18%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 41: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi HK18 a ozáření 30 min ($\lambda > 570$ nm, $12,4$ mW/cm², 30 min, $22,4$ J/cm²) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu při 37 °C byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu fotosenzitizéru.

8.2.2.3 Určení vlastní antibakteriální aktivity HK18 (bez ozáření) na *Pseudomonas aeruginosa*

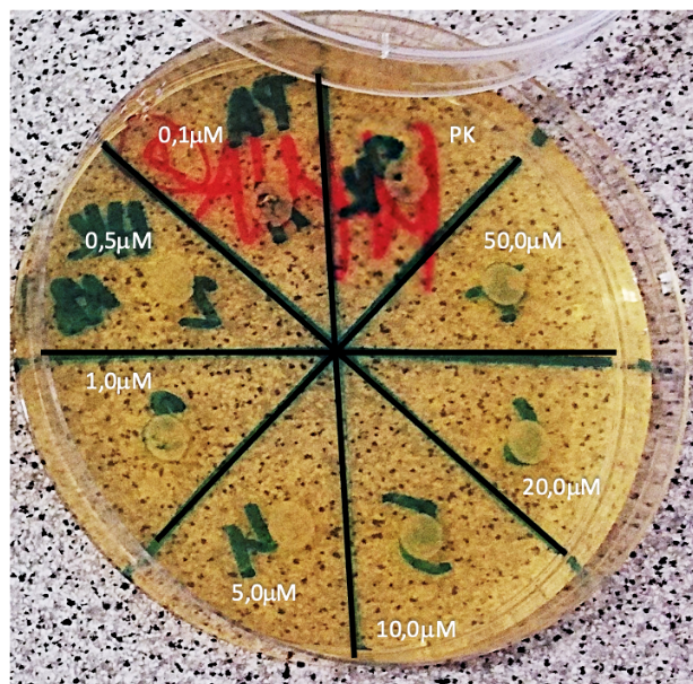
Pro HK18 a bakteriální kmen PA byla také hodnocena vlastní antibakteriální aktivita bez ozáření pomocí AB. Jak z Tabulky 11 vyplývá, tato aktivita látky HK18 v souvislosti s PA nebyla prokázána. Naopak fotosenzitizér HK18 bez ozáření spíše potencoval metabolickou aktivitu, o čemž vypovídají záporné hodnoty v % inhibice.

Tyto výsledky byly potvrzeny výsevovou metodou viz Obrázek 42, která potvrdila výsledky naměřené metodou AB.

Tabulka 11: Studium vlivu různých koncentrací fotosenzitizéru HK18 na metabolickou aktivitu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 bez ozáření. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplicátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

HK18 - PA - Dark	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM	50 µM	PK
Průměrná hodnota RFU	17410,00	17128,67	19203,33	19381,00	18871,67	16333,00	19325,67	12674,33
% metabolické aktivity *	151,63%	148,54%	171,36%	173,31%	167,71%	139,79%	172,70%	100,00%
% inhibice **	-51,63%	-48,54%	-71,36%	-73,31%	-67,71%	-39,79%	-72,70%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 42: Snímek petriho misky s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi HK18, bez ozáření byl proveden výsev („spot“ výsevovou metodou) na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu při 37 °C byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu fotosensitizeru.

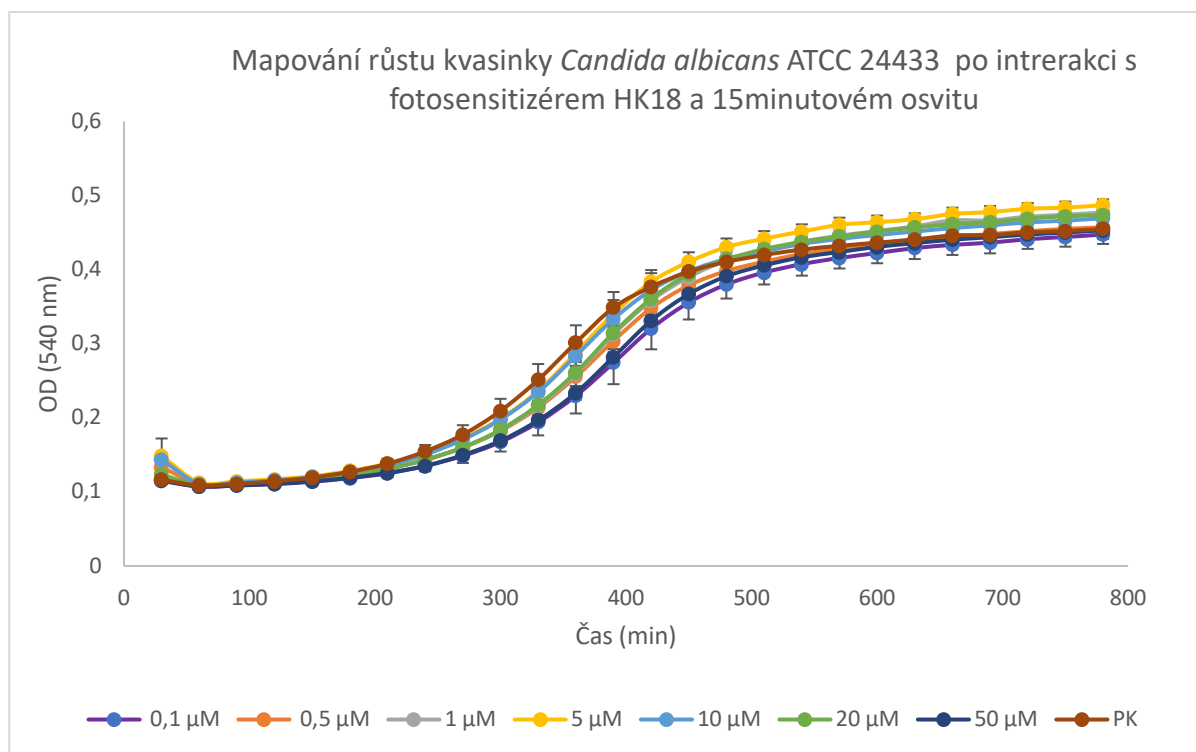
8.2.3 Vyhodnocení aktivity HK18 vůči kvasince *Candida albicans*

8.2.3.1 Doba ozáření - 15 minut

Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu nebylo možné hodnotu MFC v rámci testovaného rozmezí koncentrací HK18 po 15 min ozařování stanovit (Obrázek 43). Stejný výsledek byl zaznamenán po vizuální inspekci destičky. Jak ale z Obrázku 43 vyplývá, HK18 měl téměř mizivý vliv na zpoždění přechodu kvasinek z lag růstové fáze do exponenciální fáze růstu.

Výsledky získané metodou AB korelovaly s poznatky získanými v rámci předchozího šetření, jak vyplývá z Tabulky 12. Nejvyšší koncentrace HK18 (50 µM) nebyla postačující ani k inhibici růstu ani inhibici metabolismu kvasinky. MFC se touto metodou taktéž nepodařilo v daném rozmezí koncentrací stanovit. K nejvyššímu procentu inhibice metabolické aktivity došlo v tomto případě při 5 µM koncentraci HK18. Pokles růstu zde byl přibližně o 31 % vůči PK, která zahrnuje bakterie neexponované testovanou látkou.

Tyto výsledky byly confirmovány výsevovou metodou – viz Obrázek 44 – která vesměs potvrdila výsledky naměřené v rámci metody AB.

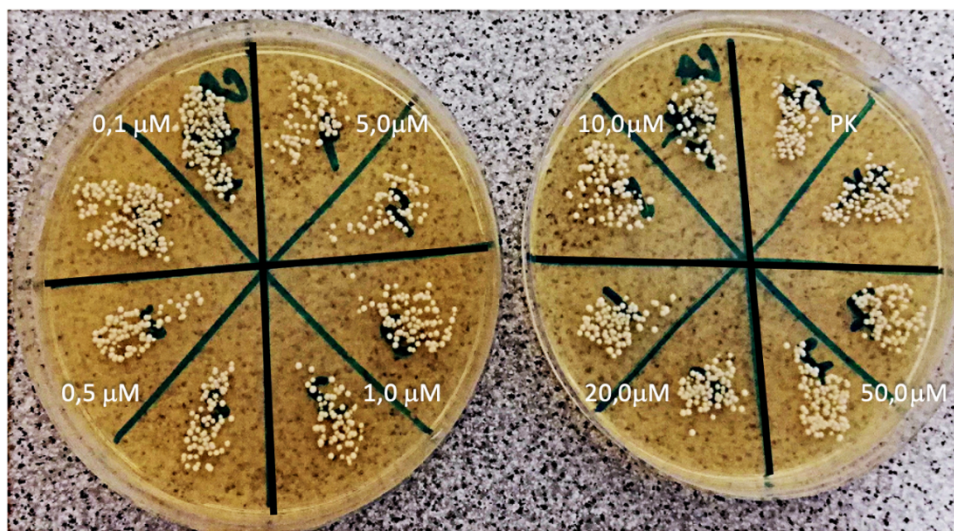


Obrázek 43: Vliv různých koncentrací HK18 na kvasinku *Candida albicans* ATCC 24433, s dobou ozařování 15 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola; OD – optická denzita.

Tabulka 12: Studium vlivu různých koncentrací fotosenzitizéru HK18 na metabolickou aktivitu kvasinky *Candida albicans* ATCC 24433 s dobou ozáření 15 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

HK18 - CA - Light	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM	50 µM	PK
Průměrná hodnota RFU	12495,67	13716,67	13250,00	11056,33	12919,00	14724,00	14793,33	15463,67
% metabolické aktivity *	79,35%	88,02%	84,71%	69,13%	82,36%	95,17%	95,66%	100,00%
% inhibice **	20,65%	11,98%	15,29%	30,87%	17,64%	4,83%	4,34%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



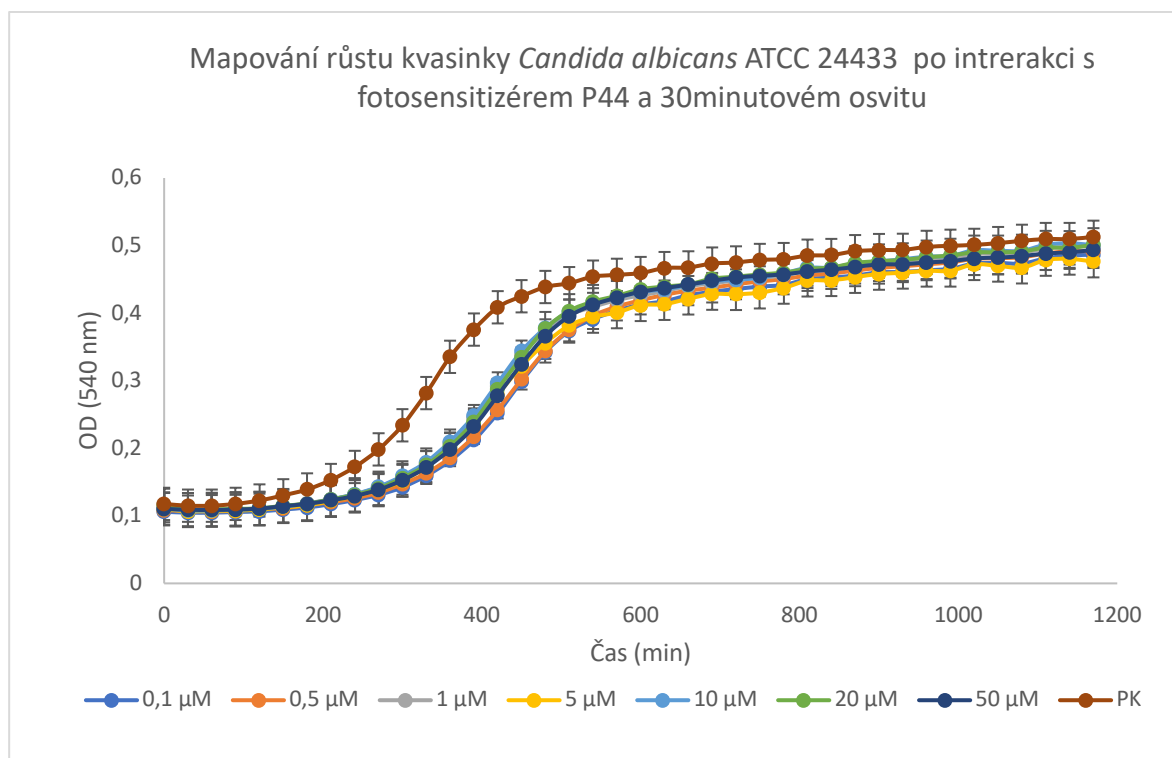
Obrázek 44: Snímek petriho misek se Sabouraud agarem a nárůstem kvasinkového kmene *Candida albicans* ATCC 24433. Po interakci kvasinkového kmene s různými koncentracemi HK18 a po ozáření 15 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu, při 37 °C byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu fotosenzitizéru.

8.2.3.2 Doba ozáření - 30 min

V případě ozáření po dobu 30 min nebylo možné na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu (Bioscreen C) stanovit hodnotu MFC (Obrázek 45). Stejný výsledek byl zaznamenán po vizuální inspekci destičky – ve všech jamkách došlo ke zjevnému nárůstu bakteriální biomasy, která se projevila zákalem. Jak je ale znázorněno na Obrázku 45, v případě použití kterékoliv koncentrace fotosenzitizéru došlo shodně k posunu v nástupu do exponenciální fáze růstu ve srovnání s PK přes 2 hodiny (cca 130 minut). Tudíž lze říci, že prodloužení doby ozáření vedlo k navýšení antimykotické aktivity, a tím tudíž i ke zpoždění počátku růstu mikroorganismů, což bylo základním předpokladem, ze kterého se vycházelo v těchto navazujících experimentech.

Data získaná metodou AB korelovala s poznatky získanými v rámci předchozího šetření. Jak vyplývá z Tabulky 13, ani zde nebyla postačující nejvyšší koncentrace HK18 (50 μM) k inhibici růstu a metabolismu kvasinky. MFC se tedy touto metodou také nepodařilo v daném rozmezí koncentrací stanovit. Na rozdíl od 15 min ozáření, kde došlo k nejvyšší inhibici při 5 μM koncentraci HK18 (31 %), zde došlo k nejvyšší parciální inhibici u 50 μM koncentrace, ale pouze o cca 25 %.

Výsledky získané pomocí přístroje Bioscreen C a metodou AB byly confirmovány výsevovou metodou – viz Obrázek 46.

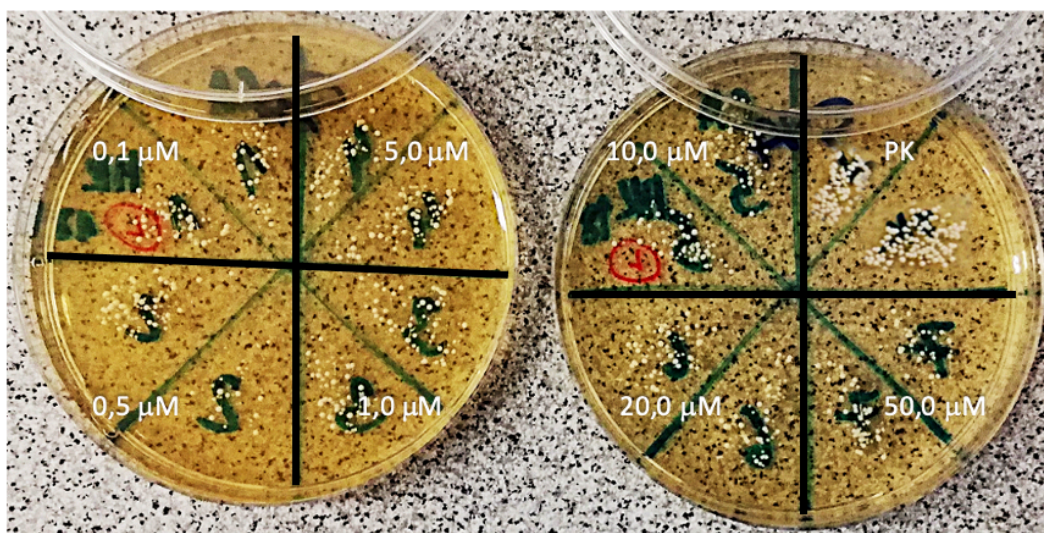


Obrázek 45: Vliv různých koncentrací HK18 na kvasinku *Candida albicans* ATCC 24433, s dobou ozařování 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola, OD – optická denzita.

Tabulka 13: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru HK18 na metabolickou aktivitu kvasinky *Candida albicans* ATCC 24433 s dobou ozáření 30 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztahované vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztahované vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

HK18 - CA - Light	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM	50 µM	PK
Průměrná hodnota RFU	12191,00	12856,67	13407,67	13075,33	12545,00	12156,00	11826,33	14669,00
% metabolické aktivity *	77,99%	83,78%	88,58%	85,69%	81,07%	77,69%	74,82%	100,00%
% inhibice **	22,01%	16,22%	11,42%	14,31%	18,93%	22,31%	25,18%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 46: Snímek petriho misek se Sabouraud agarem a nárůstem kvasinkového kmene *Candida albicans* ATCC 24433. Po interakci kvasinkového kmene s různými koncentracemi fotosensitizeru HK18 a po ozáření 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu, při 37 °C byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

8.2.3.3 Určení vlastní antimykotické aktivity HK18 (bez ozáření) na *Candida albicans*

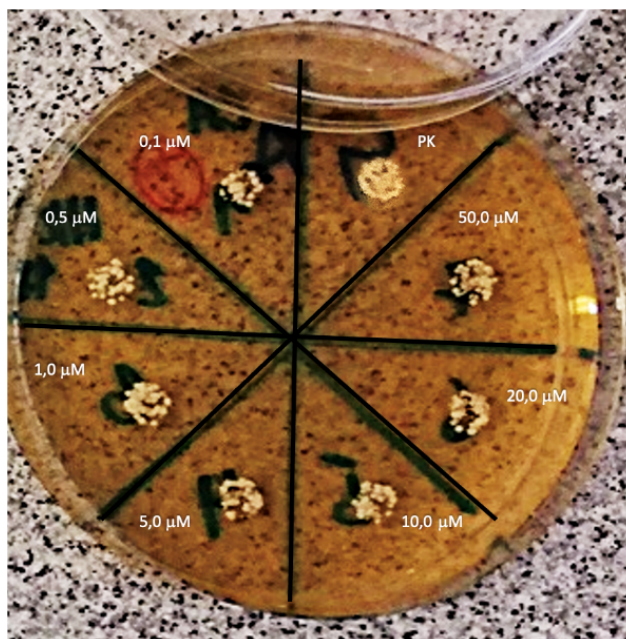
Pro kombinaci CA a HK18 byla také hodnocena vlastní antimykotická aktivita látky bez ozáření pomocí AB. Jak z Tabulky 14 vyplývá, vlastní aktivita látky HK18 bez ozáření v kombinaci s CA nebyla prokázána. Naopak, HK18 bez ozáření spíše potencoval metabolickou aktivitu, o čemž opět vypovídají záporné hodnoty v % inhibice. K poklesu metabolické aktivity došlo pouze v případě 5 μ M koncentrace, konkrétně o cca 7 % vůči PK.

Tyto výsledky byly potvrzeny výsevovou metodou (Obrázek 47), která potvrdila výsledky naměřené v rámci metody AB.

Tabulka 14: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru HK18 na metabolickou aktivitu kvasinky *Candida albicans* ATCC 24433 bez ozáření. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztahované vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztahované vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

HK18 - CA - Dark	0,1 μ M	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	20 μ M	50 μ M	PK
Průměrná hodnota RFU	13515,67	13223,33	13339,33	12197,67	13868,33	14648,00	14618,33	12976,00
% metabolické aktivity *	104,53%	102,05%	103,03%	93,33%	107,53%	114,16%	113,90%	100,00%
% inhibice **	-4,53%	-2,05%	-3,03%	6,67%	-7,53%	-14,16%	-13,90%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 47: Snímek petriho misky se Sabouraud agarem a nárůstem kvasinkového kmene *Candida albicans* ATCC 24433. Po interakci kvasinkového kmene s různými koncentracemi HK18 bez ozáření byl proveden výsev („spot“ výsevovou metodou) na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 hodin v termostatu byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

8.3 Fotosensitizér P42

Koncentrační řady pro různé doby ozáření jsou následující:

15 min: 0,1 - 0,5 - 1 - 5 - 10 - 20 - 50 µM

30 min: 0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,5 - 1 - 5 - 10 - 20 - 50 µM

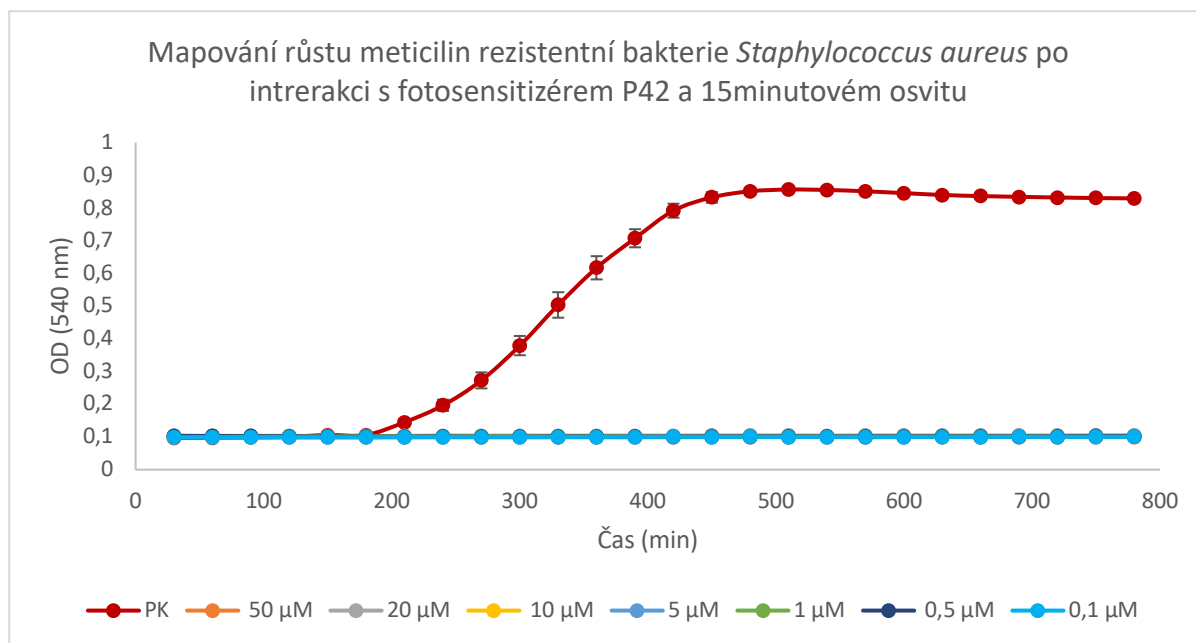
8.3.1 Vyhodnocení aktivity P42 vůči meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus*

8.3.1.1 Doba ozáření - 15 minut

Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C a také na základě vizuálního hodnocení bylo prokázáno, že při žádné z měřených koncentrací (0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20 a 50,0 µM) nedošlo k nárůstu mikrobiální biomasy – v příslušných jamkách nebyl detekován zákal (Obrázek 48). S ohledem na to, že jde o metodický přístup, tzv. „recovery“ metodu, byla na základě této metody odečtena hodnota $MBC \leq 0,1 \mu M$.

V případě hodnocení výsledků pomocí AB bylo zjištěno, obdobně jako pomocí přístroje Bioscreen C, že v případě všech měřených koncentrací (0,1 až 50,0 μM) došlo k výrazné inhibici metabolické aktivity (cca 93 %; Tabulka 15).

Výsledky získané prostřednictvím přístroje Bioscreen C a AB byly potvrzeny konfirmační výsevovou metodou, která je po vizuální inspekci potvrdila, jak znázorňuje Obrázek 49. Nárůst MRSA je patrný pouze ve výšce s PK.

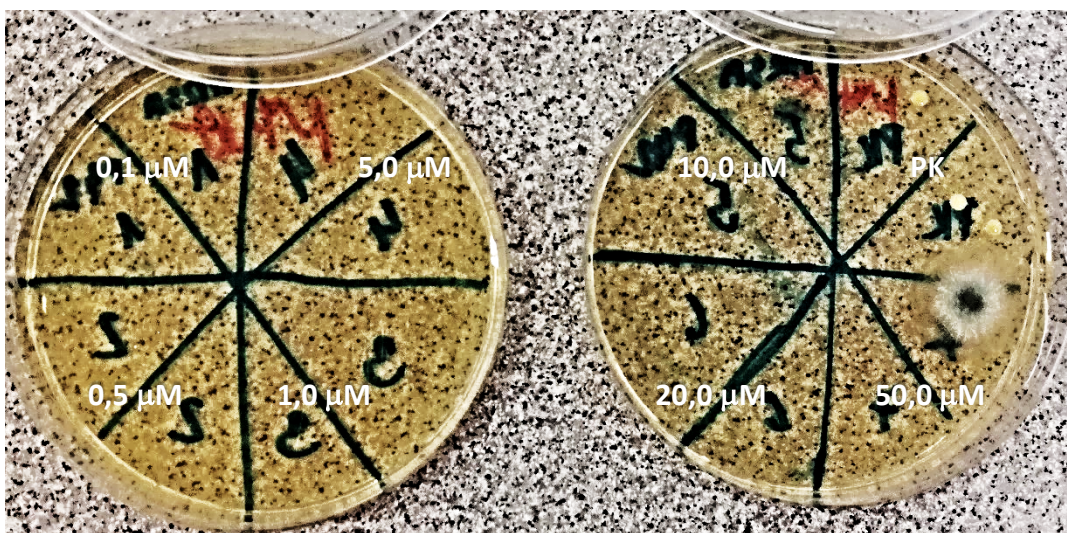


Obrázek 48: Vliv různých koncentrací P44 na meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 s dobou ozáření 15 min ($\lambda > 570 \text{ nm}$, $12,4 \text{ mW/cm}^2$, 15 min , $11,2 \text{ J/cm}^2$) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola; OD – optická denzita.

Tabulka 15: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru P42 na metabolickou aktivitu meticilin rezistentní bakterie *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 s dobou ozáření 15 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplicátech). Po subtrahování průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

P42 - MRSA - Light	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	3631,33	3427,00	3543,00	3523,67	3557,33	3484,67	3406,00	33264,00
% metabolické aktivity *	7,45%	6,82%	7,18%	7,12%	7,22%	7,00%	6,76%	100,00%
% inhibice **	92,55%	93,18%	92,82%	92,88%	92,78%	93,00%	93,24%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 49: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi P42 a po 15 min ozáření ($\lambda > 570$ nm, $12,4$ mW/cm², 15 min, $11,2$ J/cm²) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 h v termostatu byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu fotosenzitizéru. Pozn.: v rámci výseče odpovídající koncentraci 50 μM došlo ke kontaminaci agaru, tento výsledek tak nelze považovat za průkazný.

8.3.1.2 Doba ozáření - 30 minut

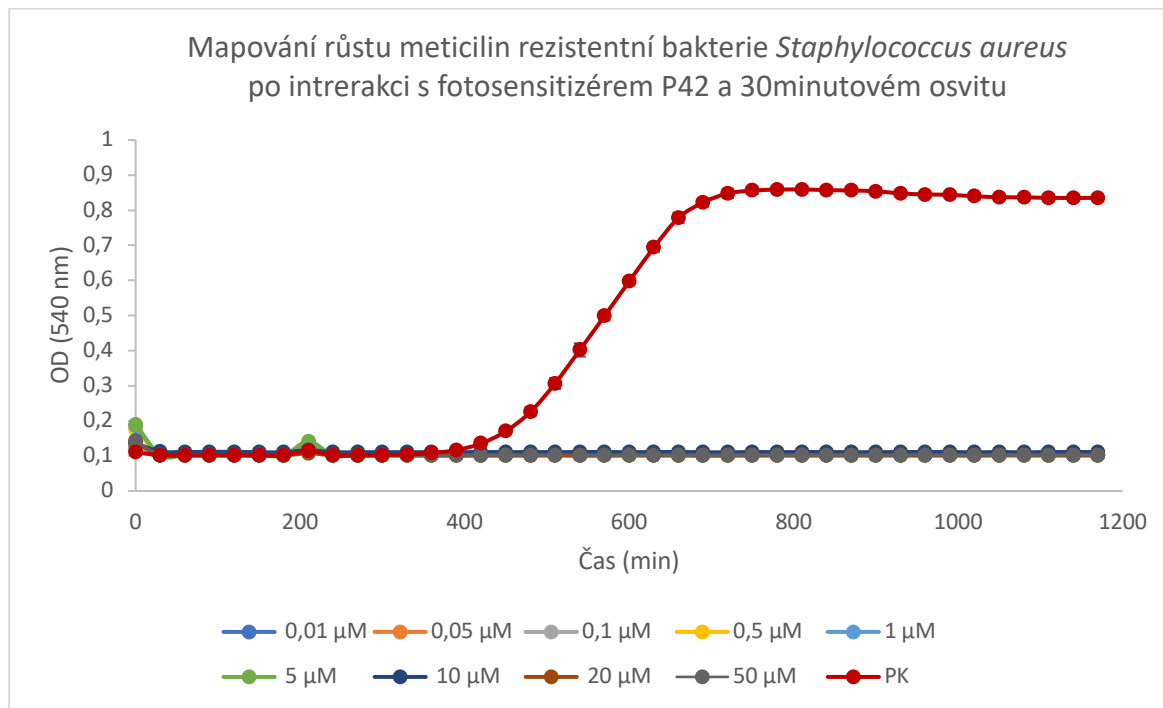
Základním předpokladem, ze kterého se vycházelo v navazujících experimentech bylo, že prodloužení doby ozáření by mělo vést k navýšení antibakteriální aktivity. V tomto případě, na základě výsledků po 15 min ozařování, došlo k upravení koncentračního rozhraní, což spočívalo především v začlenění nižších koncentrací P42.

Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C a také na základě vizuálního hodnocení bylo prokázáno, že ani zde při žádné z měřených koncentrací (0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20 a 50,0 μM) nedošlo k nárůstu mikrobiální biomasy (Obrázek 50). Na základě této metody byla odečtena hodnota $MBC \leq 0,01$ μM.

Přímé srovnání MBC při ozáření 15 min (0,1μM) a 30 min (0,01μM) nelze provést, protože obě koncentrace představují spodní limit koncentrační řady. Pro určení přesné MBC bude tedy potřeba experimenty rozšířit o nižší koncentrace. Je tedy nutné tyto experimenty v budoucnu doplnit.

V případě hodnocení výsledků pomocí AB byla zjištěna výrazná inhibice v metabolické aktivitě přibližně o 80–87 % (Tabulka 16). Pokud srovnáme výsledky získané metodou AB po 15 a 30minutovém ozáření, dojdeme k závěru, že při 30 min ozáření byly bakterie v průměru cca o 9 % metabolicky aktivnější než při ozáření pouze po dobu 15 min.

Výsledky získané prostřednictvím „recovery“ metody a AB byly potvrzeny konfirmační výsevovou metodou, která je potvrdila (Obrázek 51). Nárůst MRSA je patrný pouze ve výšeči s PK.



Obrázek 50: Vliv různých koncentrací P42 na metilicilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, s dobou ozařování 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola, OD – optická denzita

Tabulka 16: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru P42 na metabolickou aktivitu metilicilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 s dobou ozařování 30 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplicátech). Po subtrahování průměrných hodnot odpovídajících fluorescence pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

P42 - MRSA - Light	0,01 µM	0,05 µM	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM	50 µM	PK
Průměrná hodnota RFU	6461,00	6437,67	6051,00	6067,33	6209,00	6140,33	5938,00	6294,00	5950,67	12121,67
% metabolické aktivity *	19,82%	19,49%	14,00%	14,23%	16,25%	15,27%	12,40%	17,45%	12,58%	100,00%
% inhibice **	80,18%	80,51%	86,00%	85,77%	83,75%	84,73%	87,60%	82,55%	87,42%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 51: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi P42 a 30 min ozáření ($\lambda > 570$ nm, $12,4$ mW/cm², 30 min, $22,4$ J/cm²) byl proveden výsev na kulturační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 h v termostatu byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

8.3.1.3 Určení vlastní antibakteriální aktivity P42 (bez ozáření) na meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus*

Pro kombinaci látky P42 a bakterie MRSA byla také hodnocena vlastní antibakteriální aktivita bez ozáření pomocí AB. Z Tabulky 17 vyplývá, že v nižších koncentracích fotosensitizeru nebyla tato aktivita zaznamenána. V rozmezí od $0,01\mu\text{M}$ – $0,1\mu\text{M}$ jsou procenta inhibice dokonce v záporných hodnotách, což znamená zvýšení metabolické aktivity bakterií v přítomnosti fotosensitizeru. K poměrně významnému snížení metabolické aktivity se ale dostáváme u koncentrací $\geq 1\mu\text{M}$ ($\geq 57\%$). Při $50\mu\text{M}$ koncentraci je inhibice dokonce 100 %. Jelikož ale byly MBC v případě 15 i 30 min ozáření stanoveny na nejnižší použité koncentraci P42 ($\text{MBC} \leq 0,1\mu\text{M}$ a $\leq 0,01\mu\text{M}$), vlastní toxicita bez ozáření zde nemá velký význam.

Tyto výsledky byly potvrzeny výsevovou metodou (Obrázek 52), která vesměs potvrdila výsledky naměřené v rámci metody AB.

Tabulka 17: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru P42 na metabolickou aktivitu meticilin rezistentní bakterie *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 bez ozáření. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

P42 - MRSA - Dark	0,01 μM	0,05 μM	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	17636,00	15676,33	15181,67	11176,33	8198,33	5521,00	5580,67	5506,33	5000,67	12121,67
% metabolické aktivity *	180,44%	151,83%	144,61%	86,13%	42,65%	3,56%	4,43%	3,35%	0,00%	100,00%
% inhibice **	-80,44%	-51,83%	-44,61%	13,87%	57,35%	96,44%	95,57%	96,65%	100,00%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 52: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi P42 bez ozáření byl proveden výsev („spot“ výsevovou metodou) na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 h v termostatu byl hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

8.3.2 Vyhodnocení aktivity P42 vůči bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

8.3.2.1 Doba ozáření - 15 minut

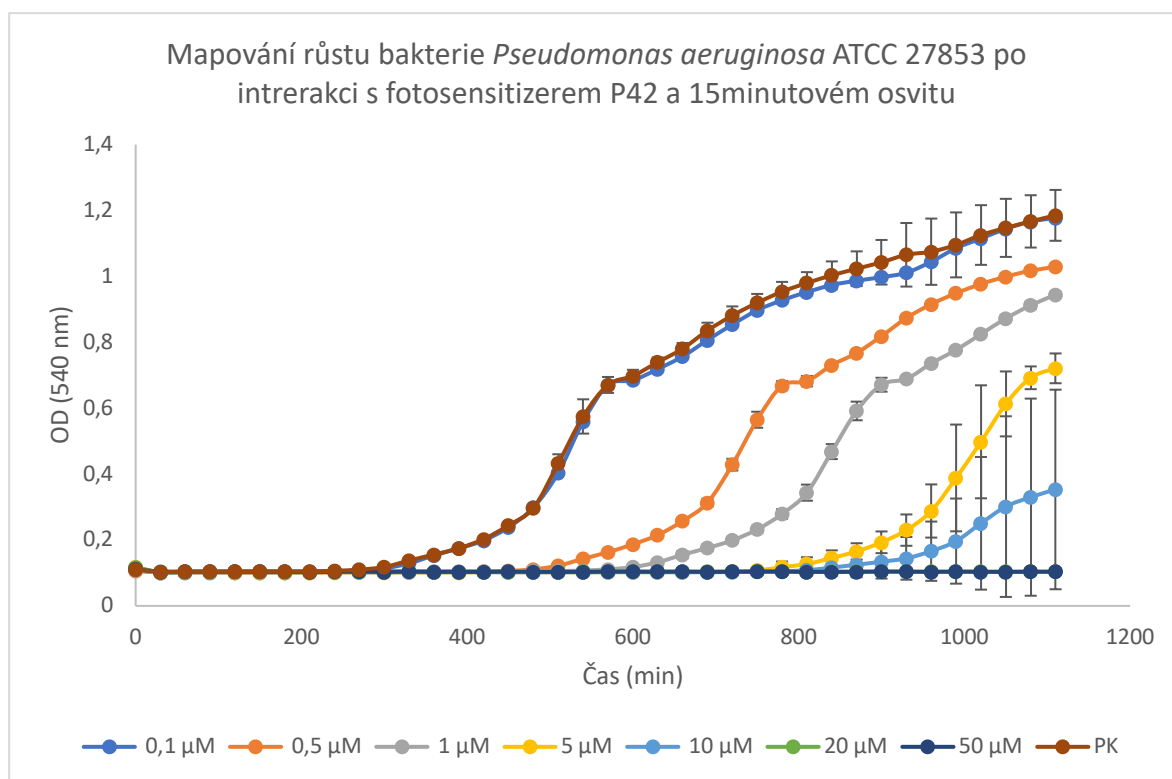
Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C a také na základě vizuálního hodnocení bylo prokázáno, že při koncentracích 20 a 50 μM nedošlo k nárůstu mikrobiální biomasy – v příslušných jamkách nebyl detekován zákal (Obrázek 53). Na základě této metody stanovena hodnota MBC na 20 μM .

Z přiloženého Obrázku 53 je zjevné, jak míra OD, která zde představuje růst mikroorganismů, klesá s rostoucí koncentrací fotosensitizeru P42. Je také patrné, že v případě

sub-MBC, odpovídající $1/2$ MBC, tedy $\text{sub-MBC} = 0,5 \times \text{MBC}$ došlo k opoždění v přechodu z lag růstové fáze do logaritmické, exponenciální fáze ve srovnání s PK o cca 9 h (550 min; Obrázek 53). Lze tedy konstatovat, že tato sub-inhibiční koncentrace se poměrně výrazně odrazí v rámci post-antimikrobního efektu. V případě $1/40$ MBC ($\text{sub-MBC} = 0,025 \times \text{MBC}$) pak došlo v přechodu z lag růstové fáze do exponenciální fáze ve srovnání s PK ke zpoždění odpovídajícímu cca 3,5 h (210 min). V případě $1/200$ MBC ($\text{sub-MBC} = 0,005 \times \text{MBC}$) ve srovnání s PK nedošlo prakticky k žádnému časovému posunu v přechodu z lag růstové fáze do fáze exponenciální.

Při hodnocení výsledků pomocí AB bylo zjištěno, že v případě koncentrací 0,5 až 50,0 μM došlo k výrazné inhibici v metabolické aktivitě (přesahující 80 %; Tabulka 18). V našem metodickém uspořádání jsme detekovali metabolickou aktivitu po cca 7 h (420 min) v rámci „recovery“ metody. Jak je patrné z Obrázku 53, PK dosahuje v tomto intervalu exponenciální fáze. V daném časovém intervalu pak bakterie pod vlivem koncentrací 0,5 až 50,0 μM nevykazují růst, což přímo koreluje s hodnotami získanými touto metodou. Jak je patrné v Tabulce 18, sub-inhibiční koncentrace 0,1 μM vedla k poklesu metabolické aktivity pouze přibližně o 17 % ve srovnání s PK.

Výsledky získané prostřednictvím přístroje Bioscreen C a AB byly potvrzeny konfirmační výsevovou metodou, která je po vizuální inspekci potvrdila. Fotografické snímky těchto výsevů ale nejsou v této práci uvedeny z důvodu ztráty dat na datové kartě fotoaparátu.



Obrázek 53: Vliv různých koncentrací fotosensitizeru P42 na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, s dobou ozařování 15 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola; OD – optická denzita

Tabulka 18: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru P42 na metabolickou aktivitu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 s dobou ozáření 15 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplicátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

P42 - PA - Light	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	1525,00	515,00	526,33	495,00	504,33	505,67	474,00	1790,33
% metabolické aktivity *	83,03%	18,59%	19,31%	17,31%	17,90%	17,99%	15,97%	100,00%
% inhibice **	16,97%	81,41%	80,69%	82,69%	82,10%	82,01%	84,03%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units

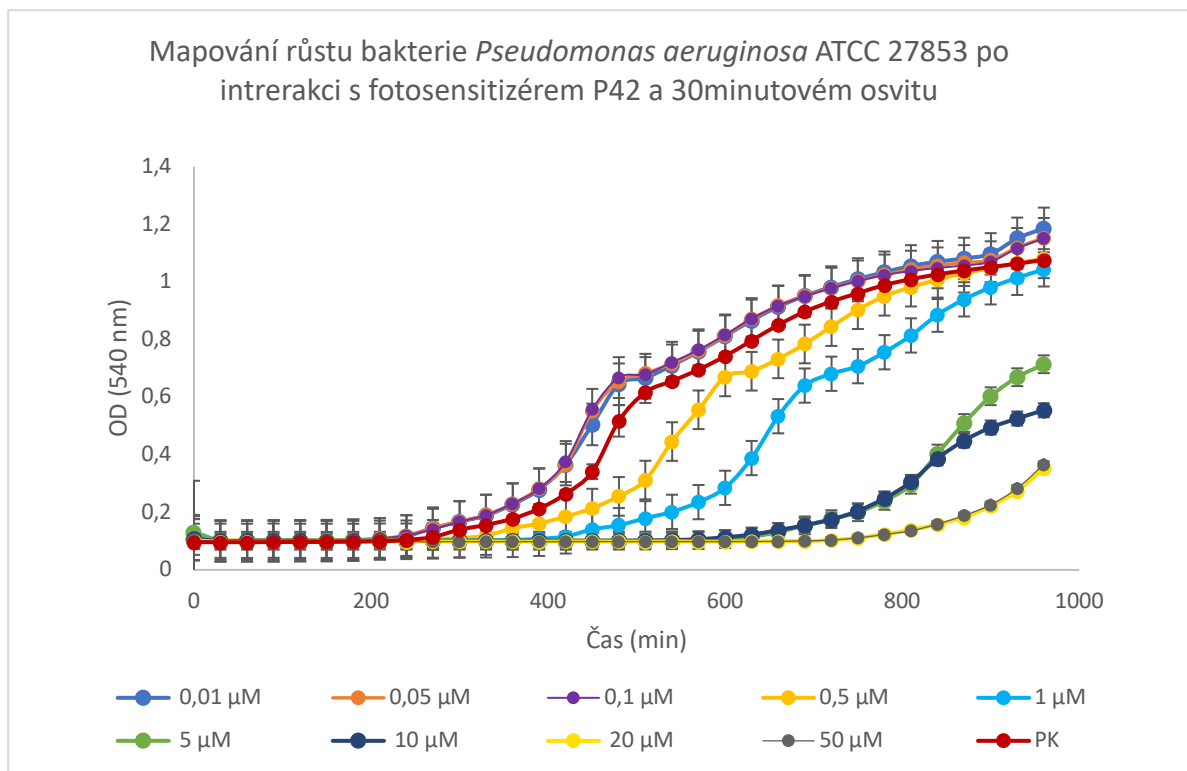
8.3.2.2 Doba ozáření - 30 minut

Základním předpokladem, ze kterého se vycházelo v navazujících experimentech bylo, že prodloužení doby ozáření by mělo vést k navýšení antibakteriální aktivity. V tomto případě došlo i k upravení koncentračního rozhraní na základě výsledků z 15 min ozařování, což spočívalo v začlenění nižších koncentrací P42. V případě ozáření po dobu 30 min ale nebylo možné na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C

hodnotu MBC stanovit (Obrázek 54). Stejný výsledek byl zaznamenán po vizuální inspekci destičky – ve všech jamkách došlo ke zjevnému nárůstu bakteriální biomasy, která se projevila zákalem. Jak je znázorněno na Obrázku 54, v případě cílové koncentrace 20 μM a 50 μM došlo k posunu v nástupu do exponenciální fáze ve srovnání s PK shodně v obou případech přes 8 h (500 min). V případě 5 μM a 10 μM koncentrace PS došlo k nástupu do exponenciální fáze o více než 5,5 h (340 min) později než u PK. Naopak v případě nejnižších volených testovaných koncentrací odpovídající 0,01, 0,05 a 0,1 μM byla dokonce zaznamenána progrese růstu ve srovnání s PK. Bakterie PA pod vlivem studované látky a po ozáření vykazovaly rychlejší nástup z lag růstové fáze do exponenciální fáze, než tomu bylo u PK.

Při hodnocení výsledků pomocí AB bylo zjištěno, že v případě koncentrací 0,5 až 50,0 μM došlo ve všech případech více než 100 % inhibici v metabolické aktivitě, což je ve srovnání s 15 min ozařováním přibližně o 20 % více. Jak již bylo zmiňováno, v našem metodickém uspořádání jsme detekovali metabolickou aktivitu po cca 7 h (420 min) v rámci „recovery“ metody. Jak je patrné z Obrázku 54, PK dosahuje v tomto intervalu exponenciální fáze. V daném časovém intervalu pak bakterie pod vlivem koncentrací 1 až 50,0 μM nevykazují růst. Je zde ale patrná jistá diskrepance u 0,5 μM P42. U této koncentrace se v měřeném časovém intervalu (420 min) na základě dat z Bioscreenu C pohybujeme již v exponenciální fázi růstu, zatímco metodou AB byla opět zjištěna víc než 100% inhibice. Mimo jiné je z Tabulky 19 také patrné, že sub-inhibiční koncentrace 0,01 μM vede k vyššímu nárůstu metabolické aktivity o cca 36 % oproti PK.

Získané výsledky byly confirmovány výsevovou metodou (Obrázek 55). Poměrně masivní nárůst bakterií se projevil ve výsečích s koncentracemi 0,01, 0,05, 0,1 a 0,5 μM . Na výsečích s koncentrací 1 μM se objevilo několik drobných kolonií. Od koncentrace 5 μM se již neobjevil žádný nárůst.

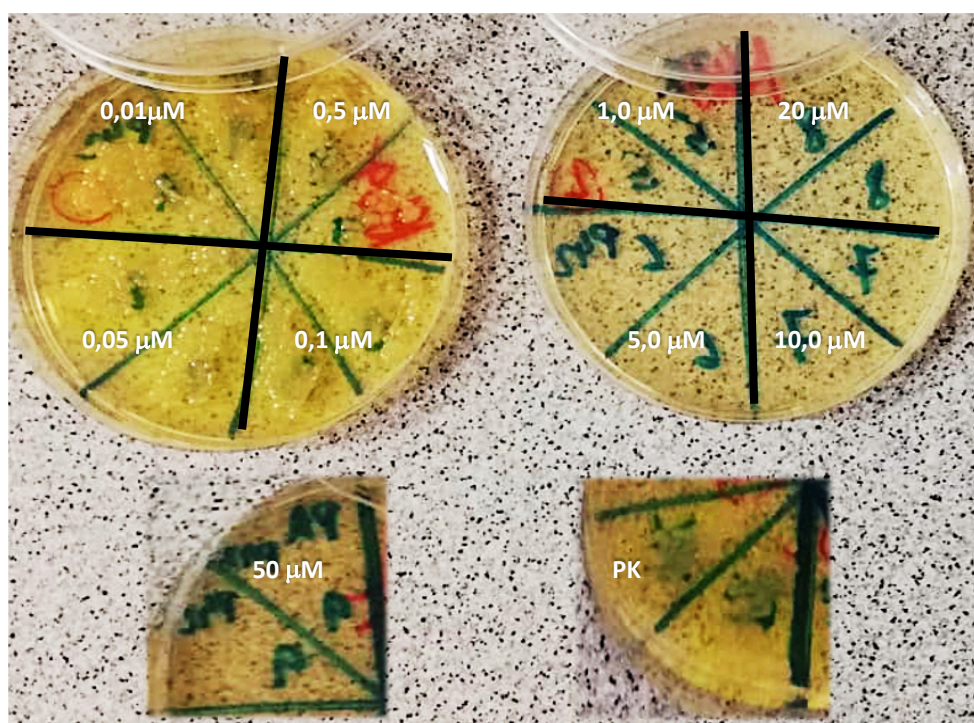


Obrázek 54 : Vliv různých koncentrací P42 na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 s dobou ozařování 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola, OD – optická densita.

Tabulka 19: Studium vlivu různých koncentrací fotosenzitizéru P42 na metabolickou aktivitu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 s dobou ozařování 30 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplicátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

P42 - PA - Light	0,01 µM	0,05 µM	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM	50 µM	PK
Průměrná hodnota RFU	11576,67	9238,33	10127,00	4700,67	4510,00	4517,00	4569,00	4538,00	4519,67	9781,33
% metabolické aktivity *	136,34%	89,10%	107,06%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%
% inhibice **	-36,34%	10,90%	-7,06%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 55: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi P42 a následném ozáření po dobu 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 h v termostatu byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

8.3.2.3 Určení vlastní antibakteriální aktivity P42 (bez ozáření) na bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

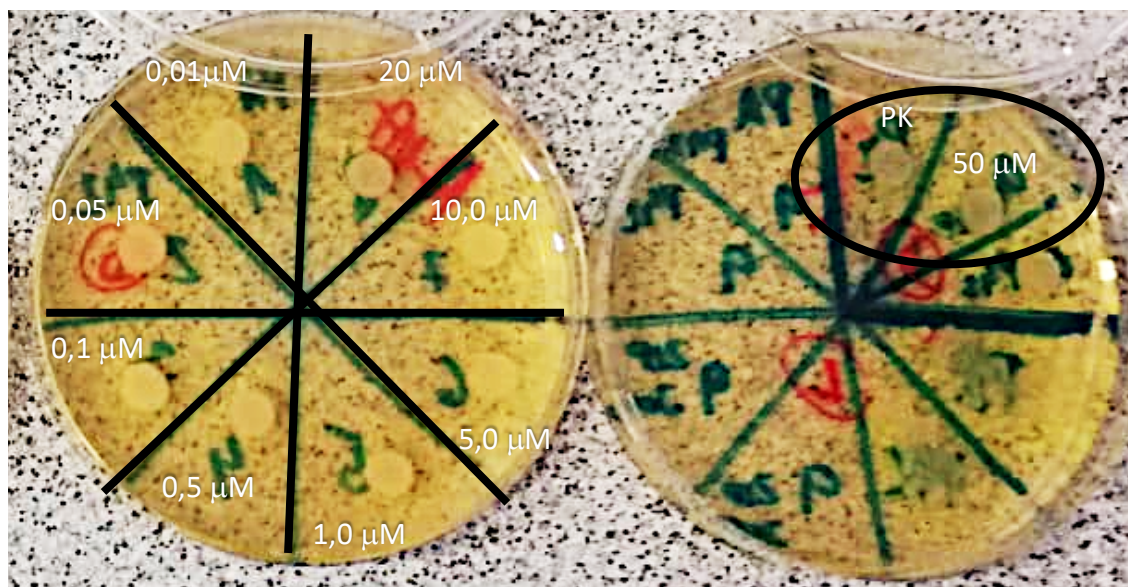
Pro fotosenzitizér P42 a PA byla také hodnocena vlastní antibakteriální aktivita bez ozáření pomocí AB. Jak je zjevné z Tabulky 20, látka P42 tuto aktivitu vůči PA nevykazuje. Naopak fotosenzitizér P42 bez ozáření spíše potencoval růst, o čemž vypovídají záporné hodnoty v % inhibice.

Tyto výsledky byly potvrzeny výsevovou metodou (Obrázek 56), která potvrdila výsledky naměřené v rámci metody AB.

Tabulka 20: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru P42 na metabolickou aktivitu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 bez ozáření. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

P42 - PA - Dark	0,01 μM	0,05 μM	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	12978,67	13225,67	13034,67	11701,33	11651,33	10145,33	10799,67	12587,00	10485,67	9781,33
% metabolické aktivity *	161,58%	166,37%	162,67%	136,80%	135,83%	106,61%	119,31%	153,98%	113,21%	100,00%
% inhibice **	-61,58%	-66,37%	-62,67%	-36,80%	-35,83%	-6,61%	-19,31%	-53,98%	-13,21%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 56: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi P42 bez ozáření byl proveden výsev („spot“ výsevovou metodou) na kulturační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 hodin v termostatu byl hodnocen nárůst. PK – pozitivní kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

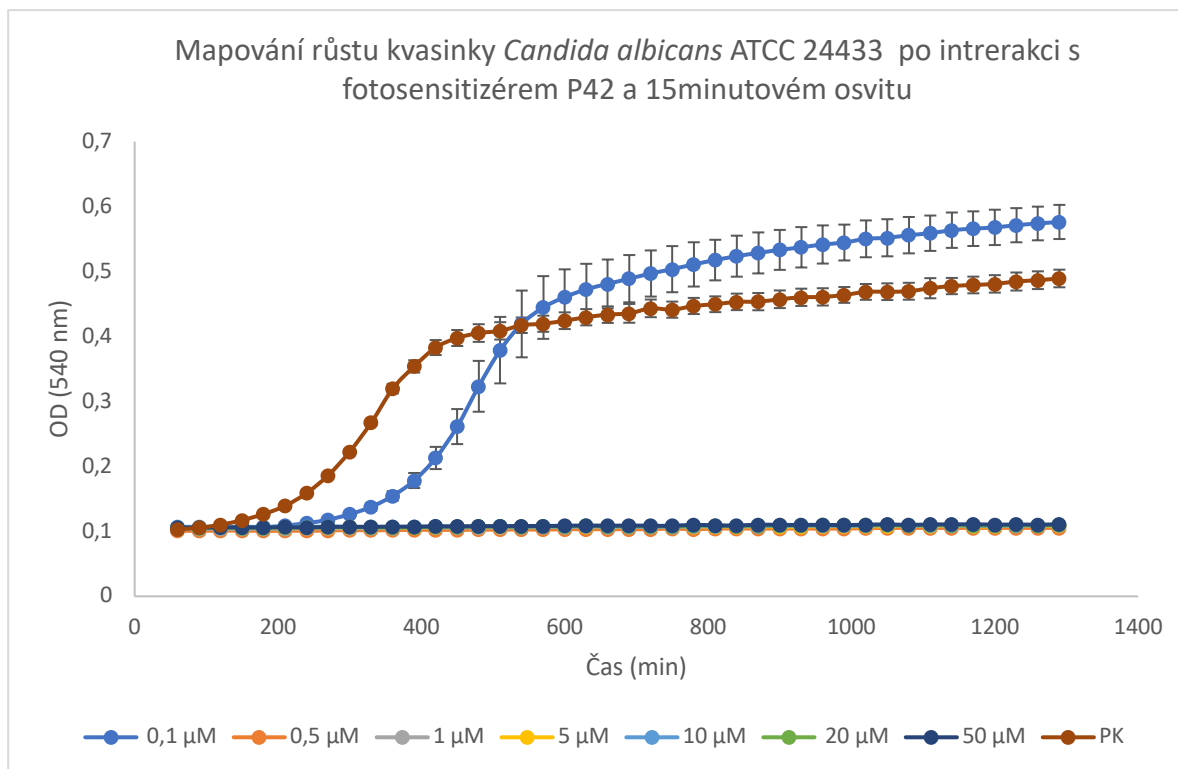
8.3.3 Vyhodnocení aktivity P42 vůči kvasince *Candida albicans*

8.3.3.1 Doba ozáření - 15 minut

Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C a také na základě vizuálního hodnocení bylo prokázáno, že při koncentracích 0,5, 1, 5, 10, 20 a 50,0 μM nedošlo k nárůstu mikrobiální biomasy – v příslušných jamkách nebyl detekován zákal (Obrázek 57). Na základě této metody byla odečtena hodnota MFC, která je rovna 0,5 μM . Jak je také patrné z Obrázku 57 v případě sub-inhibiční minimální fungicidní koncentrace (sub-MFC), odpovídající $\frac{1}{5}$ MFC, tedy $\text{sub-MFC} = 0,2 \times \text{MFC}$ došlo k opoždění v přechodu z lag růstové fáze do logaritmické, exponenciální fáze cca o 2 hodiny (120 minut) ve srovnání s PK.

Při hodnocení výsledků pomocí AB bylo zjištěno, že v případě koncentrací odpovídajících 0,5 až 50,0 μM došlo k výrazné inhibici v metabolické aktivitě (přesahující 80 %; Tabulka 21). V našem metodickém uspořádání jsme detekovali metabolickou aktivitu po cca 7 h (420 min) v rámci „recovery“ módu. Jak je patrné z Obrázku 57, PK dosahuje v tomto intervalu pozdní exponenciální fáze. V daném časovém intervalu pak kvasinky pod vlivem koncentrací 0,5 až 50,0 μM nevykazují růst, což přímo koreluje s hodnotami určené touto metodou. Jak je patrné v Tabulce 21, sub-inhibiční koncentrace 0,1 μM vedla k poklesu metabolické aktivity pouze o přibližně 17 % ve srovnání s pozitivní PK.

Výsledky získané prostřednictvím přístroje Bioscreen C a metodou AB byly potvrzeny konfirmační výsevovou metodou. Nárůst byl dle očekávání detekován pouze ve výsech s 0,1 μM koncentrací P42 (Obrázek 58).

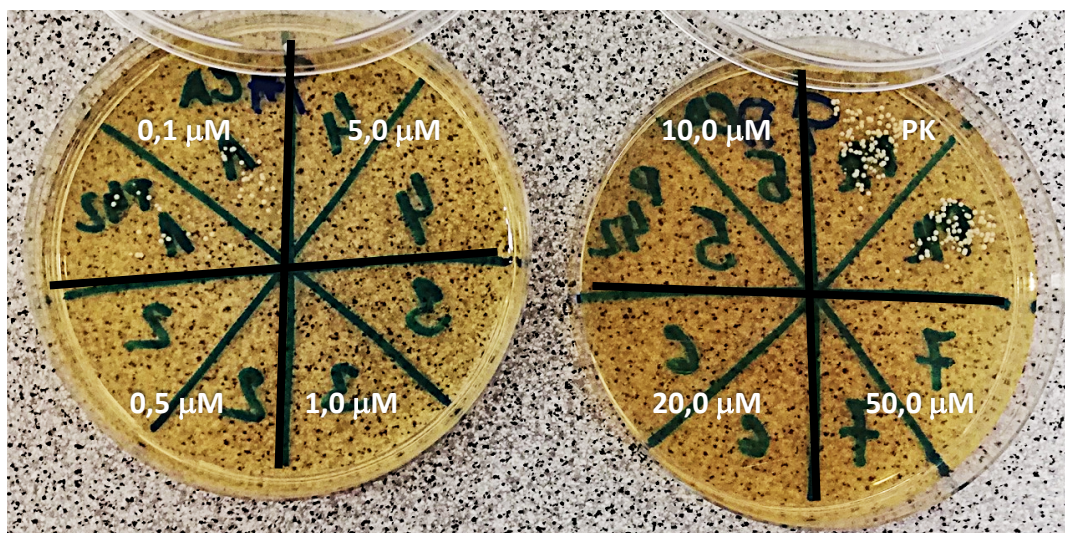


Obrázek 57: Vliv různých koncentrací P42 na kvasinku *Candida albicans* ATCC 24433, s dobou ozařování 15 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola; OD – optická denzita.

Tabulka 21: Studium vlivu různých koncentrací fotosenzitizéru P42 na metabolickou aktivitu kvasinky *Candida albicans* ATCC 24433 s dobou ozáření 15 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplicátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztahované vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztahované vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

P42 - CA - Light	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	9034,33	2620,33	2527,33	2391,00	2401,33	2430,67	2368,67	10755,67
% metabolické aktivity *	82,73%	17,95%	17,01%	15,63%	15,74%	16,03%	15,41%	100,00%
% inhibice **	17,27%	82,05%	82,99%	84,37%	84,26%	83,97%	84,59%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 58: Snímek petriho misek se Sabouraud agarem a nárůstem kvasinkového kmene *Candida albicans* ATCC 24433. Po interakci kvasinkového kmene s různými koncentracemi P42 a po 15 min ozáření ($\lambda > 570$ nm, $12,4$ mW/cm², 15 min, $11,2$ J/cm²) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 hodin v termostatu, při 37 °C byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

8.3.3.2 Doba ozáření - 30 minut

Základním předpokladem, ze kterého se vycházelo v navazujících experimentech bylo, že prodloužení doby ozáření by mělo vést k navýšení antifungální aktivity. V tomto případě došlo i k upravení koncentrační řady (začleněním nižších koncentrací P42).

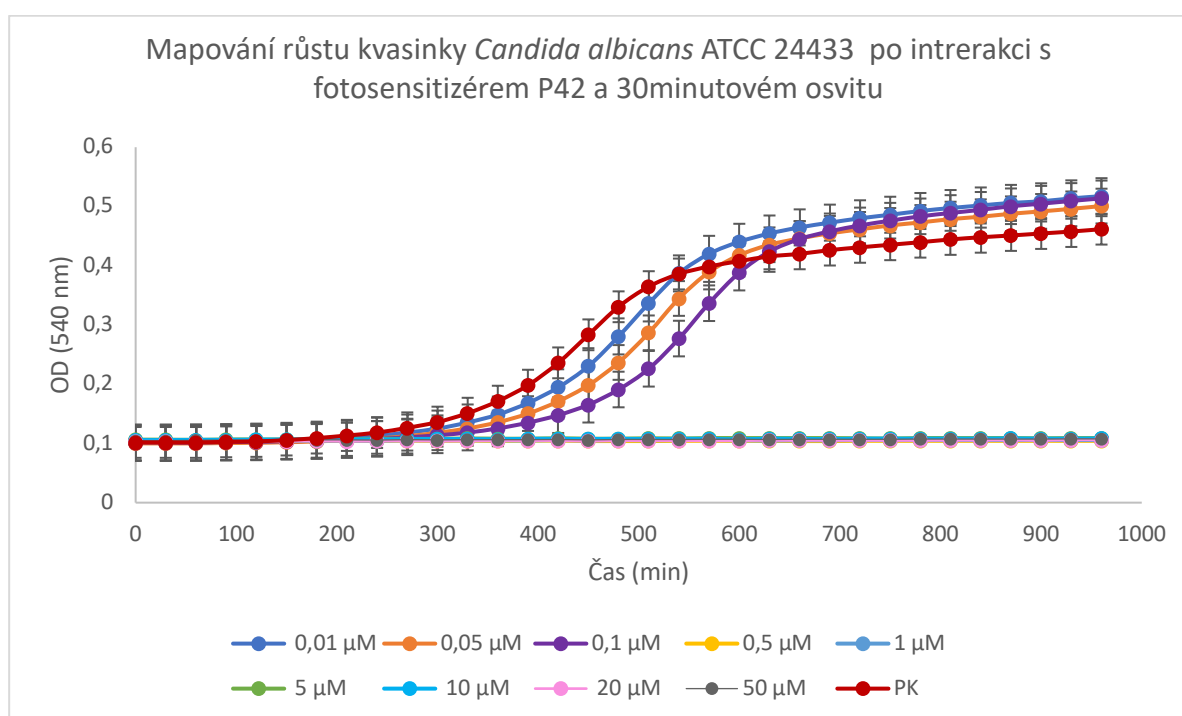
Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C a také na základě vizuálního hodnocení bylo prokázáno, že při koncentracích 0,5 až 50,0 µM nedošlo k nárůstu mikrobiální biomasy – v příslušných jamkách nebyl detekován zákal (Obrázek 59). Na základě této metody byla odečtena hodnota MFC, která je rovna 0,5 µM.

Jak je také patrné z Obrázku 59, sub-MFC, odpovídající $\frac{1}{5}$ MFC, tedy sub-MFC = $0,2 \times$ MFC, $\frac{1}{10}$ MFC (sub-MFC = $0,1 \times$ MFC) a $\frac{1}{50}$ MFC (sub-MFC = $0,02 \times$ MFC) došlo téměř shodně k opoždění v přechodu z lag růstové fáze do logaritmické, exponenciální fáze o cca 1,5 h (100 min) ve srovnání s PK.

Při hodnocení výsledků pomocí metody AB bylo zjištěno, že v případě koncentrací odpovídajících 0,5 až 50,0 µM došlo k výrazné inhibici v metabolické aktivitě přesahující 96 %, v případě 5,0 µM koncentrace bylo dokonce dosaženo 99,9% inhibice (Tabulka 22). V našem metodickém uspořádání jsme detekovali metabolickou aktivitu po cca 7 h (420 min) v rámci „recovery“ módu. Jak je patrné z Obrázku 59, PK dosahuje v tomto intervalu exponenciální

fáze. V daném časovém intervalu pak kvasinky pod vlivem koncentrací 0,5 až 50,0 μM nevykazují růst, což přímo koreluje s hodnotami určené touto metodou. Jak je patrné v Tabulce 22, sub-inhibiční koncentrace 0,1 μM vedla k poklesu metabolické aktivity přibližně pouze o 4 % ve srovnání s PK. Další sub-inhibiční koncentrace 0,01 μM a 0,05 μM dokonce potencovali metabolickou aktivitu v průměru kolem 26 %.

Výsledky získané prostřednictvím přístroje Bioscreen C a metodou AB byly potvrzovány výsevovou metodou. Došlo zde ale k jisté diskrepanci, neboť byl detekován nárůst pouze ve výsečích s 0,01 μM a 0,05 μM koncentrací P42 (Obrázek 60).



Obrázek 59: Vliv různých koncentrací P42 na kvasinku *Candida albicans* ATCC 24433, s dobou ozařování 30 min ($\lambda > 570 \text{ nm}$, $12,4 \text{ mW/cm}^2$, 30 min , $22,4 \text{ J/cm}^2$) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola, OD – optická denzita.

Tabulka 22: Studium vlivu různých koncentrací fotosenzitizéru P42 na metabolickou aktivitu *Candida albicans* ATCC 24433 s dobou ozáření 30 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

P42 - CA - Light	0,01 μM	0,05 μM	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	17108,33	17018,33	14168,67	5425,67	5173,33	5049,33	5145,00	5074,33	5093,00	14540,00
% metabolické aktivity *	126,63%	125,69%	95,77%	3,97%	1,32%	0,01%	1,02%	0,28%	0,47%	100,00%
% inhibice **	-26,63%	-25,69%	4,23%	96,03%	98,68%	99,99%	98,98%	99,72%	99,53%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 60: Snímek petriho misek se Sabouradovým agarem a nárůstem kvasinkového kmene *Candida albicans* ATCC 24433. Po interakci kvasinkového kmene s různými koncentracemi P42 a po ozáření 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 h v termostatu byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

8.3.3.3 Určení vlastní antifungální aktivity P42 (bez ozáření) na kvasinku *Candida albicans*

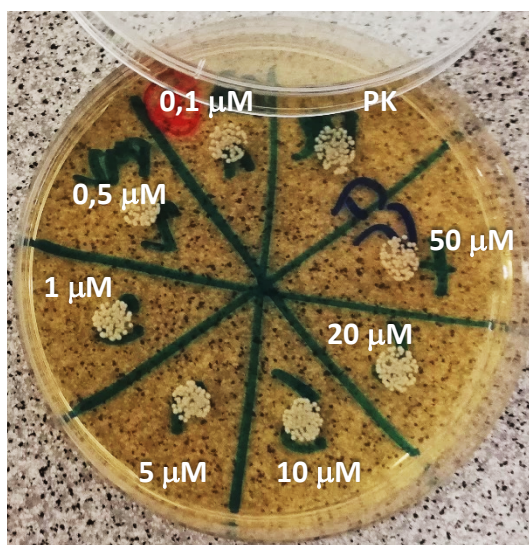
Pro kombinaci látky P42 a kvasinku CA byla také hodnocena vlastní toxicita bez ozáření pomocí AB. Jak z Tabulky 23 vyplývá, toxicita látky P42 bez ozáření v souvislosti s CA nebyla významně prokázána. K nejvyšší inhibici došlo při 0,5 μ M koncentraci (8,3 %). Naopak P42 bez ozáření spíše mírně potencoval metabolickou aktivitu, o čemž opět vypovídají záporné hodnoty v % inhibice.

Tyto výsledky byly konfirmovány výsevovou metodou, která byla provedena pouze v koncentračním rozhraní: 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20 a 50,0 μ M. Ani touto metodou ale nebyla určena významná toxicita látky P42 bez ozáření v souvislosti s CA (Obrázek 61).

Tabulka 23: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru P42 na metabolickou aktivitu kvasinky *Candida albicans* ATCC 24433 bez ozáření. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

P42 - CA - Dark	0,01 μM	0,05 μM	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	12198,67	14931,00	12900,33	11852,67	12391,67	13164,67	12978,33	12658,33	12609,67	12497,33
% metabolické aktivity *	96,33%	132,94%	105,73%	91,69%	98,91%	109,27%	106,77%	102,49%	101,83%	100,00%
% inhibice **	3,67%	-32,94%	-5,73%	8,31%	1,09%	-9,27%	-6,77%	-2,49%	-1,83%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 61: Snímek petriho misky se Sabouraud agarem a nárůstem kvasinkového kmene *Candida albicans* ATCC 24433. Po interakci kvasinkového kmene s různými koncentracemi P42 bez ozáření byl proveden výsev („spot“ výsevovou metodou) na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci po dobu 24 h v termostatu při 37 °C byl hodnocen nárůst. PK – pozitivní kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

8.4 Fotosensitizer ZIP300

Koncentrační řady pro obě délky ozařování jsme zvolili následující:

15 min: 0,1 – 0,5 – 1 – 5 – 10 – 20 – 50 μM

30 min: 0,01 – 0,05 – 0,1 – 0,5 – 1 – 5 – 10 – 20 – 50 μM

8.4.1 Vyhodnocení aktivity ZIP300 vůči meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus*

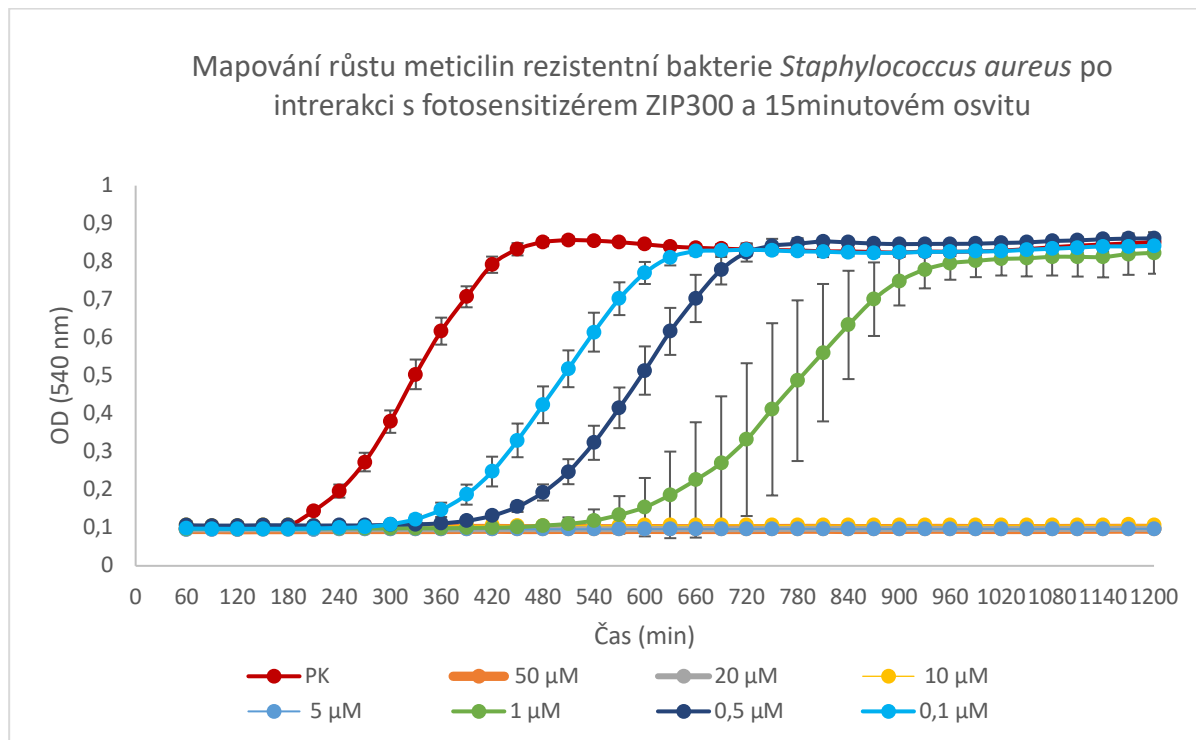
8.4.1.1 Doba ozáření - 15 minut

Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C a také na základě vizuálního hodnocení bylo prokázáno, že při koncentracích 5, 10, 20 a 50 μM nedošlo k nárůstu mikrobiální biomasy, v příslušných jamkách nebyl detekován zákal (Obrázek 62). Na základě této metody odečtena hodnota MBC, která je rovna 5 μM . Jak je také patrné z Obrázku 62, v případě sub-MBC, odpovídající $1/5$ MBC, tedy sub-MBC = $0,2 \times \text{MBC}$ došlo k opoždění v přechodu z lag růstové fáze do logaritmické, exponenciální fáze o cca 5,5 h (330 min) ve srovnání s PK. Lze tedy konstatovat, že tato sub-inhibiční koncentrace se poměrně výrazně odrazí v rámci post-antimikrobního efektu.

V případě $1/10$ MBC (sub-MBC = $0,1 \times \text{MBC}$) a pak došlo k opoždění v nárůstu odpovídající cca 3 h (180 min). V případě $1/50$ MBC (sub-MBC = $0,02 \times \text{MBC}$) pak došlo k posunu o cca 1 h (60 min) v přechodu do exponenciální fáze ve srovnání s PK.

Při hodnocení výsledků pomocí AB bylo zjištěno, že v případě koncentrací odpovídajících 5, 10, 20 a 50 μM došlo k výrazné inhibici v metabolické aktivitě (přesahující 92 %; Tabulka 24). V našem metodickém uspořádání jsme detekovali metabolickou aktivitu po cca 7 h (420 min) v rámci „recovery“ módu. Jak je patrné z Obrázku 62, PK dosahuje v tomto intervalu exponenciální fáze. V daném časovém intervalu pak MRSA pod vlivem koncentrací 5, 10, 20 a 50 μM nevykazují růst, což přímo koreluje s hodnotami stanovenými touto metodou. Jak je patrné v Tabulce 24, sub-inhibiční koncentrace 0,1 μM vedla k poklesu metabolické aktivity pouze o přibližně 40 % ve srovnání s PK. V případě dalších sub-inhibičních koncentrací 0,5 a 1 μM došlo k poklesu metabolické aktivity bakterií o 73 % a 87 % ve srovnání s PK.

Výsledky získané prostřednictvím přístroje Bioscreen C a metodou AB byly potvrzeny i konfirmační výsevovou metodou. Fotografické snímky těchto výsevů ale nejsou v této práci uvedeny z důvodu ztráty dat na datové kartě fotoaparátu.



Obrázek 62: Vliv různých koncentrací ZIP300 na meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 s dobou ozařování 15 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola; OD – optická denzita.

Tabulka 24: Studium vlivu různých koncentrací fotosenzitizéru ZIP300 na metabolickou aktivitu meticilin rezistentní bakterie *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 s dobou ozáření 15 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakti průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztahené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztahené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

ZIP300 - MRSA - Light	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM	50 µM	PK
Průměrná hodnota RFU	20382,00	9908,00	5414,33	3557,33	3573,00	3570,67	3491,00	33264,00
% metabolické aktivity *	59,38%	26,91%	12,98%	7,22%	7,27%	7,27%	7,02%	100,00%
% inhibice **	40,62%	73,09%	87,02%	92,78%	92,73%	92,73%	92,98%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units

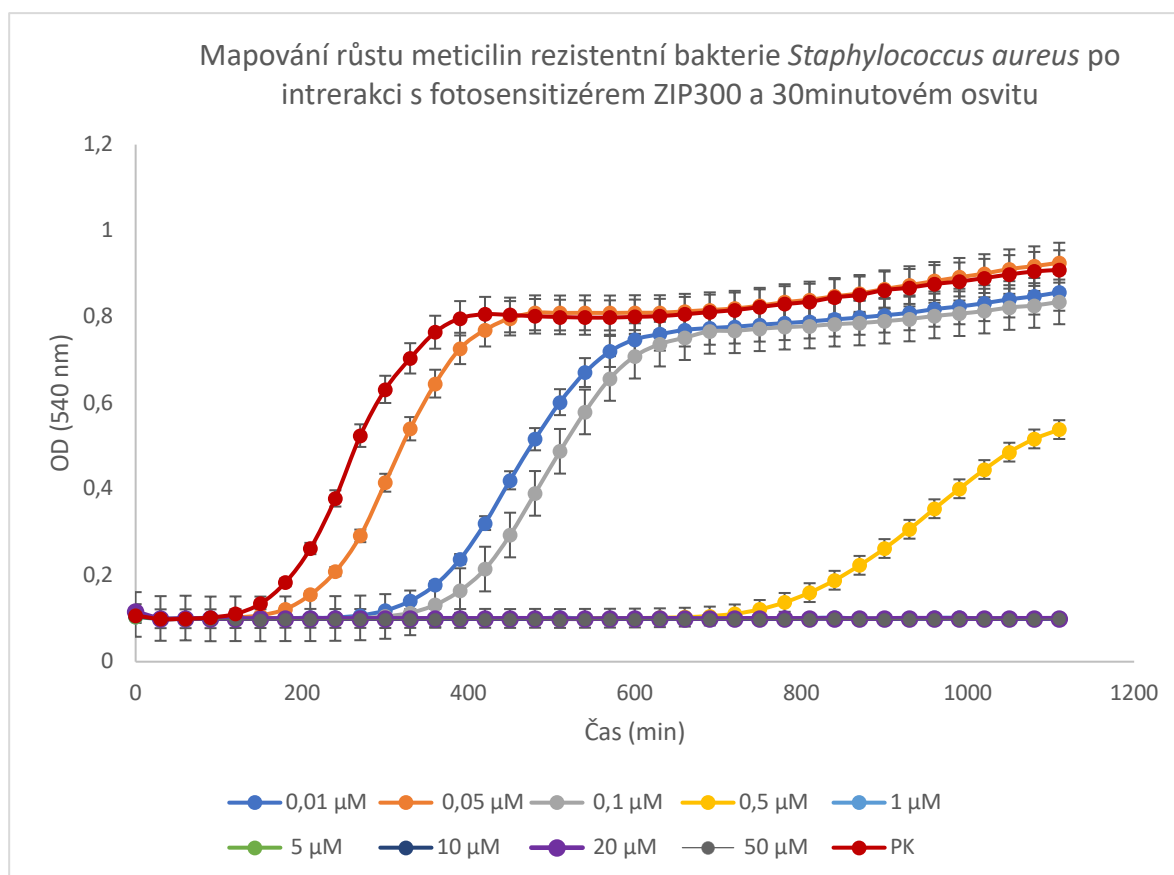
8.4.1.2 Doba ozáření - 30 minut

Základním předpokladem, ze kterého se vycházelo v navazujících experimentech bylo, že prodloužení doby ozáření by mělo vést k navýšení antibakteriální aktivity, což v tomto případě skutečně nastalo. Došlo také k upravení koncentračního rozhraní, které spočívalo v začlenění nižších koncentrací ZIP300. Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C (Obrázek 63) bylo prokázáno, že při koncentracích 1, 5, 10, 20, a 50 μM nedošlo k nárůstu mikrobiální biomasy. Na základě této metody byla odečtena hodnota MBC, která je rovna 1 μM .

Jak je také patrné z Obrázku 63 v případě sub-MBC, odpovídající $1/2$ MBC, tedy sub-MBC = $0,5 \times \text{MBC}$ došlo k opoždění v přechodu z lag růstové fáze do logaritmické, exponenciální fáze o cca 10 h (600 min) ve srovnání s PK. Lze tedy předpokládat, že tato sub-inhibiční koncentrace se poměrně výrazně odrazí v post-antimikrobním efektu. V případě $1/10$ MBC (sub-MBC = $0,1 \times \text{MBC}$) a $1/100$ MBC (sub-MBC = $0,01 \times \text{MBC}$) pak došlo v obou případech téměř shodně k opoždění v přechodu do exponenciální fáze o cca 3 h (180 min). K nejmenšímu zpoždění v přechodu do exponenciální fáze růstu ve srovnání s PK došlo překvapivě při $1/20$ MBC (sub-MBC = $0,05 \times \text{MBC}$) a to maximálně o 1 h (60 min).

Při hodnocení výsledků pomocí AB bylo zjištěno, že v případě koncentrací 1 až 50 μM došlo k výrazné inhibici v metabolické aktivitě (téměř ve všech případech přes 93 %; Tabulka 25). V našem metodickém uspořádání jsme detekovali metabolickou aktivitu po cca 7 h (420 min) v rámci „recovery“ módu. Jak je patrné z Obrázku 63, PK dosahuje v tomto intervalu pozdní exponenciální fáze a v daném časovém intervalu pak MRSA pod vlivem koncentrací 0,5 až 50 μM nevykazuje růst, což koreluje s hodnotami získanými touto metodou. Drobná odchylka je v případě 0,5 μM koncentrace, kde dle AB došlo k inhibici metabolické aktivity o cca 77 %. Jak je patrné v Tabulce 25, sub-inhibiční koncentrace 0,01, 0,05 a 0,1 μM vedly ještě k vyšší metabolické aktivitě ve srovnání s PK, o čemž vypovídají záporné hodnoty v % inhibice. V případě 0,01 a 0,1 μM koncentrace byla tato potenciace metabolické aktivity dle naměřených hodnot vyšší dokonce o 34 % a 21 %.

Výsledky získané prostřednictvím přístroje Bioscreen C a metodou AB byly potvrzeny konfirmační výsevovou metodou. Fotografické snímky těchto výsevů ale nejsou v této práci uvedeny z důvodu ztráty dat na datové kartě fotoaparátu.



Obrázek 63: Vliv různých koncentrací ZIP 300 na meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, s dobou ozařování 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola, OD – optická denzita

Tabulka 25: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru ZIP300 na metabolickou aktivitu meticilin rezistentní bakterie *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 s dobou záření 30 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

ZIP300 - MRSA - Light	0,01 μM	0,05 μM	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	10677,00	5521,00	10193,67	2419,33	1755,67	1788,00	1814,00	1759,67	1788,67	5451,33
% metabolické aktivity *	234,01%	102,01%	221,63%	22,61%	5,62%	6,45%	7,11%	5,72%	6,46%	100,00%
% inhibice **	-134,01%	-2,01%	-121,63%	77,39%	94,38%	93,55%	92,89%	94,28%	93,54%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units

8.4.1.3 Určení vlastní antibakteriální aktivity ZIP300 (bez ozáření) na meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus*

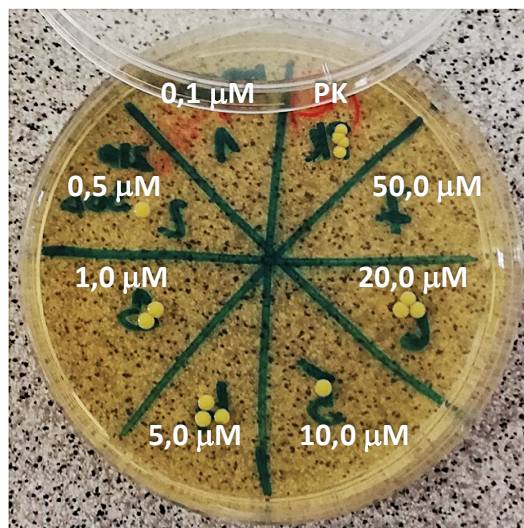
Pro kombinaci látky ZIP300 a MRSA byla také hodnocena vlastní antibakteriální aktivita bez ozáření pomocí AB, ale pouze v rozmezí koncentrací 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20 a 50,0 μM . Z Tabulky 26 vyplývá, že k jisté inhibici metabolické aktivity došlo. Nejvyšší inhibice byla v případě 50 μM koncentrace, a to konkrétně asi 36 %.

Tyto výsledky byly confirmovány výsevovou metodou (Obrázek 64).

Tabulka 26: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru ZIP300 na metabolickou aktivitu meticilin rezistentní bakterie *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 bez ozáření. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplicátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztahené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztahené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

ZIP300 - MRSA - Dark	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	31568,33	30251,67	27855,67	25071,00	28767,67	26635,33	21984,00	33393,00
% metabolické aktivity *	94,03%	89,95%	82,52%	73,89%	85,34%	78,73%	64,32%	100,00%
% inhibice **	5,97%	10,05%	17,48%	26,11%	14,66%	21,27%	35,68%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 64: Snímek petriho misky s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi ZIP300 bez ozáření byl proveden výsev („spot“ výsevovou metodou) na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 h v termostatu byl hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

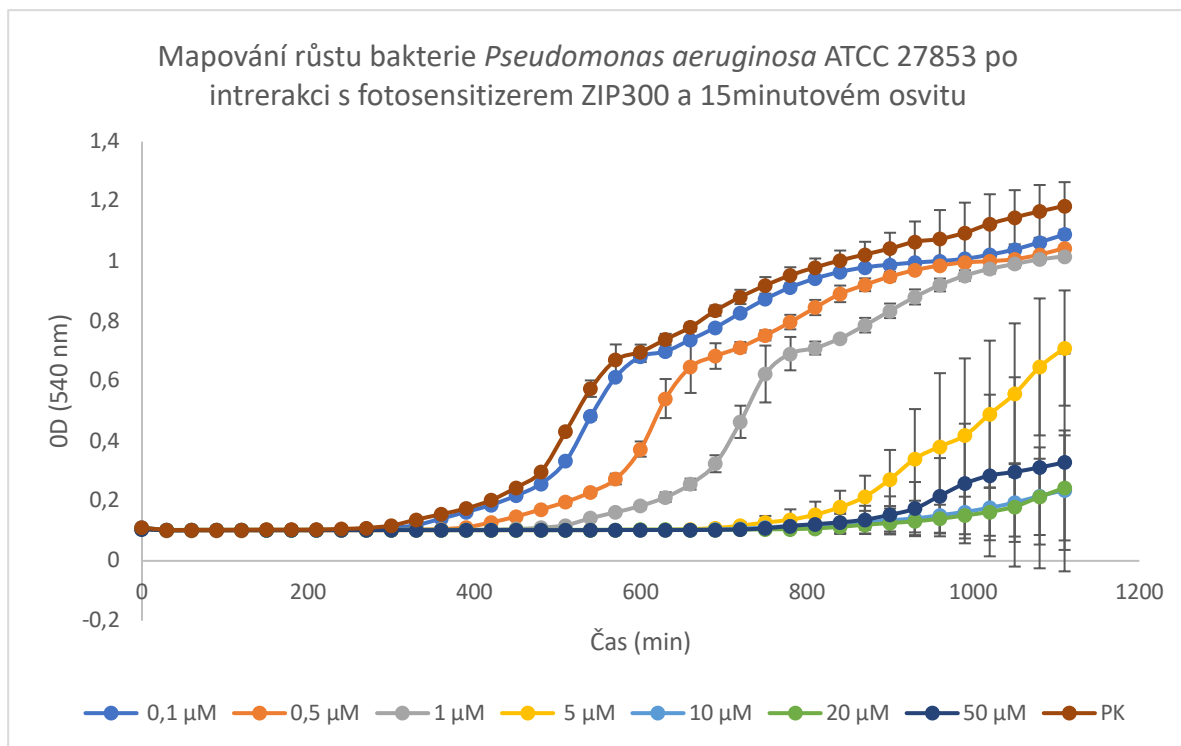
8.4.2 Vyhodnocení aktivity ZIP300 vůči bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

8.4.2.1 Doba ozáření - 15 minut

V případě ozáření po dobu 15 min nebylo možné na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C hodnotu MBC stanovit. Jak je znázorněno na Obrázku 65, v případě cílových koncentracích 10, 20 a 50 μM došlo téměř shodně k posunu v nástupu do exponenciální fáze ve srovnání s PK cca o 10 h (600 min). V případě 5 μM došlo k opoždění nástupu do exponenciální fáze růstu o přibližně 7,5 hod (450 min), u koncentrace 1 μM se jedná o zpoždění téměř o 3,5 h (200 min) a u koncentrace 0,5 μM došlo ke zpoždění přibližně o 1,5 hod (100 min) vždy v porovnání s PK. Lze tedy předpokládat, že tyto sub-inhibiční koncentrace se poměrně výrazně odrazí v rámci post-antimikrobního efektu. V případě nejnižší volené testované koncentrace (0,1 μM) pak téměř k žádnému posunu vůči PK nedošlo.

Při hodnocení výsledků pomocí AB bylo zjištěno, že v případě koncentrací 1, 5, 10, 20 a 50,0 μM došlo k poměrně výrazné inhibici v metabolické aktivitě (přesahující 81 %; Tabulka 27). V našem metodickém uspořádání jsme v tomto případě detekovali metabolickou aktivitu po cca 7 h (420 min) v rámci „recovery“ módu. Jak je patrné z Obrázku 65, PK dosahuje v tomto intervalu exponenciální fáze. V daném časovém intervalu pak bakterie pod vlivem koncentrací 1 až 50,0 μM nevykazují růst, což přímo koreluje s hodnotami určenými touto metodou. Jak je patrné v Tabulce 27, sub-inhibiční koncentrace 0,1 a 0,5 μM vedly k poklesu metabolické aktivity přibližně o 24,5 % (v případě koncentrace 0,1 μM) a 68 % (v případě koncentrace 0,5 μM) ve srovnání s PK.

Výsledky získané prostřednictvím přístroje Bioscreen C a metodou AB byly potvrzeny výsevovou metodou. Fotografické snímky těchto výsevů ale nejsou v této práci uvedeny z důvodu ztráty dat na datové kartě fotoaparátu.



Obrázek 65: Vliv různých koncentrací ZIP300 na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, s dobou ozařování 15 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola; OD – optická denzita.

Tabulka 27: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru ZIP300 na metabolickou aktivitu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 s dobou ozáření 15 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplicátech). Po subtrahování průměrných hodnot odpovídajících fluorescence pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztahované vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztahované vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

ZIP300 - PA - Light	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM	50 µM	PK
Průměrná hodnota RFU	1406,33	724,00	506,67	504,00	491,67	517,67	510,00	1790,33
% metabolické aktivity *	75,46%	31,92%	18,05%	17,88%	17,10%	18,76%	18,27%	100,00%
% inhibice **	24,54%	68,08%	81,95%	82,12%	82,90%	81,24%	81,73%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units

8.4.2.2 Doba ozáření - 30 minut

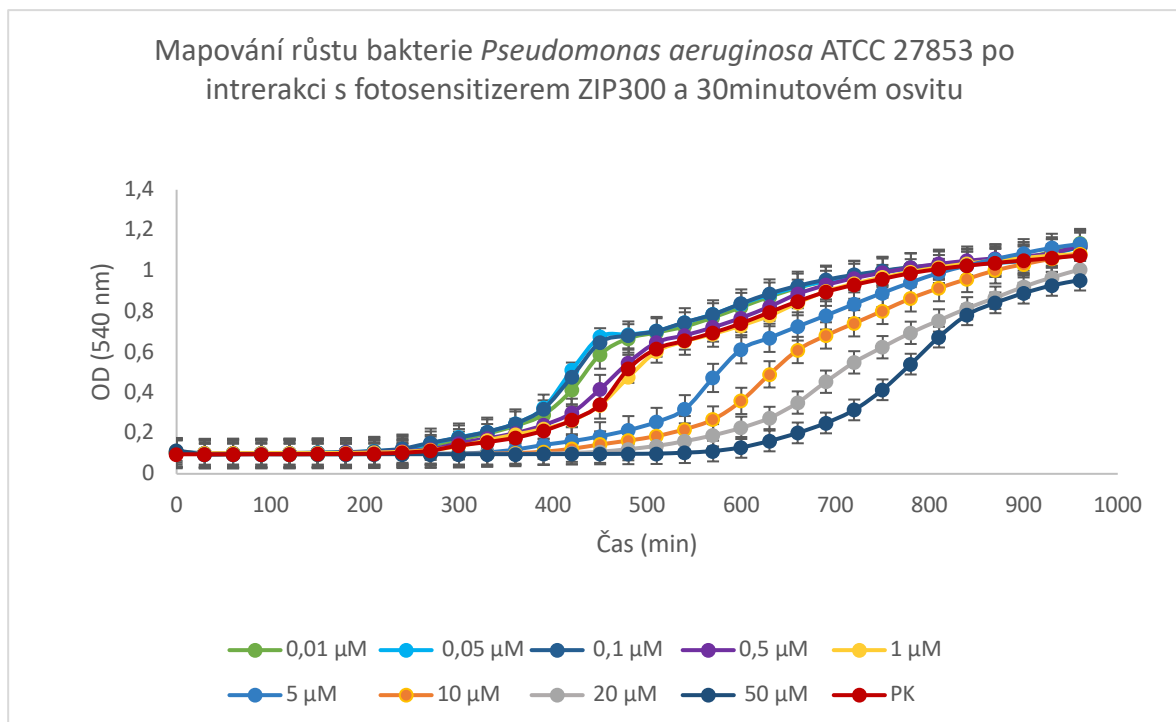
I v tomto případě bylo základním předpokladem, že prodloužení doby ozáření by mělo vést k navýšení antibakteriální aktivity, proto jsme také upravili koncentrační řadu (začlenění nižších koncentrací ZIP300). Po 30 min ozáření nebylo možné na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C hodnotu MBC stanovit (Obrázek 66).

Jak je znázorněno na Obrázku 66, v případě nejvyšší koncentrace 50 µM došlo k posunu v nástupu do exponenciální fáze ve srovnání s PK cca o 5 h (300 min). V případě

koncentrací 5, 10 a 20 μM došlo se zvyšující se koncentrací k postupnému zdržení v nástupu do exponenciální fáze cca o 1,5 h (100 min), 2,5 h (140 min) a 3,5 h (200 min) ve srovnání s PK. U koncentrací 0,5 a 1,0 μM nebyl zaznamenán žádný posun ve srovnání s PK. V případě nejnižších zvolených testovaných koncentrací 0,01, 0,05 a 0,1 μM byla dokonce zaznamenána mírná progresa růstu ve srovnání s PK.

Při hodnocení výsledků pomocí AB bylo zjištěno, že v případě koncentrací 5, 10, 20 a 50,0 μM došlo k výrazné inhibici v metabolické aktivitě (až 100 %; Tabulka 28). V našem metodickém uspořádání jsme detekovali metabolickou aktivitu po cca 7 h (420 min) v rámci „recovery“ módu. Jak je patrné z Obrázku 66, PK dosahuje v tomto intervalu exponenciální fáze. V daném časovém intervalu pak bakterie pod vlivem koncentrací 5, 10, 20 a 50,0 μM vykazují téměř minimální až nedetekovatelný růst, což vesměs koreluje s hodnotami určenými touto metodou. Jak je patrné v Tabulce 28, sub-inhibiční koncentrace 1 μM vedla také k poměrně významné inhibici metabolické aktivity, konkrétně o 95,5 % a koncentrace 0,5 μM vedla ke 49 % inhibici metabolické aktivity. V případě koncentrací 0,01, 0,05 a 0,1 μM došlo dokonce k navýšení metabolické aktivity bakterií vůči PK, o čemž vypovídají záporné hodnoty v % inhibice, a což opět koreluje s daty naměřenými pomocí přístroje Bioscreen C.

Získané výsledky byly confirmovány výsevovou metodou (Obrázek 67). Masivní nárůst bakterií se projevil ve výsečích s koncentracemi 0,01 až 10 μM . Na výsečích s koncentrací 20 a 50 μM nebyl pozorován nárůst bakteriálních kolonií.

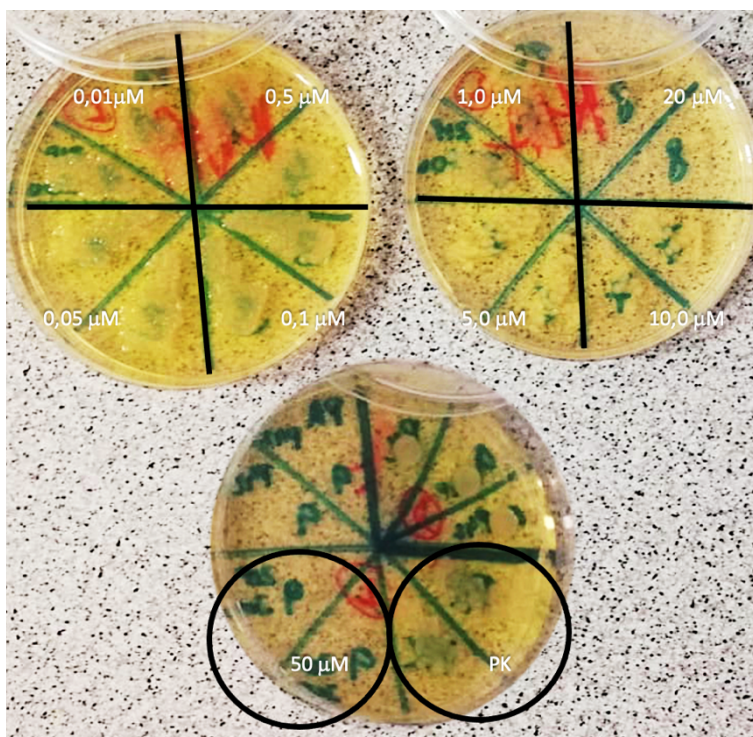


Obrázek 66: Vliv různých koncentrací ZIP300 na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 s dobou ozařování 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola, OD – optická denzita

Tabulka 28: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru ZIP300 na metabolickou aktivitu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 s dobou ozáření 30 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplicátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

ZIP300 - PA - Light	0,01 µM	0,05 µM	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM	50 µM	PK
Průměrná hodnota RFU	11828,00	10371,00	11036,33	7336,67	5049,67	4651,00	4667,67	4615,00	4580,00	9781,33
% metabolické aktivity *	141,42%	111,98%	125,42%	50,69%	4,49%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%
% inhibice **	-41,42%	-11,98%	-25,42%	49,31%	95,51%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 67: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi ZIP300 s dobou ozáření 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 h v termostatu, byl hodnocen nárůst. PK – pozitivní kontrola; pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

8.4.2.3 Určení vlastní antibakteriální aktivity ZIP300 (bez ozáření) na bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

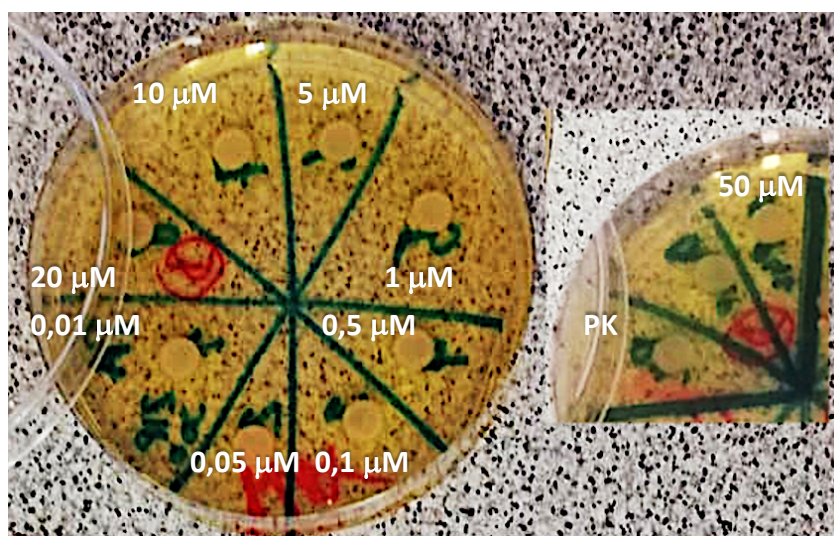
Pro kombinaci látky ZIP300 a PA byla také hodnocena vlastní antibakteriální aktivita bez ozáření pomocí AB. Jak z Tabulky 29 vyplývá, tato toxicita látky ZIP300 vůči PA nebyla prokázána. Naopak ZIP300 bez ozáření spíše potencoval metabolickou aktivitu, o čemž vypovídají záporné hodnoty v % inhibice.

Tyto výsledky byly potvrzeny výsevovou metodou (Obrázek 68), která vesměs potvrdila výsledky naměřené v rámci metody AB.

Tabulka 29: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru ZIP300 na metabolickou aktivitu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* bez ozáření. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

ZIP300 - PA - Dark	0,01 μM	0,05 μM	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	14140,33	14400,33	13796,00	12844,67	11813,33	10535,00	11797,67	12708,00	13356,33	9781,33
% metabolické aktivity *	184,12%	189,16%	177,44%	158,98%	138,97%	114,17%	138,67%	156,33%	168,91%	100,00%
% inhibice **	-84,12%	-89,16%	-77,44%	-58,98%	-38,97%	-14,17%	-38,67%	-56,33%	-68,91%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 68: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi ZIP300 bez ozáření byl proveden výsev („spot“ výsevovou metodou) na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 h v termostatu byl hodnocen nárůst. PK – pozitivní kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

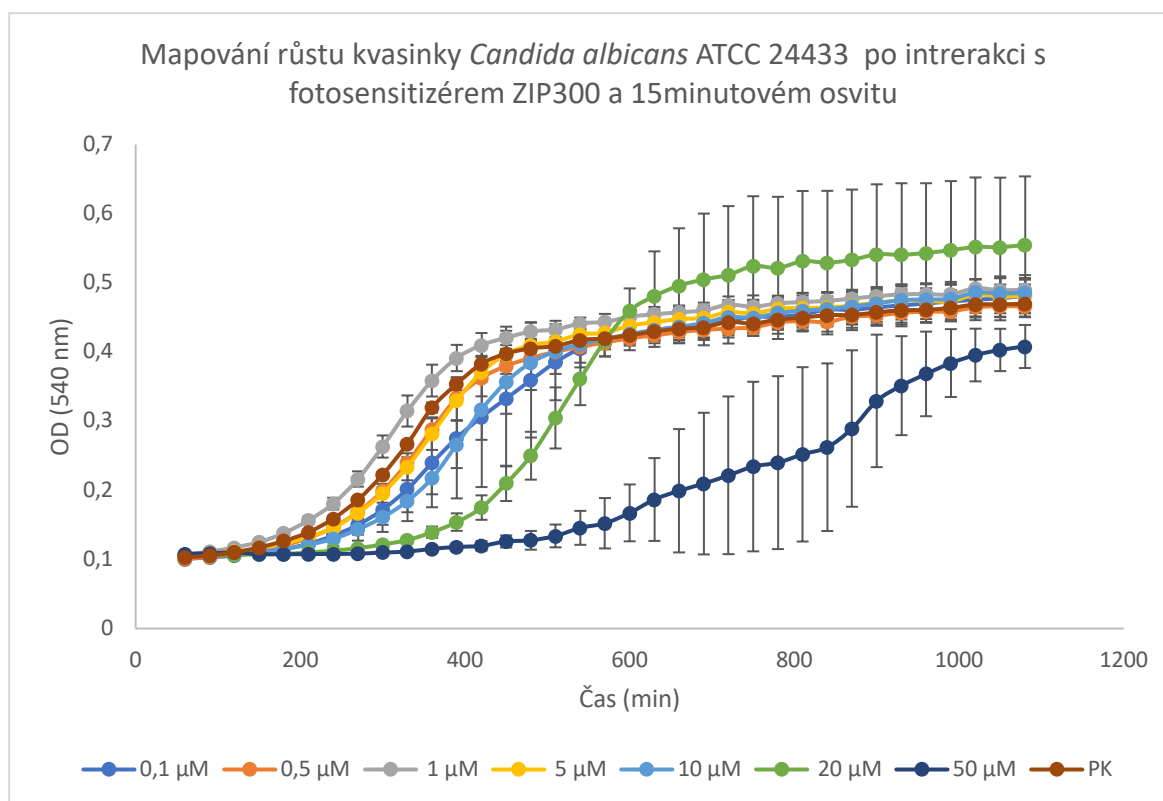
8.4.3 Vyhodnocení aktivity ZIP300 vůči kvasince *Candida albicans*

8.4.3.1 Doba ozáření - 15 minut

Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C nebylo možné hodnotu MFC v rámci testovaného rozmezí koncentrací ZIP300 po 15 min ozáření stanovit. Jak ale z Obrázku 69 vyplývá, v případě koncentrace 50 μM došlo ke zpoždění v nástupu do exponenciální fáze růstu přes 5 h (320 min) ve srovnání s PK. V případě 20 μM koncentrace ZIP300 došlo ke zpoždění v nástupu nárůstu cca o 2 h (120 min) ve srovnání s PK. V případě ostatních nižších testovaných koncentrací neměl již ZIP300 téměř žádný vliv na zpoždění přechodu do exponenciální fáze růstu.

Při hodnocení výsledků pomocí AB bylo zjištěno, že k nejvyššímu procentu inhibice došlo v případě koncentrace 50 μM (téměř 78 % inhibice; Tabulka 30). V našem metodickém uspořádání jsme detekovali metabolickou aktivitu po cca 7 h (420 min) v rámci „recovery“ módu. Jak je patrné z Obrázku 69, PK dosahuje v tomto intervalu pozdní exponenciální fáze. V daném časovém intervalu pak kvasinky pod vlivem koncentrace 50 μM téměř nevykazují růst, což přímo koreluje s hodnotami určenými touto metodou. Jak je dále patrné v Tabulce 30, sub-inhibiční koncentrace 20 μM vedla k poklesu metabolické aktivity o 46,5 % ve srovnání s PK. Koncentrace 10 μM vedla pouze k 3 % inhibici metabolická aktivity. Naopak v rozmezí koncentrací 0,5 až 5 μM došlo k ještě vyšší metabolické aktivitě než u PK, o čemž vypovídají záporné hodnoty v % inhibice. Je také zajímavé, že v případě koncentrace odpovídající 0,1 μM došlo k asi 9 % inhibici metabolické aktivity.

Výsledky získané prostřednictvím přístroje Bioscreen C a metodou AB byly potvrzeny výsevovou metodou (Obrázek 70).

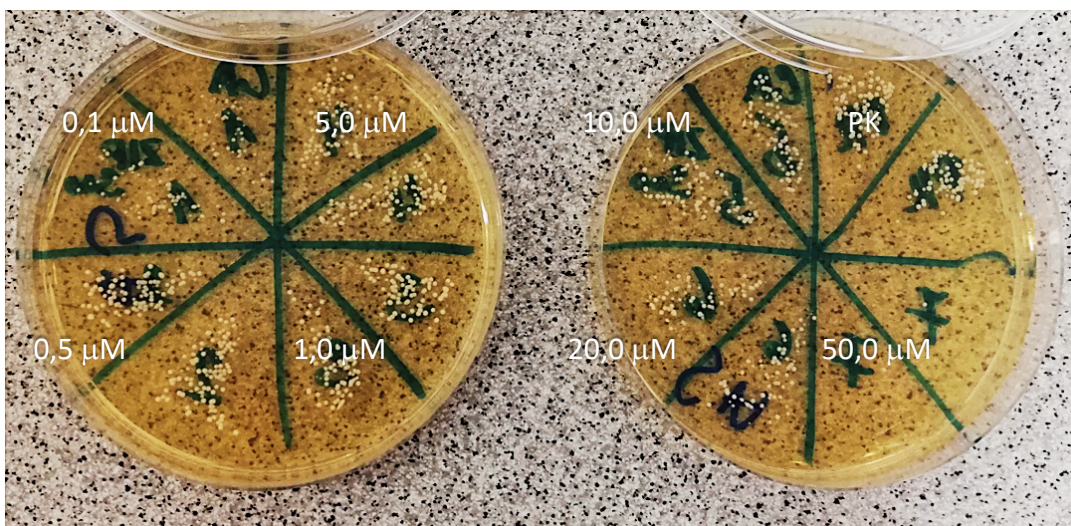


Obrázek 69: Vliv různých koncentrací ZIP300 na kvasinku *Candida albicans* ATCC 24433, s dobou ozařování 15 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola; OD – optická denzita.

Tabulka 30: Studium vlivu různých koncentrací fotosenzitizéru ZIP300 na metabolickou aktivitu kvasinky *Candida albicans* ATCC 24433 s dobou ozáření 15 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

ZIP300 - CA - Light	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM	50 µM	PK
Průměrná hodnota RFU	9847,00	12300,33	12840,33	11830,67	10420,00	6145,33	3042,00	10755,67
% metabolické aktivity *	90,94%	115,72%	121,17%	110,97%	96,73%	53,55%	22,21%	100,00%
% inhibice **	9,06%	-15,72%	-21,17%	-10,97%	3,27%	46,45%	77,79%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 70: Snímek petriho misek se Sabouraud agarem a nárůstem kvasinkového kmene *Candida albicans* ATCC 24433. Po interakci kvasinkového kmene s různými koncentracemi ZIP300 s dobou ozáření 15 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 15 min, 11,2 J/cm²) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 h v termostatu byl hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu kvasinek bez vlivu PS.

8.4.3.2 Doba ozáření - 30 minut

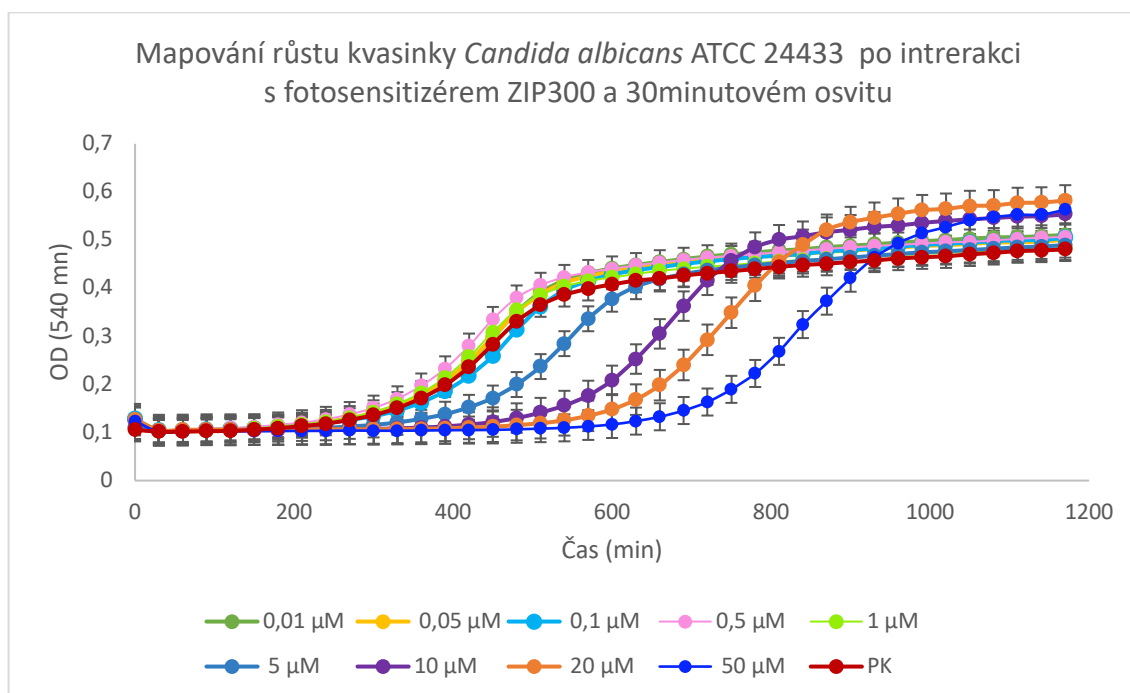
I v tomto případě bylo základním předpokladem, že prodloužení doby ozáření by mělo vést k navýšení antifungální aktivity, a tak došlo k upravení koncentrační řady přidáním nižších koncentrací ZIP300. V případě ozáření po dobu 30 min také nebylo možné na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C stanovit hodnotu MFC.

Jak je znázorněno na Obrázku 71, v případě nejvyšší koncentrace 50 μ M došlo ke zpoždění v nástupu do exponenciální fáze ve srovnání s PK cca o 5,5 h (340 min). V případě koncentrací, 10 a 20 μ M došlo k postupnému zdržení v nástupu do exponenciální fáze o cca 3,5 h (210 min) a 5 h (300 min) ve srovnání s PK. V případě koncentrace 5 μ M došlo k minimálnímu posunu ve srovnání s PK (maximálně o 40 min). U dalších měřených koncentrací (0,01, 0,05, 0,1, 0,5 a 1 μ M) nebyl zaznamenán žádný posun ve srovnání s PK.

Při hodnocení výsledků pomocí AB bylo zjištěno, že k nejvyššímu procentu inhibice metabolické aktivity došlo v případě koncentrace 20 μ M (86,5 % inhibice) a 50 μ M (přes 93 % inhibice; Tabulka 31). V našem metodickém uspořádání jsme v tomto případě detekovali metabolickou aktivitu cca po 7 h (420 min) v rámci „recovery“ módu. Jak je patrné z Obrázku 71, PK dosahuje v tomto intervalu pozdní exponenciální fáze. V daném časovém intervalu pak kvasinky pod vlivem koncentrace 20 a 50 μ M téměř nevykazují růst, což koreluje s hodnotami

naměřenými touto metodou. Jak je dále patrné v Tabulce 31, sub-inhibiční koncentrace 10 μM vedla k poklesu metabolické aktivity přibližně o 70 % ve srovnání s pozitivní kontrolou. Koncentrace 5 μM vedla pouze k 39% inhibici metabolická aktivity. Naopak, v případě koncentrací 0,01 a 0,05 μM došlo k navýšení metabolické aktivity ve srovnání s PK, o čemž vypovídají záporné hodnoty v % inhibice.

Výsledky získané prostřednictvím přístroje Bioscreen C a metodou AB byly potvrzeny výsevovou metodou (Obrázek 72).

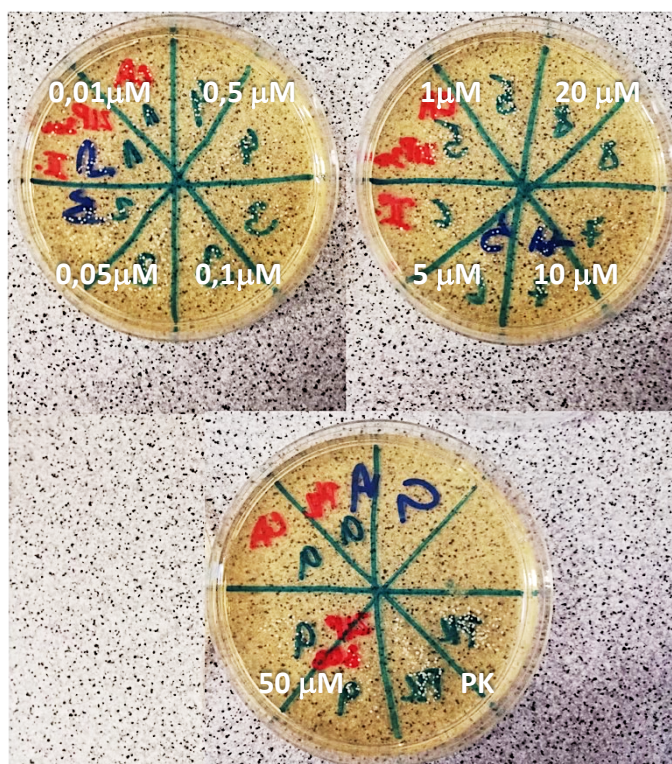


Obrázek 71: Vliv různých koncentrací ZIP300 na kvasinku *Candida albicans* ATCC 24433, s dobou ozařování 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola, OD – optická denzita.

Tabulka 31: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru ZIP300 na metabolickou aktivitu kvasinky *Candida albicans* ATCC 24433 s dobou ozáření 30 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztahované vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztahované vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

ZIP300 - CA - Light	0,01 μM	0,05 μM	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	15148,33	14586,67	13423,00	12232,00	13678,67	10815,33	7936,33	6330,00	5670,00	14540,00
% metabolické aktivity *	106,05%	100,16%	87,94%	75,43%	90,62%	60,56%	30,33%	13,46%	6,53%	100,00%
% inhibice **	-6,05%	-0,16%	12,06%	24,57%	9,38%	39,44%	69,67%	86,54%	93,47%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 72: Snímek petriho misek se Sabouraud agarem a nárůstem kvasinkového kmene *Candida albicans* ATCC 24433. Po interakci kvasinkového kmene s různými koncentracemi ZIP300 s dobou ozáření 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 h v termostatu byl hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola; pro hodnocení růstu kvasinek bez vlivu PS.

8.4.3.3 Určení vlastní antifungální aktivity ZIP300 (bez ozáření) na kvasinku *Candida albicans*

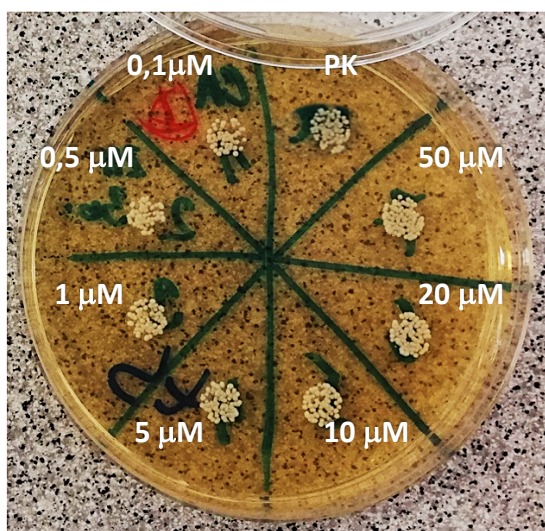
Pro ZIP300 a kvasinku CA byla také hodnocena vlastní antimykotická aktivita bez ozáření pomocí AB, která byla provedena pouze v koncentračním rozhraní: 0,1 až 50 μ M. Jak vyplývá z Tabulky 32, vlastní toxicita látky ZIP300 bez ozáření vůči CA nebyla prokázána. K nejvyšší inhibici došlo paradoxně při nejnižší z testovaných koncentrací, a to 0,1 μ M, kde došlo k inhibici metabolické aktivity cca o 19 % ve srovnání s PK. Ostatní (vyšší) testované koncentrace ZIP300 bez ozáření spíše mírně potencovaly metabolickou aktivitu, o čemž opět vypovídají záporné hodnoty v % inhibice.

Tyto výsledky byly confirmovány výsevovou metodou (Obrázek 73), která potvrdila výsledky naměřené metodou AB.

Tabulka 32: Studium vlivu různých koncentrací fotosensitizeru ZIP300 na metabolickou kvasinky *Candida albicans* ATCC 24433 bez ozáření. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

ZIP300 - CA - Dark	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	8723,00	11670,00	11928,00	11399,33	12098,00	12211,67	11812,00	10515,67
% metabolické aktivity *	81,27%	111,62%	114,28%	108,83%	116,03%	117,20%	113,08%	100,00%
% inhibice **	18,73%	-11,62%	-14,28%	-8,83%	-16,03%	-17,20%	-13,08%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 73: Snímek petriho misky se Sabouraud agarem a nárůstem kvasinkového kmene *Candida albicans* ATCC 24433. Po interakci kvasinkového kmene s různými koncentracemi ZIP300 bez ozáření byl proveden výsev („spot“ výsevovou metodou) na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 h v termostatu byl hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu kvasinek bez vlivu PS.

8.5 Methylenová modř

Koncentrační řady pro různé doby ozáření:

15 min: 5 – 10 – 20 – 100 – 500 μM

30 min: 5 – 10 – 20 – 100 μM

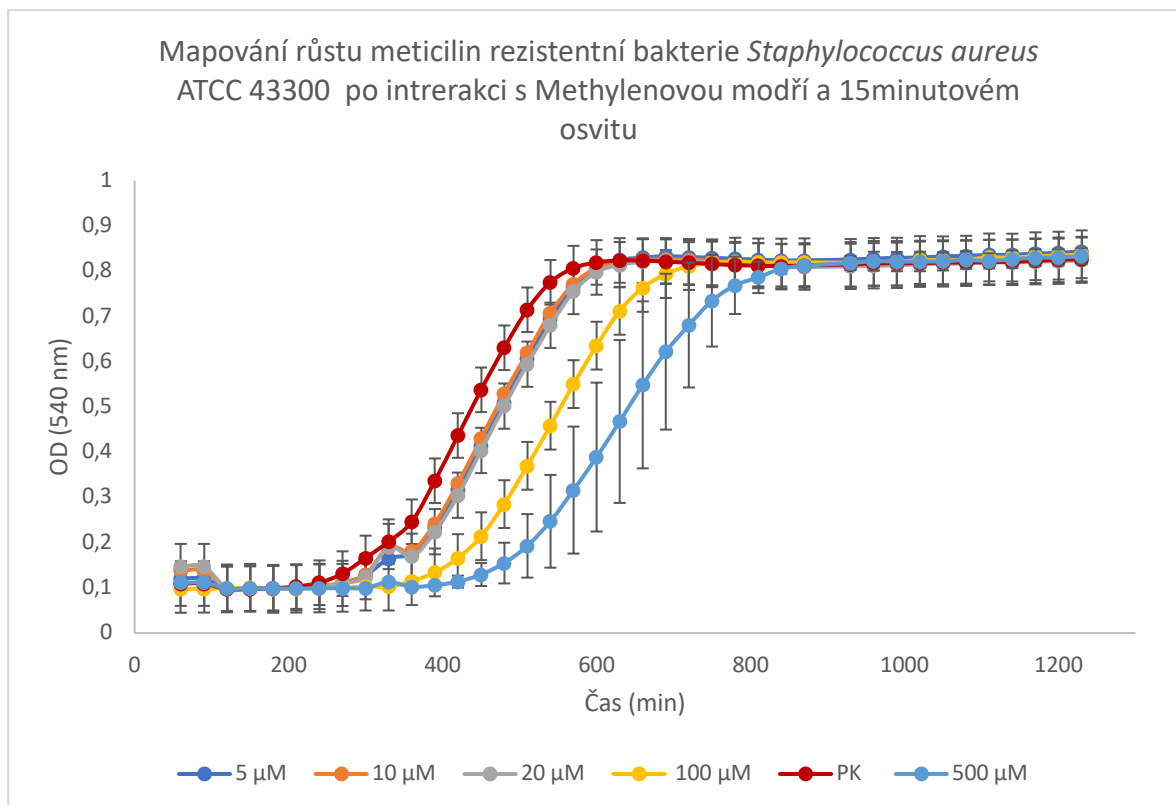
8.5.1 Vyhodnocení aktivity Methylenové modři vůči meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus*

8.5.1.1 Doba ozáření - 15 minut

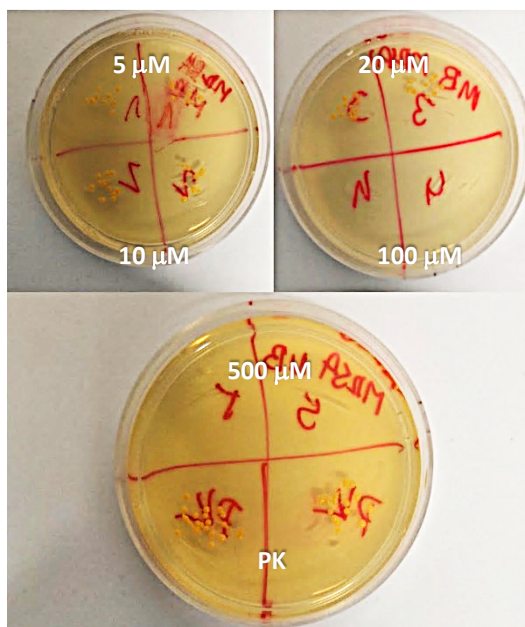
Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C nebylo možné hodnotu MBC v rámci testovaného rozmezí koncentrací MB po ozáření 15 min stanovit. Jak je znázorněno v na Obrázku 74, v případě nejvyšší cílové koncentrace 500 μM došlo ke zpoždění v nástupu do exponenciální fáze ve srovnání s PK přes 3 h (200 min), v případě koncentrace 100 μM to bylo cca o 2,5 h (160 min) a v případě koncentrací 5, 10 a 20 μM došlo shodně k posunu o 80 min.

Určení metabolické aktivity MRSA pro MB a dobu ozáření 15 min pomocí AB není uvedeno. Pro hodnocení byl volen původně zamýšlený metodický přístup (mikrobiální suspenze v PBS, expozice testovanou látkou a ozáření, přidání metabolického indikátoru), který nevykázal spolehlivost (nebyla detekována metabolická aktivita pozitivní růstové kontroly).

Získané výsledky byly potvrzeny výsevovou metodou (Obrázek 75). Nárůst byl patrný pouze na výsečích s koncentracemi 5, 10 a 20 μM a PK, což ale neodpovídá výsledkům získanými přístrojem Bioscreen C.



Obrázek 74 Vliv různých koncentrací MB na meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 s dobou ozařování 15 min ($\lambda > 570$ nm, $12,4$ mW/cm², 15 min, $11,2$ J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola; OD – optická denzita.



Obrázek 75: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi MB s dobou ozáření 15 min ($\lambda > 570$ nm, $12,4$ mW/cm², 15 min, $11,2$ J/cm²) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 h v termostatu byl hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

8.5.1.2 Doba ozáření - 30 minut

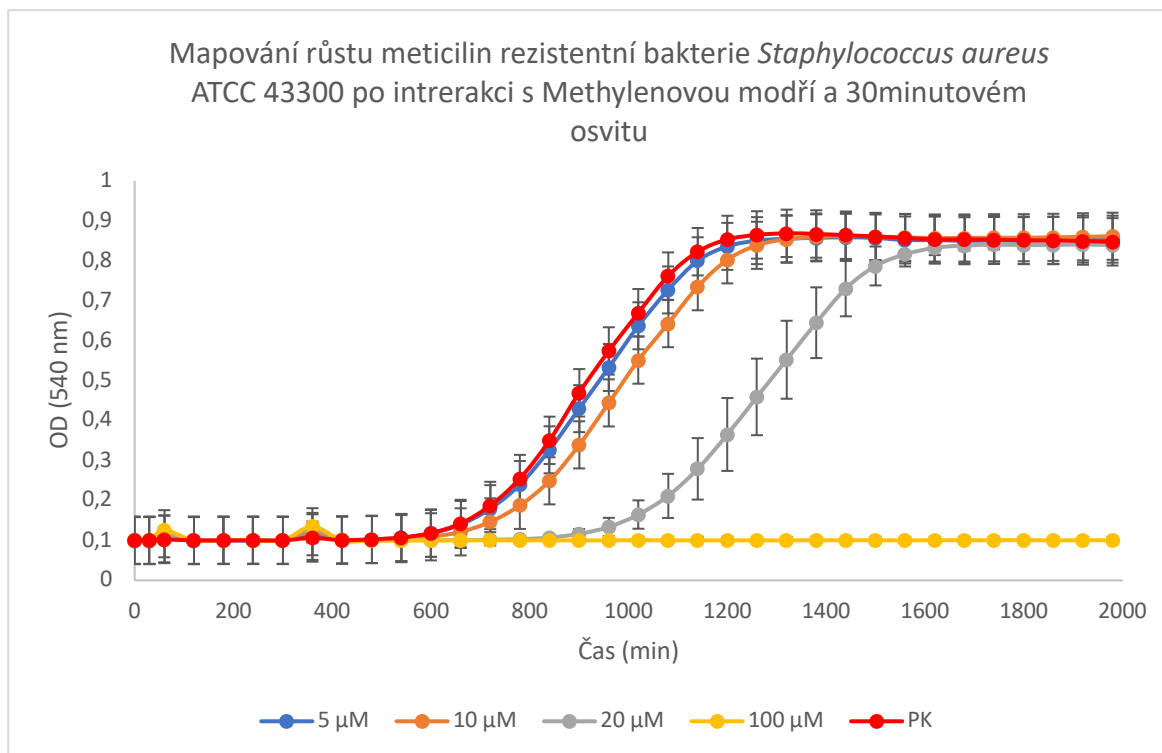
Základním předpokladem, ze kterého se vycházelo v navazujících experimentech bylo, že prodloužení doby ozáření by mělo vést k navýšení antibakteriální aktivity, což se v tomto případě potvrdilo. Došlo také k upravení koncentrační řady – nejvyšší koncentrace použitá při 15 min ozáření (500 μM) nebyla v tomto experimentu použita.

Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C a také na základě vizuálního hodnocení bylo prokázáno, že při koncentraci 100 μM nedošlo k nárůstu mikrobiální biomasy – v příslušných jamkách nebyl detekován zákal (Obrázek 76). MBC byla proto v tomto případě určena na 100 μM .

Jak je také patrné z Obrázku 76 v případě sub-MBC, odpovídající $1/5$ MBC, tedy sub-MBC = $0,2 \times \text{MBC}$ došlo k opoždění v přechodu z lag růstové fáze do logaritmické fáze cca o 5 h (300 min), což je poměrně dlouhá doba a lze tedy očekávat, že tato sub-inhibiční koncentrace se poměrně výrazně projeví v rámci post-antimikrobního efektu. Na druhou stranu v případě koncentrací odpovídajících $1/10$ MBC (sub-MBC = $0,1 \times \text{MBC}$) a $1/20$ MBC (sub-MBC = $0,05 \times \text{MBC}$) k opoždění v přechodu do exponenciální fáze růstu ve srovnání s PK téměř nedošlo.

Při hodnocení výsledků pomocí AB bylo zjištěno, že k nejvyššímu procentu inhibice metabolické aktivity došlo v případě nejvyšší cílové koncentrace odpovídající 100,0 μM (100 % inhibice; Tabulka 33). V případě koncentrací 10 a 20 μM došlo k inhibici metabolické aktivity v obou případech přes 95 %. V našem metodickém uspořádání jsme v tomto případě detekovali metabolickou aktivitu po cca 11 h (660 min) v rámci „recovery“ módu. Jak je patrné z Obrázku 76, PK dosahuje v tomto intervalu exponenciální fáze. V daném časovém intervalu pak bakterie pod vlivem koncentrace 20 a 100 μM nevykazují růst, což koreluje s hodnotami určenými touto metodou. V případě koncentrace 10 μM je zde ale v tomto směru mírná diskrepance. Jak je dále patrné v Tabulce 33, sub-inhibiční koncentrace 5,0 μM vedla k poklesu metabolické aktivity přibližně o 84 % ve srovnání s PK.

Výsledky získané prostřednictvím přístroje Bioscreen C a metodou AB byly potvrzeny výsevovou metodou (Obrázek 77). Nárůst nebyl pozorován pouze na výsech se 100 μM koncentrací MB, což přesně koreluje s výsledky získanými pomocí přístroje Bioscreen C.

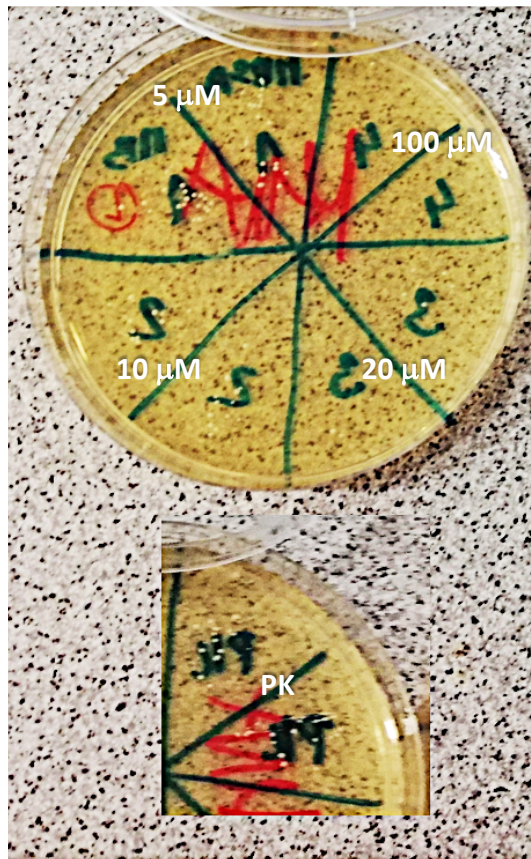


Obrázek 76: Vliv různých koncentrací MB na met icilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, s dobou ozařování 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola, OD – optická denzita.

Tabulka 33: Studium vlivu různých koncentrací MB na metabolickou aktivitu met icilin rezistentní bakterie *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 s dobou ozáření 30 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplicátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

MB - MRSA - Light	5 μM	10 μM	20 μM	100 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	5117,11	3574,67	3898,67	3368,67	13855,00
% metabolické aktivity *	16,50%	1,84%	4,92%	0,00%	100%
% inhibice **	83,50%	98,16%	95,08%	100,00%	0%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 77: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi MB s dobou ozáření 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 h v termostatu byl hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

8.5.1.3 Určení vlastní antibakteriální aktivity Methylenové modři (bez ozáření) na meticilin rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus*

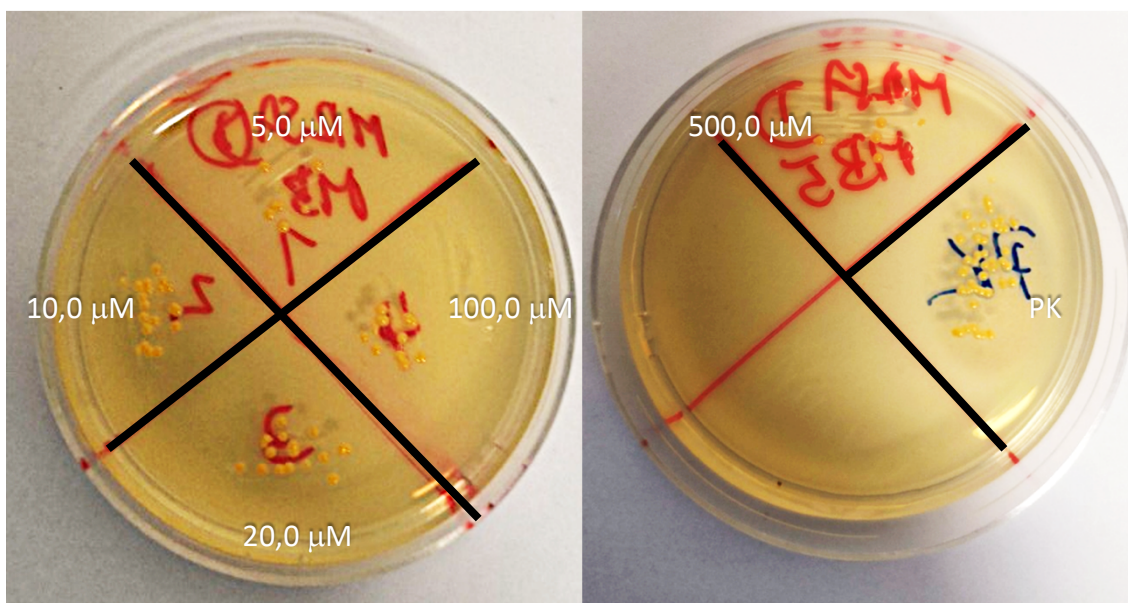
Pro kombinaci MB a MRSA byla také hodnocena vlastní antibakteriální aktivita bez ozáření pomocí AB, která byla provedena v koncentrační řadě 5 – 10 – 20 – 100 μM . Jak vyplývá z Tabulky 34, tato aktivita MB vůči MRSA bez ozáření byla významněji prokázána pouze v nejvyšší z testované koncentraci (100 μM), kde došlo k inhibici metabolické aktivity cca o 60 % ve srovnání s PK. V případě 20 μM koncentrace došlo k inhibici metabolické aktivity pouze z 1,5 %. U ostatních (nižších) koncentrací MB bez ozáření spíše nastala mírná potenciace metabolické aktivity, o čemž opět vypovídají záporné hodnoty v % inhibice.

Tyto výsledky byly potvrzeny výsevovou metodou, kde byly použity koncentrace 5 – 10 – 20 – 100 – 500 μM , viz Obrázek 78.

Tabulka 34: Studium vlivu různých koncentrací MB na metabolickou meticilin rezistentní bakterie *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 bez ozáření. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplicátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

MB - MRSA - Dark	5 μM	10 μM	20 μM	100 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	15392,33	16212,67	14547,00	7873,00	14695,00
% metabolické aktivity *	105,95%	113,17%	98,51%	39,78%	100,00%
% inhibice **	-5,95%	-13,17%	1,49%	60,22%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 78: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi MB bez ozáření byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 h v termostatu byl hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

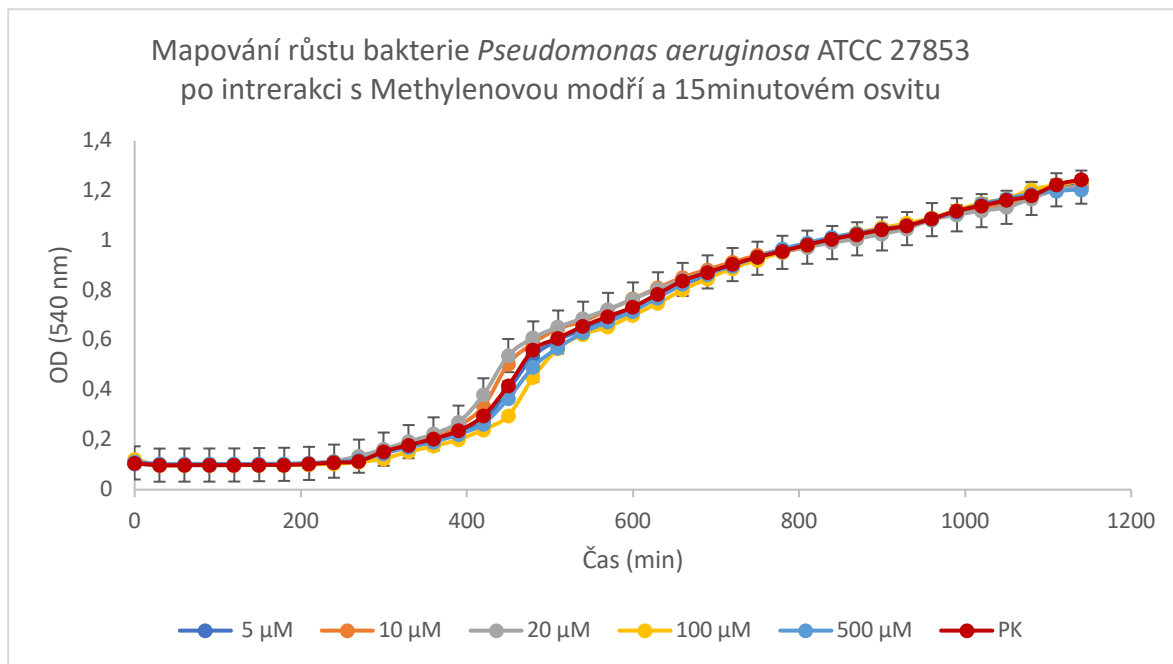
8.5.2 Vyhodnocení aktivity Methylenové modři vůči bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

8.5.2.1 Doba ozáření - 15 min

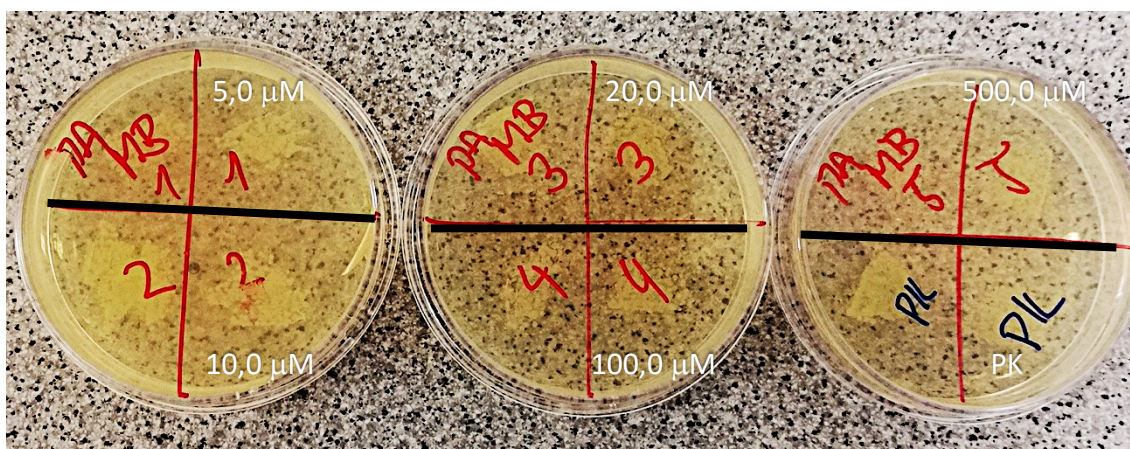
Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C, nebylo možné hodnotu MBC v rámci testovaného rozmezí koncentrací MB po době ozáření 15 min stanovit. Jak je zřejmé z Obrázku 79, nebyla zaznamenána jakákoliv antibakteriální aktivita studované látky vůči kmenu bakterie PA, a to ve všech testovaných koncentracích.

Určení metabolické aktivity pomocí AB u PA pro MB a dobu ozáření 15 min není uvedeno. Pro hodnocení byl volen původně zamýšlený metodický přístup (mikrobiální suspenze v PBS, expozice testovanou látkou a ozáření, přidání metabolického indikátoru), který nevykázal spolehlivost (nebyla detekována metabolická aktivita pozitivní růstové kontroly).

Získané výsledky byly confirmovány výsevovou metodou, která je po vizuální inspekci potvrdila (Obrázek 80). Na všech výsečích agarů je bez rozdílu patrný nárůst bakterií, který se na plotnách projevuje viditelnými koloniemi tvořícími souvislou vrstvu.



Obrázek 79: Vliv různých koncentrací MB na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, s dobou ozařování 15 min ($\lambda > 570$ nm, $12,4 \text{ mW/cm}^2$, 15 min, $11,2 \text{ J/cm}^2$) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola; OD – optická denzita.



Obrázek 80: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi MB a ozaření 15 min ($\lambda > 570$ nm, $12,4 \text{ mW/cm}^2$, 15 min, $11,2 \text{ J/cm}^2$) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37°C po dobu 24 h v termostatu, byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

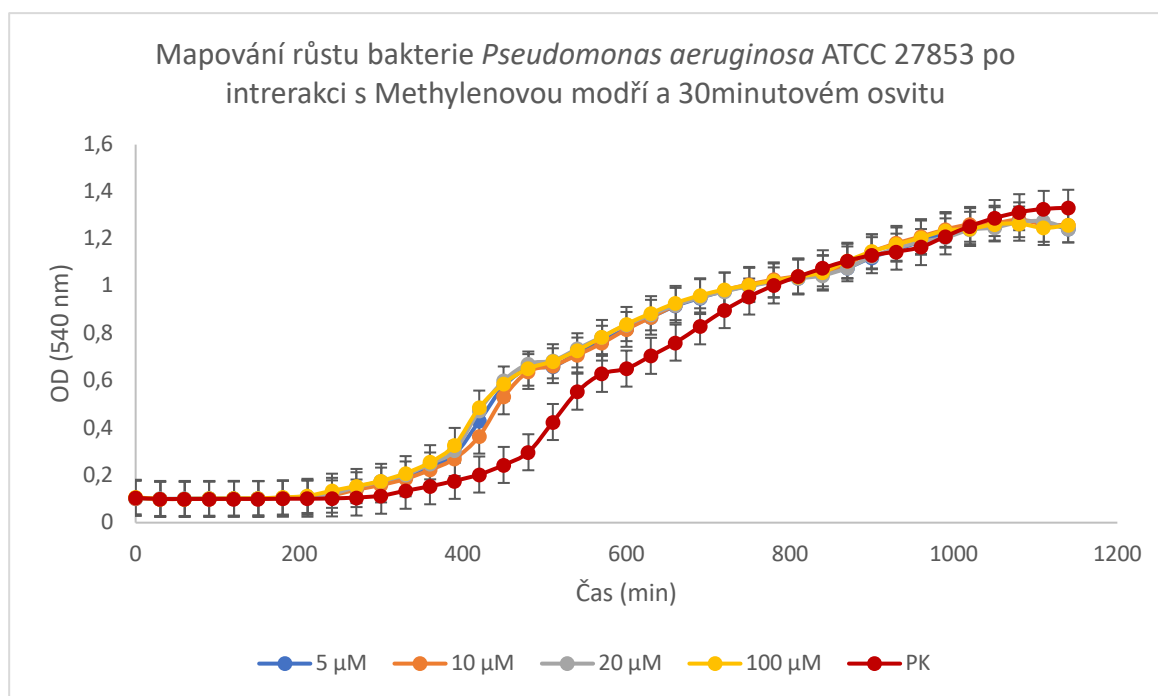
8.5.2.2 Doba ozáření - 30 min

Základním předpokladem, ze kterého se vycházelo v navazujících experimentech bylo, že prodloužení doby ozáření by mělo vést k navýšení antibakteriální aktivity. Došlo také k upravení koncentrační řady. Nejvyšší koncentrace použita při ozáření 15 min (500 μM) nebyla v tomto experimentu použita.

Jak je patrné z Obrázku 81, který byl zpracován na základě dat z přístroje Bioscreen C, ve srovnání s předchozími výsledky nedošlo k navýšení antibakteriální aktivity, dokonce byla zaznamenána progresse růstu ve srovnání s PK, což znamená, že bakterie PA pod vlivem testované látky po ozáření vykazovaly rychlejší nástup z lag růstové fáze do exponenciální fáze, než tomu bylo u PK. Zjevně tyto sub-inhibiční koncentrace MB vedly k nabuzení bakteriálního metabolismu, který podpořil vyšší obrat v nárůstu bakteriální biomasy.

Zpracovaná data z AB plně podpořila poznatek získaný v rámci předchozího šetření, jak vyplývá z Tabulky 35. Ani nejvyšší koncentrace MB (100 μM) nebyla postačující jak k inhibici růstu, tak k inhibici metabolismu bakterie. Tyto sub-inhibiční koncentrace naopak vedou k navýšení metabolické aktivity, o čemž vypovídají záporné hodnoty v % inhibice. V případě nejvyšší testované koncentrace (100 μM) pak dochází k navýšení metabolické aktivity o téměř 113 % ve srovnání s pozitivní kontrolou.

Tyto výsledky získané prostřednictvím přístroje Bioscreen C a AB byly potvrzeny konfirmační výsevovou metodou (Obrázek 82).

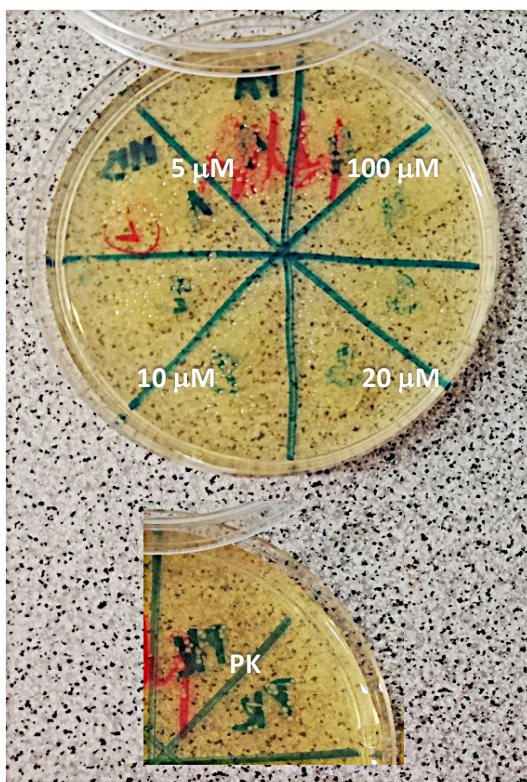


Obrázek 81: Vliv různých koncentrací MB na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 s dobou ozařování 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola, OD – optická denzita

Tabulka 35: Vliv různých koncentrací MB na metabolickou aktivitu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, s dobou ozáření 30 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

MB - PA - Light	5 µM	10 µM	20 µM	100 µM	PK
Průměrná hodnota RFU	16672,33	15358,33	19145,00	19085,67	10883,00
% metabolické aktivity *	179,60%	161,60%	213,48%	212,66%	100,00%
% inhibice **	-79,60%	-61,60%	-113,48%	-112,66%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 82: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi MB a ozáření 30 min ($\lambda > 570$ nm, $12,4 \text{ mW/cm}^2$, 30 min, $22,4 \text{ J/cm}^2$) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37°C po dobu 24 h v termostatu byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

8.5.2.3 Určení vlastní antibakteriální aktivity Methylenové modři (bez ozáření) na bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

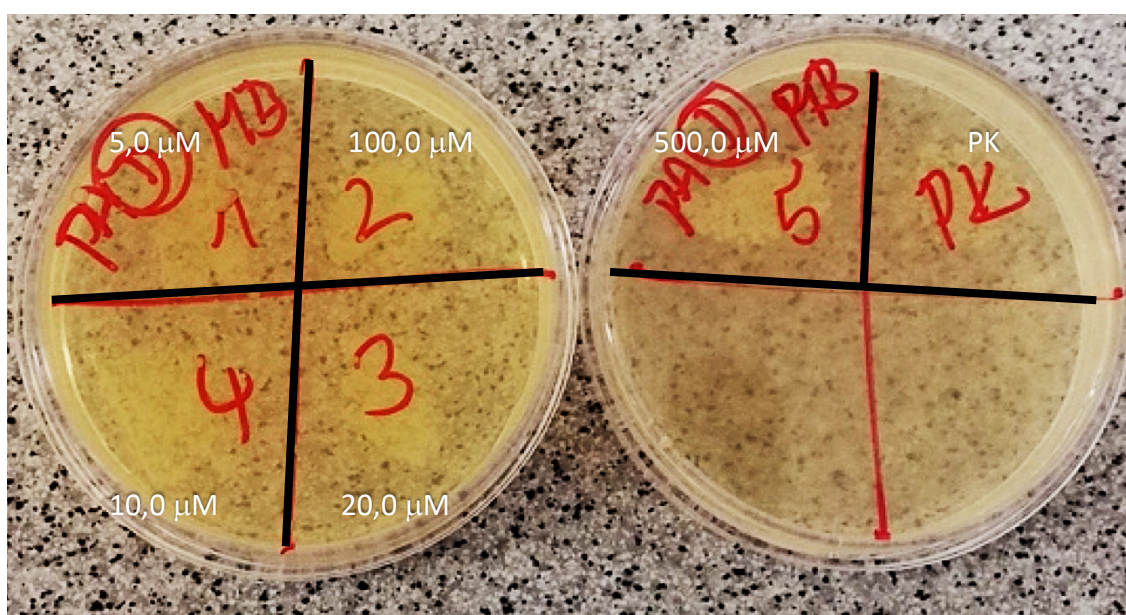
Pro hodnocení vlastní toxicity MB bez ozáření vůči PA pomocí AB byla použita tato koncentrační řasa: 5 – 10 – 20 a $100 \mu\text{M}$. Jak z Tabulky 36 vyplývá, vlastní toxicita MB bez ozáření v souvislosti s PA nebyla prokázána. Naopak MB bez ozáření spíše potencovala metabolickou aktivitu, o čemž vypovídají záporné hodnoty v % inhibice.

Tyto výsledky byly confirmovány výsevovou metodou v koncentrační řadě 5 – 10 – 20 – 100 – $500 \mu\text{M}$ (Obrázek 83. Na všech výsečích se objevil nárůst projevující se souvislou vrstvou.

Tabulka 36: Studium vlivu různých koncentrací MB na metabolickou aktivitu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 bez ozáření. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztahované vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztahované vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

MB - PA - Dark	5 μ M	10 μ M	20 μ M	100 μ M	PK
Průměrná hodnota RFU	15947,00	15590,00	18477,00	19241,67	12674,33
% metabolické aktivity *	135,54%	131,61%	163,37%	171,78%	100,00%
% inhibice **	-35,54%	-31,61%	-63,37%	-71,78%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 83: Snímek petriho misek s Mueller-Hinton agarem a nárůstem bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Po interakci bakteriálního kmene s různými koncentracemi MB bez ozáření byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 hodin v termostatu byl hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu bakterií bez vlivu PS.

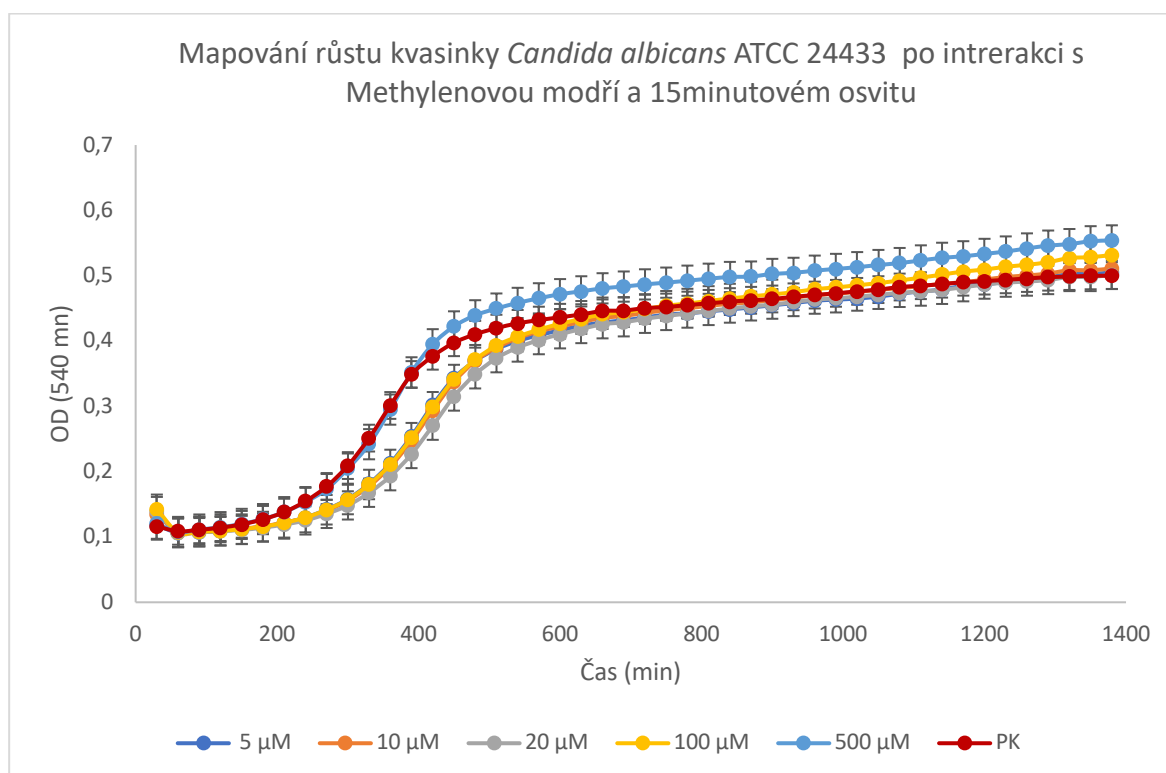
8.5.3 Vyhodnocení aktivity Methylenové modři vůči kvasince *Candida albicans*

8.5.3.1 Doba ozáření - 15 min

Na základě hodnocení dynamiky mikrobiálního růstu pomocí přístroje Bioscreen C nebylo možné hodnotu MFC v rámci testovaného rozmezí koncentrací MB po 15 min ozáření stanovit. Jak je zřejmé z Obrázku 84, nebyla zaznamenána významná antifungální aktivita studované látky vůči kmenu kvasinky CA, která by se projevila zpožděním v přechodu z lag růstové fáze do logaritmické, a to ve všech testovaných koncentracích.

Zpracovaná data z AB podpořila poznatek získaný v rámci předchozího šetření (Tabulka 37). Ani nejvyšší koncentrace MB (100 μM) nebyla postačující jak k inhibici růstu, tak k inhibici metabolismu kvasinky. K nejvyšší inhibici (cca 32 %) došlo v případě 10 μM koncentrace. Překvapivě v případě nejvyšší testované koncentrace (100 μM) pak dochází k inhibici metabolické aktivity pouze o necelých 5 % ve srovnání s PK.

Tyto výsledky byly potvrzeny výsevovou metodou (Obrázek 85), která potvrdila závěry získané prostřednictvím přístroje Bioscreen C a metodou AB.

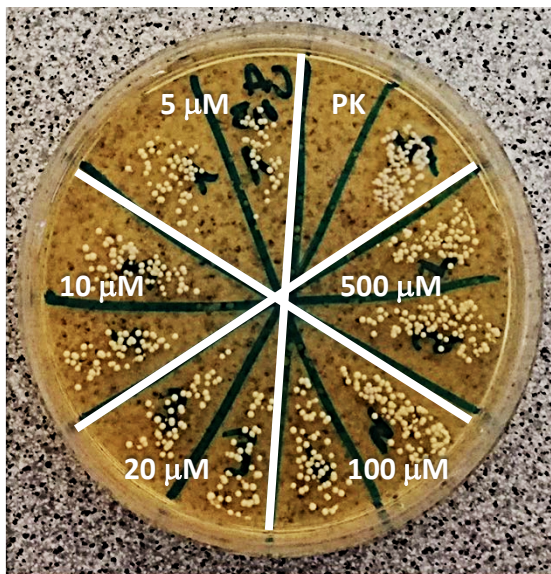


Obrázek 84: Vliv různých koncentrací MB na kvasinku *Candida albicans* ATCC 24433, s dobou ozařování 15 min ($\lambda > 570 \text{ nm}$, $12,4 \text{ mW/cm}^2$, 15 min, $11,2 \text{ J/cm}^2$) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola; OD – optická denzita.

Tabulka 37: Studium vlivu různých koncentrací MB na metabolickou aktivitu kvasinky *Candida albicans* ATCC 24433 s dobou záření 15 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplicátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

MB - CA - Light	5 μM	10 μM	20 μM	100 μM	500 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	12019,33	10875,67	11790,67	13223,00	14742,00	15463,67
% metabolické aktivity *	75,97%	67,85%	74,34%	84,51%	95,30%	100,00%
% inhibice **	24,03%	32,15%	25,66%	15,49%	4,70%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 85: Snímek petriho misky se Sabouraud agarem a nárůstem kvasinkového kmene *Candida albicans* ATCC 24433. Po interakci kvasinkového kmene s různými koncentracemi MB s dobou ozáření 15 min ($\lambda > 570$ nm, $12,4 \text{ mW/cm}^2$, 15 min, $11,2 \text{ J/cm}^2$) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37°C po dobu 24 h v termostatu byl hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu kvasinek bez vlivu PS.

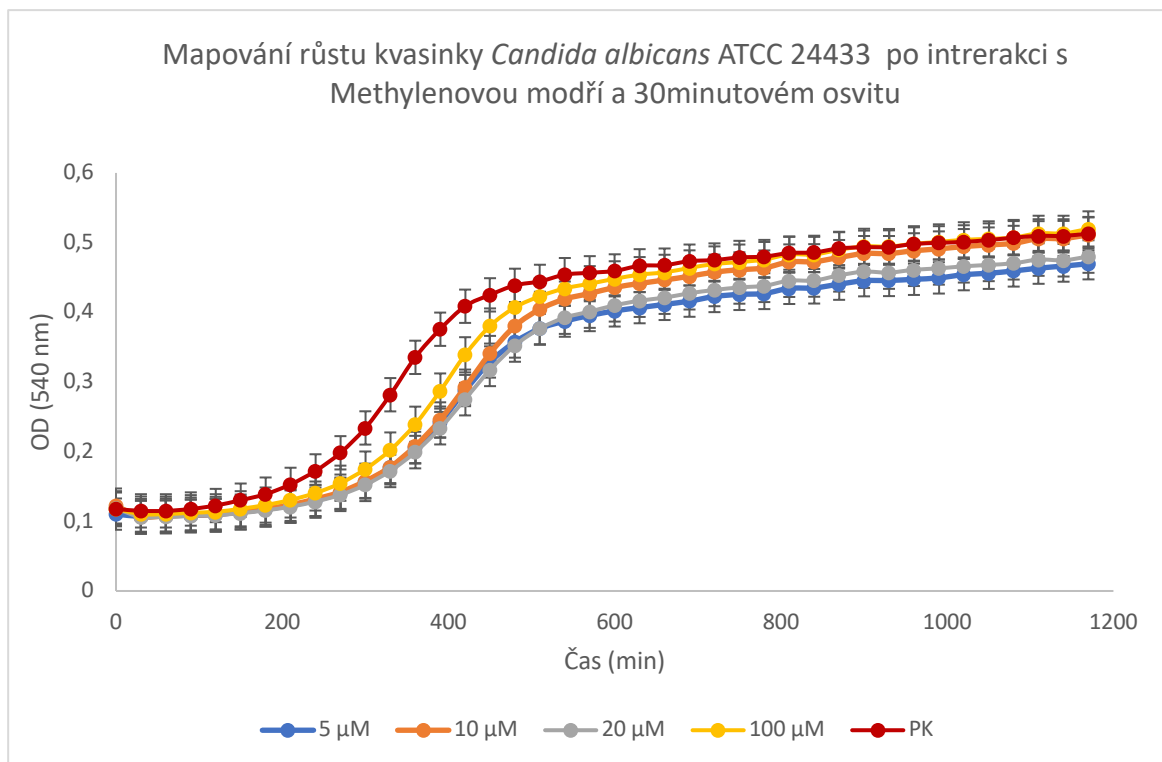
8.5.3.2 Doba ozáření - 30 min

Základním předpokladem, ze kterého se vycházelo v navazujících experimentech bylo, že prodloužení doby ozáření by mělo vést k navýšení antifungální aktivity. Došlo také k upravení koncentračního rozhraní. Nejvyšší koncentrace použitá při 15 min ozáření ($500 \mu\text{M}$) nebyla v tomto experimentu použita.

Jak je patrné z Obrázku 86, ve srovnání s předchozími výsledky nedošlo k přílišnému navýšení antifungální aktivity. V případě všech testovaných koncentrací MB došlo téměř shodně k opoždění v přechodu z lag růstové fáze do exponenciální ve srovnání s PK maximálně o 60 min.

Zpracovaná data z AB korelovala s poznatky získanými v rámci předchozího šetření (Tabulka 38). Ani nejvyšší koncentrace MB ($100 \mu\text{M}$) nebyla postačující jak k inhibici růstu, tak k inhibici metabolismu kvasinky. MFC se tedy touto metodou také nepodařilo v daném rozmezí koncentrací stanovit. K nejvyšší parciální inhibici došlo překvapivě u dvou nejnižších testovaných koncentrací (5 a $10 \mu\text{M}$), ale pouze o cca 18 % ve srovnání s PK.

Tyto výsledky byly confirmovány výsevovou metodou (Obrázek 87), která potvrdila závěry získané prostřednictvím přístroje Bioscreen C a metodou AB.

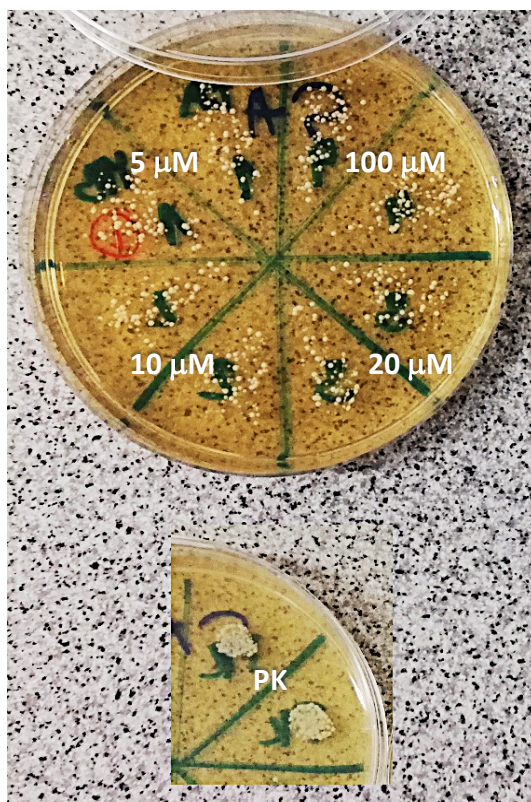


Obrázek 86: Vliv různých koncentrací MB na kvasinku *Candida albicans* ATCC 24433, s dobou ozařování 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) stanovený „recovery“ metodou. PK – pozitivní růstová kontrola, OD – optická denzita.

Tabulka 38: Studium vlivu různých koncentrací MB na metabolickou aktivitu kvasinky *Candida albicans* ATCC 24433 s dobou ozáření 30 minut. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescenci pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

MB - CA - Light	5 µM	10 µM	20 µM	100 µM	PK
Průměrná hodnota RFU	12538,00	12596,00	13974,67	12986,67	14669,00
% metabolické aktivity *	81,01%	81,52%	93,51%	84,92%	100,00%
% inhibice **	18,99%	18,48%	6,49%	15,09%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 87: Snímek petriho misky se Sabouraud agarem a nárůstem kvasinkového kmene *Candida albicans* ATCC 24433. Po interakci kvasinkového kmene s různými koncentracemi MB s dobou ozáření 30 min ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 30 min, 22,4 J/cm²) byl proveden výsev na kultivační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 h v termostatu byl hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu kvasinek bez vlivu PS.

8.5.3.3 Určení vlastní antifungální aktivity Methylenové modři, bez ozáření, na kvasinku *Candida albicans*

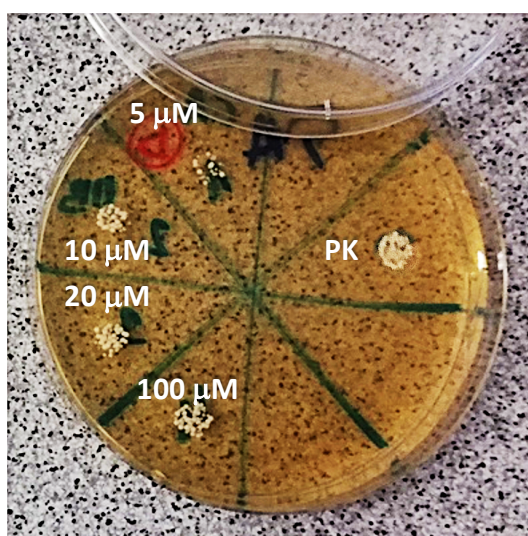
Pro MB a MRSA byla také hodnocena vlastní antifungální aktivita bez ozáření pomocí AB, která byla provedena v koncentrační řadě: 5 – 10 – 20 – 100 µM. Jak vyplývá z Tabulky 39, vlastní toxicita MB bez ozáření vůči CA byla významněji prokázána pouze v nejvyšší z testovaných koncentrací (100 µM), kde došlo k inhibici metabolické aktivity o 32 % ve srovnání s PK. V případě 20 µM koncentrace došlo k inhibici metabolické aktivity o 17 %.

Tyto výsledky byly confirmovány výsevovou metodou (Obrázek 88).

Tabulka 39: Studium vlivu různých koncentrací MB na metabolickou aktivitu *Candida albicans* ATCC 24433 bez ozáření. Metabolická aktivita byla měřena v rámci Alamar Blue assaye. V tabulce jsou zahrnuty průměrné hodnoty naměřené fluorescence (měřeno v triplikátech). Po subtrakci průměrných hodnot odpovídajících fluorescence pozadí (data nejsou v tabulce prezentována) bylo vypočítáno procento metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (100 %)*, a dále procento inhibice metabolické aktivity vztažené vůči pozitivní růstové kontrole (0 %)**

MB - CA - Dark	5 μM	10 μM	20 μM	100 μM	PK
Průměrná hodnota RFU	13727,33	14075,00	12526,67	10830,67	14459,67
% metabolické aktivity *	93,60%	96,69%	82,91%	67,82%	100,00%
% inhibice **	6,40%	3,31%	17,09%	32,18%	0,00%

Legenda: RFU – relative fluorescence units



Obrázek 88: Snímek petriho misky se Sabouraud agarem a nárůstem kvasinkového kmene *Candida albicans* ATCC 24433. Po interakci kvasinkového kmene s různými koncentracemi MB bez ozáření byl proveden výsev („spot“ výsevovou metodou) na kulturační médium do příslušných výsečí. Po následné inkubaci při 37 °C po dobu 24 h v termostatu byl následně hodnocen nárůst. PK – pozitivní růstová kontrola, pro hodnocení růstu kvasinek bez vlivu PS.

9. DISKUSE

Především dlouhodobé systematické zneužívání a nadužívání antimikrobních preparátů jak v humánní či veterinární medicíně, tak v potravinářství má za následek rozvoj antimikrobiální rezistence, což je v současné době velký celosvětový problém. Jedná se dokonce o tak velkou hrozbu, že i WHO si jako jeden ze svých prioritních cílů vytyčila tento problém řešit, jinak by hrozilo, že se svět ocitne v tzv. postantibiotické éře, kde by se i nyní běžně terapeuticky zvladatelné infekce mohly znovu stát smrtícími. Jedním z možných řešení je hledání alternativních přístupů v antiinfekční terapii (Salameh *et al.* 2015).

Takovým přístupem může být právě aPDT, a to především proto, že aPDT prezentuje neselektivní účinek na mikroorganismy, kdy prostřednictvím tvorby ROS dochází k zasažení vícero cílů v rámci mikrobiálních buněk. Díky této skutečnosti je pak velmi nepravděpodobné, že by byly mikroorganismy schopny si vyvinout nějaký mechanismus rezistence vůči tomuto typu terapie (Cieplik *et al.* 2018; Maisch, 2015; Wainwright *et al.*, 2017).

Je dostupný relativně velký počet (řádově desítky) sloučenin, o kterých se uvádí, že jsou účinné v aPDT. Velice zjednodušeně lze vhodné kandidáty rozdělit do dvou skupin. První skupina zahrnuje molekuly PSs vycházející ze struktury porfyrinu a do druhé skupiny můžeme zařadit např. kationická syntetická barviva jako jsou fenothiaziniová barviva (např. methylenová modř) nebo triarylmethanová barviva (Huang *et al.* 2010).

Experimentální náplní této práce je primárně zavést metodické úkony vedoucí ke stanovení antimikrobní aktivity kandidátních PSs v rámci fotodynamické inaktivace vybraných mikroorganismů. Do této pilotní studie byly zařazeny 4 vybrané (Aza)Pc PSs, které byly syntetizovány na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv ve skupině pana prof. Zimčíka na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Konkrétně byly použity látky s pracovním označením P44 (amfifilní, aniontická látka), HK18 (hydrofilní, aniontická látka), P42 (amfifilní, kationická látka) a ZIP300 (hydrofilní, kationická látka). Do studia antimikrobních aktivit bylo pro možné srovnání také zařazeno komerčně dostupné tricyklické barvivo – methylenová modř.

Pc jsou syntetické aromatické makrocycly, podobné svojí strukturou přírodním porfyrinům. AzaPc se od Pc odlišují tím, že mají v přikondenzovaných benzenových kruzích nahrazeny atomy uhlíku dusíkem (Lukyanets *et al.*, 2012). Díky svým strukturálním vlastnostem mají Pc širokou škálu uplatnění a byly úspěšně použity nebo studovány jako PSs v různých

lékařských aplikacích, zejména k léčbě nádorových onemocnění pomocí PDT (Demidova *et al.*, 2005).

Jedním z inovativních přístupů je využití PDT pro inaktivaci mikroorganismů. Uvádí se, že kationické PSs obecně vykazují vyšší antimikrobiální účinnost než neutrální či anionické PSs. Předpokládá se, že se kladně nabitě části PS mohou lépe vázat na záporně nabitou vnější membránu většiny mikrobiálních buněk prostřednictvím elektrostatické interakce. V případě G⁻ bakterií mohou pak kladné náboje oslabit jejich vysoce organizovanou vnější membránu a díky tomu může PS proniknout do citlivějších intracelulárních míst. Především tedy kationické Pc jsou těmi nejslibnějšími kandidáty pro aPDT (Ke *et al.*, 2014).

Bylo pozorováno, že mezi G⁺ a G⁻ bakteriemi existuje zásadní rozdíl v citlivosti vůči fotodynamické inaktivaci. Bylo zjištěno, že neutrální a anionické PSs jsou schopné efektivně působit na buňky G⁺ bakterií a kvasinek, zatímco ve srovnání s G⁻ bakteriemi jsou většinou neúčinné. Tuto vyšší citlivost G⁺ bakterií a kvasinek lze vysvětlit díky jejich fyziologii. Jejich cytoplazmatická membrána je totiž obklopena relativně porézní vrstvou peptidoglykanu a kyseliny lipoteichoové, v případě kvasinek pak vrstvou beta-glukanu a chitinu. Jinými slovy, jak stěna G⁺ bakterií, tak i stěna kvasinek umožňuje nekationovému PS snáze touto vnější buněčnou bariérou procházet (Huang *et al.*, 2010; Malik *et al.*, 1992).

U Pc testovaných v rámci naší pilotní studie je centrálním atomem zinek. Jde o deriváty, pro které bylo v odborných publikacích zavedeno označení ve formě zkratky ZnPc. Některé ZnPc jsou již v současné době zařazeny do klinické fáze testování (Galstyan, 2021). Za zmínku stojí například derivát s označením RLP068/Cl, který vykázal výraznou aktivitu (úplná ztráta životaschopnosti všech bakterií) v rámci *in vivo* studie (infekce rány na kůži, myš model) vůči MRSA (již při koncentraci 100 nM, ozáření 5 J/cm²) (Vecchio *et al.*, 2013).

Jiným příkladem může být derivát ZnPc (substituce čtyřmi bis(N,N,N-trimethyl)amino-2-propyloxy skupinami), u kterého byla vykázána aktivita (pokles CFU o 4 log₁₀) již při koncentraci (1 μM), a to jak vůči G⁺ bakterii MRSA, tak i vůči G⁻ bakterii *Escherichia coli*. Jak autoři studie Segalla *et al.*, 2002 uvádí, k méně výraznému poklesu (≈ 2 log₁₀) aktivity vůči *Escherichia coli* došlo tehdy, kdy byl v rámci testování zařazen krok odmytí PSs před ozářením (Segalla *et al.*, 2002). Je třeba uvést, že v rámci publikovaných studií zaměřených na antimikrobní aktivitu PSs lze nalézt řadu rozdílných přístupů v metodických úkonech. Za zmínku stojí například rozdíly ve velikosti počátečního mikrobiálního inokula, délka inkubace

PSs s mikrobiální suspenzí, či zařazení kroku odmytí nenavázaného PS. V rámci námi vedených experimentů jsme se rozhodli pro zavedení kroku odmytí PSs a lze očekávat, že podobně jako tomu je u výsledků výše zmíněné studie, v případě hodnocení antimikrobní aktivity bez kroku odmytí PSs bude dosaženo rozdílných výsledků.

Antimikrobní aktivita po ozáření a to nejen vůči planktonické formě bakterií, ale také vůči bakteriálním biofilmům byla rovněž studována u tetra- a okta-kationických derivátů ZnPc substituovaných amino skupinami. Ve studii Li M., *et al.*, 2017 byla prokázána aktivita některých derivátů vůči *E. coli* již při koncentraci 20 μM (pokles CFU o 3-5 \log_{10}) a vůči SA při té samé koncentraci s poklesem CFU v rozsahu 5-6 \log_{10} (Li *et al.*, 2017). Ve výčtu dostupných informací ohledně ZnPc a jejich výrazných antimikrobních aktivit po ozáření by bylo možné pokračovat i dále. To víceméně dokládá, že látky z této skupiny jsou výrazně slibnými kandidáty pro PDT.

V rámci naší studie byly za účelem screeningu antiinfekčních aktivit vybraných PSs voleny tři různé metodické přístupy. První přístup spočíval v tzv. „recovery“ metodě, kdy byl po expozici studovanou látkou o určité koncentraci a po ozáření odebrán reprezentativní alikvot (10 % z původního objemu) mikrobiální suspenze, který byl dále přenesen do čerstvého kultivačního média, s následnou inkubací po dobu 20 h v přístroji Bioscreen C (dynamické mapování přírůstků OD). V rámci tohoto přístupu mají mikroorganismy dostatečné podmínky pro případné „zotavení“ a pro jejich množení. Pokud nedochází v rámci fotodynamické inaktivace k fatálnímu poškození buněčných struktur, a tím ke ztrátě jejich životaschopnosti, jsou buňky schopné se po regeneraci dále množit, což se v čase projeví přírůstkem buněčné biomasy a navýšením hodnot OD. Nespornou výhodou tohoto přístupu je, že lze také v rámci dynamiky růstu sledovat prodlení v pomnožení mikrobiálních buněk vůči tzv. pozitivní růstové kontrole (mikrobiální buňky bez přítomnosti studované látky). Tato získaná informace ve své podstatě odpovídá hodnocenému parametru u běžných antibiotik, kterým je tzv. post-antibiotický efekt. Dlouhý post-antibiotický efekt u antibiotik je obecně považován za výraznou devizu těchto antiinfektiv (Athamna, 2004). Je třeba zmínit, že tento přístup je v rámci screeningu antimikrobní aktivity látek fotodynamickou inaktivací zcela inovativní. Nejčastěji voleným přístupem v hodnocení je tzv. výsevová metoda, která však má z našeho pohledu svá nesporná úskalí – viz níže.

Jeden z dalších metodických přístupů zvolených v naší studii byl v rámci odborných prací nejčastěji zmiňovaný přístup v podobě výsevové metody. Na rozdíl od předchozí recovery metody se jedná o end-point analýzu, která nebere v potaz průběh, ale jen stav na konci daného časového období. Tento přístup je nazýván metodou zlatého standardu. V rámci screeningových přístupů se však k němu pojí určitá omezení a nevýhody. Nespornou nevýhodou je pracnost a materiálová náročnost. Prvotním úkonem, který se k této metodě pojí, je ředění mikrobiálních suspenzí (nejčastěji desítkové, násobné ředění) a jejich následný výsev na vhodná kultivační média. Právě při početných úkonech hrozí pochybení, nehledě na to, že především u tzv. klastrujících mikroorganismů (příkladem mohou být stafylokoky) může docházet během ředění k přenosu nedostatečně reprezentativního alikvotu mikrobiální suspenze (Sanders, 2012).

Třetí zvolený metodický přístup spočíval v určení metabolické aktivity životaschopných bakterií prostřednictvím netoxického metabolického indikátoru resazurinu (komerčně dostupný mj. jako Alamar Blue). Za zmínku stojí, že jsme při úvodní rešerši dostupných informací ohledně tohoto přístupu v rámci studií antimikrobiální aktivity PSs na něj nenarazili. Běžně je ovšem tento přístup volen pro hodnocení aktivit PSs na eukaryotické savčí buňky (Frame F. *et al*, 2016). Na výsledky z tohoto metodického přístupu je ovšem nutné nahlížet racionálně. Je třeba si uvědomit, že i plně životaschopné mikrobiální buňky nemusí vykazovat metabolickou aktivitu (stav dormance). V rámci našeho prvotně voleného metodického uspořádání bylo nutné v průběhu některé kroky tohoto přístupu dále optimalizovat. Mikroorganismy po expozici testovanou látkou a ozáření v PBS bylo nutné přenést do kultivačního média s živinami, jejichž přítomnost je schopna nabudit metabolickou aktivitu. Primárním cílem bylo detekovat metabolickou aktivitu mikroorganismů co nejdříve po expozici a po ozáření. Nicméně, také s ohledem na detekční limity sdružené s užitím tohoto indikátoru, bylo možné provést hodnocení běžně až po sedmi hodinách kultivace. V rámci tohoto metodického přístupu budou dále prováděny kroky optimalizace. Jedna z nesporných výhod, kterou výsledky z tohoto přístupu nabízí, je studium odezvy mikroorganismů v podobě metabolické aktivity především v případě expozice látkami v sub-inhibičních koncentracích. Pokud dochází po expozici sub-inhibičním koncentracím k velmi výraznému nabuzení metabolické aktivity mikroorganismů, je možné, že nemusí

docházet jen k výrazným reparačním procesům v mikrobiálních buňkách, ale také k navýšené expresi genů sdružených s mikrobiální patogenezí.

Na základě hodnocení dat prostřednictvím (z našeho úhlu pohledu stěžejní metodou) dynamického mapování růstu v přístroji Bioscreen C, bylo zjištěno, že kationické PSs zastoupené látkami P42 a ZIP300 skutečně vykazovaly vyšší antimikrobní aktivitu než aniontické látky P44 a HK18.

V případě látky P42 bylo dokonce v rámci testovaných rozmezí dosaženo MBC/MFC pro všechny tři testované mikrobiální kmeny. V případě aktivity vůči bakteriálnímu kmenu MRSA bylo dosaženo nejvyšší aktivity při koncentraci 0,01 μM a době ozáření 30 minut. Nutno však podotknout, že P42 vykazovala vůči MRSA kmenu i toxicitu bez přítomnosti aktivizačního záření, a to při minimální koncentraci 0,5 μM . V případě, že se prokáže, že jde v rámci uvedené koncentrace a případně vyšších koncentracích o aktivitu vymezenou jen vůči mikrobiálním buňkám, nikoliv však buňkám hostitele, nelze pohlížet na tuto vlastnost s despektem, ale naopak jako na možnou devízu. V případě studie aktivity P42 vůči PA, při ozáření 15 min, byla MBC = 20 μM a vlastní toxicita bez ozáření nebyla zaznamenána vůbec. V případě studia aktivity P42 vůči CA došlo shodně při ozáření 15 i 30 min ke stanovení MFC = 0,5 μM a toxicita bez ozáření odpovídala při koncentraci 0,5 μM přibližně 8 % inhibice ve srovnání s PK.

Co se týče druhého kationického PS s pracovním označením ZIP300, jeho nejvyšší aktivita vůči bakteriálnímu kmenu MRSA, byla zaznamenána při ozáření po dobu 30 minut při koncentraci 1 μM (MBC). Současně ale byla při této koncentraci prokázána v menší míře i toxicita bez ozáření (procento inhibice vůči PK cca 17,5 %).

V rámci základní pracovní hypotézy se počítalo s tím, že delší doba ozáření povede k navýšení aktivity, která se odrazí snížením hodnot MBC/MFC. Tento předpoklad se ale jednoznačně podařilo potvrdit pouze ve dvou případech. U látky ZIP300 a jeho aktivitě vůči kmenu MRSA, kde v případě 15 min ozařování byla MBC stanovena na 5 μM a při ozařování po dobu 30 min MBC odpovídala 1 μM . Druhým případem byla stanovená aktivita MB opět vůči kmenu MRSA. V tomto případě, po ozáření 15 min, se MBC stanovit nepodařilo, zatímco po 30 min ozáření byla MBC stanovena na 100 μM . Zdánlivě třetím potvrzením našeho předpokladu by mohl být účinek P42 na kmen MRSA. V případě ozařování po dobu 15 min byla MBC stanovena na 0,1 μM a v případě ozáření 30 minut byla MBC rovna 0,01 μM . V obou

případech se ale jedná o nejnižší z testovaných koncentrací při daném režimu, nelze tedy tento výsledek považovat za zvýšenou účinnost, a je nutné další studium této látky.

U ostatních studovaných látek a jiných mikrobiologických agens s prodloužením doby ozáření hodnota MBC/MFC neklesala. V některých případech dokonce s prodloužením doby ozáření na 30 minut došlo k navýšení metabolické aktivity mikroorganismu, jako např. u PA po expozici P44 nebo MB. Obdobně tomu bylo i v případě kmene MRSA a HK18.

10. ZÁVĚRY

- Byla zavedena metodika stanovení antimikrobiální aktivity PSs vůči různým mikroorganismům pomocí tří metodických přístupů. Pomocí těchto metod byla vyhodnocena aktivita čtyř kandidátních látek HK18, P44, ZIP300 a P42.
- Pomocí „recovery“ metody byly určeny MBC/MFC u látek, které vůči daným mikroorganismům prokázaly po ozáření v daném experimentálním uspořádání antimikrobiální aktivitu. Zatímco látka HK18 neprojevila aktivitu vůči žádnému studovanému mikroorganismu, látka P42 byla schopná cidního účinku u všech třech testovaných mikroorganismů, konkrétně MRSA: $MBC \leq 0,01 \mu M$, PA: $MBC = 20 \mu M$, CA: $MFC = 0,5 \mu M$. V případě látek P44 a ZIP300 jsme byli schopni určit hodnotu MBC pouze pro MRSA, kde u P44: $MBC = 10 \mu M$ a u ZIP300: $MBC = 1 \mu M$.
- K určení metabolické aktivity přeživších mikroorganismů byla zavedena metodika AB, kterou bude třeba dále optimalizovat.
- Získané výsledky byly confirmovány výsevovou metodou. Kvůli časové náročnosti a pracnosti, bude třeba také tento přístup dále optimalizovat.
- Toxicita bez ozáření byla do jisté míry prokázána pouze v souvislosti s MRSA a PSs P42, ZIP300 a MB. V případě MB byla vlastní toxicita bez ozáření prokázána ještě v souvislosti s CA.
- K navýšení aktivity PSs s delší dobou ozáření došlo v případě MRSA a PSs P42, ZIP300 a MB, dále pak v případě CA a PSs P44 a MB. V ostatních případech k navýšení aktivity PSs s delší dobou ozáření nedošlo nebo byla naopak ještě potlačena ve srovnání s kratší světelnou expozicí.

11. POUŽITÉ ZKRATKY

AB	<u>A</u> lamar <u>B</u> lue
ALA.....	5-aminolevulinic acid, 5-aminolevulová kyselina
aPDT	<u>A</u> ntimicrobial <u>P</u> hotodynamic <u>T</u> herapy, antimikrobní fotodynamická terapie
AzaPc	<u>A</u> zaphthalocyanine, azaftalocyaniny
CA	<u>C</u> andida <u>A</u> lbicans
CFU	<u>C</u> olony <u>F</u> orming <u>U</u> nits, kolonie tvořící jednotky
G –	Gramnegativní
G+	<u>G</u> rampozitivní
ISC.....	<u>I</u> nter- <u>S</u> ystem <u>C</u> rossing, mezisystémové křížení
OD.....	<u>O</u> ptická <u>D</u> enzita
MB	<u>M</u> ethylene <u>B</u> lue, methylenová modř
MBC	<u>M</u> inimum <u>B</u> actericidal <u>C</u> oncentration, minimální baktericidní koncentrace
MFC	<u>M</u> inimum <u>F</u> ungicidal <u>C</u> oncentration, minimální fungicidní koncentrace
MO.....	<u>M</u> ikro <u>o</u> rganismy
MRSA	<u>M</u> eticilin <u>R</u> ezistentní <u>S</u> taphylococcus <u>A</u> ureus
NK	<u>N</u> egativní růstová <u>K</u> ontrola
PA	<u>P</u> seudomonas <u>A</u> eruginosa
PBS.....	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline, fosfátový pufr
Pc.....	<u>P</u> htalocyanine, ftalocyaniny
PDT	<u>P</u> hotodynamic <u>T</u> herapy, fotodynamická terapie
PK.....	<u>P</u> ozitivní růstová <u>K</u> ontrola
PpIX.....	<u>P</u> rotoporphyrin <u>I</u> X
PS.....	<u>P</u> hotosensitiser, fotosenzitizér
PSs	<u>P</u> hotosensitisers, fotosenzitizéry
RFU	<u>R</u> elative <u>F</u> luorescence <u>U</u> nits, relativní fluorescenční jednotky
ROS	<u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies, reaktivní formy kyslíku
SUB-MBC	<u>S</u> ub-inhibitory <u>M</u> inimum <u>B</u> actericidal <u>C</u> oncentration, sub-inhibiční minimální baktericidní koncentrace
SUB-MFC.....	<u>S</u> ub-inhibitory <u>M</u> inimum <u>F</u> ungicidal <u>C</u> oncentration, sub-inhibiční minimální fungicidní koncentrace
WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization, Světová zdravotnická organizace

12. POUŽITÁ LITERATURA

1. ALVES, E., FAUSTINO, M., NEVES, M. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Future Medicinal Chemistry*. 2014, **6**(2), 141-164. ISSN 1756-8919.
2. ATHAMNA, A. In vitro post-antibiotic effect of fluoroquinolones, macrolides, -lactams, tetracyclines, vancomycin, clindamycin, linezolid, chloramphenicol, quinupristin/dalfopristin and rifampicin on *Bacillus anthracis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004, **53**(4), 609-615. ISSN 1460-2091.
3. AVELINE, B. M. Chapter 2 Primary processes in photosensitization mechanisms. *Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology*. Elsevier, 2001, s. 17-37. Comprehensive Series in Photosciences. ISBN 9780444508287.
4. BODEY, G. P., BOLIVAR, R., FAINSTEIN, V., *et al.* Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*. 1983, **5**(2), 279-313. ISSN 1058-4838.
5. BOLES, B. R., THOENDEL, M., SINGH, P. K. Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004, **101**(47), 16630-16635. ISSN 0027-8424.
6. BAPTISTA, M. S., CADET, J., DI MASCIO, P., *et al.* Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. *Photochemistry and Photobiology*. 2017, **93**(4), 912-919. ISSN 00318655.
7. BIAN, Y., JIANG, J. Recent Advances in Phthalocyanine-Based Functional Molecular Materials. MINGOS, D. Michael P., ed. *50 Years of Structure and Bonding – The Anniversary Volume*. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2015-11-10, 159-199. Structure and Bonding. ISBN 978-3-319-35136-0.
8. BRAUN, A., TCHERNIAC, J. Über die Produkte der Einwirkung von Acetanhydrid auf Phthalamid. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1907, **40**(2), 2709-2714. ISSN 03659496
9. BUSSCHER, H. J., VAN DER MEI, H. C., SUBBIAHDOSS, G., *et al.* Biomaterial-Associated Infection: Locating the Finish Line in the Race for the Surface. *Science Translational Medicine*. 2012, **4**(153), 153rv10-153rv10. ISSN 1946-6234.
10. BUYTAERT, E., DEWAELE, M., AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2007, **1776**(1), 86-107. ISSN 0304419X.

11. CANNON, R. D., LAMPING, E., HOLMES, A. R., *et al.* *Candida albicans* drug resistance – another way to cope with stress. *Microbiology*. 2007, **153**(10), 3211-3217. ISSN 1350-0872.
12. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION: *Fungal Diseases* [online]. 2020 [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/index.html>
13. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)* [online]. 2019 [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/mrsa/community/index.html>
14. CIEPLIK, F., DENG, D., CRIELAARD, W. Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't. *Critical Reviews in Microbiology*. 2018, **44**(5), 571-589. ISSN 1040-841X.
15. CRAFT, K. M., NGUYEN, J. M., BERG, L. J., *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *MedChemComm*. 2019, **10**(8), 1231-1241. ISSN 2040-2503.
16. CLAESSENS, Ch. G., HAHN, U., TORRES, T. Phthalocyanines: From outstanding electronic properties to emerging applications. *The Chemical Record*. 2008, **8**(2), 75-97. ISSN 15278999.
17. DA SILVA, R. N., CUNHA, Â., TOMÉ, A. C. Phthalocyanine–sulfonamide conjugates: Synthesis and photodynamic inactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018, **154**, 60-67. ISSN 02235234.
18. DE DIESBACH, H., VON DER WEID, E. Quelques sels complexes des o-dinitriles avec le cuivre et la pyridine. *Helvetica Chimica Acta*. 1927, **10**(1), 886-888. ISSN 0018-019X.
19. DEMIDOVA, T. N., HAMBLIN, M. R. Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005, **49**(6), 2329-2335. ISSN 0066-4804.
20. DENT, C. E., LINSTED, R. P., LOWE, A. R. Phthalocyanines. Part VI. The structure of the phthalocyanines. *Journal of the Chemical Society*. 1934, 1033-1039. ISSN 0368-1769.
21. DEROSA, M. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*. **233-234**, 351-371. ISSN 00108545.
22. FRAME, F. M., SAVOIE, H. BRYDEN, F., *et al.* Mechanisms of growth inhibition of primary prostate epithelial cells following gamma irradiation or photodynamic

- therapy include senescence, necrosis, and autophagy, but not apoptosis. *Cancer Medicine*. 2016, **5**(1), 61-73. ISSN 2045-7634.
23. GALSTYAN, A., Turning Photons into Drugs: Phthalocyanine-Based Photosensitizers as Efficient Photoantimicrobials. *Chemistry – A European Journal*. 2021, **27**(6), 1903-1920. ISSN 0947-6539.
24. GREEN, B. N., JOHNSON, C. D., EGAN, J. T., *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview for manual therapists. *Journal of Chiropractic Medicine*. 2012, **11**(1), 64-76. ISSN 15563707.
25. GULATI, M., NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*. 2016, **18**(5), 310-321. ISSN 12864579.
26. HUANG, L., DAI, T., HAMBLIN, M. R. Antimicrobial Photodynamic Inactivation and Photodynamic Therapy for Infections. GOMER, Charles J., ed. *Photodynamic Therapy*. Totowa, NJ: Humana Press, 2010, 2010-2-22, 155-173. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-60761-696-2.
27. CHAMBLESS, J. D., HUNT, S. M., STEWART, P. S. A Three-Dimensional Computer Model of Four Hypothetical Mechanisms Protecting Biofilms from Antimicrobials. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, **72**(3), 2005-2013. ISSN 0099-2240.
28. CHOY, M. H., STAPLETON, F., WILLCOX, M. D. P., *et al.* Comparison of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from contact lens- and non-contact lens-related keratitis. *Journal of Medical Microbiology*. 2008, **57**(12), 1539-1546. ISSN 0022-2615.
29. JOSEFSEN, L. B., BOYLE, R. W. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers. *Metal-Based Drugs*. 2008, **2008**, 1-23. ISSN 0793-0291.
30. KAKOULLIS, L., LOUPPIDES, S., PAPACHRISTODOULOU, E. Porphyrins and photosensitivity: pathophysiology for the clinician. *Postgraduate Medicine*. 2018, **130**(8), 673-686. ISSN 0032-5481.
31. KE, M.-R., EASTEL, J. M., NGAI, K. L. K. Oligolysine-Conjugated Zinc(II) Phthalocyanines as Efficient Photosensitizers for Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Chemistry - An Asian Journal*. 2014, **9**(7), 1868-1875. ISSN 18614728.
32. KOU, J., DOU, D., YANG, L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget*. 2017, **8**(46), 81591-81603. ISSN 1949-2553.

33. LAMBRECHTS, S. A. G., AALDERS, M. C. G., VERBRAAK, F. D., *et al.* Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2005, **79**(1), 51-57. ISSN 10111344.
34. LAURO, F. M., PRETTO, P., COVOLO, L., *et al.* Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene–polylysine conjugates. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2002, **1**(7), 468-470. ISSN 1474905X.
35. LAXMINARAYAN, R., MATSOSO, P., PANT, S., *et al.* Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *The Lancet*. 2016, **387**(10014), 168-175. ISSN 01406736.
36. LEWIS, K. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001, **45**(4), 999-1007. ISSN 1098-6596.
37. LI, M., F. WANG a Z. GU. Synthesis of homochiral zeolitic metal–organic frameworks with amino acid and tetrazolates for chiral recognition. *RSC Advances*. 2017, **7**(9), 4872-4875. ISSN 2046-2069.
38. LINSTEAD, R. P. The phthalocyanines: A new class of synthetic colours. *British Association for the Advancement of Science*. 1933, 465-466.
39. LOVELL, J. F., LO, P. Porphyrins and Phthalocyanines for Theranostics. *Theranostics*. 2012, **2**(9), 815-816. ISSN 1838-7640.
40. LUKYANETS, E. A., NEMYKIN, V. N. The key role of peripheral substituents in the chemistry of phthalocyanines and their analogs. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2012, **14**(01), 1-40. ISSN 1088-4246.
41. MAH, T.-F., PITTS, B., PELLOCK, B., *et al.* A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*. 2003, **426**(6964), 306-310. ISSN 0028-0836.
42. MAH, T.-F. C., O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*. 2001, **9**(1), 34-39. ISSN 0966842X.
43. MAILLARD, J.-Y. Bacterial target sites for biocide action. *Journal of Applied Microbiology*. 2002, **92**, 16S-27S. ISSN 13645072.
44. MAISCH, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2015, **14**(8), 1518-1526. ISSN 1474-905X.

45. MAISCH, T., BAIER, J., FRANZ, B., *et al.* The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007, **104**(17), 7223-7228. ISSN 0027-8424.
46. MALIK, Z., LADAN, H., NITZAN, Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: Problems and possible solutions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1992, **14**(3), 262-266. ISSN 10111344.
47. MARSH, P. D., MOTER, A., DEVINE, D. A. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontology 2000*. 2011, **55**(1), 16-35. ISSN 09066713.
48. McDONNELL, G., RUSSELL, A. D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999, **12**(1), 147-179. ISSN 1098-6618.
49. McKEOWN, N. B. *Phthalocyanine materials: synthesis, structure, and function*. 6. New York: Cambridge University Press, 1998. ISBN 978-0521496230.
50. MICROBIAL GROWTH AND CONTROL: *Growth of Bacterial Cultures, Growth Curve and Measurement of Microbial growth* [online]. nptel. ac. in [cit.2020-12-14]. Dostupné z: <https://nptel.ac.in/courses/102103015/module5/lec1/5.html>
51. MULCAHY, L. R., ISABELLA, V. M., LEWIS, K. Pseudomonas aeruginosa Biofilms in Disease. *Microbial Ecology*. 2014, **68**(1), 1-12. ISSN 0095-3628.
52. NUNES, S.M.T., SGUILLA, F.S., TEDESCO, A.C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004, **37**(2), 273-284. ISSN 0100-879X.
53. OLEINICK, N. L. Basic photosensitization. Case Western Reserve University School of Medicine Cleveland, Ohio, [online]. 2011, [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <http://photobiology.info/Oleinick.html>
54. ORMOND, A., FREEMAN, H. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials*. 2013, **6**(3), 817-840. ISSN 1996-1944.
55. OY GROWTH CURVES AB LTD: *Bioscreen C – User’s manual* [online]. Finsko, 2009 [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://lsfequipmentppms.pages.ist.ac.at/wp-content/uploads/sites/81/2018/05/BioscreenUserManual0-111.pdf>
56. PEDIGO, L. A., KESSEL, D. H., GIBBS, A. J., *et al.* Absence of bacterial resistance following repeat exposure to photodynamic therapy. 2009, 73803H.
57. PERLIN, D. S., RAUTEMAA-RICHARDSON, R., ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017, **17**(12), e383-e392. ISSN 14733099.

58. PEETERS, E., NELIS, H. J., COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*. 2008, **72**(2), 157-165. ISSN 01677012.
59. PHOTOIMMUNE DISCOVERIES, Categories of photosensitizers. *Photoimmune.org*, [online]. [cit. 2021-04-03]. Dostupné z: <http://photoimmune.org/introduction/>
60. PUSHPAN, S., VENKATRAMAN, S., ANAND, V., *et al.* Porphyrins in Photodynamic Therapy – A Search for Ideal Photosensitizers. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. 2002, **2**(2), 187-207 [cit. 2021-03-19]. ISSN 15680118.
61. RUHNKE, M. Epidemiology of *Candida albicans* Infections and Role of Non-*Candida albicans* Yeasts. *Current Drug Targets*. 2006, **7**(4), 495-504. ISSN 13894501.
62. SALAMEH, P., members AMR-STAG, Global action plan on antimicrobial resistance, *Library Cataloguing-in-Publication Data Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*. 2015. ISBN 9789241509763
63. SANDERS, E. R. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, (63). ISSN 1940-087X.
64. SANTOS, A. L. S., GALDINO, A. C. M., MELLO, T. P., *et al.* What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2018, **113**(9). ISSN 1678-8060.
65. STEWART, P. S., WILLIAM COSTERTON, J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*. 2001, **358**(9276), 135-138. ISSN 01406736.
66. TAVARES, A., CARVALHO, C. M. B., FAUSTINO, M. A., *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. *Marine Drugs*. 2010, **8**(1), 91-105. ISSN 1660-3397.
67. TIM, M. Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2015, **150**, 2-10. ISSN 10111344.
68. SEGALLA, A., BORSARELLI, C. D., BRASLAVSKY, S. E. Photophysical, photochemical and antibacterial photosensitizing properties of a novel octacationic Zn(ii)-phthalocyanine. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2002, **1**(9), 641-648. ISSN 1474905X.
69. VÁCHOVÁ, L. *Syntéza a studium fotofyzikálních a fotochemických vlastností ftalocyaninů a azaftalocyaninů*. Hradec Králové, 2017. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

70. VECCHIO, D., DAI, T., HUANG, L., *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy with RLP068 kills methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and improves wound healing in a mouse model of infected skin abrasion PDT with RLP068/CI in infected mouse skin abrasion. *Journal of Biophotonics*. 2013, **6**(9), 733-742. ISSN 1864063X.
71. WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1998, **42**(1), 13-28. ISSN 14602091.
72. WAINWRIGHT, M., MAISCH, T., NONELL, S., *et al.* Photoantimicrobials—are we afraid of the light? *The Lancet Infectious Diseases*. 2017, **17**(2), e49-e55. ISSN 14733099.
73. ZHANG, Y., LOVELL, J. F. Recent applications of phthalocyanines and naphthalocyanines for imaging and therapy. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2017, **9**(1). ISSN 19395116.
74. ZIMMERLI, W., TRAMPUZ, A., OCHSNER, P. E. Prosthetic-Joint Infections. *New England Journal of Medicine*. 2004, **351**(16), 1645-1654. ISSN 0028-4793.
75. ZIMČÍK, P., MILETÍN, M. Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění, I. Přehled fotosenzitizérů. *Česká a slovenská farmacie*. 2004, LIII, č. 6, s. 271-279.