

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra Farmaceutické technologie



Diplomová práce

**ZÁKLADNÍ IN VITRO TESTOVÁNÍ STŘÍBRNÝCH
NANOČÁSTIC**

Hradec Králové 2024

Gabriela Čermáková

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

V Hradci Králové

dne 15.5.2024

.....

Gabriela Čermáková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli PharmDr. Ondřeji Holasovi Ph.D. za odborné vedení mé práce. Dále také děkuji doc. PharmDr. Ivoně Pávkové Ph.D. a MVDr. Lence Lecové, Ph.D., které se významně podílely na experimentální části diplomové práce. Děkuji všem za cenné rady, trpělivost a ochotu.

Obsah

1	Úvod a cíl práce	9
2	Seznam zkratk	11
3	Teoretická část	12
3.1	Klasifikace nanočástic	12
3.1.1	Uhlíkové nanočástice	12
3.1.2	Polymerní nanočástice	13
3.1.3	Lipidové nanočástice	14
3.1.3.1	Lipozomy	14
3.1.3.2	Pevné lipidické nanočástice	15
3.1.4	Dendrimery	15
3.1.5	Kovové nanočástice	16
3.2	Využití kovových nanočástic ve zdravotnictví	17
3.2.1	Protinádorová léčba	17
3.2.1.1	Pasivní targeting	18
3.2.1.2	Aktivní targeting	18
3.2.1.3	Radioterapie	19
3.2.1.4	Hypertermie	20
3.2.2	Protimikrobní léčba	20
3.2.2.1	Antibakteriální účinek	21
3.2.2.2	Antivirotický účinek	25
3.2.2.3	Antimykotický účinek	27
3.2.3	Další využití	28
3.3	Protimikrobní využití kovových nanočástic u rezistentních intracelulárních bakterií	29

3.4	<i>F. tularensis</i>	29
3.4.1	Základní charakteristika.....	29
3.4.2	Tularémie	30
3.4.3	Formy tularémie.....	31
3.4.4	Epidemiologie.....	32
3.4.5	Léčba.....	33
4	Experimentální část.....	34
4.1	Materiál.....	34
4.2	Přístroje.....	37
4.3	Použité metody	37
4.3.1	Příprava AgNP	37
4.3.2	Hodnocení AgNP	39
4.3.3	Sledování růstu bakterie <i>F. tularensis</i> ovlivněné ATB nebo AgNP....	39
4.3.3.1	Příprava bakteriální kultury	39
4.3.3.2	Příprava koncentrační řady ATB.....	40
4.3.3.3	Příprava koncentrační řady AgNP	42
4.3.3.4	Provedení testu inhibice růstu s ATB.....	43
4.3.3.5	Provedení testu inhibice růstu s AgNP	44
4.3.4	Sledování stability AgNP v kultivačních médiích.....	46
4.3.5	Izolace a kultivace primárních myších kostně-dřeňových makrofágů	46
4.3.6	Proliferace kostně-dřeňových makrofágů ovlivněných AgNP	48
4.3.6.1	Sklizení diferenciovaných kostně-dřeňových makrofágů a nasazení na 96-jamkový panel	48
4.3.6.2	Ovlivnění buněk AgNP	49
4.3.6.3	Stanovení proliferace pomocí MTS testu	50

5	Výsledky	51
5.1	Sledování stability AgNP v kultivačních médiích	51
5.2	Sledování růstu bakterie <i>F. tularensis</i> ovlivněné ATB nebo AgNP.....	53
5.2.1	Test inhibice růstu s ATB	53
5.2.2	Test inhibice růstu s AgNP	58
5.3	Proliferace BMM ovlivněných AgNP	65
6	Diskuze	66
7	Závěr	69
8	Seznam obrázků.....	70
9	Seznam tabulek	74
10	Seznam literatury	76

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Ondřej Holas Ph.D.

Konzultant: doc. PharmDr. Ivona Pávková Ph.D.

Posluchač: Gabriela Čermáková

Název diplomové práce: Základní *in vitro* testování stříbrných nanočástic

Tato diplomová práce se zaměřuje na základní *in vitro* testování účinnosti stříbrných nanočástic (AgNP) velikosti 10 nm (AgNP10) a velikosti 30 nm (AgNP30) vůči infekčnímu agens *Francisella tularensis* (*F. tularensis*). Cílem bylo posoudit potenciál AgNP jako možné terapeutické strategie proti tularémii a zhodnotit účinnost spojenou s rozdílnou velikostí nanočástic. AgNP byly připraveny metodou chemické redukce.

Citlivost bakterie *F. tularensis* po ovlivnění AgNP10 nebo AgNP30 byla testována mikrodiluční metodou za účelem stanovení inhibiční koncentrace (IC). Při testování AgNP10 v koncentračním rozmezí 5-30 $\mu\text{g/ml}$ se podařilo na základě více pokusů stanovit IC_{100} , která odpovídá koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$. U AgNP30 se nepodařilo z časových důvodů a technologických problémů přesně stanovit IC_{100} . Při testování bylo nutné ověřit stabilitu AgNP v různých kultivačních médiích. Získané výsledky vedly k určení vhodného média pro testování citlivosti bakterie *F. tularensis*, kterým bylo BHI médium. Před samotným testováním AgNP byly kolonie bakterií v rámci jiných experimentů ovlivněny antibiotiky za účelem zavedení metody stanovení IC a ověření inhibičního efektu vybraných antibiotik na *F. tularensis*. Dalším úkolem práce bylo stanovení životnosti buněk primárně myších kostně-dřeňových makrofágů po ovlivnění AgNP10 a AgNP30 pomocí proliferačního MTS testu. AgNP10 i AgNP30 ředěné médiem v poměru 1:1 a 1:10 měly významný negativní vliv na buněčnou proliferaci, nejnižší toxicitu AgNP prokázaly při ředění 1:100. Buněčná proliferace buněk byla nepatrně více inhibována vlivem AgNP10 než AgNP30. Výsledky budou použity pro navazující studie v rámci projektu.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Supervisor: PharmDr. Ondřej Holas Ph.D.

Consultant: doc. PharmDr. Ivona Pávková Ph.D.

Student: Gabriela Čermáková

Title of Thesis: Basic *in vitro* testing of silver nanoparticles

This thesis focuses on basic *in vitro* testing of the efficacy of silver nanoparticles (AgNP) of 10 nm (AgNP10) and 30 nm (AgNP30) against the infectious agent *Francisella tularensis* (*F. tularensis*). The aim was to assess the potential of AgNP as a possible therapeutic strategy against tularaemia and to evaluate the efficacy associated with different nanoparticle sizes. AgNP were prepared by a chemical reduction method.

The sensitivity of bacterium *F. tularensis* influenced by AgNP10 or AgNP30 was tested by the microdilution method to determine the inhibitory concentration (IC). Testing AgNP10 in the concentration range of 5-30 µg/ml based on multiple experiments was able to determine IC₁₀₀, which corresponds to a concentration of 20 µg/ml. For AgNP30, the IC₁₀₀ could not be accurately determined due to time and technological problems. During testing, it was necessary to verify the stability of AgNP in different culture media. The results obtained led to the identification of a suitable medium for susceptibility testing of *F. tularensis*, which was the BHI medium. Before the testing of AgNP, bacterial colonies in other experiments were influenced by antibiotics as part of other experiments to introduce the method for determining IC and verify the inhibitory effect of selected antibiotics on *F. tularensis*. Another aim of this thesis was to determine the cell viability of primary mouse bone marrow-derived macrophages cells after AgNP10 and AgNP30 using the MTS proliferation assay. Both AgNP10 and AgNP30 diluted with the medium at 1:1 and 1:10 had a significant negative effect on cell proliferation and AgNP showed the lowest toxicity at 1:100 dilution. Cell proliferation was slightly more inhibited by AgNP10 than AgNP30. The results will be used for follow-up studies in the project.

1 Úvod a cíl práce

V posledních letech se staly nanočásticové systémy předmětem intenzivního výzkumu a zájmu z důvodu jejich širokému spektru potenciálních aplikací v mnoha oblastech, včetně elektroniky, medicíny, environmentální vědy a průmyslu.

V biomedicínském odvětví jsou nanočástice využívány při cílené distribuci a řízeném uvolňování léčiv, v terapii nádorových a infekčních onemocnění. Nanočástice mohou chránit léčiva před chemickým rozkladem nebo rozpadem vlivem vnějších faktorů, zlepšit rozpustnost a biodostupnost léčiv. Cílená distribuce minimalizuje výskyt nežádoucích účinků a toxicity v biologických systémech.

Rostoucí výskyt nemocí a rezistence mikroorganismů vůči ATB je globální problém, který komplikuje léčbu a zvyšuje riziko šíření nebezpečných infekcí. AgNP mají významný antimikrobní potenciál vůči široké škále patogenů včetně rezistentních intracelulárních bakterií, mezi které je řazena gram-negativní bakterie *F. tularensis*. Tento původce způsobuje infekční zoonotické onemocnění zvané tularémie. Rezervoárem nákazy jsou infikované druhy volně žijících živočichů, nejčastěji hlodavci, zajíci a králíci. Vysoká virulence *F. tularensis* je způsobena její schopností napadnout a proliferovat uvnitř hostitelských buněk, primárně makrofágů.

Cílem této diplomové práce bylo připravit metodou chemické redukce AgNP a následně ověřit jejich antimikrobiální aktivitu proti infekčnímu původci *F. tularensis*. Hlavní náplní práce bylo sledování růstu bakterií po ovlivnění AgNP10 nebo AgNP30 s důrazem na rozdíly účinnosti spojené velikostí nanočástic. Na základě IC vyplývající z růstové křivky byla posuzována citlivost nebo rezistence bakterií po expozici AgNP.

V rámci jiných pokusů byly bakterie *F. tularensis* ovlivněny vybranými ATB za účelem zavedení metodiky a porovnání inhibičního efektu AgNP vůči bakteriím. Výsledky experimentů budou také využity při budoucím testování synergismu s AgNP.

Dalším úkolem práce bylo otestovat životnost buněk primárně myších BMM po ovlivnění AgNP10 a AgNP30 pomocí proliferačního MTS testu.

Výsledky budou použity pro navazující studie v rámci projektu. Pokračuje se v testování možného synergického účinku AgNP s gentamicinem a bude sledován vliv AgNP na bakterie internalizované uvnitř hostitelských buněk pomocí modelu BMM.

2 Seznam zkratek

ATB	Antibiotikum
AgNP	Stříbrné nanočástice (Silver Nanoparticles)
AgNP10	Stříbrné nanočástice velikosti 10 nm
AgNP30	Stříbrné nanočástice velikosti 30 nm
BHI	Bujón z mozkosrdcové infuze (Brain Heart Infusion)
BMM	Kostně-dřeňové makrofágy (Bone Marrow-Derived Macrophages)
caMHB	Mueller Hinton bujón II doplněný kationty (Mueller Hinton Broth II, Cation-Adjusted)
ChM	Chamberlainovo médium (Chamberlain Medium)
CFU	Kolonie tvořící jednotky (Colony Forming Units)
dH ₂ O	Deionizovaná voda
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPR	Zvýšená permeabilita a retence (Enhanced Permeability and Retention)
<i>F. tularensis</i>	<i>Francisella tularensis</i>
FBS	Fetální bovinní sérum (Fetal Bovine Serum)
IC	Inhibiční koncentrace (Inhibitory Concentration)
OD _{600nm}	Optická hustota měřená při vlnové délce 600 nm (Optical Density)
PBS	Fosfátový pufovaný roztok (Phosphate Buffered Saline)

3 Teoretická část

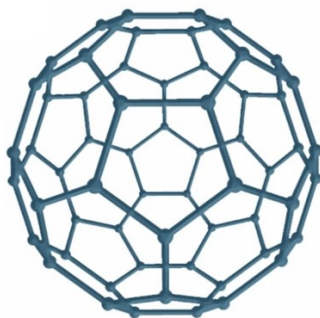
3.1 Klasifikace nanočástic

Nanočástice jsou materiály, které jsou definované ve všech třech rozměrech velikostí v řádu jednotek až stovek nanometrů. Redukce velikosti materiálu do tohoto rozměru dává těmto materiálům jedinečné vlastnosti, které jsou způsobeny tzv. kvantovými efekty. Mezi tyto vlastnosti patří chemická reaktivita, optické vlastnosti včetně fluorescence, vodivost pro elektrický proud a schopnost unikátním způsobem interagovat s biologickými cíli například buňkami. Této schopnosti se využívá pro pokročilé diagnostické metody a pro vývoj nových nanoléčiv včetně lékových forem pro cílené působení v některých specifických typech tkání jako tkáň nádorová nebo zánětlivá.

3.1.1 Uhlíkové nanočástice

Mezi základní podkategorie uhlíkových nanočástic jsou řazeny fullereny a uhlíkové nanotrubičky. Fullereny jsou sférické částice složené z 60 atomů uhlíku, které jsou umístěny ve formě kulovité duté uzavřené struktury (Obr. 1). Tyto materiály mají uspořádané pětiúhelníkové a šestiúhelníkové uhlíkové jednotky, přičemž každý uhlík je sp^2 hybridizovaný [1-4].

Fullereny mají unikátní vlastnosti, které zahrnují vysokou stabilitu, elektrickou vodivost a schopnost reagovat s jinými molekulami. Tyto vlastnosti vedou k jejich zkoumání v různých oblastech vědy a technologie, včetně biologie a medicíny. Mají významnou antioxidační aktivitu, tím mohou chránit buňky před poškozením způsobeným volnými radikály. Jsou netoxické a vykazují antibakteriální vlastnosti, podílí se na urychlování a dokončení procesu hojení ran [5].



Obrázek 1 - Schématické znázornění struktury fullerenů C_{60} (4)

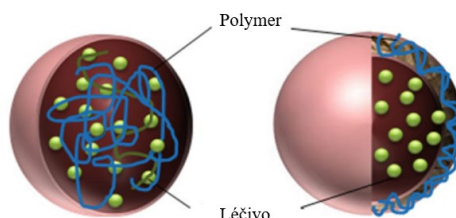
Uhlíkové nanotrubičky jsou protáhlé tubulární struktury o průměru 1-2 nm. Tyto struktury bývají velmi tenké a zajišťují extrémně vysokou pevnost, vedení tepla a elektrického proudu. Klasifikují se podle počtu stěn na jednostěnné, dvoustěnné a víceštěnné [1,3]. Tyto struktury uhlíkových nanočástic mají široké spektrum potenciálního využití v různých oblastech jako například nosiče léčiv při podávání léků či nosiče genů v genové terapii [5].

3.1.2 Polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice jsou malé koloidní částice s rozměry 1-1000 nm. Mohou být vyrobeny z různých typů přírodních i syntetických polymerů v závislosti na požadovaných vlastnostech a aplikacích. Pro aplikaci dodávání léků se běžně používají biologicky odbouratelné syntetické polymery jako například kyselina kyselina polymléčná, polyglykolová a poly(mléčná-ko-glykolová). Tyto polymery se vyznačují vysokou strukturální čistotou a stabilitou oproti přírodním materiálům (chitosan, želatina, dextran, heparin nebo hyaluronan) [6,7].

Na základě strukturálního uspořádání se dělí na nanokuličky a nanokapsle (Obr. 2). Nanokuličky jsou definovány jako matricové částice, protože představují strukturu kontinuální polymerní sítě, ve které může být léčivo zadrženo uvnitř nebo adsorbováno na vnějším povrchu jádra. U nanokapslí je přítomné duté polymerní jádro obklopenou tenkou vrstvou polymeru (tzv. rezervoárový systém). Jádro obsahuje lipofilní či hydrofilní tekutinu, ve které je léčivo rozpuštěno [6-8].

Využití polymerních nanočástic přináší řadu výhod, jako je možnost cíleného uvolňování léčiv, zlepšená biologická biodostupnost léčivých látek, prodloužená stabilita a snížená toxicita [1,6].



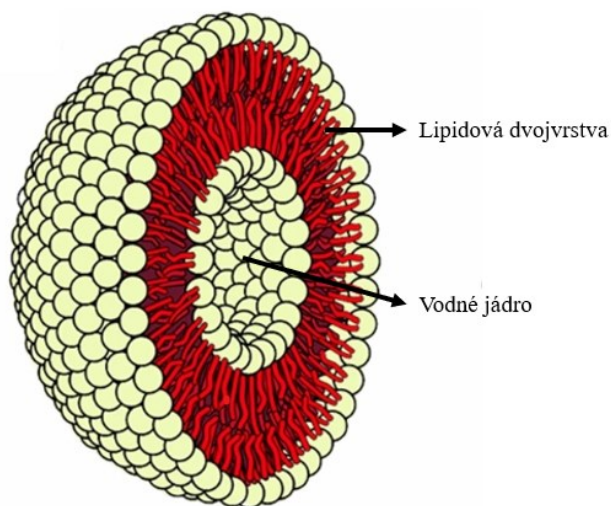
Obrázek 2 - Schematické znázornění struktury nanokuliček (vlevo) a nanokapslí (vpravo) (8)

3.1.3 Lipidové nanočástice

3.1.3.1 Lipozomy

Jedná se o sférické vezikuly, které mají vodné jádro uzavřené lipidovými dvojvrstvami (Obr. 3). Mají jednoduchou nebo vícevrstvou membránu tvořenou přírodními nebo syntetickými lipidy. Lipozomy jsou schopné nést hydrofilní látky ve vodné vnitřní části a hydrofobní látky v lipidových vrstvách, což z nich činí vhodné nosiče pro různé typy léčiv a genetických materiálů [7,9].

Lipozomy mají schopnost cíleně dodávat léčiva do cílových buněk nebo tkání, což může zvýšit účinnost léčby a zároveň minimalizovat nežádoucí vedlejší účinky. Velkou pozornost získaly jako nosiče léčiva v protinádorové léčbě. Při tomto využití prokázaly vyšší cílovou specifitu, ochranu aktivního léčiva před faktory prostředí a zabránění jeho předčasné degradaci. Mohou být dekorovány polymery (například polyethylenglykolem; PEG), aby vykazovaly prodloužený poločas v krevním oběhu. Jedná se o tzv. PEGylované lipozomy. Cílová specifita lze zvýšit konjugací lipozomů s protilátkami nebo jinými specifickými ligandy [7,9].



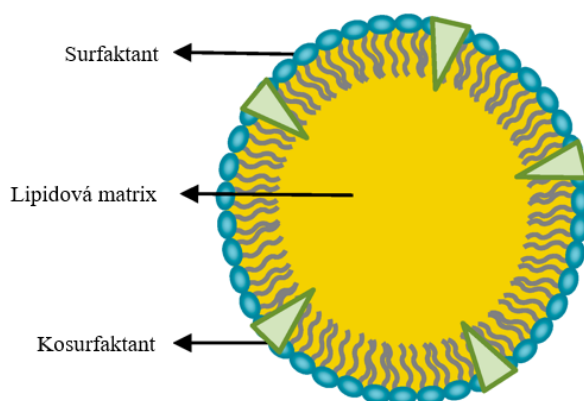
Obrázek 3 – Schématické znázornění struktury lipozomů (4)

3.1.3.2 Pevné lipidické nanočástice

Tyto koloidní částice dosahují velikosti 50-1000 nm a jsou tvořeny pevnými lipidy, případně surfaktanty a kosurfaktanty (Obr. 4). Nejčastěji používanými materiály pro vytvoření lipidového jádra jsou mono-, di- a triglyceridy, mastné kyseliny, vosky a steroidy. Tyto lipidy si zachovávají pevnou strukturu při pokojové i tělesné teplotě. Pro sterickou stabilizaci těchto nanočástic se používá řada povrchově aktivních látek (surfaktantů) včetně poloxamerů a polysorbátů. V některých případech mohou být pevné lipidické nanočástice vyrobeny i za přítomnosti kosurfaktantů, nejpoužívanějšími jsou žlučové soli (taurodeoxycholát) nebo alkoholy (butanol, ethanol) [10,11].

Účinná látka může být inkorporována v jádru částice, obalu nebo je dispergována v celé lipidové matrici. Vnější obal částice může být modifikován různými biomolekulami včetně proteinů, oligosacharidů, ligandů pro receptory nebo protilátky, které poskytují jejich specifickou aktivitu při podání do těla [11].

Při využití pevných lipidických nanočástic je výhodou jejich nízká toxicita, vyšší biologická dostupnost léčiv, proveditelnost výroby ve velkém měřítku a všestrannost začlenění hydrofilních či lipofilních léčiv [10,11].



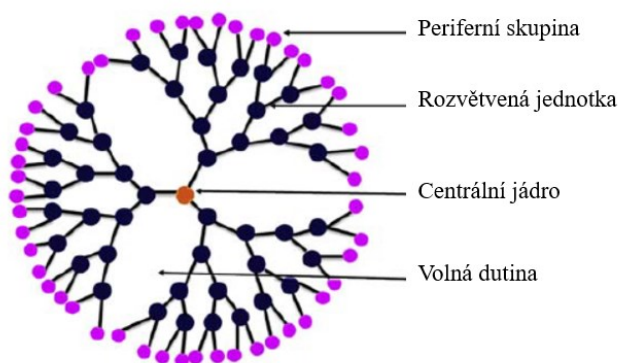
Obrázek 4 - Schématické znázornění struktury pevných lipidových nanočástic (10)

3.1.4 Dendrimery

Dendrimery jsou tvořeny rameny rozvětvených makromolekul vycházející z centrálního jádra (Obr. 5). Mají sférický tvar a dosahují průměrného rozměru 1,5-14,5 nm. Jsou vyráběny za použití přírodních nebo syntetických složek, které zahrnují

cukry, nukleotidy a aminokyseliny. Tato struktura je charakterizována pravidelným uspořádáním větvení, vysokou molekulovou hmotností a významným množstvím periferních skupin [7].

Hlavní potenciál využití mají ve specifickém dodání léčiva v organismu především v protinádorové léčbě. Léčivo buď nekovalentně zapouzdřeno ve volné dutině uvnitř dendrimeru nebo kovalentně konjugováno za vzniku makromolekulárních proléčiv. Léky dodávané dendrimery se vyznačují prodlouženým biologickým poločasem, vyšší stabilitou, sníženou imunogenicitou a antigenicitou. Dendrimery se využívají v oblastech biomedicíny, imunologie a v zobrazovacích metodách [12,13].



Obrázek 5 - Schématické znázornění struktury dendrimerů (14)

3.1.5 Kovové nanočástice

Kovové nanočástice si zachovávají jedinečné optické a elektrické vlastnosti. Některé kovové nanočástice dominují také tepelnými, magnetickými a biologickými vlastnosti. Uplatnění nacházejí nejen v lékařství a farmacii, ale i v zemědělství, elektronickém a potravinářském průmyslu a v mnoha dalších rozvíjejících se odvětvích [4].

Potenciální biomedicínské využití prokázaly převážně kovové nanočástice ušlechtilých kovů. Dosahují velikosti 1-100 nm a mohou být složeny z kobaltu, niklu, železa, zlata, stříbra a jejich oxidů [15,16]. Kovové nanočástice jsou vytvořeny z kovových prekurzorů, mohou existovat ve formě monometalických, bimetalických nebo polymetalických struktur. Bimetalické nanočástice jsou složeny z dvou různých kovových struktur, polymetalické obsahují tři a více různých kovových prvků [4].

Vzhledem k malé velikosti mohou nanočástice snadno interagovat s biomolekulami jak na povrchu, tak uvnitř buněk, čímž poskytují lepší signály a cílovou specifitu pro diagnostiku a terapii. Mohou být modifikovány funkčními chemickými skupinami, což umožňuje navázání terapeuticky účinných látek a biologických molekul peptidů, proteinů a DNA [15,16].

3.2 Využití kovových nanočástic ve zdravotnictví

Nanočásticové systémy nabízejí možnost doručit terapeutickou molekulu přímo na cílové místo účinku. Důsledkem je zvýšená koncentrace terapeutické látky v buňkách/tkáních, vyšší terapeutický účinek a snížená toxicita v těchto biologických systémech. Pro cílené doručení by se měla nanočástice s navázanou účinnou látkou udržet v systémovém řečišti požadovanou dobu, vyhnout se imunitnímu systému, zacílit na konkrétní místo působení a uvolnit terapeutickou látku. Doba uvolňování léku z nanočástic musí být regulována tak, aby nedošlo k předčasnému uvolnění před dosažením cílového místa. Aplikace nanočástic je umožněna obvykle parenterálním podáním, kdy je terapeutického účinku dosaženo po intravenózním podání. Také se využívá lokální aplikace například transdermálním, intranasálním podáním či lokální aplikací do očí [16,17].

Dominantní postavení ve biomedicinském odvětví zaujímají sférické nanočástice vyrobené ze zlata či stříbra. Tyto nanočástice jsou široce uplatňovány nejen v cílené distribuci léčiv, ale v terapii maligních onemocnění. Kromě toho se zmiňované nanočástice aktivně zkoumají za účelem detekce a zobrazování nádorů. Stříbrné nanočástice (AgNP) dominují především jako antimikrobiální látky a zajišťují široké spektrum antimikrobiální účinnosti proti bakteriím, virům a dalším eukaryotickým mikroorganismům. Tato vlastnost AgNP nabízí nové možnosti v léčbě infekcí, zejména v případech rezistence mikroorganismů vůči standardně používaným antibiotikům (ATB) [15,18].

3.2.1 Protinádorová léčba

Chemoterapeutikum bývá spojeno s nedostatečnou nádorovou specifitou a vysokou toxicitou nejen pro nádorové buňky, ale i další buňky organismu. Dalším lékovým problémem je chemoterapeutická rezistence v důsledku zvýšeného efluxu

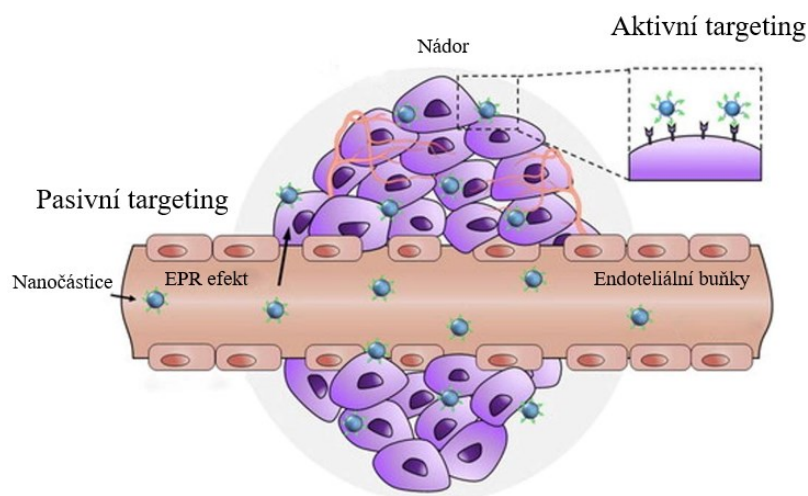
protinádorových léčiv z cytoplazmy nádorových buněk. Za účelem řešení těchto nedostatků bylo objeveno široké spektrum nanočástic včetně kovových vyrobených na bázi stříbra. K doručení protinádorového léčiva do cílové tkáně se využívá mechanismus pasivního a aktivního targetingu. Dále AgNP nabízí potenciál podílet se na selektivním hypertermickém ničení rakovinných buněk a zvýšit tak účinnost radioterapie [16,19].

3.2.1.1 Pasivní targeting

Při pasivním targetingu (Obr. 6) jsou využívány odlišné vlastnosti cévního systému nádoru ve srovnání s fyziologickými tkáněmi. Jedním z hlavních faktorů je zvýšená propustnost cév a následná retence v nádoru, která je známá pod zkratkou EPR (Enhanced Permeability and Retention). Struktura cévního epitelu je propustná na buněčné úrovni v oblasti nádoru, cévy umožňují kovovým nanočásticím proniknout do nádorového prostoru. V nádorových tkáních dále dochází k dysfunkci lymfatického systému, ke zvýšené retenci protinádorových léčiv a zabránění jejich rychlé eliminaci z nádoru. Nevýhoda může spočívat v rezistenci vůči jednomu či více léčivům následkem nekontrolované absorpce [20,21].

3.2.1.2 Aktivní targeting

Aktivní targeting modifikuje povrch kovových nanočástic ligandy, to vede k selektivnímu zacílení na tkáň (Obr. 6). Tyto ligandy (protilátky, kyselina listová, peptidy) se vážou na nadměrně exprimované receptory na povrchu rakovinných buněk. Kromě cílení na nádorové buňky mohou být aktivní ligandy namířeny na endotel cév nádoru. Mezi tyto nadměrně exprimované receptory můžeme zařadit například transferin, folát, epidermální růstový faktor, integriny a další [22,24].



Obrázek 6 - Schématické znázornění aktivního a pasivního targetingu (EPR efekt) (24)

Příkladem jsou zlaté nanočástice konjugované s kyselinou listovou na účelem zacílení na folátové receptory rakovinných buněk. Tyto nanočástice, s navázaným chemoterapeutikem metotrexátem, vykazovaly významně zvýšenou účinnost proti rakovinným buňkám ve srovnání s fyziologickými buňkami nebo samotným methotrexátem [22].

Bylo prokázáno, že AgNP modifikované fluorescenčním cyklickým peptidem, obsahujícím arginylglycylasparagovou kyselinu (RGD), jsou účinné pro detekci a cílení rakovinných buněk chronické myeloidní leukémie. Peptidová sekvence RGD se specificky váže na integriny, které jsou považovány za nadměrně exprimované receptory na povrchu rakovinných buněk. Tato interakce umožňuje AgNP selektivně identifikovat a zacílit na rakovinné buňky, což může poskytnout nový přístup k diagnostice a terapii tohoto typu leukémie [23].

3.2.1.3 Radioterapie

Radioterapie je léčebná metoda využívající ionizující záření k ničení nádorových buněk a redukci jejich růstu. Kovové nanočástice nabízí potenciál zvýšit účinnost radioterapie a snížit nežádoucí účinky léčby. Absorpci ionizujícího záření nanočástic se zvyšuje selektivní zacílení záření na nádorovou tkáň. Dále mohou AgNP působit jako radiosenzitizéry a zvyšovat citlivost nádorových buněk k účinkům ionizujícího

záření. Těmito mechanismy působení lze docílit efektivnějšího ničení nádorových buněk při zachování integrity okolních zdravých tkání [19,22].

Využití AgNP ve spojení s radioterapií je využíváno v léčbě rakoviny prsu typu TNBC (Triple-negative breast cancer). Tento nový přístup byl zkoumán prostřednictvím studie provedených *in vitro* a *in vivo*, které prokázaly pozitivní efekty v potlačení růstu rakovinných buněk TNBC a zlepšení účinnosti radiační terapie. Mechanismem účinku AgNP je indukce narušení DNA a oxidativního poškození v buňkách TNBC. Tato poškození vedou nejen k inhibici růstu rakovinných buněk, ale zvyšují jejich citlivost k účinkům ionizujícího záření. Bylo pozorováno, že tyto částice vykazují terapeutický účinek pouze na rakovinné buňky TNBC, zatímco u ostatních buněk fyziologické tkáně k podobnému účinku nedochází [25,26].

3.2.1.4 Hypertermie

Kovové nanočástice při působení elektromagnetického záření působí jako teplotní vektory a zahřívají rakovinné buňky nad jejich meze tolerance teploty. Rakovinné buňky mají omezený přísun krve, a tak se stávají citlivějšími na zvýšení teploty než zdravé buňky. Tento přístup umožňuje selektivní ničení rakovinných buněk a minimalizaci poškození okolních tkání [16,27,28].

3.2.2 Protimikrobní léčba

Narůstající rezistence patogenů má za důsledek nedostatečný terapeutický účinek v léčbě infekcí. S rostoucí rezistencí je zvyšována dávka a frekvence podávání léčiv a podávání kombinací protimikrobních látek namísto monoterapie, což může vést k častějším nežádoucím vedlejším účinkům a toxickým reakcím. Kromě toho mnoho patogenů přetrvává uvnitř buněk hostitelského organismu, což znemožňuje účinné působení řady protimikrobiálních léčiv. AgNP se jeví jako vhodné k překonání těchto omezení. Umožňují cílenější dodávání léčiv k infikovaným místům, zvyšují účinnost léčby a snižují potřebu vysokých dávek léčiv. Dále pomáhají překonat bariéry spojené s intracelulárním umístěním patogenů a umožňují léčivům proniknout do vnitřních prostor buněk [15,16].

V porovnání se syntézou ATB je příprava antimikrobiálních nanočástic nákladově efektivnější. Kromě toho mají nanočástice obvykle prodlouženou skladovatelnost a

odolnost vůči vnějším podmínkám, při které jsou konvenční ATB inaktivována. Rozvoj rezistence mikroorganismů vůči kovovým nanočásticím je méně častý, protože působí na mikroorganismy různými mechanismy účinku [15].

Antimikrobní aktivita byla prokázána u mnoha různých kovů: stříbra, zlata, zinku, mědi a titanu. Dominantní postavení v této problematice mají nanočástice na bázi stříbra, které působí na široké spektrum mikroorganismů bakterií, virů, plísní a parazitů [29,30].

Výzkum se dále zabývá synergickým působením AgNP a ATB. Tato synergie poskytuje možnost racionálnějších terapií, zajišťuje ovladatelnou a rovnoměrnou distribuci v cílové tkáni, prodloužené a řízené uvolňování, minimální vedlejší účinky a zlepšenou compliance pacienta [15,31].

3.2.2.1 Antibakteriální účinek

AgNP působí proti infekčním agens prostřednictvím několika klíčových mechanismů, které ovlivňují mikroorganismy na buněčné úrovni (Obr. 7).

Poškození vnějších obalových struktur

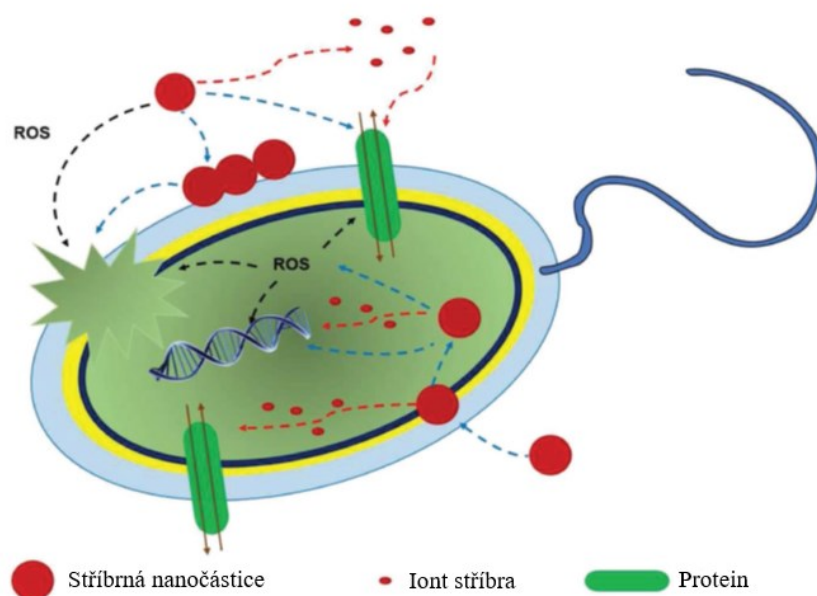
AgNP pronikají do buněčných stěn a membrán bakterií, poškozují jejich funkčnost a permeabilitu. V oblasti vnějších povrchových struktur se mohou kumulovat a způsobit morfologické změny například smršťováním cytoplazmy či odchlípením membrány. Tento proces vede ke ztrátě regulace buněčného vnitřního prostředí, což má za následek únik důležitých buněčných látek a zánik mikroorganismu [32,33].

Vznik reaktivních forem kyslíku (ROS)

AgNP vytvářejí reaktivní superoxidové radikály a peroxid vodíku, které jsou schopny reagovat s biologickými molekulami v buňkách patogenů. Tato reakce vede k jejich oxidačnímu poškození a zániku buněk [32,33].

Poškození DNA a vnitřních struktur

Po vstupu AgNP přes obalové struktury do nitra bakteriální buňky dochází k uvolnění stříbrných iontů, které následně ovlivňují DNA a proteiny mikroorganismu. Kromě toho jsou schopny interagovat s buněčnými strukturami a biomolekulami (lipidy, proteiny a DNA) uvnitř infekčního agens. Následkem toho dochází k inhibici replikace, transkripce, translace a syntézy proteinů [32,33].

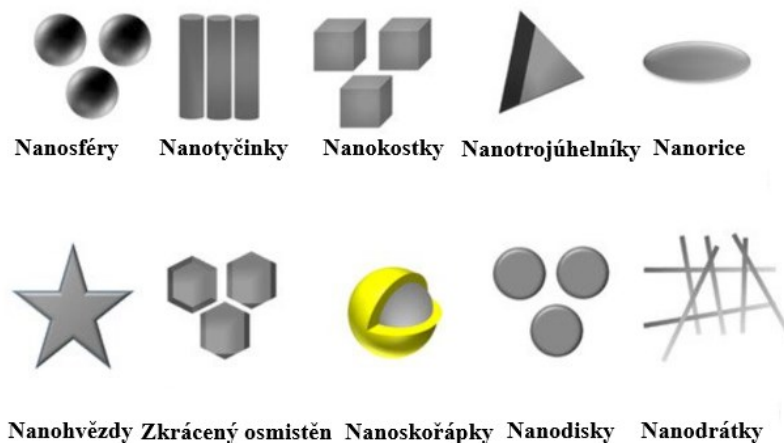


Obrázek 7 - Mechanismus antimikrobiálního působení AgNP (A - poškození buněčné membrány, ovlivnění membránových proteinů a DNA (modrá přesušovaná čára), B - uvolnění iontů stříbra, ovlivnění membrány, DNA a proteinů (červená přerušená čára), C - tvorba reaktivních oxidačních forem kyslíku (ROS), které mohou také ovlivnit DNA, buněčnou membránu a membránové proteiny (černá tečkovaná čára)) (32)

Vlastnosti kovových nanočástic se vztahují k materiálu, ze kterého jsou vyrobeny. Ze všech kovových nanočástic vykazovalo stříbro, měď a zlato nejúčinnější antimikrobiální aktivitu proti spektru grampozitivních nebo gramnegativních bakterií [34]. Antibakteriální účinky AgNP jsou ve srovnání s jinými kovovými nanočásticemi komplexnější a vykazují nižší toxicitu vůči hostitelským buňkám. Mědnaté nanočástice vykazují větší schopnost inhibovat růst bakterií než AgNP, ale vůči hostitelským buňkám jsou silně toxické. Působí na základě protržení bakteriální membrány a přenosu elektronů fotokatalytickým procesem. Zlaté nanočástice mají nižší schopnost inhibovat bakteriální růst ve srovnání s nanočásticemi na bázi stříbra, protože nevykazují zjevnou vnitřní antibakteriální aktivitu. Jejich mechanismus účinku zahrnuje pouze adhezi na povrchu bakterií prostřednictvím elektrostatických sil [36].

AgNP se vyskytují v široké škále různých tvarů, například ve formě sférických struktur, nanokostek, nanohvězd, nanodrátků a dalších (Obr. 8). Bylo zjištěno, že tvar nanočástic ovlivňuje bakteriální účinek AgNP. Částice trojúhelníkového tvaru mají

větší baktericidní účinek ve srovnání s částicemi sférického a tyčinkovitého tvaru [29,37-39].

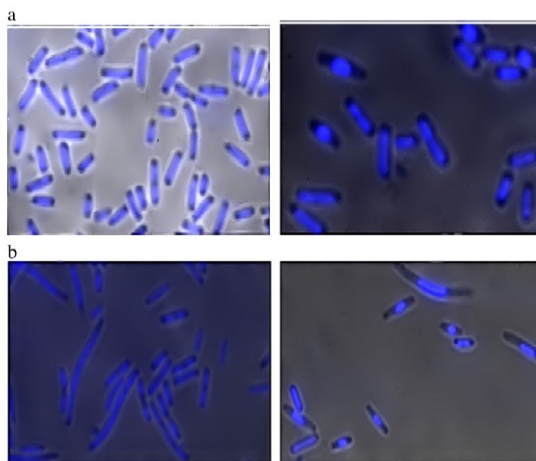


Obrázek 8 – Schématické znázornění tvarů AgNP (40)

Antibakteriální aktivita závisí na velikosti AgNP a jejich baktericidní účinek klesá s rostoucí velikostí [18,37]. Antibakteriální vlastnosti se vztahují k celkové ploše povrchu nanočástic. Menší částice s větším poměrem povrchu k objemu mají větší antibakteriální aktivitu a snadněji prostoupí přes bakteriální membránu do buněk [41]. AgNP dosahují velikosti 1-100 nm, avšak z důvodu zachování účinnosti by neměla být jejich velikost větší než 50 nm. Nanočástice na bázi stříbra velikosti 1-10 nm jsou považovány za nejvhodnější v léčbě bakteriálních infekcí [38].

Druh mikroorganismu má zásadní vliv na účinnost AgNP v boji proti bakteriím. Grampozitivní bakterie projevují vyšší odolnost vůči působení AgNP ve srovnání s gramnegativními bakteriemi. Peptidoglykanová vrstva gramnegativní bakterie dosahuje tloušťky přibližně 3-4 nm, zatímco grampozitivní bakterie mají peptidoglykanovou vrstvu kolem 30 nm. Silnější buněčná stěna a vyšší obsah peptidoglykanu grampozitivních bakterií brání efektivnímu působení antibakteriálních AgNP, což vede ke snížené účinnosti terapie u těchto druhů mikroorganismů [32,38,42,43].

Tento předpoklad byl potvrzen při testování AgNP, které byly cíleny na grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* a gramnegativní bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*). AgNP nevykazovaly žádnou aktivitu vůči bakteriím *Staphylococcus aureus*, zatímco prokázaly vysokou antibakteriální aktivitu vůči *E. coli* [32,44]. Důsledky interakce AgNP s buňkami bakterií byly detailně pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu. K zviditelnění DNA bylo použito modré fluorescenční barvivo DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) navázané na dvouřetězcovou DNA buněk bakterií. Ze snímku (Obr. 9) je viditelné, že po ovlivnění AgNP buňky *Staphylococcus aureus* nezměnily tyčinkovitý tvar, u vzorků bakterie *E. coli* došlo k prodloužení a fragmentaci buněk. Změna morfologické struktury byla pravděpodobně spojena s poškozením buněčné membrány a zvýšenou permeabilitou, čímž byl umožněn vstup nanočástice do periplazmy buněk. Následkem toho došlo ke ztrátě replikační schopnosti DNA a úhynu bakterie [43,45].



Obrázek 9 - Snímky fluorescenčního mikroskopu bakterie (a – *Staphylococcus aureus*, b - *E. coli*) označené modrým barvivem DAPI (43)

Adheze AgNP je významně podpořena elektrostatickou přitažlivostí mezi negativně nabitou buněčnou membránou mikroorganismů a kladným povrchovým nábojem AgNP. Tím dochází k silnější antibakteriální aktivitě u kladně nabitých AgNP ve srovnání s těmi negativně nabitými [32,46].

AgNP s odlišnými elektrickými povrchovými náboji (pozitivní, neutrální a negativní) byly testovány vůči grampozitivním *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* a *Streptococcus pyogenes* a gramnegativním bakteriím *E. coli*, *Proteus vulgaris*. Dle

získaných výsledků vykazovaly kladně nabitě AgNP nejvyšší baktericidní aktivitu vůči všem testovaným mikroorganismům. U záporně nabitých nanočástic se dostavil nejmenší efekt a neutrální nanočástice si zachovaly střední antibakteriální aktivitu [46].

3.2.2.2 Antivirotický účinek

Viry se vyznačují schopností vstoupit do hostitelských buněk, replikovat virový genetický materiál, produkovat nové virové částice a navodit apoptózu hostitelské buňky. Vzhledem k známému a účinnému antimikrobnímu působení AgNP představují slibnou alternativu i v antivirové léčbě [36,47]. Nedávno byl studován antivirotický účinek AgNP vůči virovému onemocnění COVID-19, chřipce A, HIV-1, hepatitidě B, herpesu simplex, opičím neštovicím a dalším [47].

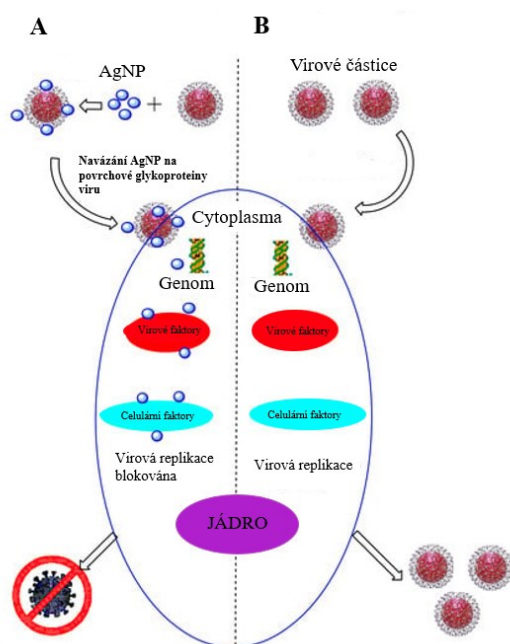
Existují dva způsoby interakce AgNP s patogenním virem (Obr. 10).

Vazba na povrch viru

V oblasti vnějších povrchových struktur se AgNP naváží na povrchové glykoproteiny vnějšího obalu viru, tím blokuje připojení viru k buněčným receptorům hostitelské buňky a vstup viru do buňky [36,47].

Poškození nukleových kyselin

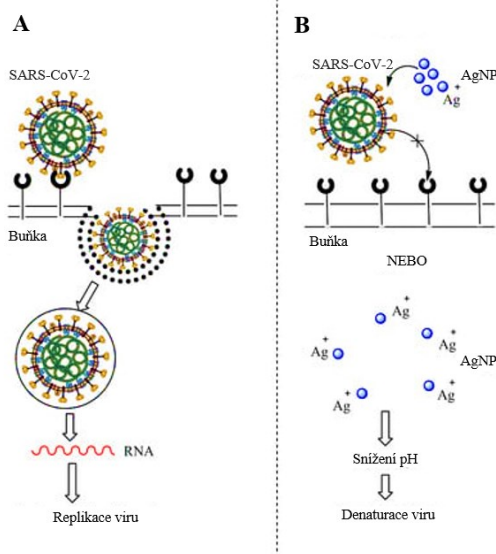
AgNP se vážou na DNA nebo RNA, tím dojde k inhibici virové replikace uvnitř hostitelských buněk [36,47].



Obrázek 10 – Mechanismus antivirotického působení AgNP (A – mechanismus působení AgNP proti virům, B – rozvoj virové infekce) (36)

Na základě studie prokázaly AgNP o velikosti 10 nm virucidní účinek na virus chřipky A. Pravděpodobně interagovaly s povrchovými proteiny viru chřipky (hemaglutinin a neuraminidáza) a tím narušily virový lipidový obal. Prostřednictvím specifické interakce s dvouvláknovou DNA došlo k inhibici buněčné replikace [48].

Existuje hypotéza mechanismu účinku AgNP k léčbě pacientů s COVID-19. Předpokládá se, že AgNP se budou vázat na vrcholový glykoprotein viru SARS-CoV-2, čímž inhibují vazbu viru na buňky. Účinek by mohl být posílen uvolňováním iontů stříbra, které změní pH respiračního epitelu na alkalické, což působí jako nepříznivé prostředí pro přežití virů (Obr. 11) [49].



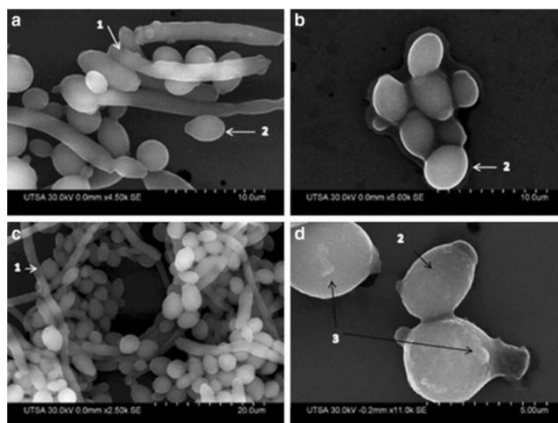
Obrázek 11 – Mechanismus antivirotického působení AgNP proti SARS-CoV-2 (A – rozvoj virového onemocnění COVID-19, B – mechanismus působení AgNP vůči viru SARS-CoV-2) (36)

3.2.2.3 Antimykotický účinek

Vývoj nových antifungálních látek se potýká s nedostatkem selektivních cílů a vysokou toxicitou některých současných antimykotik, zejména polyenů a v menší míře azolů. Léková rezistence vůči antimykotikům představuje rostoucí riziko. Studie zaměřené na AgNP poskytují slibnou alternativu v léčbě mykotických infekcí. AgNP působí jako silné a rychle účinné antimykotické činidlo s rozsáhlým spektrem účinků proti plísním. Jejich schopnost působit odlišnými mechanismy mohou přinést inovativní řešení mykotických infekcí a zároveň minimalizovat toxicitu spojenou s podáváním antimykotik [50].

Mezi významné oportunní patogeny patří kvasinka *Candida albicans* běžně přítomná v prostředí gastrointestinální mikroflóry u zdravých jedinců a hlavní původce kandidózy. Schopnost konverze *Candidy albicans* mezi kvasinkovou a hyfální morfologií hraje klíčovou roli v tvorbě biofilmu kvasinky. Struktura biofilmu představuje komplexní uspořádání buněk mikroorganismu propojených s povrchem a obklopených exopolysacharidovou maticí, která poskytuje ochranu a umožňuje komunikaci mezi buňkami. Přisedlé buňky v těchto biofilmech mají schopnost odolávat koncentracím léčiv dokonce 1000krát vyšším než pro planktonní formy kvasinek [50,51].

AgNP prokázaly účinnost proti *Candida albicans* narušením její buněčné stěny, únikem iontů póry vzniklých v buněčné stěně, vyvoláním strukturních změn uvnitř buněk a indukci apoptózy (Obr. 12) [50,51].



Obrázek 12 - SEM snímky biofilmu *Candida albicans* (1 - hyfy, 2 - kvasinky, 3 - poškozená buněčná stěna, a), c) biofilm bez AgNP, b), d) biofilm ovlivněný AgNP po 24 h) (50)

Byly prokázány fungistatické a fungicidní účinky AgNP vůči vybraným patogenním kvasinkám způsobujícím život ohrožující invazivní plísňové infekce. Fungistatická aktivita AgNP o středním průměru 25 nm byla testována po ovlivnění kvasinek *Candida albicans*, *Candida tropicalis* a *Candida parapsilosis*. Získané výsledky ukázaly, že AgNP inhibovaly všechny testované *Candida spp.* ve velmi nízkých koncentracích a inhibice byla závislá na testovaném druhu kvasinek. Nejnižší IC AgNP bylo dosaženo proti *Candida albicans*, střední antimykotickou aktivitu prokázala *Candida tropicalis* a *Candida parapsilosis* byla nejméně citlivá ve srovnání s těmito druhy kvasinek. Na základě srovnání IC AgNP s hodnotou IC vybraných klinicky dostupných antimykotik (azoly, amfotericin B a kaspofungin) lze účinky nanočástic považovat za srovnatelné nebo dokonce vyšší v případě stabilizovaných nanočástic [52].

3.2.3 Další využití

Kovové nanočástice jsou intenzivně zkoumány v mnoha odvětvích medicíny. AgNP jsou předmětem výzkumu a využití při léčbě popálenin, v antroplastice a prevenci usazování bakterií na protézách, katétrech, cévních štěpech, dentálních materiálech [45].

3.3 Protimikrobní využití kovových nanočástic u rezistentních intracelulárních bakterií

Rostoucí výskyt nemocí a rezistence vůči ATB směřuje ke hledání nových účinných látek a mechanismu působení proti infekčním agens. Dnes se v této oblasti rozvíjí využití baktericidního efektu AgNP proti široké škále gramnegativních a grampozitivních mikroorganismů včetně rezistentních intracelulárních bakterií [53].

Intracelulární mikroorganismus dokáže žít a množit se uvnitř hostitelských buněk. Intracelulární bakterie se většinou nacházejí uvnitř buněk mononukleárního fagocytárního systému (MPS), jejichž úlohou je odstraňovat cizí částice a mikroorganismy fagocytózou při zánětu nebo infekci. MPS je soubor všech tkáňových makrofágů a jejich prekurzorů. Tkáňové makrofágy jsou rozptýleny po celém těle, nacházejí se například v lymfatických uzlinách, slezině, játrech a v dalších tkáních [54,56].

Intracelulární bakterie vstupují do fagocytů, ve kterých dokážou přetvořit mechanismus fagocytózy ve svůj prospěch na základě dvou základních mechanismů. Po vstupu do hostitelské buňky se cytosolická bakterie uvolňuje z fagosomu do cytosolu, kde se množí. Příkladem cytosolických bakterií jsou *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Burkholderia pseudomallei* a *Francisella tularensis*. Vakuolární intracelulární bakterie po vstupu zůstává ukrytá a replikuje se ve speciální vakuole. Mezi významné zástupce vakuolárních bakterií patří *Salmonella typhimurium*, *Brucella abortus* a *Legionella pneumophila* [86].

3.4 *F. tularensis*

3.4.1 Základní charakteristika

Francisella tularensis (*F. tularensis*) je malá, aerobní gramnegativní, fakultativně intracelulární bakterie, která patří mezi významné patogeny lidí a zvířat. Dosahuje velikosti cca $0,2\text{--}0,7 \times 0,2 \mu\text{m}$ a má krátký, tyčinkovitý nebo kokovitý tvar. Je nepohyblivá a nevytváří spory. Pro její růst je vhodné dodržet optimální podmínky: aerobní prostředí, teplota $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pH 6,9 [55,58].

Způsobuje závažné infekční onemocnění zvané tularémie neboli zaječí nemoc. Toto onemocnění bylo poprvé definováno Georgem McCoyem a Chapinem v roce 1911 při vypuknutí moru u syslů. Jedním z nejvýznamnějších průkopnických vědců byl doktor Edward Francis, který tuto bakterii efektivně zkoumal. V roce 1919 ji označil jako *Bacterium tularensis* po názvu města Tulare County v Kalifornii, kde byla nemoc rozšířena mezi hlodavci. Na jeho památku však dostala bakterie své současné jméno *F. tularensis* [58,59].

V současné době jsou rozpoznány čtyři poddruhy *F. tularensis* spp. *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* a *novicida*. S nákazou lidí bývají spojovány především poddruhy *tularensis* (typ A) a *holarctica* (typ B). Poddruh *holarctica* prokazuje nižší virulenci, pomaleji se šíří a způsobuje mírnější formu onemocnění oproti poddruhu *tularensis*, který je vysoce nakažlivý pro lidi a zvířata [59,60].

Vysoká virulence *F. tularensis* je způsobena její schopností napadnout a proliferovat uvnitř různých typů hostitelských buněk. Hlavními primárními cílovými buňkami jsou fagocyty – makrofágy, dendritické buňky, neutrofilny, ale dokáže pronikat i do buněk nefagocytárních jako jsou epitelální buňky. Tato bakterie může infikovat i erytrocyty, ve kterých nejsou zachovány optimální podmínky pro množení a není v nich umožněna replikace *F. tularensis* uvnitř buněk. Infikované erytrocyty by ale mohly sloužit jako rezervoár patogenů, zejména v případě přenosu infekce krevní cestou prostřednictvím hmyzích vektorů (například klíšťata nebo mouchy) [62].

Bakterie *F. tularensis* vstupuje do makrofágů procesem fagocytózy, aby se usadila fagosomu zvaném FCP (*Francisella*-containing phagosome). Následně bakterie uniká do cytosolu, kde se masivně množí. V konečné fázi replikačního cyklu navozuje apoptózu hostitelských buněk, z nichž se uvolňuje a napadá další neinfikované makrofágy [54,67].

3.4.2 Tularémie

Tularémie je zoonotické onemocnění, jehož původcem je bakterie *F. tularensis*. Rezervoárem nákazy jsou infikované druhy volně žijících živočichů, nejčastěji hlodavci, zajáci a králíci. K přenosu na člověka dochází přímým kontaktem prostřednictvím členovců nebo hmyzích vektorů, infikovanou vodou, požitím

kontaminovaného materiálu nebo vdechováním aerosolizovaných mikroorganismů. Přenos *F. tularensis* z člověka na člověka dosud nebyl zaznamenán [59,61].

Inkubační doba tohoto onemocnění dosahuje 3-6 dnů, ve vzácných případech může být i delší. Nástup klinických příznaků je náhlý a podobá se nespecifickým příznakům chřipkového onemocnění. Z počátku se projevuje vysokými horečkami, zimnicí, bolestí hlavy, svalů, slabostí a kašlem. Onemocnění může být doprovázeno nauzeou, zvracením a průjmem. Bez léčby tyto příznaky přetrvávají několik týdnů, mohou způsobit závažné poškození až smrt pacienta [63,64].

Progradující symptomy až život ohrožující klinické projevy se vyskytují v závislosti na cestě přenosu infekce, infekční dávce a infekčním poddruhu. Dle místa vstupu a cesty přenosu rozlišujeme ulceroglandulární, glandulární, okuloglandulární, orofaryngeální, gastrointestinální, plicní a tyfoidní formu tularémie [63,65].

3.4.3 Formy tularémie

Ulceroglandulární tularémie

Ulceroglandulární forma tularémie je nejčastější formou onemocnění přenášející se přímým kontaktem s infikovaným zvířetem nebo kousnutím vektorem. V místě vstupu patogenu se vytvoří malý uzlík s lividním infiltrátem či ulcerující pustulou v době nebo krátce po nástupu nespecifických příznaků včetně horečky. Infekce se často šíří do regionálních lymfatických uzlin, dochází k otoku, bolesti a citlivosti lymfatické tkáně. Vyvíjející kožní útvar může přejít až do tvorby abscesu. V případě nevčasné léčby (do 2 týdnů) může absces prasknout a uvolnit hnisavý obsah do okolí tkáně. Mezi další symptomy této formy patří červené zbarvení kůže známé jako roseola či zvětšení sleziny (splenomegalie) [63,64].

Glandulární tularémie

Glandulární tularémie se oproti ulceroglandulární formě vyznačuje nepřítomností kožní léze v místě vstupu infekce. Ostatní klinické příznaky bývají u těchto obou forem identické [63,66].

Okuloglandulární tularémie

Při okuloglandulární tularémii dochází ke vstupu patogenu prostřednictvím oka. Tato forma se přenáší přímým kontaktem s infikovanými materiály, často prostřednictvím kontaminovaných rukou nebo aerosolem kontaminovaných částic. Je jednou z nejvzácnějších forem tularémie a vyznačuje se postižením očí a lymfatických uzlin. Mezi oční příznaky patří zarudnutí očí, bolest, slzení, svědění, výtok a zánět spojivek. Lymfatické uzliny v okolí očí a obličejové oblasti mohou být zduřelé a bolestivé [63,65,66].

Orofaryngeální a gastrointestinální tularémie

Orofaryngeální forma se prokazuje přítomností orálních puchýřů, stomatitidou a faryngitidou. Projevy gastrointestinální formy tularémie zahrnují symptomy jako například zvracení, průjem a v některých případech ulcerace střeva. Tato forma tularémie je přenášena konzumací nedostatečně tepelně upraveného masa a prostřednictvím kontaminované vody a jídla [66].

Plicní tularémie

Plicní forma se vyvíjí v důsledku vdechování infekčních aerosolů či prachů. Obvykle bývá sekundární komplikací jiných forem. Dominují zde respirační příznaky jako kašel s minimální produkcí sputa, bolest na hrudi, dušnost, dále může být přítomna horečka, únava a zimnice [30,67].

Tyfoidní tularémie

V případě tyfoidní tularémie nebyla zjištěna žádná vstupní brána nebo adenopatie. Pacienti vykazují horečku, únavu a někdy neurologické nebo zažívací problémy (zvracení, průjem a bolesti břicha). Pneumonická forma a tyfoidní forma tularémie jsou považovány za systémové formy, protože se vyvíjejí šířením bakterií krevním systémovým oběhem [66,67].

3.4.4 Epidemiologie

Tularémie se vyskytuje v různých částech světa, *F. tularensis subsp. tularensis* (typ A) se vyskytuje výhradně v Severní Americe především v oblasti USA. *F. tularensis subsp. holarctica* (typ B) je rozšířen po celé severní polokouli včetně Severní Ameriky.

Rozšíření poddruhu *mediasiatica* je omezeno na střední Asii. Poddruh *novicida* zřídka způsobuje onemocnění u lidí [63,68].

V Evropě je hlavní příčinou tularémie původce typu B [66]. V posledních letech došlo k nárůstu ohnisek především v Norsku, Švédsku a Finsku. V České republice bylo hlášeno okolo 50 případů ročně za minulých 10 let. Ohniska tularémie v ČR trvale vyskytují v Jihomoravském kraji, občasné ohniska nákazy jsou hlášena z krajů Jihočeského, Královéhradeckého a Pardubického [59,69,70].

3.4.5 Léčba

Léčba je založena na podávání fluorochinolonu nebo tetracyklinu, zatímco u těžkých forem tularémie jsou doporučovány aminoglykosidy (převážně gentamicin). Streptomycin byl prvním používaným ATB v léčbě tularémie, prokazuje vysokou účinnost v léčbě, ale z důvodu výrazného nežádoucího účinku ototoxicity se od jeho používání postupně opouští. Ciprofloxacin a doxycyklin jsou doporučené léky na mírnou nebo středně těžkou infekci u dospělých. Ciprofloxacin, doxycyklin a chloramfenikol v kombinaci s aminoglykosidem lze použít k léčbě závažných projevů meningitidy a endokarditidy. Gentamicin je preferovaným aminoglykosidem pro léčbu tularémie u dětí, při selhání gentamicinu je nahrazen streptomycinem. Azithromycin představuje možnost první volby léčby tularémie během těhotenství. Délka léčby tularémie se pohybuje od 10 do 14 dnů, lze prodloužit na 21 dní u meningitidy a endokarditidy [66,71,72].

4 Experimentální část

4.1 Materiál

Biologický materiál

Francisella tularensis subsp. *holarctica* FSC200

Klinický izolát (*Francisella* Strain Collection (FSC) of the Swedish Defense Research Agency, Umeå, Švédsko)

Laboratorní myši kmene BALB/c (MHC Haplotyp H2d) Velaz s.r.o.

Antibiotika

Ciprofloxacin Sigma-Aldrich, Merck

Gentamicin Sigma-Aldrich, Merck

Chloramfenicol Bioline

Tetracyclin Zymo research

Penicilin (10 000 U/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) Sigma-Aldrich, Merck

Chemický materiál

Ammonium hydroxide solution Sigma-Aldrich, Merck

Argenti nitras Fagron

BD BBL™ Brain Heart Infusion, BHI* Becton Dickinson

BD BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment* Becton Dickinson

BBL™ Hemoglobin Becton Dickinson

BBL™ Mueller Hinton Broth II, caMHB* Millipore

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Promega

Difco™ GC Medium Base	Becton Dickinson
Fetal Bovine Serum, FBS*	Sigma-Aldrich, Merck
Maltose monohydrate	Sigma-Aldrich, Merck
Phosphate Buffered Saline, PBS*	Sigma-Aldrich, Merck
Poly(acrylic acid) solution	Sigma-Aldrich, Merck
Sodium hydroxide	Lach-Ner s.r.o.
StableCell™ DMEM - high glucose medium*	Sigma-Aldrich, Merck
Trypanová modř	Lachema s.r.o.
Stříbrné nanočástice AgNP 10 nm	KFCh, PřF, UPOL
Stříbrné nanočástice AgNP 30 nm	KFCh, PřF, UPOL

*Pro přípravu kultivačních médií

Kultivační média

BHI médium

9,25 g BD BBL™ Brain Heart Infusion bylo rozpuštěno ve 250 ml deionizované vody (dH₂O), následovala úprava pH na 6,8. Poté byl roztok sterilizován pomocí membránového filtru (0,22 μm, Express™ Plus, Millipore).

caMHB médium

5,5 g BBL™ Mueller Hinton Broth II bylo rozpuštěno ve 250 ml dH₂O. Následovala sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Těsně před použitím byl k hotovému kultivačnímu médiu přidán IsoVitaleX™ Enrichment ve finální koncentraci 2 %.

BMM médium

složení: médium StableCell™ DMEM
10% FBS
10% médium z L929

Chamberlainovo médium

Chamberlainovo médium (ChM) bylo poskytnuto pracovníky Katedry molekulární patologie a biologie Vojenské lékařské fakulty, Univerzity obrany již připravené podle postupu publikovaného v Chamberlain RE, 1965 [73].

PBS

1 tableta Phosphat Buffered Saline byla rozpuštěna ve 200 ml dH₂O, následovala sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut.

Kultivační půda

McLeod agar

složení:

1. Roztok

Difco™ GC Medium Base 72 g
deionizovaná voda 1 l

Složky roztoku 1 byly smíseny a ponechány do druhého dne v chladu.

2. Roztok

BBL™ Hemoglobin 20 g
deionizovaná voda 1 l

Složky roztoku 2 byly smíseny a za stálého míchání ponechány při laboratorní teplotě k nabobtnání do druhého dne.

V den přípravy ploten byla provedena sterilizace obou roztoků v autoklávu (121 °C, 20 minut), následně byly spojeny a promíchány. Po vytemperování na teplotu 50 °C byl přidán IsoVitallex™ Enrichment o objemu 20 ml a směs byla vylita na Petriho misky.

4.2 Pístroje

Laminární box Bioair S@fefflow 1.2	BioAir Instruments
CO ₂ inkubátor 5215-2 53 SHEL LAB	Sheldon Manufacturing
CO ₂ inkubátor MCO-170AICUVD	PHC comporation
Denzitometr CO 8000	WPA comporation
Reader Synergy H1	BioTek
Třepačka IKA MS 3 digital	Sigma-Aldrich, Merck
Centrifuga Heraeus Megafure 16 R	Thermo Fisher Scientific
Mikroskop ECLIPSE Ts2	Nikon
Magnetická míchačka IKA-WERKE RT 5 power, 100-1000 ot/min	IKA-Werke
Zetasizer Nano ZS	Malvern Panalytical, Malvern
Analytické váhy Ohaus Discovery, max. 210 g, d= 0,1 mg	Ohaus comporation

4.3 Použité metody

4.3.1 Příprava AgNP

AgNP byly připraveny metodou chemické redukce v laboratořích Katedry farmaceutické technologie. Při této metodě došlo k redukci Ag⁺ iontů na Ag⁰ v roztoku pomocí redukčních činidel. Dusičnan stříbrný AgNO₃ zde působil jako zdroj stříbrných iontů. Při prvním pokusu byla použita maltóza jako redukční činidlo za účelem přípravy AgNP velikosti 30 nm (AgNP30). V druhém případě syntézy AgNP velikosti 10 nm (AgNP10) tuto funkci plnil tetraboritan sodný NaBH₄, navíc zde byla přidána kyselina polyakrylová (PAA) za účelem stabilizace vzorku.

Syntéza AgNP s maltózou

Syntéza AgNP30 zahrnovala přípravu 4 roztoků z čištěné vody a vypočítaného množství/objemu surovin dusičnanu stříbrného AgNO₃, amoniaku NH₃, hydroxidu

sodného NaOH, maltózy dle požadovaných koncentrací (Tab. 1). Jednotlivé suroviny byly naváženy (NH₃ byl napipetován), rozpuštěny v částečném množství čištěné vody a kvantitativně převedeny do 250ml odměrných baněk, v případě maltózy do 50 ml.

Kádinka s magnetickým míchadlem byla umístěna na magnetickou míchačku. Do kádinky bylo v následujícím pořadí postupně napipetováno 5 ml připraveného roztoku AgNO₃, 1,25 ml NH₃, 12,75 ml čištěné vody, 1 ml NaOH a 5 ml maltózy. Následně byl vzorek 10 minut ponechán za stálého míchání na magnetické míchačce.

Tabulka 1 – Přehled připravovaných roztoků s požadovanými koncentracemi při syntéze AgNP

Připravovaný roztok	Požadovaná koncentrace roztoku
AgNO ₃	5×10^{-3} M
NH ₃	0,1 M
NaOH	0,24 M
Maltóza	5×10^{-2} M

Syntéza AgNP s NaBH₄

Při syntéze AgNP10 byly připraveny 3 roztoky z čištěné vody a vypočítaného množství/objemu surovin dusičnanu stříbrného AgNO₃, amoniaku NH₃, tetraboritanu sodného NaBH₄ dle požadovaných koncentrací (Tab. 2). Jednotlivé suroviny byly naváženy (napipetovány), rozpuštěny v částečném množství čištěné vody a kvantitativně převedeny do 250ml odměrných baněk. S výjimkou NaBH₄ převedeného do 100ml odměrné baňky ponořené v ledové lázni, připraveného až těsně před smísením jednotlivých roztoků a čištěné vody. Při manipulaci s NaBH₄ bylo nutné důležité dodržovat bezpečnostní opatření. Práce byla provedena v laminárním boxu za současného použití ochranných pomůcek.

Tabulka 2 - Přehled připravovaných roztoků s požadovanými koncentracemi při syntéze AgNP

Připravovaný roztok	Požadovaná koncentrace roztoku
AgNO ₃	5×10^{-3} M
NH ₃	0,1 M
NaBH ₄	0,01 M

Do kádinky s magnetickým míchadlem umístěné na magnetické míchače byly postupně přidány složky v následujícím pořadí: 5 ml roztoku AgNO₃, 0,625 ml NH₃, 14,34 ml čištěné vody, 36 µl 0,05% PAA a 5 ml NaBH₄. Suspenze AgNP byla ponechána za stálého míchání 10 minut na magnetické míchače.

Takto připravené vzorky suspenzí AgNP byly ponechány při pokojové teplotě do druhého dne za účelem vyhodnocení.

4.3.2 Hodnocení AgNP

Připravené AgNP byly charakterizovány z hlediska jejich velikosti a polydisperzity pomocí dynamického rozptylu světla (Zetasizer Nano ZS). Vzorky byly naředěny ultračistou vodou na konečnou koncentraci částic 1,5 mg/ml a umístěny do standardní polystyrenové kyvety. Intenzita rozptýleného světla byla detekována při úhlu zpětného rozptylu 173°. Velikost a polydisperzita NS byly vypočteny na základě protokolu o distribuci intenzity velikosti. Viskozita média byla zvolena stejná jako u vody. Všechny vzorky byly měřeny třikrát a každé měření zahrnovalo nejméně 12 nezávislých běhů.

4.3.3 Sledování růstu bakterie *F. tularensis* ovlivněné ATB nebo AgNP

4.3.3.1 Příprava bakteriální kultury

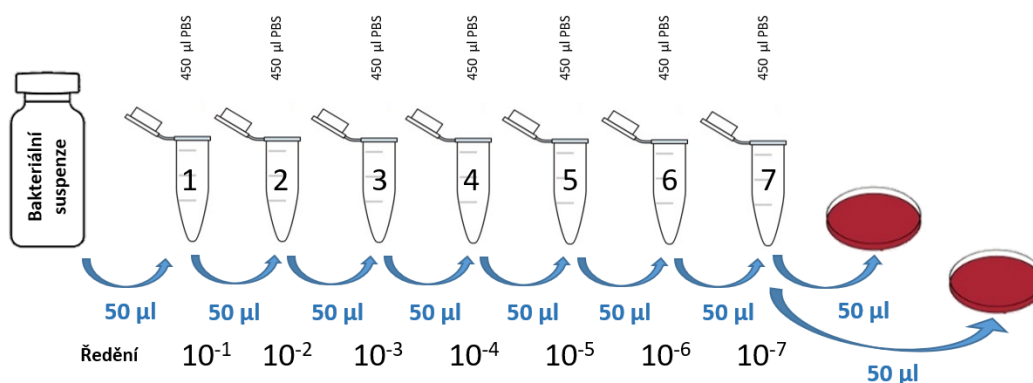
Tři dny před pokusem byly ze zamražené zásobní kultury *F. tularensis* připraveny tzv. zásobní půdy. Zásobní kultury byly ihned po rozmražení masivně vysety na McLeod agar (50 µl/plotna) a inkubovány 48-72 hodin při 37 °C. Následně, den před pokusem, byla část kultury ze zásobní plotny přenesena bakteriologickou kličkou na novou McLeod plotnu a inkubována po dobu 24 hodin při 37 °C (pasáž 1, P1).

V den pokusu byla z bakteriální kultury P1 a fosfátového pufovaného roztoku (PBS) připravena suspenze s optickou hustotou (OD_{600nm}) 1, což odpovídá přibližné koncentraci 3×10^9 bakterií/ml. Jeden ml této suspenze byl přemístěn do centrifugační zkumavky a centrifugován 7 minut při $3600 \times g$. Oddělený supernatant byl odebrán a peleta bakterií byla resuspendována v 1 ml BHI média.

Počet bakterií v připravené suspenzi byl ověřen nepřímou kultivační, tzv. plotnovou metodou výsevu s následným odečtem kolonií tvořících jednotek (CFU). Do 7 sterilních zkumavek bylo napipetováno 450 μl roztoku PBS a do zkumavky číslo 1 bylo přidáno 50 μl bakteriální suspenze $\text{OD}_{600\text{nm}}=1,0$ (ředění 10^{-1}). Po pečlivém promíchání bylo 50 μl ze zkumavky číslo 1 přeneseno do zkumavky číslo 2 (ředění 10^{-2}) a stejným způsobem se pokračovalo až do zkumavky číslo 7 (ředění 10^{-7}). Z poslední zkumavky s ředěním 10^{-7} byl duplicitně proveden výsev 50 μl po celém povrchu McLeod plotny (Obr. 13). Narostlé kolonie byly spočítány po 72 h kultivaci v termostatu při 37 °C.

Počet bakterií v 1 ml původní suspenze byl přepočítán dle následujícího vzorce:

$$\text{CFU/ml} = \text{průměrný počet kolonií} \times 20 \times \text{kladná hodnota vyšetého ředění}$$



Obrázek 13 - Schéma metody počítání CFU

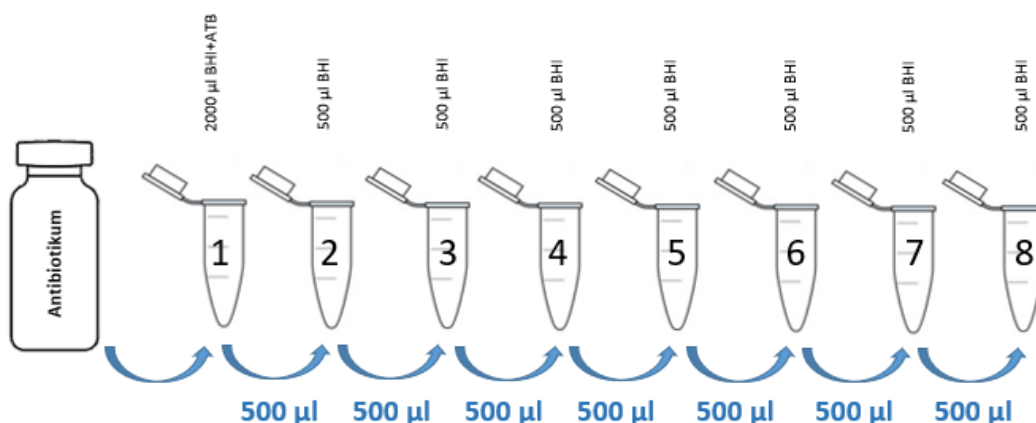
4.3.3.2 Příprava koncentrační řady ATB

Růst bakterie *F. tularensis* byl sledován v přítomnosti 4 antibiotik (gentamicin tetracyklin, chloramfenikol a ciprofloxacin) v daném koncentračním rozmezí (Tab. 3).

Tabulka 3 - Použitá ATB, koncentrace zásobních roztoků ATB, koncentrace pracovních roztoků ATB v BHI a koncentrační rozmezí při testování citlivosti bakterie *F. tularensis*

Antibiotikum	Koncentrace			
	zásobní roztok	pracovní roztok v BHI	koncentrační rozmezí	výsledné rozmezí v testu
Gentamicin	10 mg/ml	32 µg/ml	32-0,25 µg/ml	16-0,125 µg/ml
Tetracyklin	10 mg/ml	32 µg/ml	32-0,25 µg/ml	16-0,125 µg/ml
Chloramfenikol	50 mg/ml	32 µg/ml	32-0,25 µg/ml	16-0,125 µg/ml
Ciprofloxacin	2 mg/ml	2 µg/ml	2-0,016 µg/ml	1-0,008 µg/ml

Těsně před samotným testováním citlivosti bakterie byl pro každé zkoušené antibiotikum připraven čerstvý pracovní roztok a koncentrační řada. V první zkumavce ATB dosahovalo nejvyšší koncentrace (pracovní roztok v BHI). Do následující zkumavky v řadě byl poté přenášen objem 500 µl z předchozí zkumavky a smísen s 500 µl napipetovaného kultivačního média BHI (Obr. 14). Koncentrace ATB se tak ve zkumavce snížila vždy na polovinu. Obsah zkumavky byl vždy před každým ředěním řádně promíchán pomocí třepačky. Tímto způsobem bylo připraveno dvojkové ředění testovaných ATB o 8 různých koncentracích.



Obrázek 14 - Schéma přípravy ředící řady ATB

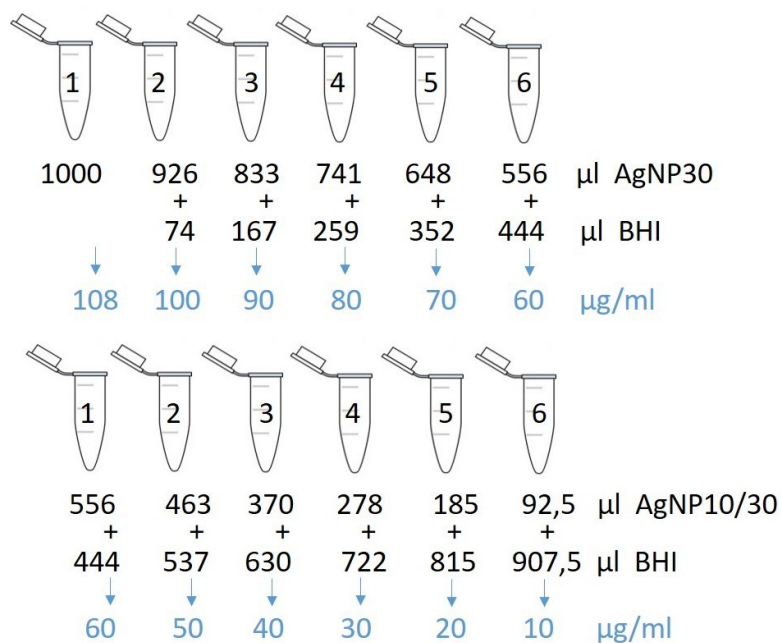
4.3.3.3 Příprava koncentrační řady AgNP

Inhibice růstu bakterie *F. tularensis* byla testována za přítomnosti AgNP10 a AgNP30 v daném koncentračním rozmezí (Tab. 4).

Tabulka 4 - Použité AgNP, koncentrace zásobních roztoků AgNP a koncentrační rozmezí při testování citlivosti bakterie *F. tularensis*

AgNP	Koncentrace		
	zásobní roztok	koncentrační rozmezí	výsledné rozmezí v testu
10 nm	108 mg/l	60-10 µg/ml	30-5 µg/ml
30 nm	108 mg/l	108-60 µg/ml	54-30 µg/ml
		60-10 µg/ml	30-5 µg/ml

Těsně před testováním růstu bakterie byly připraveny roztoky AgNP v kultivačním médiu BHI dle vybraného koncentračního rozmezí (Obr. 15). Nejvyšší koncentrace AgNP byla ve zkumavce číslo 1, postupně bylo množství AgNP ve zkumavkách snižováno. Jednotlivé zkumavky s různými objemy AgNP byly doplněny kultivačním médiem do 1 ml a potřepány pomocí třepačky k zajištění důkladné homogenizace složek.

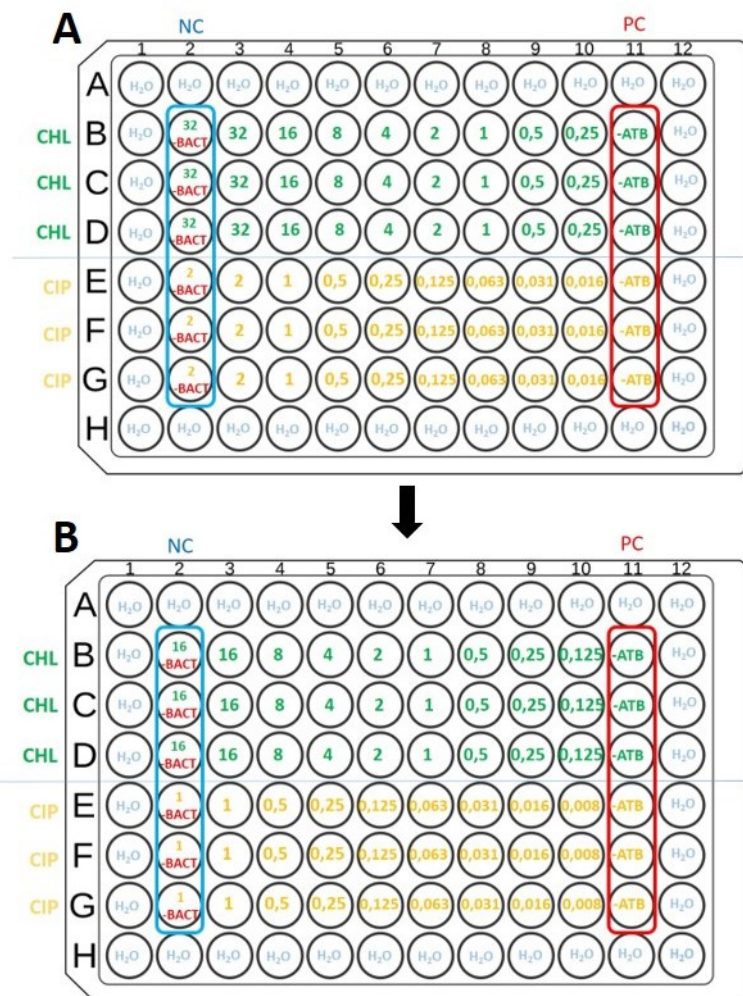


Obrázek 15 - Schéma přípravy AgNP v kultivačním médiu BHI dle požadované koncentrace

4.3.3.4 Provedení testu inhibice růstu s ATB

Testovaná ATB v kultivačním médiu BHI byla nanesena na 96-jamkovou mikrotitrační destičku typu TPP96 (Obr. 16). Jednotlivé složky (ATB, bakteriální suspenze) byly napipetovány vždy v objemu 100 µl. Výsledný objem v jamce tak odpovídal 200 µl. Krajní jamky byly vyplněny 300 µl sterilní dH₂O z důvodu zabránění odpařování.

Při každém testu byly použity dvě vybraná ATB. Do jamek řádků B-D (sloupce 2-10) bylo naneseno první testované ATB v připravené koncentrační řadě. Stejným způsobem byl nanesen objem druhého testovaného ATB do jamek řádků E-G (sloupce 2-10). Do jamek obsahujících ATB (sloupce 3-10) byla přidána bakteriální suspenze s výslednou koncentrací 2×10^7 bakterií/jamku. Do jamek sloupce 11 bylo napipetováno čisté kultivační médium BHI (100 µl) a suspenze bakterií. Jednalo o pozitivní kontrolu růstu mikroorganismů bez ATB. Negativní kontrola (sloupec 2) obsahovala nejvyšší koncentrace vybraných ATB bez bakteriální suspenze.

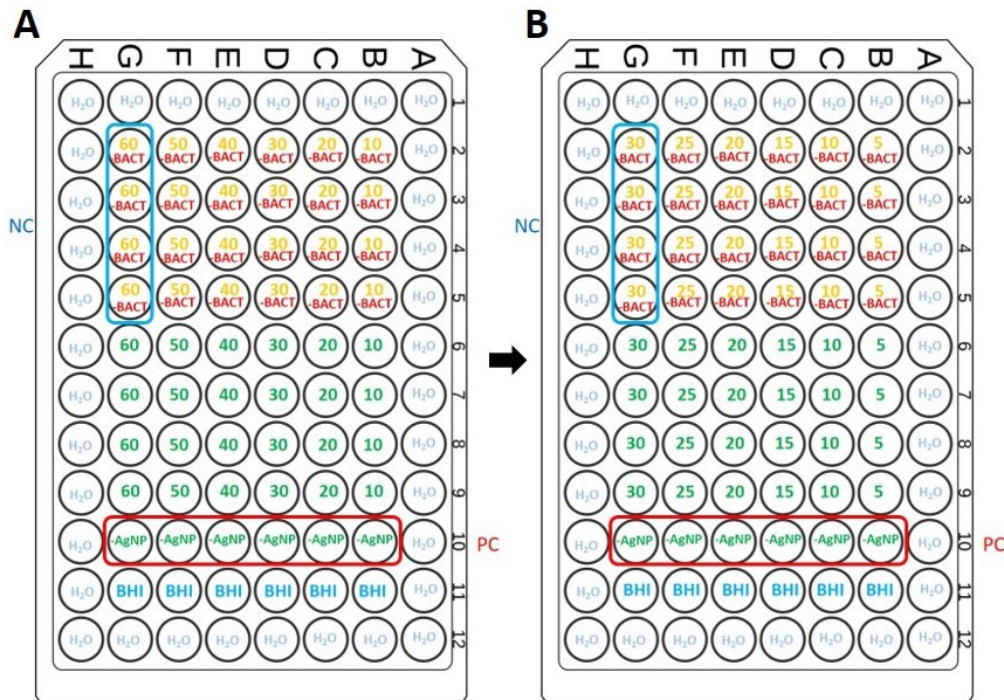


Obrázek 16 - Schéma příkladu nanesení ATB a bakteriální suspenze na 96-jamkový panel (A - koncentrace ATB před přidáním bakteriální suspenze/média; B - výsledná koncentrace ATB po přidání bakteriální suspenze/média; NC - negativní kontrola; PC - pozitivní kontrola, CHL – chloramfenikol, CIP - ciprofloxacin)

4.3.3.5 Provedení testu inhibice růstu s AgNP

Na 96-jamkovou destičku typu TPP96 byly naneseny jednotlivé složky v objemu 100 μ l podle schématu (Obr. 17). Výsledný objem v jamce odpovídal 200 μ l. Testované AgNP10 nebo AgNP30 byly napipetovány dle připravené koncentrační řady do jamek řádků B-G (sloupce 2-9). Bakteriální suspenze *F. tularensis* byla přidána jen do poloviny jamek řádků B-G (sloupce 6-10, Obr. 17 zelená barva) s výslednou koncentrací 2×10^7 bakterií/jamku. Do druhé poloviny bylo přidáno čisté BHI médium (sloupce 2-5, Obr. 17 žlutá barva). Jamky sloupce 10 byly vyplněny čistým médiem BHI a bakteriální suspenzí. Jednalo se o pozitivní kontrolu bez AgNP. Negativní

kontrola v řádku G (sloupec 2-5) obsahovala nejvyšší koncentrace vybraných AgNP bez bakteriální suspenze. Do jamek sloupce 11 bylo napipetováno 200 μ l čistého BHI, jako kontrola pro vyloučení možné kontaminace kultivačního média. Zbylé krajní jamky byly naplněny 300 μ l sterilní dH₂O z důvodu zabránění odpařování.



Obrázek 17 - Schéma nanesení vzorků AgNP a bakteriální suspenze (zelená) na 96-jamkový panel (A - koncentrace AgNP před přidáním bakteriální suspenze/média; B - výsledná koncentrace AgNP po přidání bakteriální suspenze/média; NC - negativní kontrola; PC - pozitivní kontrola)

Takto připravené uzavřené mikrotitrační destičky byly vloženy do přednastaveného a vytemperovaného spektrofotometru Synergy H1 (Tab. 5). Přístroj měřil absorbanci v jednotlivých jamkách při vlnové délce 620 nm po dobu 25 hodin. Z naměřených dat byly následně sestaveny růstové křivky v programu Microsoft Excel pro vyhodnocení výsledků.

Tabulka 5 - Parametry měření spektrofotometrem Synergy H1 (BioTek)

Parametr	Nastavení
Vlnová délka	620 nm
Teplota	37 °C
Počet cyklů	25
Délka cyklu	60 min
Třepání	orbitální, 180/min

4.3.4 Sledování stability AgNP v kultivačních médiích

AgNP10 nebo AgNP30 v zásobní koncentraci 108 µg/ml byly naneseny na 96-jamkovou mikrotitrační destičku a smíchány s vybranými kultivačními médii v poměru 1:1. K testování bylo použito chemicky definované Chamberlainovo médium (ChM), BHI médium, caMHB médium, caMHB médium s přídavkem IsoVitaleX™ Enrichment (ISV) ve finální koncentraci 2 % a BHI médium obohacené přídavkem aminokyseliny cysteinu (Cys) v koncentraci 0,1 %. Zbarvení takto namíchaných disperzí bylo zdokumentováno pomocí fotoaparátu ihned po nanesení. Po 1 hodině inkubace při pokojové teplotě bylo provedeno vizuální vyhodnocení a porovnáno se stavem ihned po nanesení na mikrotitrační destičku.

4.3.5 Izolace a kultivace primárních myších kostně-dřeňových makrofágů

Primární myší kostně-dřeňové makrofágy (BMM) byly připraveny diferenciací buněk, získaných výplachem kostní dřeně ze stehenních a holenních kostí, v médiu s obsahem růstového faktoru M-CSF. Jako zdroj růstového faktoru byl použit supernatant získaný kultivací buněk L929.

Myši kmene BALB/c byly uspány v diethyléteru a usmrceny stříhem do krčních tepen. Následovala dezinfekce břicha a zadních nohou 70% ethanolem. Řez byl veden od břišní dutiny směrem k zadním končetinám zvířete. V oblasti pánve byly kosti zadních končetin odděleny od těla a uchovány v médiu DMEM.

Další kroky byly prováděny ve sterilním prostředí laminárního boxu. Vypreparované zadní končetiny byly vydezinfikovány ponořením do 70% ethanolu na cca 1 minutu a poté opláchnuty DMEM médiem. Kosti byly očištěny od svalové a pojivové tkáně sterilním netkaným textilem. Stehenní a holenní kost byla oddělena v kolenním kloubu. Konce kostí byly odštíženy těsně pod kloubní hlavicí a pomocí jehly propláchnuty přibližně 2 ml média z obou stran do 50ml zkumavky. Zbytky tělní tkáně ve výplachu se nechaly usadit na dno zkumavky a supernatant byl přenesen do nové 50ml zkumavky a zcentrifugován po dobu 7 minut při 400 x g, při pokojové teplotě.

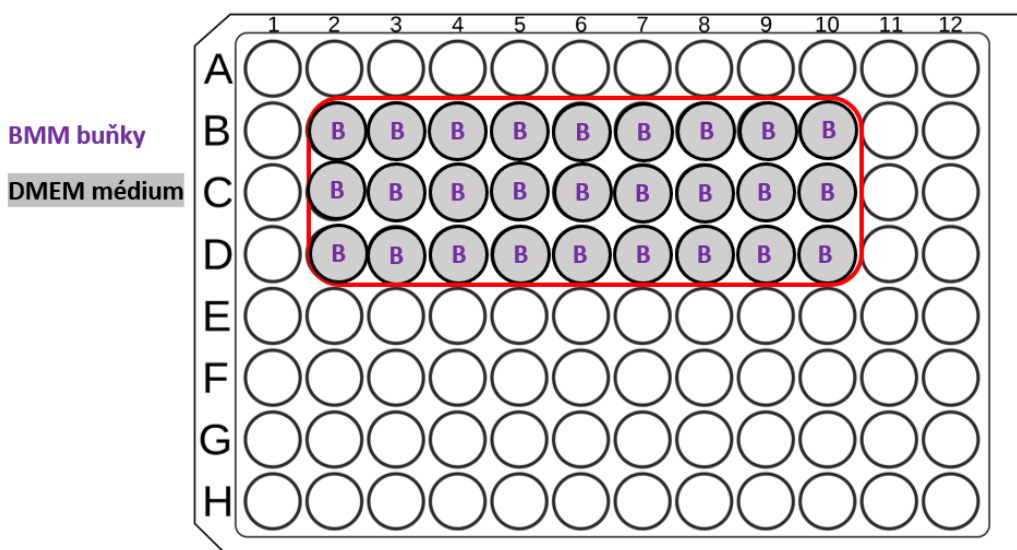
Supernatant byl opatrně odstraněn a kostně-dřeňové buňky na dně zkumavky byly resuspendovány v 10 ml roztoku BMM média s ATB (penicilin 10000 U/ml a streptomycin 50 µg/ml). Koncentrace buněk v 1 ml suspenze byla stanovena v Bürkerově komůrce. Naředěná suspenze o objemu 10 µl byla smíchána s 10 µl trypanové modři, nanesena do Bürkerovy komůrky a počet buněk byl spočítán pomocí optického mikroskopu (zvětšení 200x). Buněčná suspenze byla následně rozdělena do Petriho misek o průměru 10 cm tak, aby v každé misce bylo přibližně $5-6 \times 10^6$ buněk. Do každé misky bylo doplněno BMM médium s ATB do objemu 15 ml. Buňky se ponechaly diferenciovat v BMM v inkubátoru při teplotě 37 °C v přítomnosti 5% CO₂. Z 1 kusu myši lze tímto způsobem získat přibližně $1,5 \times 10^7$ buněk.

Po 3 dnech byla provedena výměna média za nové BMM médium bez ATB. Po 7 dnech diferenciované BMM byly využity k testování proliferace BMM ovlivněných AgNP.

4.3.6 Proliferace kostně-dřeňových makrofágů ovlivněných AgNP

4.3.6.1 Sklizení diferenciováných kostně-dřeňových makrofágů a nasazení na 96-jamkový panel

Diferenciované BMM kultivované na Petriho miskách byly zkontrolovány pod optickým mikroskopem. Pomocí pipety bylo odebráno médium a buňky adherované na dně byly opláchnuty 10 ml PBS. Následně byl k promytým buňkám přidán ledově vychlazený PBS o objemu 4-5 ml do každé Petriho misky. Mikrotitrační destička byla inkubována při teplotě 4 °C po dobu 5 minut. Opětovným nasáváním a vytlačováním tekutiny sérologickou pipetou byly buňky odloučeny ode dna Petriho misky, vzniklá suspenze byla přenesena do 50ml zkumavky. Obsah zkumavky byl zcentrifugován při 400 x g po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn a buňky usazené na dně zkumavky byly resuspendovány v 10 ml DMEM s 10% fetálním bovinním séru (FBS). Počítáním v Bürkerově komůrce bylo stanoveno množství buněk v 1 ml média a koncentrace buněk byla upravena na 5×10^4 buněk / 100 μ l. Buňky byly nanесeny na mikrotitrační destičku TPP96 podle schématu (Obr. 18) v množství 100 μ l buněčné suspenze do jedné jamky a ponechány k adhezi do druhého dne v inkubátoru při teplotě 37 °C v přítomnosti 5% CO₂.



Obrázek 18 - Schéma nanесení buněk BMM na 96-jamkový panel (B - buňky BMM, šedé pozadí jamek - DMEM médium)

4.3.6.2 Ovlivnění buněk AgNP

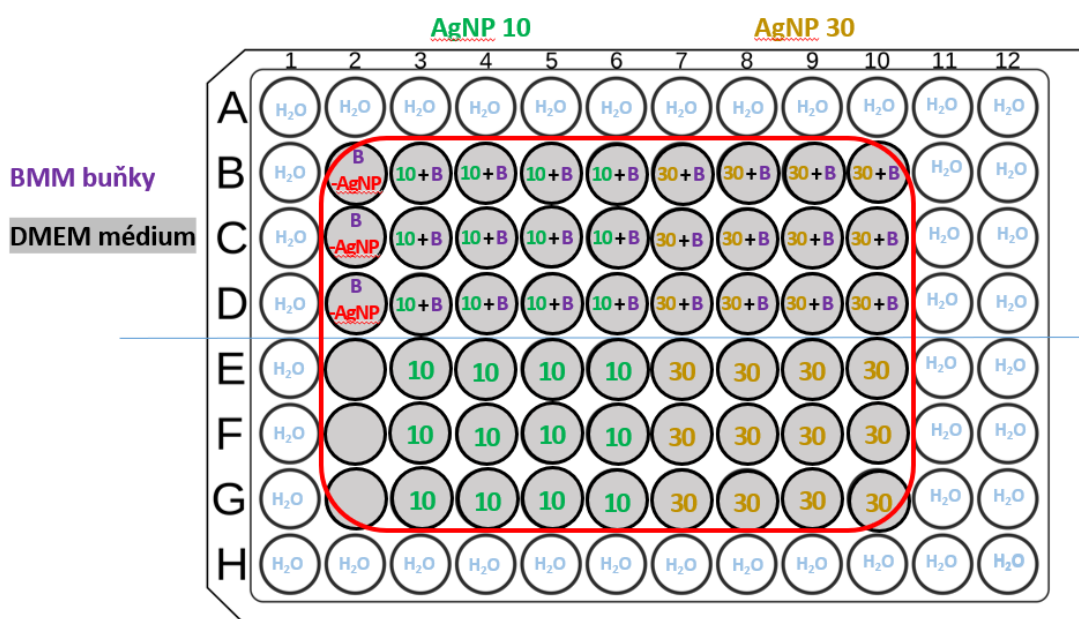
Jednotlivé koncentrace testovaných AgNP byly připraveny ve sterilních mikrozkušavkách naředěním potřebným množstvím DMEM média (Tab. 6) a důkladně promíchány.

Tabulka 6 - Množství AgNP 10/30 nm a DMEM média dle testovaného poměru, výsledná koncentrace vzorku

Poměr AgNP:DMEM	AgNP 10/30 nm	DMEM	Výsledná koncentrace
1:1	500 µl	500 µl	50 µg/ml
1:10	100 µl	900 µl	10 µg/ml
1:12,5	80 µl	920 µl	8 µg/ml
1:20	50 µl	950 µl	5 µg/ml
1:25	40 µl	960 µl	4 µg/ml
1:50	20 µl	980 µl	2 µg/ml
1:100	10 µl	990 µl	1 µg/ml

Z jamek mikrotitrační destičky s naadherovanými buňkami bylo kompletně odstraněno médium. Do každé jamky pak bylo napipetováno 100 µl příslušného vzorku AgNP dle schématu (Obr. 19). AgNP10 nebo AgNP30, naředěné DMEM médiem dle testovaného poměru, byly naneseny do jamek řádků B-D (sloupce 3-10). K buňkám v jamkách ve sloupci 2 bylo napipetováno pouze DMEM médium (bez AgNP) sloužící jako kontrola.

Do jamek řádků E-G (bez buněk) bylo naneseno DMEM médium (sloupec 2) a AgNP o dané koncentraci (sloupce 3-10) pro odečtení pozadí a kontrolu agregace. Okolní prázdné jamky byly vyplněny 100 µl sterilní dH₂O z důvodu zabránění odpařování. Buňky s AgNP byly inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C za aerobních podmínek 5% CO₂.



Obrázek 19 - Schéma nanesení buněk BMM na 96-jamkový panel (B - buňky BMM, šedé pozadí jamek - DMEM médium)

4.3.6.3 Stanovení proliferace pomocí MTS testu

MTS test se řadí mezi kolorimetrickou metodu pro stanovení počtu životaschopných buněk v testech proliferace, cytotoxicity nebo chemosenzitivity [74]. Dané testování bylo provedeno pomocí komerčního kitu CellTiter 96® AQueous One Solution dle návodu výrobce. Tento kit obsahuje tetrazoliovou sloučeninu 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium, která je redukována enzymem dehydrogenázou na tmavě modře zbarvený formazan. K této reakci dochází pouze v živých metabolicky aktivních buňkách [75].

Test byl proveden podle návodu dodaného výrobcem kitu. Do každé jamky 96-jamkového panelu bylo napipetováno 20 µl roztoku CellTiter 96® AQueous One Solution a po 4 hodinové inkubaci při 37°C, 5% CO₂ byla proměřena absorbance při vlnové délce 490 nm pomocí spektrofotometru Synergy H1.

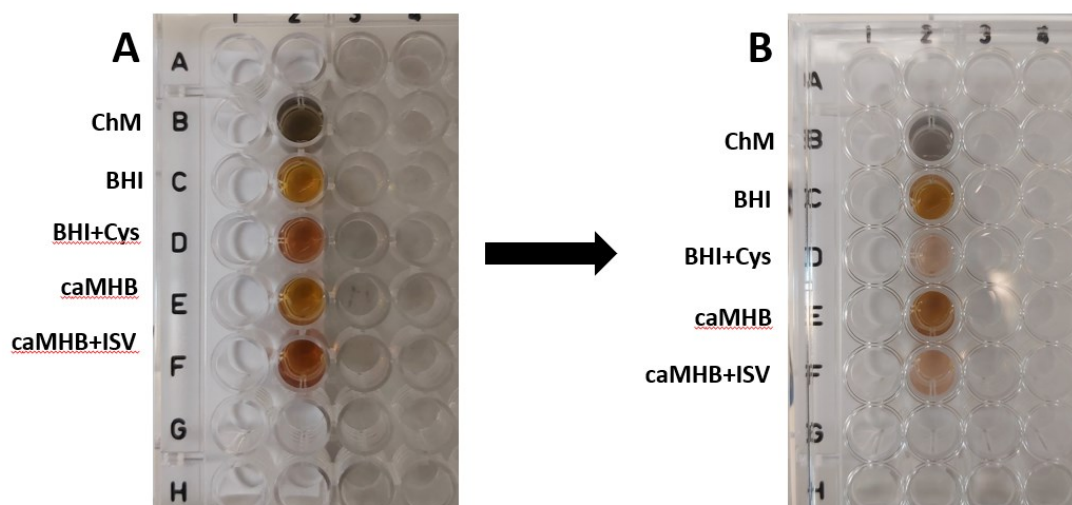
Z naměřených dat byly sestaveny grafy v programu Microsoft Excel pro vyhodnocení výsledků.

5 Výsledky

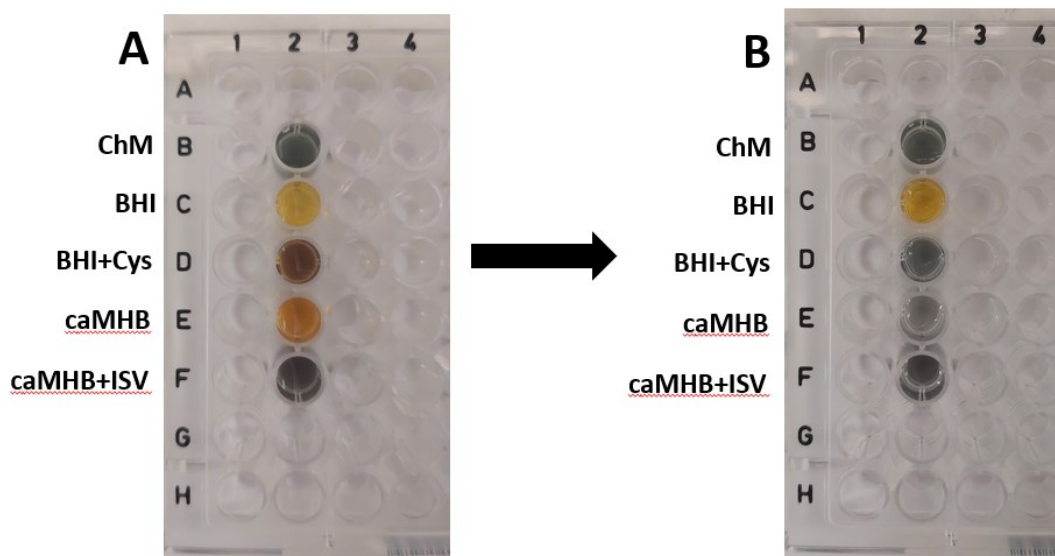
5.1 Sledování stability AgNP v kultivačních médiích

Stabilita AgNP byla sledována vizuálním porovnáním zbarvení po 1-hodinové inkubaci v daném médiu v poměru 1:1. Výraznější změna zbarvení svědčí o nestabilitě AgNP v daném médiu projevující se jejich agregací a následnou sedimentací. V případě AgNP10 (Obr. 20) došlo k nejvýraznější změně zbarvení Chamberlainova média, kdy došlo k výraznému ztmavnutí ihned po přidání k částicím. Po hodinové inkubaci byla patrná změna zbarvení ještě i u médií BHI s přídavkem 0,1 % cysteinu a caMHB s přídavkem 2 % Isovitalexu. U AgNP30 (Obr. 21) došlo k ještě intenzivnějším barevným změnám u všech testovaných médií, s výjimkou BHI.

Na základě těchto výsledků lze usoudit, že AgNP10 jsou stabilní v BHI a caMHB médiu, větší částice AgNP30 jsou stabilní pouze v BHI médiu. Z tohoto důvodu bylo v dalších experimentech použito médium BHI.



Obrázek 20 – Sledování stability AgNP10 ve vybraných kultivačních médiích na základě změny zbarvení (A - vzhled ihned po smíchání AgNP10 s médii v poměru 1:1, B - vzhled po 1-hodinové inkubaci, Cys – cystein, ISV - IsoVitaleX™ Enrichment)



Obrázek 21 – Sledování stability AgNP30 ve vybraných kultivačních médiích na základě změny zbarvení (A – vzhled ihned po smíchání AgNP30 s médiem v poměru 1:1, B – vzhled po 1-hodinové inkubaci, Cys – cystein, ISV - IsoVitaleX™ Enrichment)

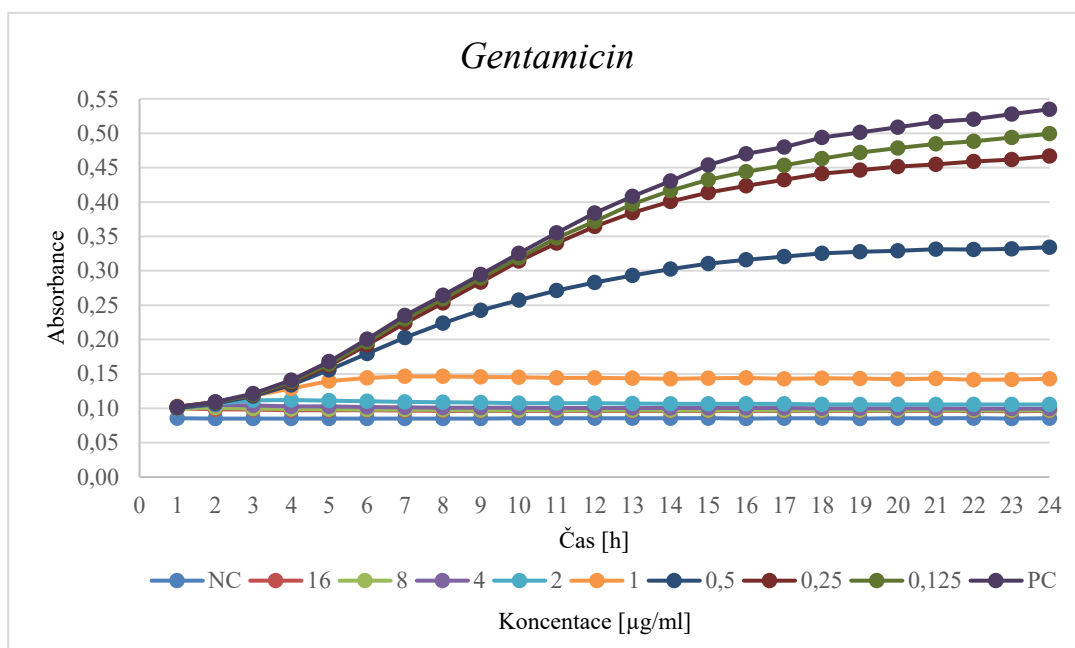
5.2 Sledování růstu bakterie *F. tularensis* ovlivněné ATB nebo AgNP

Růst bakterie *F. tularensis* byl sledován po ovlivnění konkrétními ATB nebo AgNP10 a AgNP30 v daných koncentračních rozmezích. Mezi testovaná ATB byl zahrnut gentamicin, tetracyklin, chloramfenikol a ciprofloxacín. Růst bakterie v tekutém médiu se projevoval formou zákalu, který byl sledován v pravidelných časových intervalech stanovením absorbance při vlnové délce 620 nm pomocí spektrofotometru. Grafickým vynesáním hodnot absorbance naměřených v pravidelných jednohodinových intervalech byla sestavena růstová křivka. Růstová křivka umožnila v čase sledovat dynamiku růstu bakterie pod vlivem ATB nebo AgNP a srovnat s růstem bakterie neovlivněné. Z křivky byly určeny inhibiční koncentrace (IC) definované jako nejnižší koncentrace testovaných látek, při které byl viditelně inhibován růst daného kmene mikroorganismu.

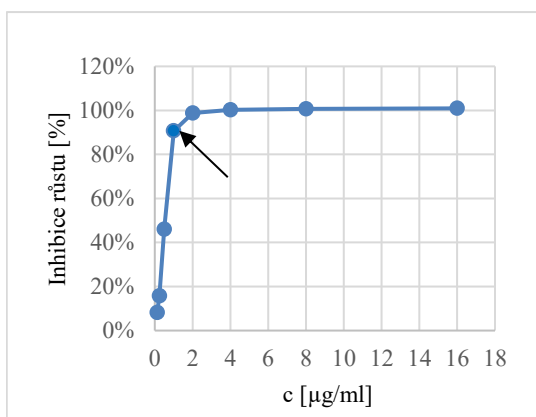
5.2.1 Test inhibice růstu s ATB

Za účelem zavedení dané metodiky a ověření inhibičního efektu vybraných ATB na *F. tularensis* v našich experimentálních podmínkách, byl růst této bakterie sledován v BHI médiu s přidáním ATB v různých koncentracích po dobu 24 hodin. V pravidelných časových intervalech byl proměřen zákal bakteriální suspenze a ze získaných hodnot byla sestrojena růstová křivka. Pro každé ATB byl experiment zopakován za stejných podmínek minimálně 3x, pouze v případě chloramfenikolu 2x. Pro demonstraci je zde ukázána růstová křivka vždy jen z jednoho vybraného pokusu. Růstové křivky ze všech dalších měření nicméně vykazovaly až na výjimky stejný průběh.

U dvou provedených experimentů došlo k 90% inhibici růstu bakterie (IC₉₀) v BHI médiu s gentamicinem v koncentraci 1 µg/ml, v jednom opakování však hodnota IC₉₀ odpovídala koncentraci 0,5 µg/ml. Hodnota IC₉₀ byla proto stanovena v rozmezí 0,5-1 µg/ml. U vyšších koncentrací (2-16 µg/ml) byla inhibice růstu vždy prakticky 100% (Obr. 22, Obr. 23, Tab. 7). Gentamicin v koncentraci 0,5 µg/ml, resp. 0,25 µg/ml (u jednoho pokusu) zamezil růstu *F. tularensis* přibližně ze 45-50%. Nižší koncentrace růst bakterie neovlivňovaly.



Obrázek 22 - Růst bakterie *F. tularensis* v médiu s gentamicinem (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace ATB bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez ATB)

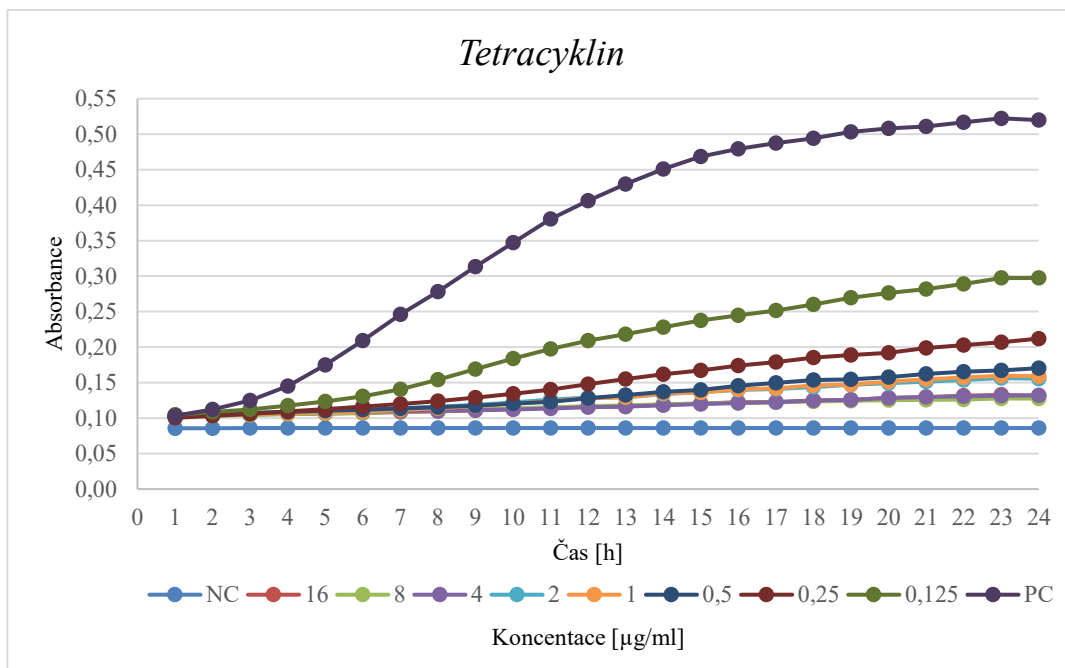


Obrázek 23 - Grafické vyjádření koncentrace gentamicinu [µg/ml] v závislosti na inhibici růstu [%] v čase 24 h (IC₉₀ - označeno šipkou)

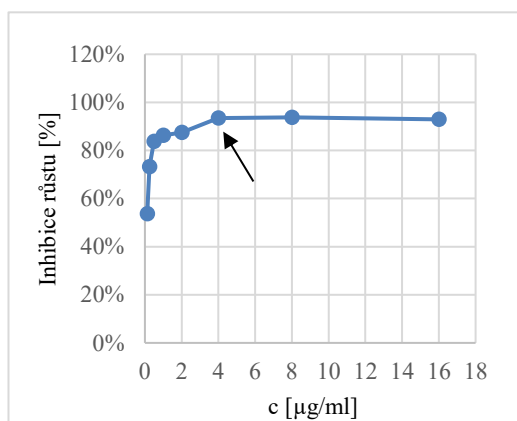
Tabulka 7 - Testované koncentrace gentamicinu [µg/ml], rozdíl absorbance změřené po 24 h a 1 h inkubaci, inhibice růstu [%] (IC₉₀ - označeno *)

c [µg/ml]	A _{24h} -A _{1h}	Inhibice růstu [%]
16	-0,004	100,92%
8	-0,003	100,69%
4	-0,001	100,31%
2	0,005	98,85%
1*	0,040	90,69%
0,5	0,234	45,96%
0,25	0,365	15,70%
0,125	0,397	8,24%

Výsledky 90% inhibice růstu tetracyklinu provedené ve třech experimentech byly nejednotné, proto je IC₉₀ uvedena v koncentračním rozmezí 0,5-4 µg/ml. V prvním měření odpovídala IC₉₀ koncentraci 1 µg/ml, v dalším opakování byla tato hodnota dosažena při koncentraci 0,5 µg/ml. Při třetím experimentu tetracyklin projevils optimální účinnost potlačení růstu bakterie *F. tularensis* při koncentraci 4 µg/ml (IC₉₀) a vyšších (Obr. 24, Obr. 25). Při koncentraci 0,125 µg/ml byl patrný inhibiční efekt mezi 45-60 %. (Tab. 8).



Obrázek 24 - Růst bakterie *F. tularensis* v médiu s tetracyklinem (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace ATB bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez ATB)

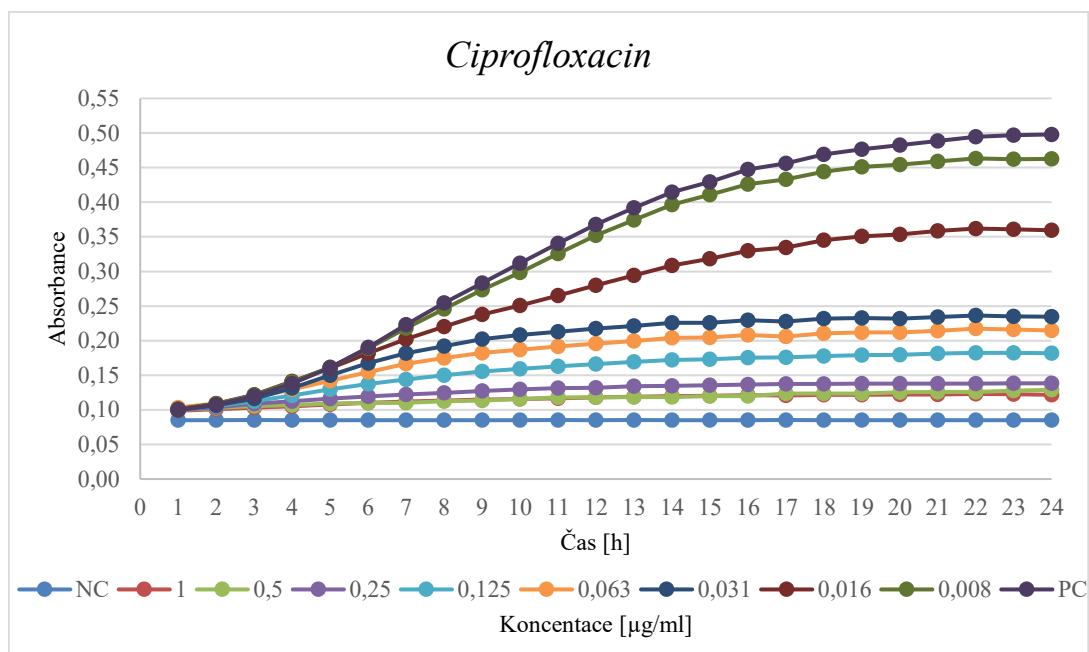


Obrázek 25 - Grafické vyjádření koncentrace tetracyklinu [µg/ml] v závislosti na inhibici růstu [%] v čase 24 h (IC₉₀ - označeno šipkou)

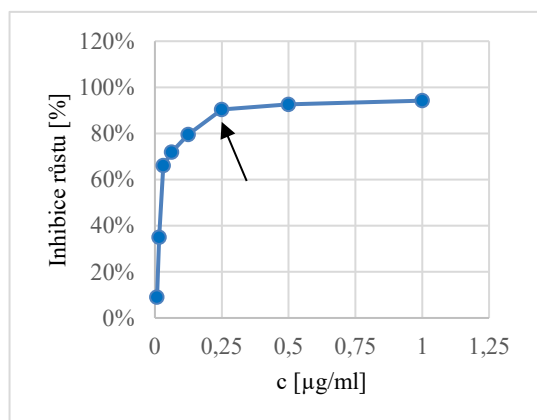
Tabulka 8 - Testované koncentrace tetracyklinu [µg/ml], rozdíl absorbance změřené po 24 h a 1 h inkubaci, inhibice růstu [%] (IC₉₀ - označeno *)

c [µg/ml]	A _{24h} -A _{1h}	Inhibice růstu [%]
16	0,029	92,96 %
8	0,026	93,76 %
4*	0,027	93,44 %
2	0,052	87,44 %
1	0,057	86,32 %
0,5	0,068	83,76 %
0,25	0,112	73,20 %
0,125	0,193	53,68 %

Z grafu růstových křivek (Obr. 26) lze usoudit, že k prvním známkám ovlivnění růstu *F. tularensis* došlo u ciprofloxacinu při koncentraci 0,016 µg/ml. V tomto případě byla dosažena 35% inhibice růstu, při koncentraci 0,031 µg/ml byl růst inhibován z 66 % (Tab. 9). Antibakteriální účinnost s důsledkem 90% inhibice růstu (IC₉₀) se projevila při koncentraci 0,25 µg/ml (Tab. 9, Obr. 27). V případě nejnižší koncentrace (0,008 µg/ml) byla bakterie vůči danému ATB téměř rezistentní. Průběh růstových křivek a koncentrace odpovídající IC₉₀ byly identické i v dalších měření.



Obrázek 26 - Růst bakterie *F. tularensis* v médiu s ciprofloxacinem (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace ATB bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez ATB)

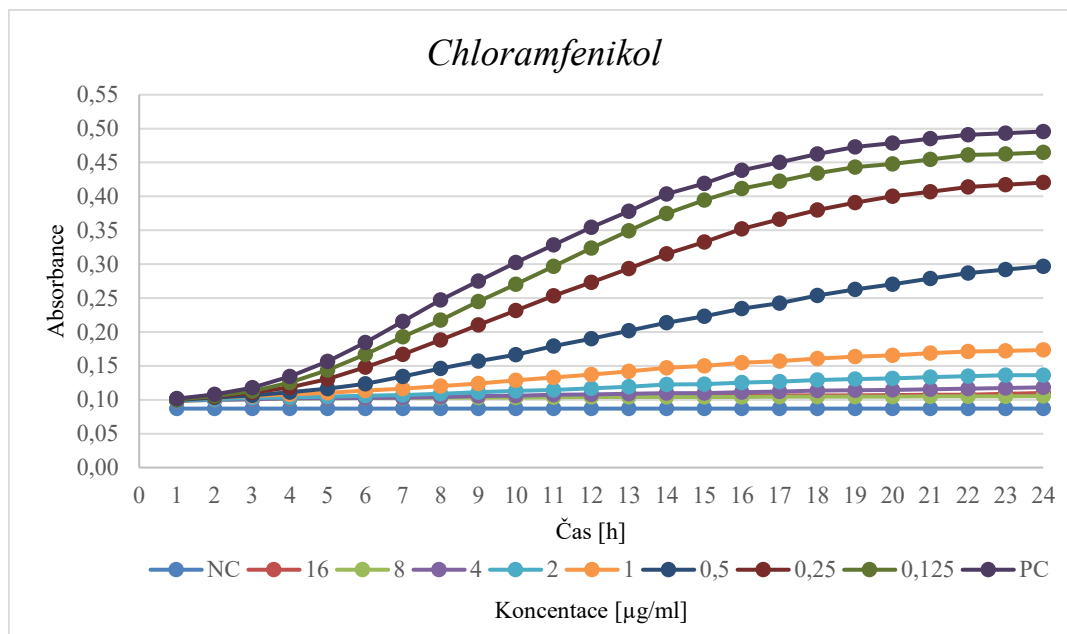


Obrázek 27 - Grafické vyjádření koncentrace ciprofloxacinu [µg/ml] v závislosti na inhibici růstu [%] v čase 24 h (IC_{90} - označeno šipkou)

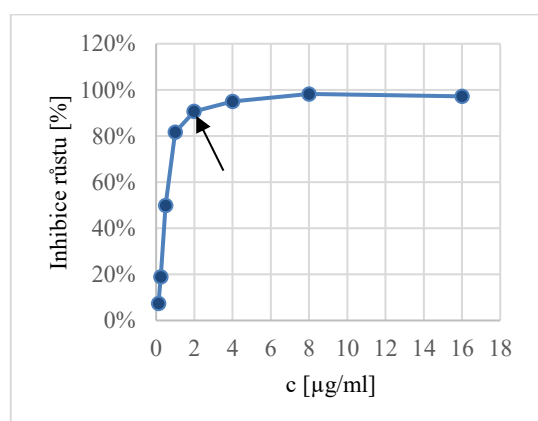
Tabulka 9 - Testované koncentrace ciprofloxacinu [µg/ml], rozdíl absorbance změřené po 24 h a 1 h inkubaci, inhibice růstu [%] (IC_{90} - označeno *)

c [µg/ml]	$A_{24h}-A_{1h}$	Inhibice růstu [%]
1	0,023	94,22 %
0,5	0,029	92,62 %
0,25*	0,038	90,36 %
0,125	0,081	79,55 %
0,063	0,111	72,00 %
0,031	0,135	66,14 %
0,016	0,259	34,95 %
0,008	0,362	9,05 %

Chloramfenikol vždy zcela inhiboval růst populace bakterie *F. tularensis* v koncentraci 4 µg/ml a vyšší. (Obr. 28, Obr. 29). IC_{90} odpovídala přibližné koncentraci 2 µg/ml (Tab. 10). V koncentračním rozmezí 0,125-0,25 µg/ml byla bakterie vůči působení chloramfenikolu téměř rezistentní. Při druhém měření byl průběh růstových křivek a koncentrace odpovídající IC_{90} jednotný.



Obrázek 28 - Růst bakterie *F. tularensis* v médiu s chloramfenikolem (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace ATB bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez ATB)



Obrázek 29 - Grafické vyjádření koncentrace chloramfenikolu [$\mu\text{g/ml}$] v závislosti na inhibici růstu [%] v čase 24 h (IC_{90} - označeno šipkou)

Tabulka 10 - Testované koncentrace chloramfenikolu [$\mu\text{g/ml}$], rozdíl absorbance změřené po 24 h a 1 h inkubaci, inhibice růstu [%] (IC_{90} - označeno *)

c [$\mu\text{g/ml}$]	$A_{24\text{h}}-A_{1\text{h}}$	Inhibice růstu [%]
16	0,011	97,21 %
8	0,007	98,22 %
4	0,020	95,01 %
2*	0,037	90,61 %
1	0,072	81,64 %
0,5	0,197	49,92 %
0,25	0,320	18,87 %
0,125	0,365	7,45 %

Hodnoty IC_{90} získané z opakovaných měření ATB byly shrnuty v tabulce (Tab. 11). V našich experimentálních podmínkách IC_{90} ciprofloxacinu pro *F. tularensis* byla 0,25 $\mu\text{g/ml}$, u chloramfenikolu 2 $\mu\text{g/ml}$. Po dvou měření gentamicinu byla vyhodnocena IC_{90} na 1 $\mu\text{g/ml}$, ve třetím měření koncentrace klesla na 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Z tohoto důvodu byla IC_{90} gentamicinu sjednocena do koncentračního rozmezí 0,5-1 $\mu\text{g/ml}$. Výsledky tetracyklinu byly nejednotné, proto byla IC_{90} uvedena v koncentračním rozmezí 0,5-4 $\mu\text{g/ml}$.

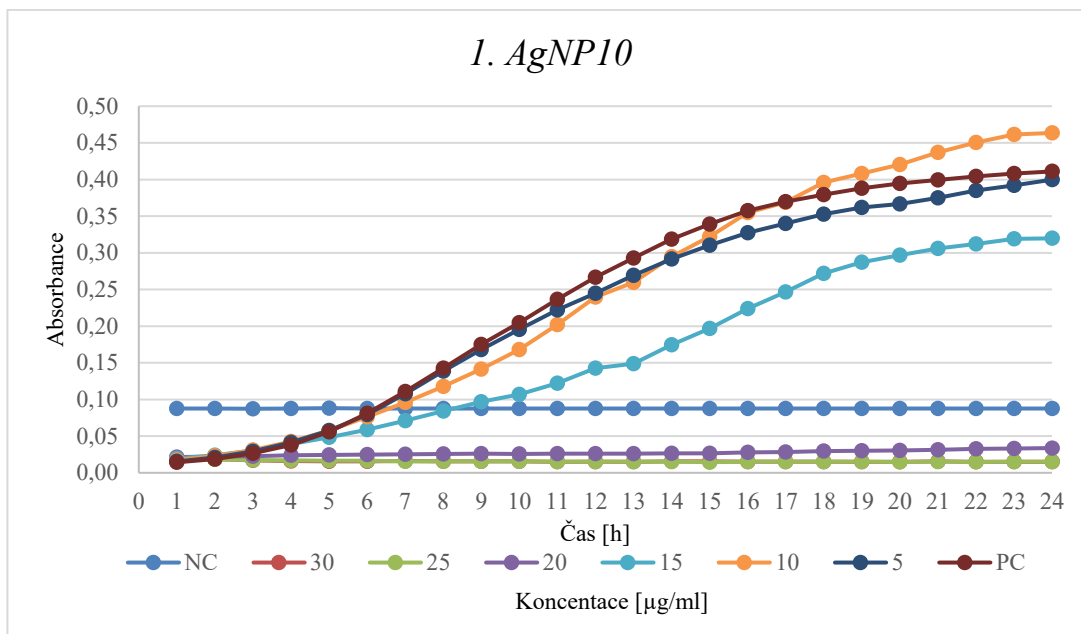
Tabulka 11 - IC₉₀ testovaných ATB

ATB	IC ₉₀ [µg/ml]
Gentamicin	0,5-1
Tetracyklin	0,5-4
Ciprofloxacin	0,25
Chloramfenikol	2

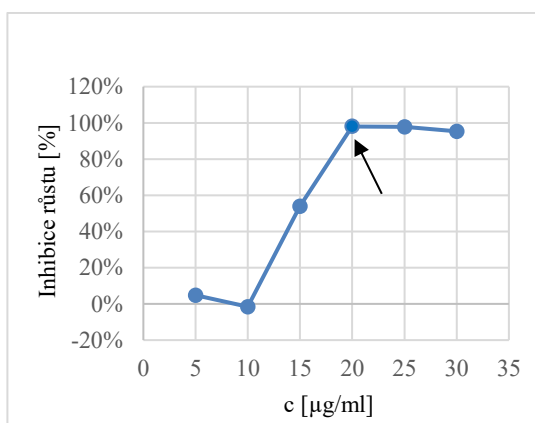
5.2.2 Test inhibice růstu s AgNP

Stejným způsobem, jako u ATB, byl v dalších experimentech sledován vliv AgNP10 a AgNP30 na růst bakterie *F. tularensis*. V případě AgNP10 byl experiment za stejných podmínek zopakován minimálně 3x, pro demonstraci jsou zde ukázány výsledky ze 3 opakování. Při měření AgNP30 v koncentračním rozmezí 5-30 µg/ml nebyl patrný žádný účinek inhibice, v dalším opakování se nepokračovalo a je zde uveden pouze jeden výsledek prvního měření. V případě AgNP30 v koncentračním rozmezí 30-45 µg/ml jsou z časových důvodů a technologických problémů uvedeny pouze výsledky z prvního pokusu.

Z grafického znázornění (Obr. 30, Obr. 32, Obr. 34) vyplývá, že antimikrobní účinek AgNP nebyl patrný v koncentračním rozmezí 5-10 µg/ml. AgNP10 efektivně inhibovaly růst populace bakterie *F. tularensis* od koncentrace 20 µg/ml a výš (Obr. 31, Obr. 33, Obr. 35). Výsledky všech tří provedených stanovení shodně prokazují, že při koncentraci 20 µg/ml dochází k téměř 100% inhibici růstu bakterie (Tab. 12, Tab. 13, Tab. 14). Konstantní průběh křivky odpovídající negativní kontrole, tj. nejvyšší koncentraci AgNP10 bez bakterie, svědčí o stabilitě částic v průběhu celého sledování.



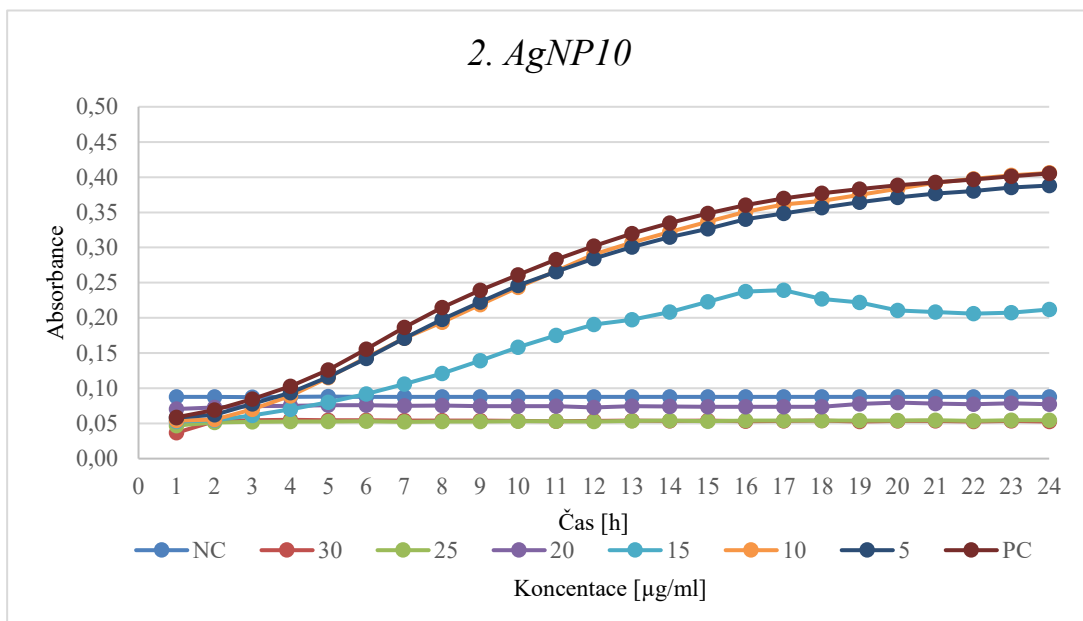
Obrázek 30 - Růst bakterie *F. tularensis* v médiu s AgNP10 (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace AgNP bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez AgNP)



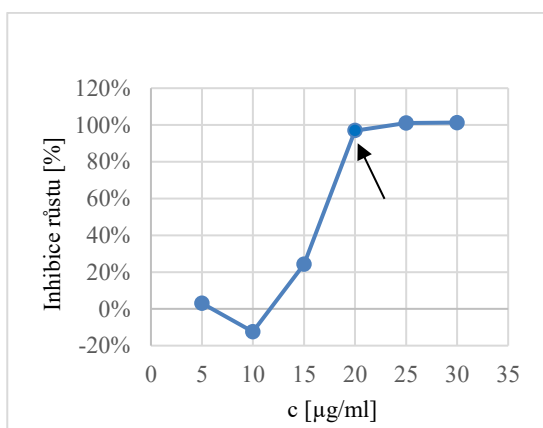
Obrázek 31 - Grafické vyjádření koncentrace AgNP10 [$\mu\text{g/ml}$] v závislosti na inhibici růstu [%] v čase 24 h (IC_{100} - označeno šipkou)

Tabulka 12 - Testované koncentrace AgNP10 [$\mu\text{g/ml}$], rozdíl absorbance změřené po 24 h a 1 h inkubaci, inhibice růstu [%] (IC_{100} – označeno *)

c [$\mu\text{g/ml}$]	$A_{24h}-A_{1h}$	Inhibice růstu [%]
30	0,016	95,39 %
25	0,007	97,86 %
20*	0,007	97,99 %
15	0,159	54,01 %
10	0,352	-1,55 %
5	0,330	4,84 %



Obrázek 32 - Růst bakterie *F. tularensis* v médiu s AgNP10 (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace AgNP bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez AgNP)

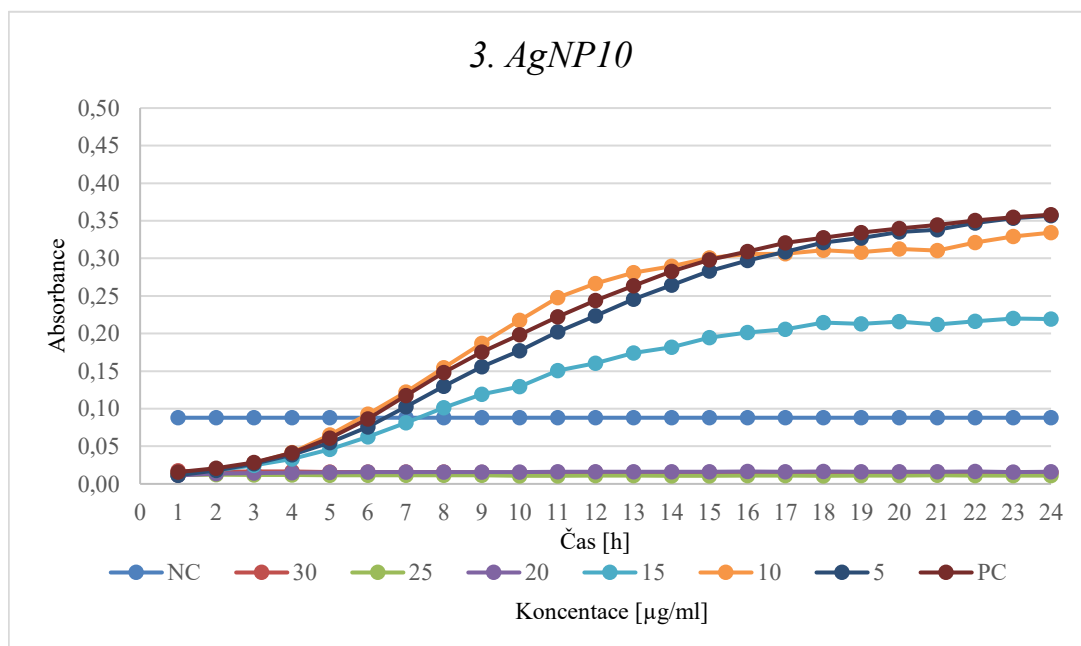


Obrázek 33 - Grafické vyjádření koncentrace AgNP10 [µg/ml] v závislosti na inhibici růstu [%] v čase 24 h (IC₁₀₀ - označeno šipkou)

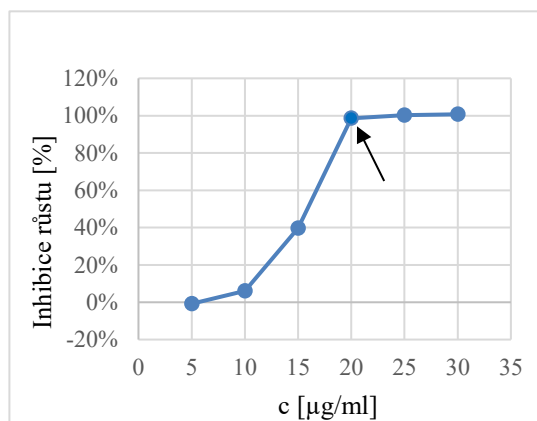
Tabulka 13 - Testované koncentrace AgNP10 [µg/ml], rozdíl absorbance změřené po 24 h a 1 h inkubaci, inhibice růstu [%] (IC₁₀₀ – označeno *)

c [µg/ml]	A _{24h} -A _{1h}	Inhibice růstu [%]
30	-0,005	101,32 %
25	-0,004	101,01 %
20*	0,012	96,91 %
15	0,300	24,31 %
10	0,446	-12,44 %
5	0,384	3,13 %

3. AgNP10



Obrázek 34 - Růst bakterie *F. tularensis* v médiu s AgNP10 (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace AgNP bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez AgNP)

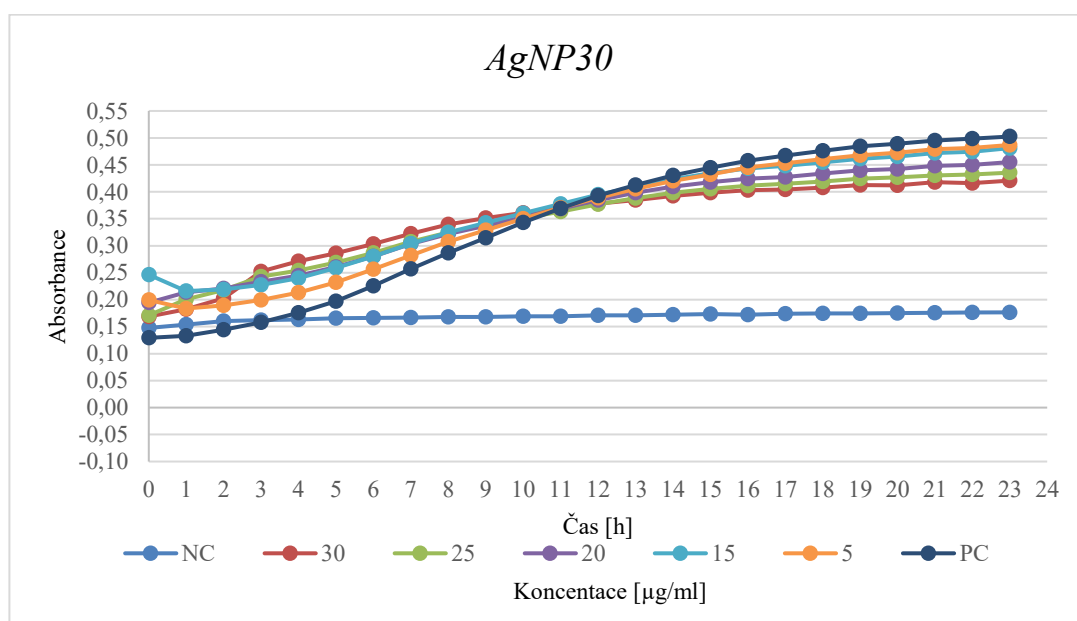


Obrázek 35 - Grafické vyjádření koncentrace AgNP10 [µg/ml] v závislosti na inhibici růstu [%] v čase 24 h (IC_{100} - označeno šipkou)

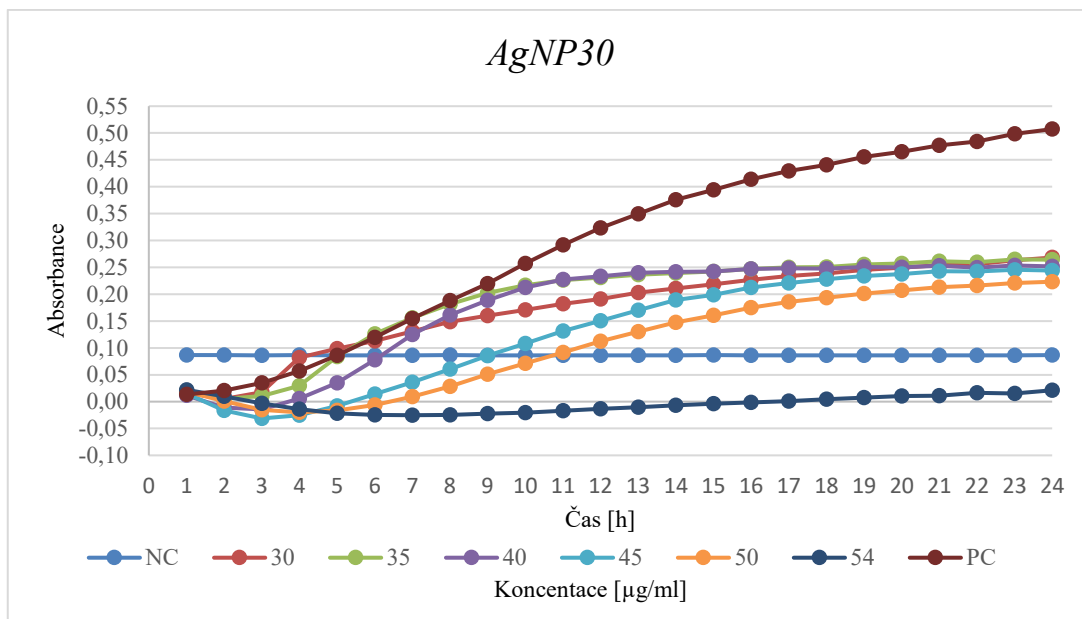
Tabulka 14 - Testované koncentrace AgNP10 [µg/ml], rozdíl absorbance změřené po 24 h a 1 h inkubaci, inhibice růstu [%] (IC_{100} - označeno *)

c [µg/ml]	$A_{24h}-A_{1h}$	Inhibice růstu [%]
30	-0,002	100,73 %
25	-0,001	100,29 %
20*	0,005	98,61 %
15	0,207	39,71 %
10	0,322	6,13 %
5	0,345	-0,80 %

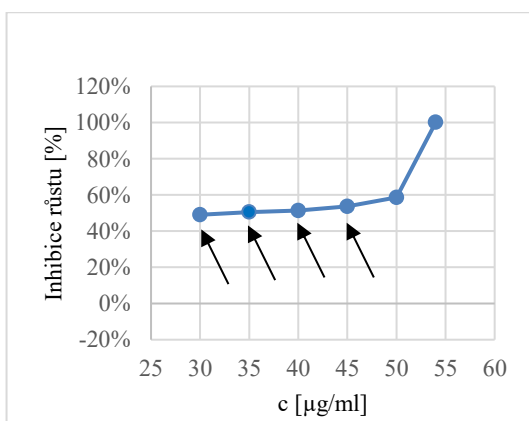
V případě AgNP30 lze konstatovat, že oproti AgNP10 nebyl patrný žádný účinek inhibice v koncentračním rozmezí 5-30 $\mu\text{g/ml}$ (Obr. 36). Z tohoto důvodu byly AgNP30 dále testovány ve vyšším koncentračním rozmezí 30-54 $\mu\text{g/ml}$ (Obr. 37). Tento graf růstových křivek dokazuje, že přítomností AgNP30 dochází zcela k inhibici růstu bakterií *F. tularensis* při koncentraci 54 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{100}). Částečný inhibiční vliv AgNP lze pozorovat v případě koncentračního rozmezí 30-45 $\mu\text{g/ml}$, při kterém bylo dosaženo kolem 50% inhibice růstu (IC_{50}) (Obr. 38, Tab. 15).



Obrázek 36 - Růst bakterie *F. tularensis* v médiu s AgNP30 (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace AgNP bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez AgNP)



Obrázek 37 - Růst bakterie *F. tularensis* v médiu s AgNP30 (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace AgNP bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez AgNP)



Obrázek 38 - Grafické vyjádření koncentrace AgNP30 [$\mu\text{g/ml}$] v závislosti na inhibici růstu [%] v čase 24 h (IC_{50} - označeny šipkami)

Tabulka 15 - Testované koncentrace AgNP30 [$\mu\text{g/ml}$], rozdíl absorbance změřené po 24 h a 1 h inkubaci, inhibice růstu [%] (IC_{50} - označeny *)

c [$\mu\text{g/ml}$]	$A_{24h}-A_{1h}$	Inhibice růstu [%]
30*	0,2518	49,05 %
35*	0,2445	50,52 %
40*	0,2400	51,43 %
45*	0,2286	53,75 %
50	0,2048	58,56 %
54	-0,0007	100,15 %

Z výsledků opakovaných měření AgNP10 nelze IC_{50} jednoznačně určit, avšak hodnoty IC_{100} jednotně odpovídaly koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 16). Na základě jednoho provedeného měření AgNP30 (v koncentračním rozmezí 30-54 $\mu\text{g/ml}$) bylo možné stanovit IC_{50} odpovídající koncentračnímu rozmezí 30-45 $\mu\text{g/ml}$, při koncentraci 54 $\mu\text{g/ml}$ bylo dosaženo 100 % inhibice růstu bakterie *F. tularensis* (Tab. 16).

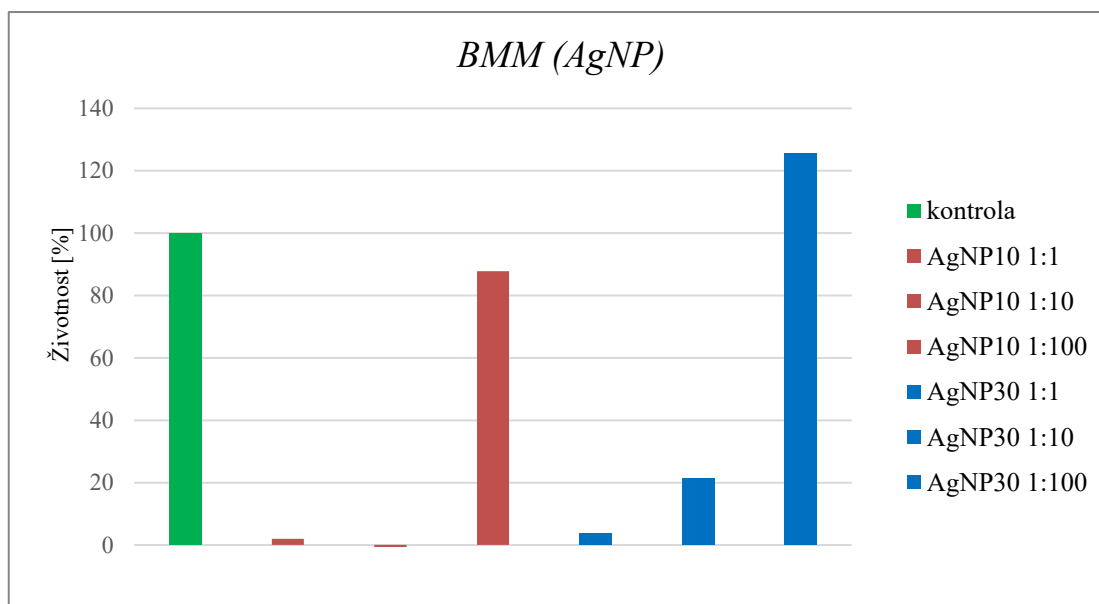
Tabulka 16 - IC_{50} , IC_{100} u testovaných AgNP10/30

	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	IC_{100} [$\mu\text{g/ml}$]
AgNP10	---	20
AgNP30	30-45	54

5.3 Proliferace BMM ovlivněných AgNP

Vliv AgNP na životnost buněk byl testován na primárních myších kostně-dřeňových makrofázích (BMM). BMM byly ovlivněny příslušnou koncentrací AgNP10 nebo AgNP30 po dobu 24 hodin a jejich životnost byla stanovena pomocí proliferačního MTS testu. Test byl proveden dvakrát, vždy se stejným výsledkem. Pro demonstraci je zde ukázán graf pouze z jednoho pokusu.

Životnost buněk ovlivněných AgNP byla porovnána s buňkami neovlivněnými (100 %) (Obr. 39). Z výsledků je zřejmé, že AgNP10 i AgNP30 ředěné médiem v poměru 1:1 a 1:10 (v přibližné koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$) měly významný negativní vliv na buněčnou proliferaci. Nejnižší toxicitu prokázaly AgNP v přibližné koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ (ředění 1:100). V případě AgNP10 životnost buněk BMM oproti kontrole mírně klesla na 90 %. Nebyla však překročena hraniční hodnota 80% životnosti, od které je obecně testovaná látka pokládána za toxickou. Buněčná proliferace buněk byla nepatrně více inhibována vlivem AgNP10 než AgNP30, což může být důsledkem menší velikosti těchto částic a s tím spojeným snadnějším průnikem do makrofágů a také vyšším povrchem s tím vyšší mírou uvolňování stříbrných iontů.



Obrázek 39 – Procentuální vyjádření životnosti BMM ovlivněných AgNP10 a AgNP30 ředěné médiem v různých poměrech

6 Diskuze

Zvýšená prevalence nemocí a rezistence vůči antibiotikům posouvá hledání nových účinných látek a způsobů, jak účinněji bojovat proti infekčním agens. V současnosti se zkoumá využití baktericidního efektu AgNP proti široké škále gramnegativních i grampozitivních mikroorganismů. Antimikrobní efekt AgNP byl zaznamenán i u rezistentních intracelulárních bakterií. Markovská a kol. zjistili, že peptidoglykan v buněčné stěně původce *Listeria monocytogenes* je cílem aktivity AgNP proti tomuto patogenu [76]. Účinnost AgNP vůči bakterii *Mycobacterium tuberculosis* byla také prokázána v mnoha studiích, ačkoliv přítomnost vícevrstvé hydrofobní mykobakteriální buněčné stěny bohaté na lipidy a efluxní systémy bývá spojována s vysokou odolností původce [77,78].

Není dostupná studie, která by se zabývala testováním AgNP v souvislosti *F. tularensis*. Proto na začátku našeho projektu bylo zásadní potvrdit předpoklad inhibičního efektu AgNP na růst této bakterie. Citlivost bakterie *F. tularensis* po ovlivnění AgNP byla testována mikrodiluční metodou za účelem stanovení IC. Při této metodě byla využívána růstová křivka, umožňující sledování kontinuálního růstu bakterie v čase. Při testování AgNP10 v koncentračním rozmezí 5-30 $\mu\text{g/ml}$ se nám podařilo stanovit IC_{100} , která odpovídá koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ podložené na základě více pokusů. U AgNP30 se nepodařilo z časových důvodů a technologických problémů přesně stanovit IC_{100} . Stabilitní problémy byly pravděpodobně způsobeny nedostatečnou stabilizací a citlivostí na elektrolyty, což vedlo k agregaci AgNP.

Při testování bylo nutné ověřit stabilitu AgNP v různých kultivačních médiích, která byla sledována vizuálním porovnáním změn zbarvení ve vybraných médiích po jednohodinové inkubaci. Změna zbarvení byla důkazem nestability AgNP v daném médiu projevující se agregací a následnou sedimentací nanočástic. Získané výsledky vedly k určení vhodného média pro testování citlivosti bakterie *F. tularensis*, kterým bylo BHI médium kompatibilní s AgNP10 i AgNP30. AgNP30 prokázaly stabilitu v přítomnosti kultivačního média caMHB, standardně používaného pro testování antibiotik. AgNP10 v tomto médiu stabilní nebyly. Jako kultivačně náročná bakterie, vyžaduje *F. tularensis* ke svému růstu přítomnost dalších růstových faktorů

dodávaných formou ISV. V takto obohateném caMHB však již docházelo k vysrážení AgNP.

Vysvětlením pozorovaného jevu může být stabilizace povrchu AgNP10 pomocí polyakrylové kyseliny (PAA). Tato povrchová modifikace může vést k vyšší míře koloidní stability a menší tendenci k agregaci částic v prostředí bohatém na elektrolyty. AgNP30 takto stabilizovány nebyly a proto agregovaly.

Vznik precipitátu může být také projevem rezistence bakterií, které indukují agregaci AgNP a tím potlačí antibakteriální účinek AgNP [85]. Existují rozdílné názory vědců ohledně schopnosti bakterií vyvinout rezistenci vůči AgNP. Durán a kol. se domnívají, že bakteriím by mohlo být obtížné vyvinout rezistenci vůči těmto nanočásticím [82]. Na druhou stranu Graves a jeho kolegové tvrdí, že bakterie mohou relativně snadno vyvinout rezistenci proti AgNP pomocí jednoduchých genomických změn [83]. Vzácné případy rezistence byly objeveny u původců *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* a *Citrobacter freundii* [84]. V našem případě AgNP30 (oproti AgNP10) více agreagovaly, což bylo patrné stejným zčernáním vzorků v jamkách, avšak tato nestabilita AgNP se odehrála za jiných okolností než v těchto člancích, ve kterých byly přítomny bakterie.

Před samotným testováním AgNP byla bakterie *F. tularensis* ovlivněna ATB v daných koncentračních rozmezích za účelem stanovení IC. Mezi testovaná ATB patřil gentamicin, tetracyklin, chloramfenikol a ciprofloxacin. Tento krok byl proveden za účelem zavedení metodiky, tak i pro ověření inhibičního účinku vybraných ATB na používaný kmen *F. tularensis*. Jednotlivá ATB budou v následující fázi studie využita jako kontrolní ověřování použitých experimentálních modelů. Uplatní se také při testování synergického účinku těchto antibiotik s AgNP.

V dalším kroku testování byla stanovena životnost primárních myších BMM po ovlivnění AgNP10/AgNP30 pomocí proliferačního MTS testu. AgNP10 i AgNP30 ředěné médiem v poměru 1:1 a 1:10 měly významný negativní vliv na buněčnou proliferaci. Nejnižší toxicitu prokázaly AgNP10/30 v přibližné koncentraci 1 µg/ml (ředěné v poměru 1:100). Buněčná proliferace buněk byla nepatrně více inhibována vlivem AgNP10 než AgNP30.

Ačkoliv se v tomto případě jedná o velmi malý rozdíl v účinnosti AgNP10 a AgNP30, i tak lze potvrdit předpoklad, že částice menší velikosti s větším poměrem povrchu k objemu mají větší antibakteriální aktivitu a snadněji vstoupí do buněk [41]. Tento předpoklad byl potvrzen Moroles a kol., kteří zjistili, že menší částice mají zjevně lepší schopnost pronikat do bakterií, zejména u gramnegativních [78]. Yacamam a kol. zjistili, že AgNP velikosti 10 nm a 15 nm mají nejen zvýšenou antimikrobiální aktivitu, ale také zvýšenou stabilitu a biokompatibilitu [38]. V jiné studii bylo zjištěno, že nanočástice velikosti 1-10 nm přímo interagují s bakteriemi a účinek není pouze způsoben uvolňováním kovových iontů v roztoku [78].

Gliga a kol. zkoumali lidské bronchiální epiteliální buňky (BEAS-2B), u kterých byla indukována toxicita vlivem AgNP různých velikostí (10, 40 a 75 nm) s různými povlaky (citrát a PVP). Buňky byly vystaveny dávkám 5-50 $\mu\text{g/ml}$ nanočástic a pouze AgNP10 (jak CIT-AgNP, tak PVP-AgNP) indukovaly toxicitu v buňkách po expozici nejvyšších dávek 20 a 50 $\mu\text{g/ml}$ [80].

V další studii byl testován cytotoxický účinek AgNP velikosti 27 nm za účelem hodnocení účinku cytotoxicity buněčných linií lidských keratinocytů (SVK14) a myších fibroblastů (NIH3T3) pomocí MTT testu. AgNP byly testovány v koncentračním rozmezí 1-108 $\mu\text{g/ml}$. Nejvyšší toxicitu prokázaly AgNP v přibližné koncentraci 108 $\mu\text{g/ml}$ u obou typů savčích buněk, v případě koncentrace 54 $\mu\text{g/ml}$ AgNP dosahovala životnosti kolem 50-70 %. Při koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ bylo dosaženo 100 % životnosti buněk v obou případech [81].

Sjednocením informací získaných v našem experimentu s dalšími studii lze potvrdit, že antimikrobiální aktivita závisí na koncentraci AgNP. Zvýšením koncentrací AgNP se zvýší cytotoxická aktivita, ačkoliv se jedná o rozdílné typy savčích buněk testované v různých koncentračních rozmezích.

7 Závěr

1. U AgNP připravených metodou chemické redukce byl potvrzen inhibiční efekt na růst bakterie *F. tularensis*.
2. Byla úspěšně zavedena metoda pro sledování antibakteriální účinnosti extracelulárně kultivované bakterie *F. tularensis*.
3. Při testování AgNP10 v koncentračním rozmezí 5-30 $\mu\text{g/ml}$ se podařilo na základě více pokusů stanovit IC_{100} , která odpovídá koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$. U AgNP30 se nepodařilo z časových důvodů a technologických problémů přesně stanovit IC_{100} .
4. V další části diplomové práce se podařilo stanovit koncentraci pro AgNP10, při které není ovlivněna životnost primárních myších BMM. U AgNP větších velikostí je však nezbytné pokračovat v testování a provést další studie.
5. Výsledky budou použity pro navazující studie v rámci projektu. Pokračuje se v testování možného synergického účinku AgNP s gentamicinem a bude sledován vliv AgNP na bakterie internalizované uvnitř hostitelských buněk pomocí modelu BMM.

8 Seznam obrázků

Obrázek 1 - Schématické znázornění struktury fullerenu C_{60} (4).....	12
Obrázek 2 - Schématické znázornění struktury nanokuliček (vlevo) a nanokapslí (vpravo) (8).....	13
Obrázek 3 – Schématické znázornění struktury lipozomů (4).....	14
Obrázek 4 - Schématické znázornění struktury pevných lipidových nanočástic (10) 15	
Obrázek 5 - Schématické znázornění struktury dendrimerů (14).....	16
Obrázek 6 - Schématické znázornění aktivního a pasivního targetingu (EPR efekt) (24)	19
Obrázek 7 - Mechanismus antimikrobiálního působení AgNP (A - poškození buněčné membrány, ovlivnění membránových proteinů a DNA (modrá přesušovaná čára), B - uvolnění iontů stříbra, ovlivnění membrány, DNA a proteinů (červená přerušovaná čára), C - tvorba reaktivních oxidačních forem kyslíku (ROS), které mohou také ovlivnit DNA, buněčnou membránu a membránové proteiny (černá tečkovaná čára)) (32).....	22
Obrázek 8 – Schématické znázornění tvarů AgNP (40).....	23
Obrázek 9 - Snímky fluorescenčního mikroskopu bakterie (a – Staphylococcus aureus, b - E. coli) označené modrým barvivem DAPI (43).....	24
Obrázek 10 – Mechanismus antivirotického působení AgNP (A – mechanismus působení AgNP proti virům, B – rozvoj virové infekce) (36).....	26
Obrázek 11 – Mechanismus antivirotického působení AgNP proti SARS-CoV-2 (A – rozvoj virového onemocnění COVID-19, B – mechanismus působení AgNP vůči viru SARS-CoV-2) (36)	27
Obrázek 12 - SEM snímky biofilmu Candida albicans (1 - hyfy, 2 - kvasinky, 3 - poškozená buněčná stěna, a), c) biofilm bez AgNP, b), d) biofilm ovlivněný AgNP po 24 h) (50)	28
Obrázek 13 - Schéma metody počítání CFU	40
Obrázek 14 - Schéma přípravy ředící řady ATB	41

Obrázek 15 - Schéma přípravy AgNP v kultivačním médiu BHI dle požadované koncentrace	43
Obrázek 16 - Schéma příkladu nanesení ATB a bakteriální suspenze na 96-jamkový panel (A - koncentrace ATB před přidáním bakteriální suspenze/média; B - výsledná koncentrace ATB po přidání bakteriální suspenze/média; NC - negativní kontrola; PC - pozitivní kontrola, CHL – chloramfenikol, CIP - ciprofloxacin).....	44
Obrázek 17 - Schéma nanesení vzorků AgNP a bakteriální suspenze (zelená) na 96-jamkový panel (A - koncentrace AgNP před přidáním bakteriální suspenze/média; B - výsledná koncentrace AgNP po přidání bakteriální suspenze/média; NC - negativní kontrola; PC – pozitivní kontrola)	45
Obrázek 18 - Schéma nanesení buněk BMM na 96-jamkový panel (B - buňky BMM, šedé pozadí jamek - DMEM médium).....	48
Obrázek 19 - Schéma nanesení buněk BMM na 96-jamkový panel (B - buňky BMM, šedé pozadí jamek - DMEM médium).....	50
Obrázek 20 – Sledování stability AgNP10 ve vybraných kultivačních médiích na základě změny zbarvení (A - vzhled ihned po smíchání AgNP10 s médiem v poměru 1:1, B – vzhled po 1-hodinové inkubaci, Cys – cystein, ISV - IsoVitaleX™ Enrichment)	51
Obrázek 21 – Sledování stability AgNP30 ve vybraných kultivačních médiích na základě změny zbarvení (A – vzhled ihned po smíchání AgNP30 s médiem v poměru 1:1, B – vzhled po 1-hodinové inkubaci, Cys – cystein, ISV - IsoVitaleX™ Enrichment)	52
Obrázek 22 - Růst bakterie <i>F. tularensis</i> v médiu s gentamicinem (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace ATB bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez ATB).....	54
Obrázek 23 - Grafické vyjádření koncentrace gentamicinu [$\mu\text{g/ml}$] v závislosti na inhibici růstu [%] v čase 24 h (IC_{90} - označeno šipkou).....	54
Obrázek 24 - Růst bakterie <i>F. tularensis</i> v médiu s tetracyklinem (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace ATB bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez ATB).....	55

Obrázek 25 - Grafické vyjádření koncentrace tetracyklinu [$\mu\text{g/ml}$] v závislosti na inhibici růstu [%] v čase 24 h (IC_{90} - označeno šipkou).....	55
Obrázek 26 - Růst bakterie <i>F. tularensis</i> v médiu s ciprofloxacinem (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace ATB bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez ATB).....	56
Obrázek 27 - Grafické vyjádření koncentrace ciprofloxacinu [$\mu\text{g/ml}$] v závislosti na inhibici růstu [%] v čase 24 h (IC_{90} - označeno šipkou).....	56
Obrázek 28 - Růst bakterie <i>F. tularensis</i> v médiu s chloramfenikolem (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace ATB bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez ATB).....	57
Obrázek 29 - Grafické vyjádření koncentrace chloramfenikolu [$\mu\text{g/ml}$] v závislosti na inhibici růstu [%] v čase 24 h (IC_{90} - označeno šipkou).....	57
Obrázek 30 - Růst bakterie <i>F. tularensis</i> v médiu s AgNP10 (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace AgNP bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez AgNP).....	59
Obrázek 31 - Grafické vyjádření koncentrace AgNP10 [$\mu\text{g/ml}$] v závislosti na inhibici růstu [%] v čase 24 h (IC_{100} - označeno šipkou).....	59
Obrázek 32 - Růst bakterie <i>F. tularensis</i> v médiu s AgNP10 (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace AgNP bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez AgNP).....	60
Obrázek 33 - Grafické vyjádření koncentrace AgNP10 [$\mu\text{g/ml}$] v závislosti na inhibici růstu [%] v čase 24 h (IC_{100} - označeno šipkou).....	60
Obrázek 34 - Růst bakterie <i>F. tularensis</i> v médiu s AgNP10 (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace AgNP bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez AgNP).....	61
Obrázek 35 - Grafické vyjádření koncentrace AgNP10 [$\mu\text{g/ml}$] v závislosti na inhibici růstu [%] v čase 24 h (IC_{100} - označeno šipkou).....	61

Obrázek 36 - Růst bakterie <i>F. tularensis</i> v médiu s AgNP30 (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace AgNP bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez AgNP)	62
Obrázek 37 - Růst bakterie <i>F. tularensis</i> v médiu s AgNP30 (NC - negativní kontrola, nejvyšší koncentrace AgNP bez bakterie, PC - pozitivní kontrola bakterie bez AgNP)	63
Obrázek 38 - Grafické vyjádření koncentrace AgNP30 [$\mu\text{g/ml}$] v závislosti na inhibici růstu [%] v čase 24 h (IC_{50} - označeny šipkami)	63
Obrázek 39 – Procentuální vyjádření životnosti BMM ovlivněných AgNP10 a AgNP30 ředěné médiem v různých poměrech	65

9 Seznam tabulek

Tabulka 1 – Přehled připravovaných roztoků s požadovanými koncentracemi při syntéze AgNP	38
Tabulka 2 - Přehled připravovaných roztoků s požadovanými koncentracemi při syntéze AgNP	38
Tabulka 3 - Použitá ATB, koncentrace zásobních roztoků ATB, koncentrace pracovních roztoků ATB v BHI a koncentrační rozmezí při testování citlivosti bakterie <i>F. tularensis</i>	41
Tabulka 4 - Použité AgNP, koncentrace zásobních roztoků AgNP a koncentrační rozmezí při testování citlivosti bakterie <i>F. tularensis</i>	42
Tabulka 5 - Parametry měření spektrofotometrem Synergy H1 (BioTek).....	46
Tabulka 6 - Množství AgNP 10/30 nm a DMEM média dle testovaného poměru, výsledná koncentrace vzorku.....	49
Tabulka 7 - Testované koncentrace gentamicinu [$\mu\text{g/ml}$], rozdíl absorbance změřené po 24 h a 1 h inkubaci, inhibice růstu [%] (IC_{90} – označeno *).....	54
Tabulka 8 - Testované koncentrace tetracyklinu [$\mu\text{g/ml}$], rozdíl absorbance změřené po 24 h a 1 h inkubaci, inhibice růstu [%] (IC_{90} – označeno *).....	55
Tabulka 9 - Testované koncentrace ciprofloxacinu [$\mu\text{g/ml}$], rozdíl absorbance změřené po 24 h a 1 h inkubaci, inhibice růstu [%] (IC_{90} - označeno *)	56
Tabulka 10 - Testované koncentrace chloramfenikolu [$\mu\text{g/ml}$], rozdíl absorbance změřené po 24 h a 1 h inkubaci, inhibice růstu [%] (IC_{90} – označeno *).....	57
Tabulka 11 - IC_{90} testovaných ATB	58
Tabulka 12 - Testované koncentrace AgNP10 [$\mu\text{g/ml}$], rozdíl absorbance změřené po 24 h a 1 h inkubaci, inhibice růstu [%] (IC_{100} – označeno *)	59
Tabulka 13 - Testované koncentrace AgNP10 [$\mu\text{g/ml}$], rozdíl absorbance změřené po 24 h a 1 h inkubaci, inhibice růstu [%] (IC_{100} – označeno *)	60
Tabulka 14 - Testované koncentrace AgNP10 [$\mu\text{g/ml}$], rozdíl absorbance změřené po 24 h a 1 h inkubaci, inhibice růstu [%] (IC_{100} – označeno *)	61

Tabulka 15 - Testované koncentrace AgNP30 [$\mu\text{g/ml}$], rozdíl absorbance změřené po 24 h a 1 h inkubaci, inhibice růstu [%] (IC_{50} – označeny *).....	63
Tabulka 16 - IC_{50} , IC_{100} u testovaných AgNP10/30	64

10 Seznam literatury

- [1] KHAN, Ibrahim; SAEED, Khalid a KHAN, Idrees. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Online. *Arabian Journal of Chemistry*. 2019, roč. 12, č. 7, s. 908-931. ISSN 18785352. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>. [cit. 2024-02-18].
- [2] NAMAKKA, Murtala; RAHMAN, Md. Rezaur; SAID, Khairul Anwar Mohamad Bin; ABDUL MANNAN, Mohammad a PATWARY, Abdul Majed. A review of nanoparticle synthesis methods, classifications, applications, and characterization. Online. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*. 2023, roč. 20. ISSN 22151532. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2023.100900>. [cit. 2024-02-18].
- [3] ALTAMMAR, Khadijah A. A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2023, roč. 14. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1155622>. [cit. 2024-02-18].
- [4] JOUDEH, Nadeem a LINKE, Dirk. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. Online. *Journal of Nanobiotechnology*. 2022, roč. 20, č. 1. ISSN 1477-3155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>. [cit. 2024-02-18].)
- [5] HAJISHOREH, Negar Karimi; JAMALPOOR, Zahra; RASOULI, Ramin; ASL, Amir Nezami; SHEERVALILOU, Roghayeh et al. The recent development of carbon-based nanoparticles as a novel approach to skin tissue care and management - A review. Online. *Experimental Cell Research*. 2023, roč. 433, č. 2. ISSN 00144827. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2023.113821>. [cit. 2024-02-18].
- [6] ZIELIŃSKA, Aleksandra; CARREIRÓ, Filipa; OLIVEIRA, Ana M.; NEVES, Andreia; PIRES, Bárbara et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. Online. *Molecules*. 2020, roč. 25, č. 16. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>. [cit. 2024-02-18].
- [7] DIN, Fakhar ud; AMAN, Waqar; ULLAH, Izhar; QURESHI, Omer Salman; MUSTAPHA, Omer et al. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. Online. *International Journal of Nanomedicine*. 2017, roč. 12, s. 7291-7309. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/IJN.S146315>. [cit. 2024-02-18].
- [8] SIDDIQUEE, Shafiquzzaman; MELVIN, Gan Jet Hong a RAHMAN, Md. Mizanur (ed.). Nanotechnology: Applications in Energy, Drug and Food. Online. Cham: Springer International Publishing, 2019. ISBN 978-3-319-99601-1. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-99602-8>. [cit. 2024-02-18].

- [9] TORCHILIN, Vladimir P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. Online. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005, roč. 4, č. 2, s. 145-160. ISSN 1474-1776. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrd1632>. [cit. 2024-02-18].
- [10] BAYÓN-CORDERO, Laura; ALKORTA, Itziar a ARANA, Lide. Application of Solid Lipid Nanoparticles to Improve the Efficiency of Anticancer Drugs. Online. *Nanomaterials*. 2019, roč. 9, č. 3. ISSN 2079-4991. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nano9030474>. [cit. 2024-02-18].
- [11] GESZKE-MORITZ, Małgorzata a MORITZ, Michał. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies. Online. *Materials Science and Engineering: C*. 2016, roč. 68, s. 982-994. ISSN 09284931. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.119>. [cit. 2024-02-18].
- [12] ABBASI, Elham; AVAL, Sedigheh Fekri; AKBARZADEH, Abolfazl; MILANI, Morteza; NASRABADI, Hamid Tayefi et al. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. Online. *Nanoscale Research Letters*. 2014, roč. 9, č. 1. ISSN 1556-276X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-247>. [cit. 2024-02-18].
- [13] WOLINSKY, J a GRINSTAFF, M. Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment☆. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008, roč. 60, č. 9, s. 1037-1055. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.02.012>. [cit. 2024-02-18].
- [14] PATEL, Vruti, Chitra RAJANI, Debleena PAUL, Pooja BORISA, Kuldeep RAJPOOT, Susanne R YOUNGREN-ORTIZ a Rakesh K TEKADE. Dendrimers as novel drug-delivery system and its applications. In: *Dendrimers as novel drug-delivery system and its applications*. London, England: Academic Press, 2020, s. 336. ISBN 9780128144879. Dostupné z: [doi:10.1016/B978-0-12-814487-9.00008-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814487-9.00008-9)
- [15] RAI, Mahendra; INGLE, Avinash P.; BIRLA, Sonal; YADAV, Alka a SANTOS, Carolina Alves Dos. Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. Online. *Critical Reviews in Microbiology*. 2016, s. 1-24. ISSN 1040-841X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1018131>. [cit. 2024-02-19].
- [16] YETISGIN, Abuzer Alp; CETINEL, Sibel; ZUVIN, Merve; KOSAR, Ali a KUTLU, Ozlem. Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. Online. *Molecules*. 2020, roč. 25, č. 9. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules25092193>. [cit. 2024-02-19].
- [17] HOSSEINI, Seyed Mostafa; TAHERI, Mohammad; NOURI, Fatemeh; FARMANI, Abbas; MOEZ, Narjes Morovati et al. Nano drug delivery in intracellular bacterial infection treatments. Online. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022, roč. 146. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112609>. [cit. 2024-02-2].
- [18] RAI, Mahendra; YADAV, Alka a GADE, Aniket. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Online. *Biotechnology Advances*. 2009, roč. 27, č. 1, s.

76-83. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>. [cit. 2024-02-20].

[19] BARANWAL, Jaya; BARSE, Brajesh; DI PETRILLO, Amalia; GATTO, Gianluca; PILIA, Luca et al. Nanoparticles in Cancer Diagnosis and Treatment. Online. *Materials*. 2023, roč. 16, č. 15. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma16155354>. [cit. 2024-02-22].

[20] EJIGAH, Victor; OWOSENI, Oluwanifemi; BATAILLE-BACKER, Perpetue; OGUNDIPE, Omotola D.; FISUSI, Funmilola A. et al. Approaches to Improve Macromolecule and Nanoparticle Accumulation in the Tumor Microenvironment by the Enhanced Permeability and Retention Effect. Online. *Polymers*. 2022, roč. 14, č. 13. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym14132601>. [cit. 2024-02-22].

[21] CLEMONS, Tristan D.; SINGH, Ruhani; SOROLLA, Anabel; CHAUDHARI, Nutan; HUBBARD, Alysia et al. Distinction Between Active and Passive Targeting of Nanoparticles Dictate Their Overall Therapeutic Efficacy. Online. *Langmuir*. 2018, roč. 34, č. 50, s. 15343-15349. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02946>. [cit. 2024-02-22].

[22] ABDELKAWI, Abdullah; SLIM, Aliyah; ZINOUNE, Zaineb a PATHAK, Yashwant. Surface Modification of Metallic Nanoparticles for Targeting Drugs. Online. *Coatings*. 2023, roč. 13, č. 9. ISSN 2079-6412. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/coatings13091660>. [cit. 2024-02-22].

[23] XU, Jia-Jie; ZHANG, Wan-Chen; GUO, Ya-Wen; CHEN, Xiao-Yi a ZHANG, You-Ni. Metal nanoparticles as a promising technology in targeted cancer treatment. Online. *Drug Delivery*. 2022, roč. 29, č. 1, s. 664-678. ISSN 1071-7544. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2039804>. [cit. 2024-02-22].

[24] BAJRACHARYA, Rajiv; SONG, Jae Geun; PATIL, Basavaraj Rudragouda; LEE, Sang Hoon; NOH, Hye-Mi et al. Functional ligands for improving anticancer drug therapy: current status and applications to drug delivery systems. Online. *Drug Delivery*. 2022, roč. 29, č. 1, s. 1959-1970. ISSN 1071-7544. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2089296>. [cit. 2024-02-22].

[25] SINGH, Ravi; SWANNER, Jessica; MIMS, Jade; AKMAN, Steven; FURDUI, Cristina et al. Differential cytotoxic and radiosensitizing effects of silver nanoparticles on triple-negative breast cancer and non-triple-negative breast cells. Online. *International Journal of Nanomedicine*. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/IJN.S80349>. [cit. 2024-02-22].

[26] SEARS, James; SWANNER, Jessica; FAHRENHOLTZ, Cale D; SNYDER, Christina; ROHDE, Monica et al. Combined Photothermal and Ionizing Radiation Sensitization of Triple-Negative Breast Cancer Using Triangular Silver Nanoparticles. Online. *International Journal of Nanomedicine*. 2021, roč. 16, s. 851-865. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/IJN.S296513>. [cit. 2024-02-22].

- [27] SHETAKE, NeenaGirish; BALLA, MuraliM.S; KUMAR, Amit a PANDEY, BadriNarain. Magnetic hyperthermia therapy: An emerging modality of cancer treatment in combination with radiotherapy. Online. *Journal of Radiation and Cancer Research*. 2016, roč. 7, č. 1. ISSN 2588-9273. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0973-0168.184606>. [cit. 2024-02-19].
- [28] CONDE, João; DORIA, Gonçalo a BAPTISTA, Pedro. Noble Metal Nanoparticles Applications in Cancer. Online. *Journal of Drug Delivery*. 2012, roč. 2012, s. 1-12. ISSN 2090-3014. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2012/751075>. [cit. 2024-02-22].
- [29] MATHUR, Prateek; JHA, Swati; RAMTEKE, Suman a JAIN, N. K. Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. Online. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2018, roč. 46, č. sup1, s. 115-126. ISSN 2169-1401. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1414825>. [cit. 2024-02-20].
- [30] LEE, Sang a JUN, Bong-Hyun. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, roč. 20, č. 4. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms20040865>. [cit. 2024-02-21].
- [31] ALOTAIBI, Areej M.; ALSALEH, Nasser B.; ALJASHAM, Alanoud T.; TAWFIK, Essam A.; ALMUTAIRI, Mohammed M. et al. Silver Nanoparticle-Based Combinations with Antimicrobial Agents against Antimicrobial-Resistant Clinical Isolates. Online. *Antibiotics*. 2022, roč. 11, č. 9. ISSN 2079-6382. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091219>. [cit. 2024-02-24].
- [32] TANG, Shaoheng a ZHENG, Jie. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects. Online. *Advanced Healthcare Materials*. 2018, roč. 7, č. 13. ISSN 2192-2640. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adhm.201701503>. [cit. 2024-02-23].
- [33] ZHANG, Shujun; LIN, Linghuang; HUANG, Xuanhao; LU, You-Guang; ZHENG, Da-Li et al. Antimicrobial Properties of Metal Nanoparticles and Their Oxide Materials and Their Applications in Oral Biology. Online. *Journal of Nanomaterials*. 2022, roč. 2022, s. 1-18. ISSN 1687-4129. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2022/2063265>. [cit. 2024-02-23].
- [34] QADRI, Shahnaz; ABDULREHMAN, Tahir; AZZI, Jamil; MANSOUR, Said a HAIK, Yousef. AgCuB nanoparticle eradicates intracellular *S. aureus* infection in bone cells: in vitro. Online. *Emergent Materials*. 2019, roč. 2, č. 2, s. 219-231. ISSN 2522-5731. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s42247-019-00035-7>. [cit. 2024-02-25].
- [35] QADRI, Shahnaz; ABDULREHMAN, Tahir; AZZI, Jamil; MANSOUR, Said a HAIK, Yousef. AgCuB nanoparticle eradicates intracellular *S. aureus* infection in bone cells: in vitro. Online. *Emergent Materials*. 2019, roč. 2, č. 2, s. 219-231. ISSN 2522-5731. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s42247-019-00035-7>. [cit. 2024-02-25].

- [36] SALLEH, Atiqah; NAOMI, Ruth; UTAMI, Nike Dewi; MOHAMMAD, Abdul Wahab; MAHMOUDI, Ebrahim et al. The Potential of Silver Nanoparticles for Antiviral and Antibacterial Applications: A Mechanism of Action. Online. *Nanomaterials*. 2020, roč. 10, č. 8. ISSN 2079-4991. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nano10081566>. [cit. 2024-02-24].
- [37] RUPARELIA, Jayesh P.; CHATTERJEE, Arup Kumar; DUTTAGUPTA, Siddhartha P. a MUKHERJI, Suparna. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Online. *Acta Biomaterialia*. 2008, roč. 4, č. 3, s. 707-716. ISSN 17427061. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>. [cit. 2024-02-21].
- [38] DAKAL, Tikam Chand; KUMAR, Anu; MAJUMDAR, Rita S. a YADAV, Vinod. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2016, roč. 7. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>. [cit. 2024-02-24].
- [39] PAL, Sukdeb; TAK, Yu Kyung a SONG, Joon Myong. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, roč. 73, č. 6, s. 1712-1720. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>. [cit. 2024-02-24].
- [40] ZHANG, Junhui; AHMADI, Maziar; FARGAS, Gemma; PERINKA, Nikola; REGUERA, Javier et al. Silver Nanoparticles for Conductive Inks: From Synthesis and Ink Formulation to Their Use in Printing Technologies. Online. *Metals*. 2022, roč. 12, č. 2. ISSN 2075-4701. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/met12020234>. [cit. 2024-03-18].
- [41] CHOI, Okkyoung a HU, Zhiqiang. Size Dependent and Reactive Oxygen Species Related Nanosilver Toxicity to Nitrifying Bacteria. Online. *Environmental Science & Technology*. 2008, roč. 42, č. 12, s. 4583-4588. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/es703238h>. [cit. 2024-02-24].
- [42] LI, Ju; RONG, Kaifeng; ZHAO, Huiping; LI, Fei; LU, Zhong et al. Highly Selective Antibacterial Activities of Silver Nanoparticles Against *Bacillus subtilis*. Online. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2013, roč. 13, č. 10, s. 6806-6813. ISSN 15334880. Dostupné z: <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7781>. [cit. 2024-02-24].
- [43] CHATTERJEE, Tanaya; CHATTERJEE, Barun K.; MAJUMDAR, Dipanwita a CHAKRABARTI, Pinak. Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2015, roč. 1850, č. 2, s. 299-306. ISSN 03044165. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.022>. [cit. 2024-02-24].
- [44] GOUYAU, Jimmy; DUVAL, Raphaël E.; BOUDIER, Ariane a LAMOUREUX, Emmanuel. Investigation of Nanoparticle Metallic Core

Antibacterial Activity: Gold and Silver Nanoparticles against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 4. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22041905>. [cit. 2024-02-24].

[45] PANÁČEK, Aleš; KVÍTEK, Libor; PRUCEK, Robert; KOLÁŘ, Milan; VEČEŘOVÁ, Renata et al. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. Online. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006, roč. 110, č. 33, s. 16248-16253. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jp063826h>. [cit. 2024-02-24].

[46] ABBASZADEGAN, Abbas; GHAHRAMANI, Yasamin; GHOLAMI, Ahmad; HEMMATEENEJAD, Bahram; DOROSTKAR, Samira et al. The Effect of Charge at the Surface of Silver Nanoparticles on Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: A Preliminary Study. Online. *Journal of Nanomaterials*. 2015, roč. 2015, s. 1-8. ISSN 1687-4110. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2015/720654>. [cit. 2024-02-23].

[47] GALDIERO, Stefania; FALANGA, Annarita; VITIELLO, Mariateresa; CANTISANI, Marco; MARRA, Veronica et al. Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents. Online. *Molecules*. 2011, roč. 16, č. 10, s. 8894-8918. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules16108894>. [cit. 2024-02-24].

[48] NAUMENKO, Krystyna; ZAHORODNIA, Svitlana; POP, Calin V. a RIZUN, Nodari. Antiviral activity of silver nanoparticles against the influenza A virus. Online. *Journal of Virus Eradication*. 2023, roč. 9, č. 2. ISSN 20556640. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jve.2023.100330>. [cit. 2024-02-24].

[49] SARKAR, Dr. Subhasish. Silver Nanoparticles with Bronchodilators Through Nebulisation to Treat COVID 19 Patients. Online. *Journal of Current Medical Research and Opinion*. 2020, roč. 3, č. 04. ISSN 2589-8779. Dostupné z: <https://doi.org/10.15520/jcmro.v3i04.276>. [cit. 2024-02-24].

[50] RAMAGE, Gordon; SAVILLE, Stephen P.; THOMAS, Derek P. a LÓPEZ-RIBOT, José L. Candida Biofilms: an Update. Online. *Eukaryotic Cell*. 2005, roč. 4, č. 4, s. 633-638. ISSN 1535-9778. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/EC.4.4.633-638.2005>. [cit. 2024-03-03].

[51] LARA, Humberto H.; ROMERO-URBINA, Dulce G.; PIERCE, Christopher; LOPEZ-RIBOT, Jose L.; ARELLANO-JIMÉNEZ, M. Josefina et al. Effect of silver nanoparticles on Candida albicans biofilms: an ultrastructural study. Online. *Journal of Nanobiotechnology*. 2015, roč. 13, č. 1. ISSN 1477-3155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0147-8>. [cit. 2024-03-03].

[52] PANÁČEK, Aleš; KOLÁŘ, Milan; VEČEŘOVÁ, Renata; PRUCEK, Robert; SOUKUPOVÁ, Jana et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against Candida spp. Online. *Biomaterials*. 2009, roč. 30, č. 31, s. 6333-6340. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.065>. [cit. 2024-03-17].

- [53] BRUNA, Tamara; MALDONADO-BRAVO, Francisca; JARA, Paul a CARO, Nelson. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 13. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22137202>. [cit. 2024-02-25].
- [54] KRAKAUER, Teresa. Inflammasomes, Autophagy, and Cell Death: The Trinity of Innate Host Defense against Intracellular Bacteria. Online. *Mediators of Inflammation*. 2019, roč. 2019, s. 1-10. ISSN 0962-9351. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2019/2471215>. [cit. 2024-03-07].
- [55] NANO, Francis E.; ZHANG, Na; COWLEY, Siobhán C.; KLOSE, Karl E.; CHEUNG, Karen K. M. et al. A Francisella tularensis Pathogenicity Island Required for Intramacrophage Growth. Online. *Journal of Bacteriology*. 2004, roč. 186, č. 19, s. 6430-6436. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JB.186.19.6430-6436.2004>. [cit. 2024-03-16].
- [56] VAN FURTH, R; COHN, ZA; HIRSCH, JG; HUMPHREY, JH; SPECTOR, WG et al. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. Online. *Bull World Health Organ*. Roč. 1972, č. 46 (6), s. 845-52. [cit. 2024-03-19].
- [57] FOLEY, Janet E. a NIETO, Nathan C. Tularemia. Online. *Veterinary Microbiology*. 2010, roč. 140, č. 3-4, s. 332-338. ISSN 03781135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.017>. [cit. 2024-03-11].
- [58] WHITMAN, William B. (ed.). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Online. Wiley, 2015. ISBN 9781118960608. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781118960608>. [cit. 2024-03-11].
- [59] SJÖSTEDT, ANDERS. Tularemia: History, Epidemiology, Pathogen Physiology, and Clinical Manifestations. Online. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007, roč. 1105, č. 1, s. 1-29. ISSN 0077-8923. Dostupné z: <https://doi.org/10.1196/annals.1409.009>. [cit. 2024-03-07].
- [60] FARLOW, Jason; WAGNER, David M.; DUKERICH, Meghan; STANLEY, Miles; CHU, May et al. Francisella tularensis in the United States. Online. *Emerging Infectious Diseases*. 2005, roč. 11, č. 12, s. 1835-1841. ISSN 1080-6040. Dostupné z: <https://doi.org/10.3201/eid1112.050728>. [cit. 2024-03-07].
- [61] CELLI, J. a ZAHRT, T. C. Mechanisms of Francisella tularensis Intracellular Pathogenesis. Online. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013, roč. 3, č. 4, s. a010314-a010314. ISSN 2157-1422. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010314>. [cit. 2024-03-07].
- [62] CONLAN, J. W. Francisella tularensis: A Red-blooded Pathogen. Online. *Journal of Infectious Diseases*. 2011, roč. 204, č. 1, s. 6-8. ISSN 0022-1899. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/infdis/jir224>. [cit. 2024-03-07].

- [63] PETERSEN, Jeannine M.; DENNIS, David T. a BEARD, C. Ben. Tularemia. Online. In: *Infectious Diseases*. Elsevier, 2017, 1085-1090.e1. ISBN 9780702062858. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00127-1>. [cit. 2024-03-11].
- [64] POTZ-BIEDERMANN, Christiane; SCHWENDEMANN, Lena; SCHRÖPPEL, Klaus; SÖNNICHSEN, Karsten; SCHMIDT, Diethard et al. Ulceroglandular tularemia. Online. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2011, roč. 9, č. 10, s. 806-808. ISSN 1610-0379. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2011.07670.x>. [cit. 2024-03-11].
- [65] KANTARDJIEV, T.; PADESHKI, P. a IVANOV, I. N. Diagnostic approaches for oculoglandular tularemia: advantages of PCR. Online. *British Journal of Ophthalmology*. 2007, roč. 91, č. 9, s. 1206-1208. ISSN 0007-1161. Dostupné z: <https://doi.org/10.1136/bjo.2007.117523>. [cit. 2024-03-11].
- [66] YENI, Derya Karataş; BÜYÜK, Fatih; ASHRAF, Asma a SHAH, M. Salah ud Din. Tularemia: a re-emerging tick-borne infectious disease. Online. *Folia Microbiologica*. 2021, roč. 66, č. 1, s. 1-14. ISSN 0015-5632. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00827-z>. [cit. 2024-03-11].
- [67] DEGABRIEL, Manon; VALEVA, Stanimira; BOISSET, Sandrine a HENRY, Thomas. Pathogenicity and virulence of Francisella tularensis. Online. *Virulence*. 2023, roč. 14, č. 1. ISSN 2150-5594. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2274638>. [cit. 2024-03-11].
- [68] NÜBEL, Ulrich; REISSBRODT, Rolf; WELLER, Annette; GRUNOW, Roland; PORSCH-ÖZCÜRÜMEZ, Mustafa et al. Population Structure of Francisella tularensis. Online. *Journal of Bacteriology*. 2006, roč. 188, č. 14, s. 5319-5324. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JB.01662-05>. [cit. 2024-03-11].
- [69] STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV (SZÚ). *Základní informace tularémie* [online]. 2019 [cit. 2024-03-11]. Dostupné z: <https://szu.cz/temata-zdravi-a-bezpecnosti/a-z-infekce/t/tularemie/zakladni-informace/>
- [70] EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. *Tularaemia Annual Epidemiological Report for 2019* [online]. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/tularaemia-annual-epidemiological-report-2019> [cit. 2024-03-11].
- [71] MAURIN, Max a PELLOUX, Isabelle. Francisella tularensis et la tularémie. Online. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2014, roč. 2014, č. 464, s. 31-35. ISSN 1773035X. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(14\)72572-9](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(14)72572-9). [cit. 2024-03-12].
- [72] Medicina Fluminensis [online]. 2016 (52.2), 211-216 [cit. 2024-03-12]. ISSN 1848-820X. Dostupné z: <https://hrcak.srce.hr/clanak/233761>
- [73] CHAMBERLAIN, Robert E. Evaluation of Live Tularemia Vaccine Prepared in a Chemically Defined Medium. Online. *Applied Microbiology*. 1965, roč. 13, č. 2,

s. 232-235. [cit. 2024-02-15]. ISSN 0003-6919. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/am.13.2.232-235.1965>.

[74] MARKOSSIAN, S, A GROSSMAN a K BRIMACOMBE, et. al. Cell Viability Assays. The Assay Guidance Manual [online]. 2004 [cit. 2023-11-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

[75] MING-GENE, Tu, Liang WEN-MIIN, Wu TAI-CHIN a Chen SAN-YUE. Evaluation of cytotoxicity of resin bonding materials toward human oral epithelial cells using three assay systems. Journal of Dental Sciences [online]. 2009, 178–186 [cit. 2023-09-03]. ISSN 2213-8862. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1991790209600246>

[76] MARKOWSKA, KATARZYNA; GRUDNIAK, ANNA MARIA; MILCZAREK, BARBARA a WOLSKA, KRYSZYNA IZABELLA. The Effect of Silver Nanoparticles on *Listeria monocytogenes* PCM2191 Peptidoglycan Metabolism and Cell Permeability. Online. Polish Journal of Microbiology. 2018, roč. 67, č. 3, s. 315-320. ISSN 2544-4646. Dostupné z: <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-037>. [cit. 2024-04-27].

[77] TĂBĂRAN, Alexandru-Flaviu; MATEA, Cristian Tudor; MOCAN, Teodora; TĂBĂRAN, Alexandra; MIHAIU, Marian et al. Silver Nanoparticles for the Therapy of Tuberculosis . Online. International Journal of Nanomedicine. 2020, roč. 15, s. 2231-2258. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/IJN.S241183>. [cit. 2024-04-27].

[78] MORONES, Jose Ruben; ELECHIGUERRA, Jose Luis; CAMACHO, Alejandra; HOLT, Katherine; KOURI, Juan B et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Online. Nanotechnology. 2005, roč. 16, č. 10, s. 2346-2353. ISSN 0957-4484. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>. [cit. 2024-04-27].

[79] SELIM, A.; ELHAIG, M.M.; TAHA, S.A. a NASR, E.A. Antibacterial activity of silver nanoparticles against field and reference strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* and multiple-drug-resistant tuberculosis strains. Online. Revue Scientifique et Technique de l'OIE. 2018, roč. 37, č. 3, s. 823-830. ISSN 0253-1933. Dostupné z: <https://doi.org/10.20506/rst.37.3.2888>. [cit. 2024-04-27].

[80] GLIGA, Anda R; SKOGLUND, Sara; ODNEVALL WALLINDER, Inger; FADEEL, Bengt a KARLSSON, Hanna L. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. Online. Particle and Fibre Toxicology. 2014, roč. 11, č. 1. ISSN 1743-8977. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-11>. [cit. 2024-04-27].

[81] JIRAVOVA, Jana; TOMANKOVA, Katerina Barton; HARVANOVA, Monika; MALINA, Lukas; MALOHLAVA, Jakub et al. The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells in vitro. Online. Food and Chemical Toxicology. 2016, roč. 96, s. 50-61. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.015>. [cit. 2024-04-27].

- [82] DURÁN, Nelson; DURÁN, Marcela; DE JESUS, Marcelo Bispo; SEABRA, Amedea B.; FÁVARO, Wagner J. et al. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. Online. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2016, roč. 12, č. 3, s. 789-799. ISSN 15499634. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>. [cit. 2024-04-27].
- [83] GRAVES, Joseph L.; TAJKARIMI, Mehrdad; CUNNINGHAM, Quincy; CAMPBELL, Adero; NONGA, Herve et al. Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. Online. *Frontiers in Genetics*. 2015, roč. 6. ISSN 1664-8021. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00042>. [cit. 2024-04-27].
- [84] STERLING, Jose P. Silver-resistance, allergy, and blue skin: Truth or urban legend? Online. *Burns*. 2014, roč. 40, s. S19-S23. ISSN 03054179. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.10.007>. [cit. 2024-04-27].
- [85] PANÁČEK, Aleš; KVÍTEK, Libor; SMÉKALOVÁ, Monika; VEČEŘOVÁ, Renata; KOLÁŘ, Milan et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. Online. *Nature Nanotechnology*. 2018, roč. 13, č. 1, s. 65-71. ISSN 1748-3387. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0013-y>. [cit. 2024-04-27].
- [86] PETIT, Thomas J.P. a LEBRETON, Alice. Adaptations of intracellular bacteria to vacuolar or cytosolic niches. Online. *Trends in Microbiology*. 2022, roč. 30, č. 8. ISSN 0966842X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.03.001>. [cit. 2024-05-12].
- [87] CHONG, Audrey a CELLI, Jean. The *Francisella* Intracellular Life Cycle: Toward Molecular Mechanisms of Intracellular Survival and Proliferation. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2010, roč. 1. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00138>. [cit. 2024-05-12].