

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Doktorský studijní program
Lékařská mikrobiologie**

Fotodynamická antimikrobní terapie

Photodynamic antimicrobial therapy

MUDr. Lenka Ryšková

Školitel: Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.

Školitel konzultant: Doc. MUDr. Radovan Slezák, CSc.

Hradec Králové, 20.června 2014

Obhajoba dne:
(doplň studijní odd.)

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 20. června 2014

Poděkování

Dovoluji si poděkovat panu Doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc., přednostovi Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a mému školiteli, za podporu a všestrannou pomoc při mé práci. Zároveň chci poděkovat za totéž mému spoluškoliteli Doc. MUDr. Radovanu Slezákovi, CSs.

Současně děkuji paní Ing. Marii Karáskové, Ing. Janu Rakušanovi a Ing. Jiřímu Černému z CCM (bývalá VÚOS), kteří se zasloužili o vývoj a přípravu ftalocyaninových derivátů, za nenahraditelnou pomoc, cenné rady a spolupráci. Tato spolupráce vznikla na podkladě řešení projektu č. 2B06104, Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy: Fotosenzibilizátory v zubním lékařství.

Moje poděkování patří i laborantkám Lékařské fakulty při Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní za jejich podíl při této práci.

Za statistické zpracování výsledků mé práce děkuji paní RNDr. Evě Čermákové z Výpočetního střediska Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

1	Obsah	
1	Obsah	4
2	Seznam použitých zkratk	7
3	Úvod do problematiky	8
3.1	Fotodynamická terapie	8
3.2	Mechanismus fotoinaktivace	9
3.3	Fotosenzitivní látky	10
3.4	Zdroje světla, lasery	13
3.5	Vliv prostředí	14
3.6	Testované mikroorganismy	14
3.7	Testování fotoinaktivační schopnosti	18
3.8	Možnosti klinického využití	19
3.9	Komplikace u PDT	21
4	Cíl práce	22
5	Materiál a metodika	23
5.1	Testované ftalocyaniny	23
5.2	Testované kmeny bakterií a kvasinek	26
5.3	Laser	26
5.4	Testování fotoinaktivační schopnosti ftalocyaninů	27
5.4.1	Příprava bakteriálních kmenů	27
5.4.2	Příprava ftalocyaninů	28
5.4.3	Inkubace s PS	28
5.4.4	Ozařování laserem	28
5.4.5	Hodnocení baktericidního účinku	28
5.5	Testování vybraných ftalocyaninů na nosiči	29
6	Výsledky	30

6.1	Výsledky skriningového testování	30
6.1.1	Pc1 - Amonná sůl disulfonovaného ftalocyaninu zinku	31
6.1.2	Pc2 - Sulfonovaný tetramethylammóniumhydroxyhlinitý ftalocyanin	33
6.1.3	Pc3 - sulfonovaný [(3-diethylammonium)-propylsulfonamid]ftalocyaninu zinku	35
6.1.4	Pc4 - sodná sůl disulfonovaného ftalocyaninu hliníku	37
6.1.5	Pc5 - Sulfonovaný bis(N-2-hydroxyethyl)-aminoethylsulfonamid hlinitého ftalocyaninu	39
6.1.6	Pc6 - tetrakis(trimethylammónium)-jodid zinečnatého ftalocyaninu	41
6.1.7	Pc7 - tetramethylenpyridinium chlorid hydroxyhlinitého ftalocyaninu	43
6.1.8	Pc8 - Amonná sůl trisulfonovaného ftalocyaninu zinku	45
6.1.9	Pc9 - tetrakis(N-methylpyridium -3-oxy)-jodid zinečnatého ftalocyaninu	47
6.1.10	Pc10 - Sodná sůl tetrasulfonovaného bezkovového ftalocyaninu	49
6.1.11	Pc11 - Tetrajodid tetrakis(4-N,N,N-trimethylammóniumfenylazo)zinečnatý ftalocyanin	51
6.1.12	Pc12 - Tetrakis(diethylfosfonato)zinečnatý ftalocyanin	53
6.1.13	Pc13 - Tetrakis(3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-D-glukosyl)zinečnatý ftalocyanin	55
6.1.14	Pc14 - Tetrakis(D-glukopyranosyl)zinečnatý ftalocyanin	57
6.1.15	Pc15 - Sodná sůl trisulfonovaného ftalocyaninu hliníku	59
6.2	Výsledky dalších testů vybraných ftalocyaninů	63
6.2.1	Pc3 - sulfonovaný [(3-diethylammonium)-propylsulfonamid]ftalocyaninu zinku	65
6.2.2	Pc7 - tetramethylenpyridinium chlorid hydroxyhlinitého ftalocyaninu	68
6.3	Výsledky testování ftalocyaninů na nosiči	71
7	Diskuse	73
8	Závěr	78

9	Seznam použité literatury	80
10	Seznam obrázků, tabulek a grafů	89

2 Seznam použitých zkratk

CFU – colony forming unit (v textu počet životaschopných bakterií)

EDTA – kyselina ethylendiaminotetraoctová

FTC – ftalocyanin

ESBL – širokospektrá betalaktamáza

HPLC - vysoce účinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)

HPMC - hydroxypropylmethylcelulóza

MRSA– methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

PACT – fotodynamická antimikrobní terapie

PBS – fosfátový pufr

PDT – fotodynamická terapie

Pc – derivát ftalocyaninu

PS – fotosenzitivní látka

VUOS – Výzkumný ústav organických syntéz a.s.

3 Úvod do problematiky

3.1 Fotodynamická terapie

Při fotodynamické terapii se využívá tzv. fotodynamický jev, kdy fotosenzitivní látka reaguje na expozici světlem vznikem singletového kyslíku a volných kyslíkových radikálů a dochází k následnému letálnímu poškození buňky. Tento jev poprvé popsal Oscar Raab a spol. už v roce 1890, když zaznamenal toxicitu, závislou na světle, u akridinové oranžičky proti prvoku *Paramecium caudatum*. Praktické pokusy s léčbou u člověka zahájil už v roce 1903 prof. von Tappeiner, který také zavedl pojem fotodynamická reakce. Používal zejména 5% eosin nebo erythrosin při léčbě některých kožních afekcí, ale pro nevelkou úspěšnost a zejména závažné vedlejší účinky byla léčba zastavena. Znovu se začala studovat možnost praktického využití fotodynamického jevu až v druhé polovině 20. století, nejprve v sedmdesátých letech v oblasti terapie tumorů a až v osmdesátých a devadesátých letech 20. století pro oblast antimikrobní léčby (1).

Fotodynamická protinádorová terapie (PDT) je založena na předpokladu, že fotosenzitivní látka (PS) podaná celkově se přednostně vychytává v rychle rostoucí tumorózní tkáni a po jejím ozáření dochází v důsledku vzniku reaktivních cytotoxických produktů k následné destrukci nádorových buněk. Limitujícím faktorem je lokalizace tumoru a možnost jeho cíleného ozáření. První úspěšné využití PDT bylo popsáno při terapii kožních tumorů, jako fotosenzitivní látka byl použit eosin, který se akumuluje v rychle rostoucích nádorových buňkách (2, 3). Prvním oficiálně schváleným senzitivizátorem pro PDT byl derivát hematoporfyrinu s obchodním názvem Photofrin. V současné době se klinicky využívají porfyrinové deriváty (Photofrin, Foscan, Visudyne), které byly schváleny pro použití u onkologických pacientů v USA, Kanadě, v Evropské unii a Japonsku (pro terapii karcinomu močového měchýře, plic, jícnu, žaludku, hlavy a krku).

Ačkoliv porfyrinové preparáty jsou efektivní při PDT, je známo, že se po jejich celkovém podání vyskytují nežádoucí účinky typu prolongované kožní fotosenzitivity (3). V kožním lékařství je PDT využíváno především pro terapii bazaliomů, prekancerózy m. Bowen a aktinické keratózy, léčivé přípravky jsou ve formě masti nebo gelu obsahující kyselinu deltaaminolevulovou (jako prekurzor fotosenzitivního protoporfyrinu IX). Aplikace tohoto postupu se také využívá v léčbě chronických kožních zánětů - acné vulgaris, psoriasis, mycosis fungoides (4). V očním lékařství je možno PDT využít v léčbě věkem podmíněné

okulární degenerace při degenerativních změnách na sítnici, jako fotosenzitivní látka se používá porfyrinový derivát verteporfin - Visudine (5).

V osmdesátých a devadesátých letech se začalo zvažovat využití PDT v antimikrobní terapii – v souvislosti se zvyšující se rezistencí patogenních mikroorganismů k antibiotikům a následnou nutností hledat alternativní přístupy při léčbě infekčních onemocnění. Počáteční práce na tomto poli ukázaly, že fotosenzitivní látky po ovlivnění světlem vykazují významný antimikrobní efekt a jsou mnohem více toxické pro mikroby než pro humánní buňky (6, 7, 8). Fotodynamická antimikrobní terapie (PACT) tak může představovat lokální, neinvazivní techniku, která by se mohla stát efektivní alternativou k používání antibiotik a antiseptik v léčbě lokálních infekcí. Výhodou postupu založeného na principu cílené aplikace fotosenzitivní látky do místa infekčního procesu a cíleného ozáření, je minimalizace rizika poškození fyziologické mikroflóry a hostitelských buněk mimo léčená místa. Limitem této metody je stejně jako u protinádorové fotodynamické terapie dosah paprsků světelného zdroje a omezení jen na lokálního použití PS kvůli vzniku systémové kožní fotosenzibilizace po celkovém podání PS (3).

Fotoinaktivace se zatím ve větší míře studuje in vitro v laboratorních podmínkách, ale objevují se práce i na zvířecích modelech (9, 10). Klinicky se jeví perspektivní využití PACT v terapii infikovaných ran a popálenin, abscesů, dále povrchových kožních a slizničních hnisavých afekcí. Ve stomatologii se předpokládá její uplatnění při komplexní léčbě chorob souvisejících s přítomností dentálního plaku - parodontitidy a povrchového zubního kazu (11, 12). V literatuře se objevují i další příklady využití, např. u pacientů s infekcí v terénu diabetické nohy (13).

Za perspektivní se považuje využití fotoinaktivace v oblasti sterilizace transfúzních přípravků, při úpravě a čištění odpadních vod. Intenzivní výzkum probíhal také v oblasti využití fotosenzitivních látek jako pesticidů, především k hubení hmyzu napadajícího hospodářské plodiny (14).

3.2 Mechanismus fotoinaktivace

Fotodynamická terapie se dá definovat jako eradikace cílových mikrobiálních buněk v důsledku působení světla na fotosenzitivní látku (15). Samotná fotosenzitivní látka obvykle nemá žádný nebo jen zanedbatelný baktericidní efekt, ale po jejím ozáření světlem příslušné vlnové délky (při tom dochází k absorpci fotonu fotosenzitivní látkou) se ze základního klidového stavu dostává do nestabilního, excitovaného stádia, ve kterém může dojít po reakci se substrátovými molekulami prostředí v přítomnosti kyslíku ke vzniku jeho

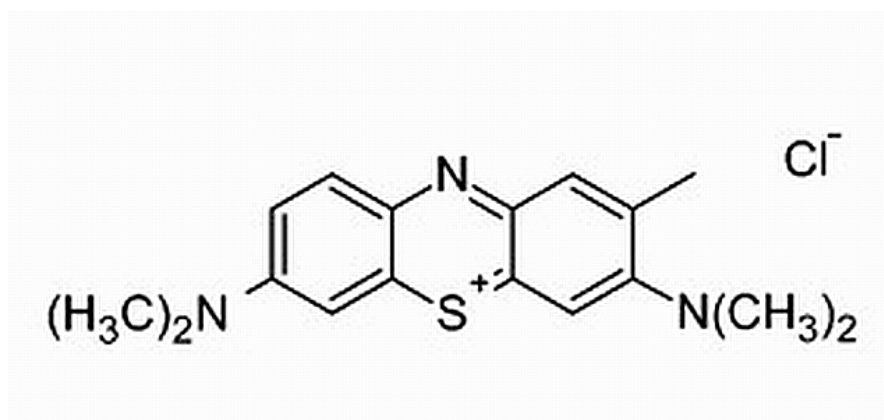
reaktivních cytotoxických produktů – hydroxylového radikálu OH^\cdot , superoxidového radikálu nebo singletového kyslíku $^1\text{O}_2$ (molekulární kyslík O_2 v základním stavu obsahuje 6 valenčních elektronů, z nichž 2 jsou nepárové, po přijetí určitého množství energie dojde v elektronicky excitovaném stavu ke spárování těchto elektronů a vzniku singletového kyslíku). Rozlišují se dva typy interakce excitované PS s biomolekulami prostředí. Při fotochemické reakci I. typu, kdy dochází k přenosu elektronu, se vytvářejí volné radikály a radikálové ionty. Ty mohou okamžitě reagovat s kyslíkem za vzniku reaktivních forem kyslíku. Mechanismus II. typu, kdy dochází k přenosu energie, vede k tvorbě vysoce reaktivního singletového kyslíku, jehož přímý oxidační účinek poškozuje biomolekuly, včetně lipidových složek buněčných membrán. Oba mechanismy mohou při PDT probíhat současně, ale fotoinaktivační efekt způsobuje především singletový kyslík jako energeticky nejbohatší a a vysoce reaktivní forma molekulárního kyslíku (16, 17). Singletový kyslík má velmi krátký poločas rozpadu (řádově nanosekundy) a difúzi omezenou na vzdálenost do 100 nm, z toho vyplývá, že pro úspěšnou fotoinaktivaci je žádoucí akumulace fotosenzitivní látky v bakterii nebo jejím blízkém okolí. K letálnímu poškození buňky může dojít dvěma způsoby: destrukcí DNA nebo poškozením cytoplazmatické membrány, které pak dovoluje únik obsahu buňky ven a zároveň inaktivuje membránové transportní systémy (18).

3.3 Fotosenzitivní látky

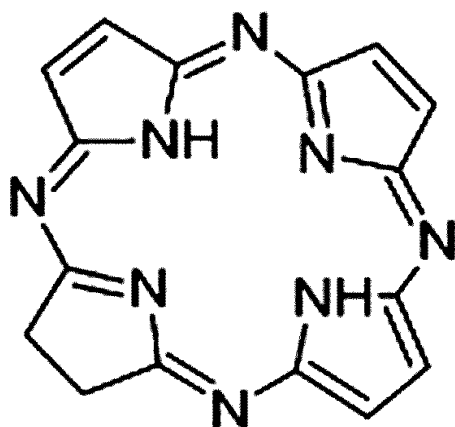
Proces fotoinaktivace mikrobu je závislý na fotosenzitivní látce a na zdroji světla. Fotosenzitivní látka vhodná pro PDT musí splňovat určitá kritéria: dostatečně vysoký kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$ (19), fotostabilitu látky, nízkou toxicitu v nepřítomnosti ozáření (tzv. dark toxicity), maximální absorpci světla v oblasti vlnové délky 600 – 800 nm (oblast terapeutického okna, které umožňuje průnik do tkáně) a naopak nízkou absorpci v oblasti spektrálního maxima denního světla 400–600 nm z důvodu možné fotosenzitizace kůže (absorpce světla melaninem a hemoglobinem). Důležitá je také její molekulární struktura a náboj (20).

Je známo mnoho přírodních i syntetických fotosenzitivních látek, typicky se jedná o barviva. Fotosenzitivní látky jsou obvykle aromatické nebo heterocyklické molekuly, patří mezi ně fenothiaziny - toluidinová (viz Obr. č. 1) a methylenová modř, porfyriny - hematoporfyrin, kyselina deltaaminolevulová, (viz. Obr. č. 2), xanteny (bengálská červeň), psoraleny, chloriny – chlorin (e6), deriváty chlorinu s poly-L-lysinem a polyetyleniminem,

ftalocyaniny (viz Obr. č. 3) – např. disulfonovaný ftalocyanin hliníku, disulfonovaný ftalocyanin zinku.

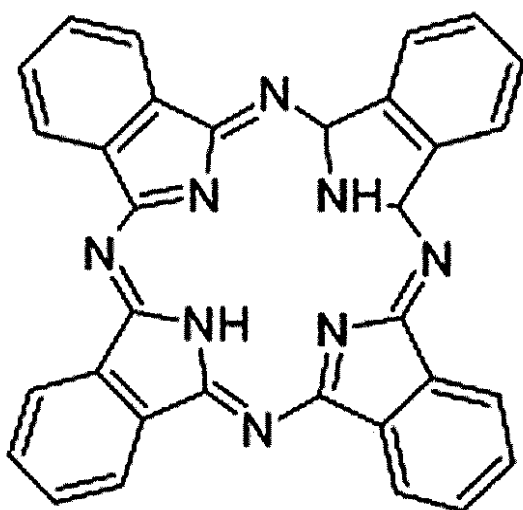


Obr. č.1. Toluidinová modř



Obr.č.2. Základní struktura porfyriu

Ftalocyaniny jsou heterocyklické sloučeniny skládající se ze čtyř benzindolových jader spojených dusíkovými můstky (chemicky tetrabenzotetraazaporfyriny), některé jejich deriváty se používají jako barviva do tiskáren (modrá barva), nátěrových látek nebo plastů. Jsou to účinné fotosenzitivní látky, po jejich ozáření se vytváří velké množství singletového kyslíku (jsou schopné zůstat delší dobu v excitovaném stavu), větší než při použití standardních fotosenzitivních látek jako je methylenová nebo toluidinová modř. Navíc jsou poměrně odolné vůči chemické a fotochemické degradaci. Absorbují světlo s vlnovou délkou 660 - 700 nm blížíící se infračervenému světlu.



Obr.č.3. Základní struktura ftalocyaninu

Efekt ftalocyaninů byl zatím studován v souvislosti s dekontaminací krevních produktů. Výhodné je jejich absorpční maximum při vlnové délce 600 - 700 nm, zatímco absorpce erytrocytů je při této vlnové délce minimální a tudíž riziko jejich potencionálního poškození nízké. Slibné jsou i výsledky z experimentálních studií zjišťujících působení ftalocyaninů při PDT tumorů. Oproti první generaci porfyrinů, prokazovaly vyšší účinek při testech na zvířatech v rámci protinádorové terapie, včetně menšího výskytu nežádoucích účinků (21). Antimikrobní vlastnosti ftalocyaninů při PACT jsou zatím ve fázi studia v podmínkách in vitro.

Důležitým faktorem ovlivňujícím účinnost konkrétní PS je tedy její schopnost proniknout do cílového mikroorganismu, velikost absorpce světla určité vlnové délky a její kapacita generovat reaktivní cytotoxické kyslíkové produkty (22).

K PACT se nejdříve začala používat barviva typu akridinová oranž, bengálská červeň, toluidinová a methylenová modř (tzv. fotosenzibilizátory 1. generace). Později byl testován antimikrobní efekt dalších fotosenzitivních látek (porfyriny, chloriny, ftalocyaniny). Bylo zjištěno, že látky jako bengálská červeň, akridinová oranž a porfyriny užívané při PDT po aktivaci světlem působí dobře na grampozitivní mikroby, ale jejich efekt na gramnegativní mikroby je jen částečný (6). Rozdíl v účinku je vysvětlován rozdílnou strukturou buněčné stěny. Stěna grampozitivních bakterií je tvořena poměrně propustnou peptidoglykanovou vrstvou, zatímco ve vnější stěně gramnegativních bakterií je záporně nabitý lipopolysacharid,

a anionické PS (což je většina klasických fotosenzitizérů) nejsou schopné přes něj penetrovat. Při fotoinaktivaci gramnegativních buněk se uplatňují spíše PS s polykationtovou molekulární strukturou – přirozenou nebo uměle vytvořenou navázáním kladně nabitého řetězce. Tyto látky pak mají schopnost lépe se vázat a pronikat přes záporně nabitý lipopolysacharid do gramnegativních bakteriálních buněk (23, 24, 25). Fenothiazinové deriváty (methylenová a toluidinová modř) jsou přirozeně kationické látky schopné fotoinaktivovat široké spektrum bakterií. Toluidinová modř vykazuje větší antibakteriální efekt vůči gramnegativním bakteriím než methylenová modř. Ftalocyaniny a porfyriny mohou být transformovány mezi kationické látky navázáním pozitivně nabitého postranního řetězce na jejich tetrapyrrolové nebo tetraazaindolové jádro. Tyto skupiny fotosenzitivních látek v současné době představují PS vhodné pro využití při PACT. Proto probíhá výzkum na objevení nových účinných PS a ftalocyaniny jsou v tomto ohledu slibnou skupinou (26). Ftalocyaniny jsou efektivní fotosenzitivní látky, po jejich ozáření vzniká velké množství singlet kyslíku, FTC jsou odolné vůči chemické i fotochemické degradaci. Skládají se z tetrapyrrolového jádra s 16 periferními pozicemi, které mohou být vhodně substituovány.

3.4 Zdroje světla, lasery

Neméně významný pro fotoinaktivaci je zdroj světla a dávka světla aplikovaná při fotoinaktivaci. Vlnová délka vyzařovaných paprsků by měla být co nejbližší absorpčního maxima fotosenzitivní látky.

K aktivaci fotosenzitivních látek je nutná expozice viditelnému světlu ve specifické vlnové délce. Většina PS je aktivována červeným světlem v rozsahu 630 – 700 nm, to odpovídá průniku světelného paprsku do tkáně zhruba do hloubky 0,5 - 1,5 cm, což zároveň odpovídá limitu pro terapeutický efekt PDT. Technicky je možné využít různé zdroje světla, nejvíc se osvědčily lasery a lampy se schopností většího výdeje světelné energie, zdroje vybavené LED (světelné diody). Lasery jsou přístroje schopné generovat monochromatický světelný paprsek o určité energii, podle velikosti vydané světelné energie se rozdělují na high-power a low-power lasery. Je známo, že při použití high-power laserů může docházet k letálnímu antimikrobnímu efektu už jen v důsledku samotného ozáření. V práci Dostálové a kol. (27) je popisován silný antibakteriální efekt při použití Er:YAG laseru při ošetření kořenového kanálku, ale je zdůrazněna nutnost dodržení přesného množství aplikované světelné energie. Při použití podprahových dávek nedochází k baktericidnímu efektu, naproti tomu nežádoucí komplikací při užití vyšší dávky energie je poškození struktury kořenového kanálku. Pro ozařování fotosenzitivních látek se při PACT využívají low-power lasery (je

důležité působit pouze na fotosenzitivní látku a minimalizovat tak nežádoucí poškození okolní tkáně). Fotoinaktivace bakterií je dosaženo už dávkami světla v řádu mW, ozařování bakteriální kultury bez přítomnosti PS nemá žádný vliv na životaschopnost bakteriálních buněk.

3.5 Vliv prostředí

Vlastní proces fotoinaktivace je také ovlivněn prostředím, ve kterém probíhá. Přítomnost krve, slin nebo séra poskytuje bakteriím určitou ochranu před fotoinaktivací (28, 29). Pravděpodobně je to způsobeno přítomností bílkovin, které mohou absorbovat fotony světla a tím snížit jejich množství pro interakci s PS a potažmo i množství vzniklého singlet kyslíku. Bílkoviny také mohou vyvazovat určitou frakci PS a zmenšit tak počet molekul PS navázaných na cílové bakteriální buňky. Bylo prokázáno, že vazba PS na cílové buňky je 5× menší v séru (pro větší obsah bílkovin) než ve slinách (30). Vliv na rozsah letálního účinku fotoinaktivace má i pH prostředí. Optimální je prostředí s neutrálním pH, výkyvy na obě strany snižují efekt fotoinaktivace (31).

3.6 Testované mikroorganismy

Možnost fotoinaktivovat bakterie v rámci PACT byla již mnohokrát experimentálně prokázána. V těchto pracech byly při pokusech použity kmeny různých bakterií: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* v práci Tegose a kol. (32), *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans* v práci Rovaldiho a kol. (33), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* v práci Gada a kol. (29), *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* v práci Kömerika a kol. (22), MRSA, EMRSA, *Streptococcus sanguinis* v práci Embletona a kol. (34).

Dalším potenciálním cílem PACT jsou mikroskopické houby, včetně kvasinky *Candida albicans* (28, 32). Kvasinky mají přirozeně vyšší rezistenci k PACT v důsledku přítomnosti jaderné membrány, která představuje další bariéru pro penetraci PS k cílové struktuře. K potřebnému účinku bylo nutné použít vyšší koncentraci PS a větší dávku světla. Objevily se rovněž práce s vláknitou houbou *Aspergillus fumigatus* (35).

Experimentálně byla také opakovaně prokázána možnost efektivně fotoinaktivovat virové částice – volné i intracelulárně uložené, pokusy byly prováděny např. s HIV (36),

s virem chřipky A (37). Výzkum probíhá v oblasti PACT u kožních a slizničních herpetických afekcí (38, 39) a také, úspěšně, v terapii anogenitálních papillomatóz – afekcí způsobených humánními papilomaviry (40). Fotoinaktivace virů se v praxi využívá už nyní v některých zemích k eliminaci mikrobů (především virů – HIV, původců virových hepatitid, CMV) pomocí methylenové modři z dárcovské krve a krevních produktů ve speciálních boxech (41).

V posledních letech se také začíná studovat možnost fotoinaktivace prvoků, např. u promastigotních a amastigotních stádií *Leishmania amazonensis* v laboratorních podmínkách (42).

Tab. č. 1. Přehled fotosenzitivních látek a mikroorganismů testovaných pro PACT

Testovaný mikroorganismus	Fotosenzitivní látka	Autor
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Chlorin (e6), Methylenová modř	Gad a kol. (29)
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Chlorin (e6)	Tegos a kol. (32)
MRSA (methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>), <i>Streptococcus sanguis</i>	Chlorin (e6)	Embleton a kol. (34)
MRSA	Ftalocyaniny	Griffiths a kol. (43) Soncin a kol. (44)
<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Bacteroides forsythus</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Campylobacter rectus</i> , <i>Eikenella corrodens</i> , <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , <i>Actinomyces viscosus</i> , <i>Str. sobrinus</i> , <i>Str. mitis</i> , <i>Str. oralis</i> , <i>Str. mutans</i>	Porfyriny	Rovaldi a kol. (33)
<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Actinomyces viscosus</i>	Ftalocyaniny	Burns a kol. (45)
<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Ftalocyaniny	Wilson a kol. (46)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Toluidinová modř	Kömerik a kol. (47)
<i>Escherichia coli</i>	Ftalocyaniny	Bertoloni a kol. (48) Minnock a kol. (49) Lacey a kol. (50)

<i>Enterococcus</i> sp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i>	Ftalocyaniny	Minnock a kol. (51)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ftalocyaniny Toluidinová modř	Wilson a kol. (52) Kömerik a kol. (22)
<i>Helicobacter pylori</i>	Porfyriny	Hamblin a kol. (53)
<i>Candida albicans</i>	Ftalocyaniny Toluidinová modř	Chiti a kol. (28) Donnelly a kol. (54)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Porfyriny	Friedberg a kol. (35)
<i>Plasmodium falciparum</i>	Ftalocyaniny	Lustigman et al. (55)
<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	Ftalocyaniny	Ferro et al. (56)

Byl zaznamenán signifikantní rozdíl v účinnosti PACT při fotoinaktivaci grampozitivních a gramnegativních bakterií. Grampozitivní bakterie byly k fotoinaktivaci poměrně citlivé, antibakteriální efekt byl dosažen při fotoinaktivaci zprostředkované fotosenzitivními látkami s rozdílnou chemickou strukturou (účinné byly kladně nabitě, záporně nabitě i neutrální fotosenzitivní látky). Gramnegativní bakterie byly k fotoinaktivaci více rezistentní, u řady druhů účinněji odolávající letálnímu poškození než grampozitivní bakterie (22, 57). Tento rozdíl je vysvětlován rozdílnou strukturou buněčného obalu. U grampozitivních bakterií na fosfolipidovou vrstvu nasedá poměrně propustný vnější peptidoglykanový plášť, který umožňuje průnik dostatečného množství fotosenzitivní látky k cytoplazmatické membráně, cílovému místu PACT. Ztluštění stěny u MRSA (methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*) nebo VRE (vankomycin rezistentní enterokoky) sice limituje penetraci antibiotik, antiseptik a dezinfekčních prostředků, ale zatím nebylo prokázáno snížení účinnosti PACT (58). Gramnegativní bakterie mají nad peptidoglykanovou vrstvou vnější membránu tvořenou fosfolipidovou dvojvrstvou, která je normálně jen málo propustná pro velké a hydrofobní molekuly. Záporně nabitě PS nejsou schopné penetrovat přes lipopolysacharid, ale mohou být částečně efektivní ve vyšší koncentraci, kdy vzniká větší množství singletového kyslíku v těsné blízkosti bakteriálních buněk. Citlivost gramnegativních buněk k fotoinaktivaci se zvyšuje použitím PS s polykationtovou molekulární strukturou – přirozenou nebo uměle vytvořenou navázáním kladně nabitého řetězce (mají schopnost lépe se vázat a pronikat přes záporně nabitý lipopolysacharid do gramnegativních bakteriálních buněk). Kationické PS dokáží inaktivovat širší spektrum bakteriálních druhů než neutrální nebo anionické PS, v mikromolární koncentraci mohou snížit množství bakteriální populace o 4-5 řádů po inkubaci do 5-10

minut a ozáření dávkou okolo 50 mW/cm². Působí účinně i proti bakteriálním kmenům rezistentním k antibiotikům a bakteriálním kmenům rostoucím v biofilmu (59, 60, 61). Citlivost gramnegativních bakterií k fotoinaktivaci se také může zvýšit přidáním látek jako je EDTA (kyselina ethylendiaminotetraoctová) nebo polymyxin B, které zvyšují permeabilitu vnější stěny gramnegativních bakterií uvolněním až 50% lipopolysacharidu (48, 50, 62). Nicméně některé bakteriální druhy (např. *Burkholderia cepacia*, *Proteus mirabilis*) jsou přirozeně rezistentní ke kationtovým strukturám, což může snižovat efekt inaktivace zprostředkované kladně nabitými PS. Navíc se objevila práce Makely a kol. (63), ve které se popisuje záchyt kmene *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vykazující nízký stupeň rezistence ke kationtovým strukturám – lipopolysacharid tohoto kmene měl v porovnání s citlivými kmeny celkově snížený záporný náboj.

V rámci studia PACT na různých bakteriálních kmenech bylo zjištěno, že existuje různorodá skupina bakterií, na kterou působí inaktivačně již samotné ozáření světlem určité vlnové délky i bez přítomnosti fotosenzitivní látky. Podrobnou analýzou těchto bakteriálních kmenů bylo prokázáno, že jejich fotosenzitivita je dána akumulací přirozeně vzniklých porfyrinů uvnitř bakteriálního těla, především se jednalo o prekurzory vznikající při syntéze hematoporfyrinů (53). Do této skupiny patří především černě pigmentované druhy anaerobů *Porphyromonas* sp. a *Prevotella* sp., u kterých je akumulace porfyrinů, a tedy fotosenzitivita, závislá na podmínkách vnějšího prostředí. U bakteriálních druhů *Propionibacterium acnes* a *Helicobacter pylori* je schopnost akumulovat porfyriny prokazatelná trvale. Poznatky o bakteriích přirozeně produkujících fotoaktivní porfyriny jsou dosud spíše roztráštěné a vysvětlení příčin tohoto jevu je zatím neznámé.

Z dostupné literatury vyplývá, že v průběhu PACT jsou zabíjeny stejně účinně divoké i multirezistentní bakteriální kmeny – opakovaně to bylo prokázáno především v experimentech s bakteriálními kmeny MRSA a *Pseudomonas aeruginosa*. Faktem je, že vznik rezistence k fotochemické destrukci mikrobů zprostředkované singletovým kyslíkem a dalšími reaktivními cytotoxickými produkty je vysoce nepravděpodobný (jde o přirozený mechanismus nitrobuněčného zabíjení) a zatím se pouze debatuje o teoretické možnosti jejího vzniku. Nicméně byla in vitro prokázána schopnost bakterie vypudit efluxním mechanismem molekuly derivátů fenothiazinu - methylenovou modř a toluidinovou modř (64). Tyto látky se staly substrátem pro efluxní pumpy - NorA u *S. aureus*, AcrAB-TolC u *E. coli* a MexAB-OprM u *P. aeruginosa*. Zároveň se podařilo prokázat, že inhibitory efluxní pumpy dokážou výrazně zlepšit výsledek při PDT zprostředkované fenothiaziny (65), jako inhibitor byl použit alkaloid reserpin. Dále by teoreticky mohlo dojít ke snížení citlivosti bakterií v důsledku

snížení propustnosti bakteriální stěny pro PS. Stejný mechanismus se uplatňuje při vzniku rezistence bakterií k antiseptikům nebo antibiotikům.

3.7 Testování fotoinaktivační schopnosti

Většina poznatků o fotodynamické inaktivaci vychází především z výsledků *in vitro* studia v laboratorních podmínkách.

Laboratorní testy se provádějí obvykle na planktonických kulturách, někteří autoři se pokusili o ověření fotoinaktivace bakterií v biofilmu. Bakterie v biofilmu mají jiný fenotyp, rostou pomaleji, obecně jsou rezistentnější k zevním vlivům (66). Uvádí se, že jsou až 1000-krát méně citlivé k působení antimikrobních látek ve srovnání s planktonickými kulturami (67). Biofilm se významně uplatňuje v patogenezi onemocnění v dutině ústní související s nahromaděním dentálního plaku, u chronické infekce u pacientů s cystickou fibrózou, u chronických infekcí ran, močových cest a u infekcí spojených s přítomností implantovaného cizorodého materiálu (68).

Wood (69) a Senda (60) při pokusu na uměle připraveném dentálním plaku exponovaného kationickému derivátu ftalocyaninu prokázali, že při PDT došlo vedle inaktivace bakterií i k redukci tloušťky plaku na polovinu (pod elektronovým mikroskopem zjištěna vakuolizace cytoplazmy, poškození membrán). Zdá se, že poškozením bakteriální stěny se také snížila schopnost buněk vázat se na sebe a na extracelulární matrix. K baktericidnímu efektu docházelo na povrchu plaku - jen v aerobním prostředí, v hlubších vrstvách bez přítomnosti kyslíku nebyl baktericidní efekt zaznamenán. Podobně v práci Fontany a kol. (70) bylo při fotoinaktivaci směsné kultury bakterií dentálního plaku ve formě biofilmu prostřednictvím methylenové modři redukováno inokulum pouze o 32%. V práci Müllera a kol. (71) se nepodařilo zralý orální biofilm složený z mikrobiálních druhů *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sobrinus*, *S. oralis*, a *C. albicans* redukovat ani současným působením ozónu a PDT pomocí methylenové modři.

V práci Costy a kol. byla zaznamenána při PDT s erythrosinem úplná eliminace planktonických kultur *C. albicans* a *C. dubliniensis*, avšak kultury obou druhů kvasinek ve formě biofilmu byly mnohem rezistentnější, došlo k redukci CFU jen o 74%, resp. 21% (72). V práci Gonzálesové a kol. (73) bylo dosaženo při použití kationického porfyriu (XF-73) redukce CFU planktonické kultury *C. albicans* o 6 řádů a CFU kultury ve formě biofilmu o 5 řádů, ale bylo nutné prodloužit inkubaci z 15 minut až na 4 hodiny.

Několik prací popisuje užití PACT na zvířecích modelech. V pokusech na zvířatech se zkoumal vliv PACT v určitých modelových situacích – u infikovaných ran, popálenin, infekcí měkkých tkání, onemocnění způsobených *Helicobacter pylori*, mozkových abscesů. V experimentu bylo ověřeno, že u myši došlo po aplikaci PS a jejímu lokálnímu ozáření k rychlé redukci bakteriální nálože v infikovaných ranách a popáleninách, zlepšilo se hojení ran, u žádné myši nedošlo k rozvoji sepse (74, 75). Ve studii na potkanech bylo prokázáno, že je možné eradikovat *Porphyromonas gingivalis* v dásňovém žlábků využitím PACT (jako fotosenzitivní látka byla použita toluidinová modř), tato terapie navíc vedla k významnému snížení ztráty kostí doprovázejícímu parodontitidu – bez detekovatelného poškození přilehlých tkání vyšetřených histologicky (47). V experimentu na fretkách došlo po PACT s toluidinovou modří ke zhojení slizničních lézí způsobených *Helicobacter mustelae*. U imunosuprimovaných myši došlo po lokální aplikaci methylenové modří a její následné aktivaci světlem k úplné eradikaci *C. albicans* odpovědné za pseudomembranózní léze na povrchu jazyka (76). Podobně, na myším modelu, byl zaznamenán terapeutický úspěch PACT při použití toluidinové a methylenové modří k léčbě kožní kandidózy vyvolané infikováním rány *C. albicans*, lepších výsledků bylo dosaženo v experimentu s toluidinovou modří (77).

3.8 Možnosti klinického využití

PACT má ve srovnání s klasickými antimikrobními a antiseptickými látkami určité přednosti. Při PACT je možnost cíleně aplikovat fotosenzitivní látku do místa infekce a cíleně ho ozářit, což může zabránit poškození fyziologické mikroflóry a hostitelských buněk mimo léčená místa (tzv. duální selektivita) nebo toto poškození minimalizovat. Uvedený postup by měl snižovat riziko vzniku oportunních infekcí. Lokální podání fotosenzitivní látky by také mělo zmenšit pravděpodobnost jejího systémového rozšíření a zabránit vzniku systémové kožní fotosenzibilizace, což byl problém při užití první generace porfyrinů ve fotodynamické protinádorové terapii (2).

Klinicky se bude pravděpodobně PACT využívat tam, kde bude možné cíleně aplikovat fotosenzitivní látku přímo do infekčního ložiska a následně ji ozářit světlem příslušné vlnové délky. Předpokládá se tudíž její využití pro terapii infikovaných ran a popálenin, rychle se šířící infekce měkkých tkání a abscesů, povrchových zánětů rohovky, zánětlivých procesů v uších, nazálních sinech, močovém měchýři a žaludku (3, 58). PACT bude pravděpodobně možné využít pro terapii zánětlivých afekcí v dutině ústní vznikajících v souvislosti s přítomností dentálního plaku - při komplexní léčbě parodontitidy a povrchového zubního kazu.

Klinické využití PACT je již popsáno v jednotlivých kazuistikách, menších souborech pacientů i v klinických studiích. Zdá se, že nejlépe je problematika využití PACT prostudována u stomatologických pacientů. Klinicky prokazatelnou účinnost PACT v terapii parodontitidy popisuje řada studií (78, 79). Léčebně se aplikuje PS do parodontálního chobotu a pomocí optického vlákna se aplikuje světlo. V práci de Oliveiry a kol. (80) porovnávali PACT s toluidinovou modří se stomatologickým ošetřením u 10 pacientů s agresivní formou parodontitidy. Oba postupy měly podobný klinický efekt. Hlavní výhodou PACT je její cílené lokální působení, nezanedbatelným benefitem je možnost snížení spotřeby antibiotik, ke kterým je nutné se jinak při těžších formách parodontitidy či periimplantitidy uchýlit. Dále je použití PACT popisováno při dezinfekci kořenových kanálků u pacientů léčených pro nekrózu pulpy a periapikální lézi. Tento postup se ukázal být úspěšným v práci Garceze a kol. (81), kdy na standardní endodontické ošetření zubů navázalo PACT s konjugátem polyethyleniminu a chlorinu (e6).

Na trhu existují komerčně dostupné systémy pro využití ve stomatologii. V České republice je dostupný Helbo Photodynamic System, jehož výrobcem je HELBO Photodynamic System GmbH & Co KG, Grieskirchen, Rakousko (82).

Využití PACT se popisuje také často u dermatologických pacientů, kde jsou indikací především mykózy. Na souborech pacientů s interdigitální mykózou, tinea cruris a onychomykózou při použití různých léčebných protokolů (aplikace PACT 1 – 3× u kožního postižení, 6 – 7× u postižení nehtů) bylo ošetření terapeuticky úspěšné u 60 – 80% pacientů, ale byly zaznamenány i rekurence (83, 84, 85). Méně často bylo zatím PACT využito při léčbě bakteriálních kožních afekcí. Wiegell a kol. (86) léčili pacienta z kožním postižením vyvolaným *Mycobacterium marinum*, v práci Claytona (87) použili PACT v terapii chronického nehojícího se bércového vředu u 72-leté pacientky s nálezem signifikantně zlepšeného hojení. V rámci klinické studie bylo také hodnoceno PACT při terapii kožní formy leishmaniózy, při které bylo zjištěno, že léčba PACT s kys. deltaaminolevulovou byla úspěšnější než lokálně podaný paromomycin (88).

PACT s využitím endogenního porfyrinu (53) byla využita v pilotní studii na 18 pacientech s infekcí *Helicobacter pylori*, kdy se podařilo bezpečně aplikovat endoskopicky světlo po celém povrchu žaludeční sliznice a bylo dosaženo redukce množství bakterií v různých částech žaludku o minimálně 86%, nicméně v následujících dnech byl opět pozitivní dechový test (89).

Z dostupné literatury vyplývá, že v průběhu PACT jsou zabíjeny stejně účinně divoké i multirezistentní bakteriální kmeny, a tak by se fotodynamická antimikrobiální terapie

mohla stát účinným postupem v léčbě bakteriálních infekcí způsobených multirezistentními kmeny, což se jeví obzvláště výhodné v současné době, kdy dochází k jejich zvýšenému výskytu (90).

3.9 Komplikace u PDT

Komplikací užití PDT je potenciální možnost poškození sousedních hostitelských buněk a fyziologické mikroflóry, přestože se v mnoha in vitro studiích na tkáňových kulturách prokázalo, že koncentrace PS a dávka světla nutná pro fotoinaktivaci bakterií má jen malý vliv na životaschopnost hostitelských buněk. V práci Soukose a kol. (91) bylo prokázáno, že zatímco *Streptococcus sanguinis* byl inaktivován při PACT s toluidinovou modří, humánní keratinocyty a fibroblasty zůstaly nepoškozeny. Totéž se potvrdilo i v práci Soncina a kol. (44) v experimentech s PACT s kationickým ftalocyaninem zinku a humánními fibroblasty a keratinocyty. Zeina a kol. (92) prokázal, že při použití PACT s methylenovou modří, kožními mikroby a humánními keratinocyty jsou keratinocyty zabíjeny 18 – 200× pomaleji než mikroby, tudíž potvrdil, že PACT za podmínek, kdy jsou efektivně inaktivovány mikroby o 7 řádů, působí jen minimálně na keratinocyty.

Přes tyto potenciální komplikace posiluje zájem vyvinout metody pro přesné zacílení PS na infekční agens, jehož dalším důsledkem by bylo i zvýšení letálního účinku PS při snížení jeho koncentrace a snížení dávky světla. V laboratorních podmínkách se podařilo při fotoinaktivaci bakteriální směsi (*Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*) prostřednictvím toluidinové modří s navázanými specifickými monoklonálními protilátkami proti lipopolysacharidu *P. gingivalis* působit selektivně na vybrané agens (30). V práci Embletona a kol. (34) bylo dosaženo podobných selektivních účinků vůči *Staphylococcus aureus* pomocí bakteriofágů.

4 Cíl práce

Cílem předložené práce je studium antimikrobního efektu fotosenzitivních látek při fotodynamické inaktivaci vybraných mikrobiálních agens. Jako fotosenzitivní látky bylo zvoleno 15 derivátů ftalocyaninů syntetizovaných ve Výzkumném ústavu organických syntéz, a.s., Pardubice (VUOS).

Cíle práce byly následující:

1. příprava laboratorního postupu vhodného pro testování fotoinaktivační schopnosti ftalocyaninů u bakterií a kvasinek
2. provedení a vyhodnocení základního skríningu fotodynamického účinku testovaných ftalocyaninů
3. ověření antimikrobního efektu ftalocyaninů vybraných na základě skríningu – při fotodynamické inaktivaci vybraných kmenů bakterií a kvasinek, včetně kmenů rezistentních k antibiotikům a antimykotikům
4. testování ftalocyaninů navázaných na vhodné nosiče pro posouzení efektivity potenciální aplikační formy

5 Materiál a metodika

Všech 15 derivátů ftalocyaninů bylo testováno a hodnoceno v základním skríníngu při fotodynamické inaktivaci zástupců grampozitivních (*Staphylococcus aureus*), gramnegativních (*Escherichia coli*) a fungálních mikroorganismů (*Candida albicans*).

Na podkladě hodnocení dosažených výsledků byly vybrány nejučinnější fotosenzitivní látky a v následných experimentech s vybranými kmeny bakterií a kvasinek (*Streptococcus mutans*, methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* ESBL+ (multirezistentní kmen v důsledku produkce širokospektré β -laktamázy), *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*) byl dále studován jejich fotoinaktivační efekt.

V poslední experimentální části byl posuzován fotoinaktivační efekt ftalocyaninu po navázání na vhodné nosiče.

5.1 Ftalocyaniny

Bylo otestováno celkem 15 různých derivátů ftalocyaninu (Pc) syntetizovaných v laboratořích Výzkumného ústavu organických syntéz (VUOS) v Pardubicích. Jednotlivé deriváty jsou blíže charakterizovány v Tab. č. 2., včetně náboje molekuly a množství vyprodukovaného singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$). Základní struktura syntetizovaných ftalocyaninů je znázorněna na Obr. č. 4., poloha a struktura navázaných substituentů je popsána v Tab. č. 3. Chemická čistota jednotlivých vzorků byla kontrolována chromatograficky (HPLC). Množství produkovaného singletového kyslíku bylo měřeno jodidovou metodou – ve vodném roztoku i v roztoku ftalocyaninu v dimethylformamidu (93).

Tab. č. 2. Testované deriváty ftalocyaninu

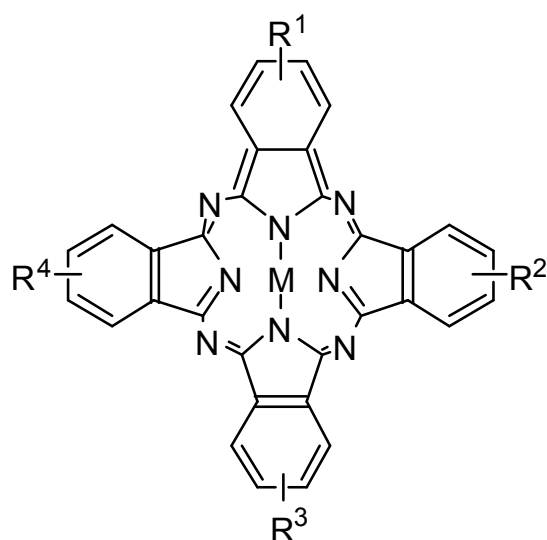
derivát Pc	Schematický vzorec	Systematický název	Náboj Pc	produkce $^1\text{O}_2$ (J^{-1})
Pc1	ZnFTC(SO ₃ NH ₄) ₂	amonná sůl disulfonovaného ftalocyaninu zinku	A*	0,363
Pc2	AlOHFTC(SO ₃ H) [SO ₃ ⁻ N ⁺ (CH ₃) ₄]	sulfonovaný tetramethylamoniumhydroxyhli - nitý ftalocyanin	A*	2,483

Pc3	ZnFTC(SO ₃ H) [SO ₂ NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ⁺ (C 2H ₅) ₂] citrate ⁻	sulfonovaný [(3- diethylamonium)- propylsulfonamid]ftalocyaninu zinku ve formě citrátu	A* + K*	0,123
Pc4	AlOHFTC(SO ₃ Na) ₂	sodná sůl disulfonovaného ftalocyaninu hliníku	A*	1,746
Pc5	AlOHFTC(SO ₃ H) (SO ₂ NHCH ₂ CH ₂ NHCH ₂ CH ₂ OH) ₂	sulfonovaný bis(<i>N</i> -2- hydroxyethyl)- aminoethylsulfonamid hlinitého ftalocyaninu	A* + N*	2,879
Pc6	ZnFTC[N ⁺ (CH ₃) ₃] ₄ I ₄ ⁻	tetrakis(trimethylamonium)-jodid zinečnatého ftalocyaninu	K*	-----
Pc7	AlOHFTC(CH ₂ C ₃ H ₅ N ⁺ Cl ⁻) ₄	tetramethylenpyridinium chlorid hydroxyhlinitého ftalocyaninu	K*	1,562
Pc8	ZnFTC(SO ₃ NH ₄) ₃	amonná sůl trisulfonovaného ftalocyaninu zinku	A*	2,044
Pc9	ZnFTC(OC ₅ H ₄ N ⁺ CH ₃) ₄ I ₄ ⁻	tetrakis (<i>N</i> -methylpyridium -3- oxy)-jodid zinečnatého ftalocyaninu	K*	0,471
Pc10	H ₂ FTC(SO ₃ Na) ₄	sodná sůl tetrasulfonovaného bezkovového ftalocyaninu	A*	0,277
Pc11	ZnFTC[N=N-C ₆ H ₄ - N ⁺ (CH ₃) ₃] ₄ I ₄ ⁻	tetrajodid tetrakis(4- <i>N,N,N</i> - trimethylammóniumfenylazo)zi- nečnatý ftalocyanin	K*	-----
Pc12	ZnFTC[PO(OCH ₂ CH ₃) ₂] ₄	tetrakis(diethylfosfonato)zinečna -tý ftalocyanin	N*	-----
Pc13	ZnFTC(O-C ₁₄ H ₂₀ O ₈ N) ₄	tetrakis(3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2- acetamido-2-deoxy- <i>D</i> - glukosyl)zinečnatý ftalocyanin	N*	0,786
Pc14	ZnFTC(O-C ₆ H ₁₁ O ₅) ₄	tetrakis(<i>D</i> - glukopyranosyl)zinečnatý ftalocyanin	N*	0,433
Pc15	AlOHFTC(SO ₃ Na) ₃	sodná sůl trisulfonovaného ftalocyaninu hliníku	A*	1,687

*A – anionická (záporně nabitá) molekula

*K – kationická (kladně nabitá) molekula

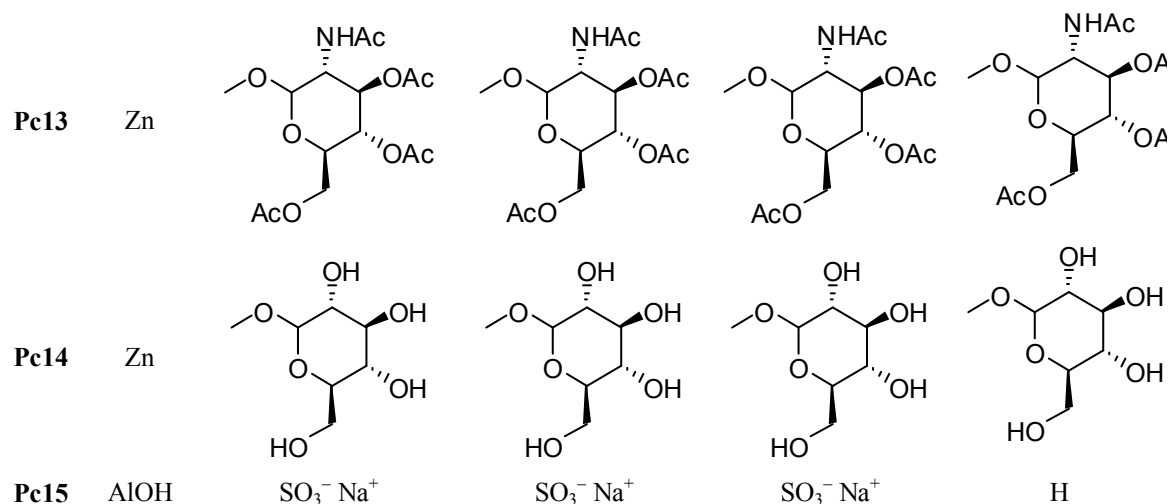
*N – neutrální molekula



Obr. č. 4. Struktura derivátů ftalocyaninu, umístění substituentů v pozici R1-R4

Tab. č. 3 – Charakteristika testovaných ftalocyaninů – centrální atom a jednotlivé substituenty v pozici R1-R4*

Pc	Centrální atom (M)	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Pc1	Zn	SO ₃ ⁻ NH ₄ ⁺	SO ₃ ⁻ NH ₄ ⁺	H	H
Pc2	AlOH	SO ₃ H	SO ₃ ⁻ N ⁺ (CH ₃) ₄	H	H
Pc3	Zn	SO ₃ H	SO ₂ NHCH ₂ CH ₂ NH ⁺ (C ₂ H ₅) ₂ citrate ⁻	H	H
Pc4	AlOH	SO ₃ ⁻ Na ⁺	SO ₃ ⁻ Na ⁺	H	H
Pc5	AlOH	SO ₂ NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ N HCH ₂ CH ₂ OH	SO ₂ NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ NHCH ₂ CH ₂ OH	SO ₃ H	H
Pc6	Zn	N ⁺ (CH ₃) ₃ I ⁻	N ⁺ (CH ₃) ₃ I ⁻	N ⁺ (CH ₃) ₃ I ⁻	N ⁺ (CH ₃) ₃ I ⁻
Pc7	AlOH				
Pc8	Zn	SO ₃ ⁻ NH ₄ ⁺	SO ₃ ⁻ NH ₄ ⁺	SO ₃ ⁻ NH ₄ ⁺	H
Pc9	Zn				
Pc10	H ₂	SO ₃ ⁻ Na ⁺	SO ₃ ⁻ Na ⁺	SO ₃ ⁻ Na ⁺	SO ₃ ⁻ Na ⁺
Pc11	Zn				
Pc12	Zn	PO(OC ₂ H ₅) ₃	PO(OC ₂ H ₅) ₃	PO(OC ₂ H ₅) ₃	PO(OC ₂ H ₅) ₃



* centrální atom a jednotlivé substituenty v pozici R1-R4

5.2 Kmeny bakterií a kvasinek

Pro základní testování ftalocyaninů byly zvoleny bakteriální kmeny *Staphylococcus aureus* 5887, *Escherichia coli* 5276 a *Candida albicans* 6258 z České národní sbírky typových kultur při Státním zdravotním ústavu v Praze. Pro následné testování vybraných derivátů ftalocyaninů byly použity izoláty z humánních vzorků získané kultivací klinického materiálu od pacientů Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Byly zvoleny bakteriální kmeny *Streptococcus mutans*, methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* (kmen s produkcí širokospektré betalaktamázy ESBL), *Pseudomonas aeruginosa*. V následných pokusech byly také testovány *Candida glabrata* a *Candida krusei*. *Streptococcus mutans* byl zvolen jako zástupce běžné slizniční orální mikroflóry a zároveň jako etiologické agens podílející se na vzniku zubního kazu (s ohledem na náplň projektu – Fotoenzibilizátory v zubním lékařství), ostatní bakterie, rezistentní k antibiotikům, byly zvoleny pro ověření antibakteriálního fotoinaktivačního efektu derivátů ftalocyaninů při PACT multirezistentních bakterií. Oba druhy kvasinek byly vybrány pro svou rezistenci k flukonazolu.

5.3 Zdroj světelného záření

Při pokusech byl použit laserový systém MAESTRO/CCM (MediCom, a.s.). Skládá se ze stolní řídicí jednotky a laserové sondy (aktivní laserové prostředí tvoří polovodičová laserová dioda AlGaInP), která vyzařuje koherentní monochromatické světlo vlnové délky 670 nm odpovídající absorpčnímu spektru ftalocyaninů a má výkon 80mW (viz Obr. č. 5).



Obr. č. 5. Laser MAESTRO/CCM.

5.4 Testování fotoinaktivační schopnosti ftalocyaninů

Schéma pokusu bylo upraveno podle Tegose a kol. (32).

5.4.1 Příprava testovaných mikrobiálních kmenů

Byl použit kultivační způsob přípravy testované bakteriální suspenze – bakteriální kmeny (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, MRSA, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) byly naočkovány do BHI bujónu (Brain-Heart Bouillon, BioMerieux) a kultivovány 18 – 24 hodin při 36°C. Po pomnožení byla 18–24-hodinová kultura přeočkována v poměru 1:100 do čerstvého BHI bujónu a kultivována do dosažení mid-log fáze růstu. Kmeny kvasinek (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*) byly naočkovány do Sabouraudova bujónu (BioMerieux) a kultivovány 18 – 24 hodin při 36°C. Po pomnožení byla 18–24-hodinová kultura přeočkována v poměru 1:100 do čerstvého Sabouraudova bujónu a kultivována do dosažení mid-log fáze růstu. Pro dosažení standardní velikosti inokula byla denzita bujónové kultury stanovena denzitometrem

(optická denzita $\approx 0,6$ odpovídá 10^8 CFU/ml u bakterií a 10^7 CFU/ml u kvasinek), v experimentech byla používána hustota inokula $10^8 - 10^9$ CFU/ml. Následně byla bujónová kultura odstředěna při 5000 ot./ 10 min, poté odsát supernatant a sediment byl resuspendován ve sterilním fosfátovém pufru (PBS, pH 7,2) na hodnotu výchozí denzity.

5.4.2 Příprava ftalocyaninů

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním testovaného ftalocyaninu ve sterilní destilované vodě tak, aby koncentrace byla 1 mg/ml. Ze zásobního roztoku byly připraveny pracovní koncentrace 2, 4, 8, 16 mg/l.

5.4.3 Inkubace s PS

Dalším krokem byla inkubace 1ml testované kultury s 1ml testovaného ftalocyaninu v poměru 1:1 tak, že konečné testované koncentrace ftalocyaninu byly 1 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l a 8 mg/l; po 30 minutách působení při pokojové teplotě a ve tmě byla testovaná suspenze odstředěna (5000 ot./ 10 min), odsát supernatant a pro resuspendování přidán sterilní fosfátový pufr do celkového objemu 2 ml.

5.4.4 Ozařování laserem

100 μ l testované kultury bylo přeneseno do jamky mikrotitrační destičky a ozářeno laserovou sondou dávkou světla 20 J/cm² a 40 J/cm² z konstantní vzdálenosti 2 – 3 mm.

5.4.5 Hodnocení baktericidního účinku

Po ozáření bylo z jamky mikrotitrační destičky odsáto 100 μ l testované kultury a naředěno přenesením do zkumavky s 900 μ l fosfátového pufru. Byla připravena ředící řada - série šesti ředění (\log_{10}) pro každou testovanou koncentraci a dávku světla. Z každého ředění byly vyočkovány dva vzorky po 100 μ l na Petriho misku s vhodným kultivačním médiem (Mueller-Hinton 2 agar (BioMerieux) byl použit pro kultivaci kultur *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*; krevní agar pro *Streptococcus mutans*; Sabouraudova půda pro kmeny kvasinek). Po 24-hodinové inkubaci u bakterií a 48-hodinové inkubaci u kvasinek byly spočítány narostlé kolonie testovaného kmene (v ředění, ve kterém se počet vyrostlých kolonií pohyboval v rozmezí 20 až 200 (94).

Látky byly testovány ve dvou nezávislých pokusech na zvolených kmenech bakterií a kvasinek, součástí pokusů byly i kontrolní testy pro zjištění vlivu samotné látky na bakteriální kulturu bez ozáření a také pro vyhodnocení vlivu samotného ozáření bez přítomnosti testovaného ftalocyaninu. Účinnost fotoinaktivace byla hodnocena porovnáním

počtu viabilních bakterií po ovlivnění bakteriální kultury ftalocyaninem a ozáření laserem k počtu bakterií v kontrolních vzorcích (survival fraction). Výsledky byly zpracovány statisticky (RNDr. Eva Čermáková, Výpočetní středisko, Lékařská fakulta University Karlovy, Hradec Králové)

Za účinné, antimikrobně působící látky byly podle literatury považovány látky snižující počet bakterií minimálně o 3 řády (32).

5.5 Testování vybraných ftalocyaninů na nosiči

Ftalocyanin Pc7 vybraný ze základního skrínungu byl navázán na nosič (hydroxypropylmethylcelulózu, HPMC) ve formě 1,5% a 3% gelu. Látky byly opět připraveny ve VUOS.

Testované Pc na nosiči:

- 3% hydroxypropylmethylcelulóza s Pc7 – se dvěma různými koncentracemi účinné látky – 20 mg ftalocyaninu (**H1**) a 10 mg ftalocyaninu (**H2**) na 1000 g gelu
- 1,5% hydroxypropylmethylcelulóza s Pc7 – s koncentrací účinné látky Pc7 20 mg ftalocyaninu na 1000 g gelu (**H3**)
- 3% hydroxypropylmethylcelulóza – **H**

Postup:

Mikrobiální kultury *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Candida albicans* byly připraveny jako v předchozích experimentech (5.4.1), inkubovány s testovanými látkami na nosiči v poměru 1 ml testované látky a 0,25 ml bakteriální suspenze po dobu 30 min, 2 hod a 24 hod a poté 100 μ l testované suspenze přeneseno do jamky mikrotitrační destičky a ozářeno laserovou sondou dávkou světla 40 J/cm² ze vzdálenosti 2 – 3 mm. Další postup byl stejný jako u samotného Pc (5.4.5).

Antimikrobní účinnost přípravku byla hodnocena porovnáním počtu životaschopných mikrobů v testované kultuře s počtem mikrobů v kontrolním vzorku, což byl gel neobsahující ftalocyanin. Vzorek H (samotná HPMC) byl použit jako kontrola.

6 Výsledky

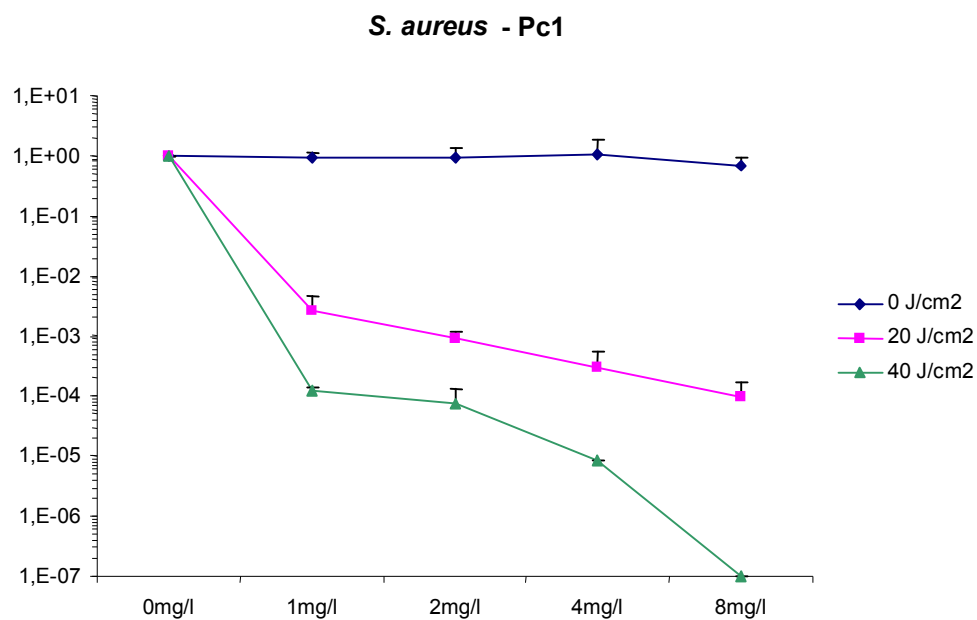
6.1 Výsledky skrínigového testování ftalocyaninů

V základním skrínigu byl hodnocen fotoinaktivační účinek 15 derivátů ftalocyaninů vůči - *S. aureus*, *E. coli* a *C. albicans*. Výsledky testovaných ftalocyaninů byly rozdílné v závislosti na jejich chemické struktuře a náboji, velikosti dávky ozáření a v neposlední řadě na testovaném mikroorganismu. Při hodnocení výsledků bylo zjištěno, že za účinné antimikrobně působící fotosenzitivní látky můžeme podle zvoleného kritéria (zmenšení inokula testované kultury o minimálně tři řády) považovat 9 z 15 testovaných Pc. Osm testovaných Pc působilo efektivně vůči *S. aureus*, ale jen čtyři preparáty vůči *E. coli* a dva preparáty vůči *C. albicans*. Antimikrobní efekt testovaných ftalocyaninových preparátů byl ve všech pokusech přímo úměrný dávce světla použitého k ozáření bakteriální kultury. Zároveň u 13 testovaných látek byla velikost antibakteriálního efektu přímo závislá i na koncentraci testované látky. Výjimkou jsou výsledky pokusů preparátů Pc2 a Pc3, kdy bylo dosaženo většího fotoinaktivačního efektu při nižší koncentraci testované látky (viz Graf č. 4, 7).

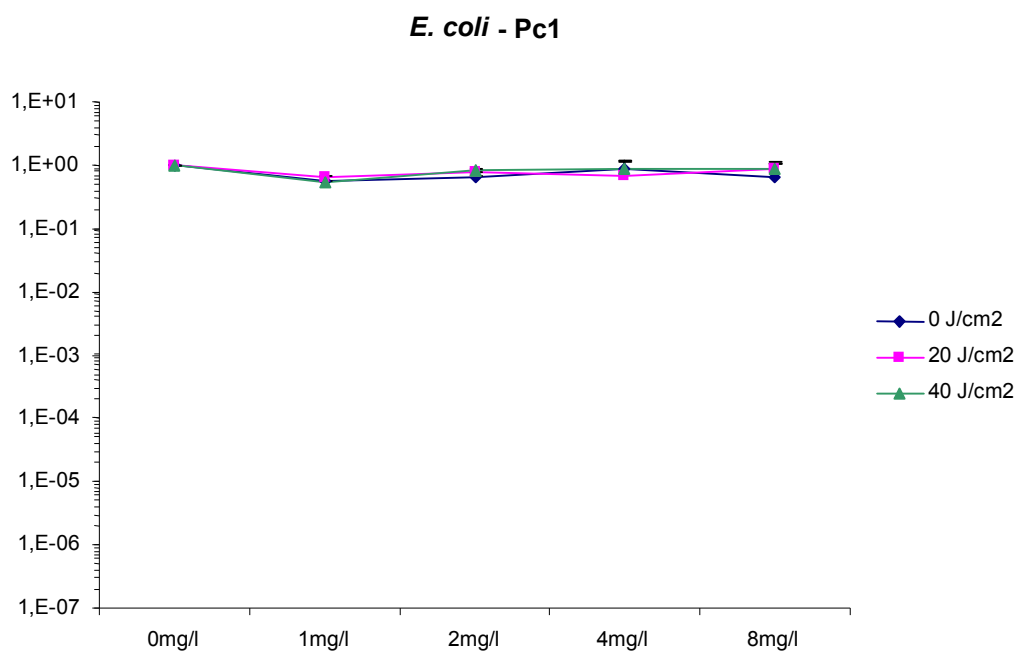
Samotné ozáření testované kultury bez přítomnosti Pc nemělo vliv na viabilitu vyšetřovaných mikroorganismů, ale u tří derivátů Pc byl prokázán určitý antibakteriální efekt i bez následného ozáření. Jednalo se o Pc3, Pc7 a Pc9, které dokázaly v koncentraci 8 mg/l zmenšit inokulum *S. aureus* o 98 % (Pc3, viz Graf č. 7), 81 % (Pc7, viz Graf č. 19) a 62 % (Pc9, viz Graf č. 25) a ve stejné koncentraci ovlivnily kulturu *E. coli* o 79 % (Pc7, viz Graf č. 20).

Výsledky pokusů fotoinaktivace vybraných skrínigových agens jednotlivými deriváty ftalocyaninů jsou znázorněny v grafech (na ose x jsou uvedeny testované koncentrace Pc, na ose y počet viabilních CFU/ml), v tabulce č. 4 jsou pak sumarizovány výsledky pokusů při použití nejvyšší koncentrace testovaného derivátu ftalocyaninu (8 mg/l) a maximální dávky světla 20 J/ cm² a 40 J/ cm². Na základě těchto výsledků byly vybrány nejúčinnější látky k dalšímu testování.

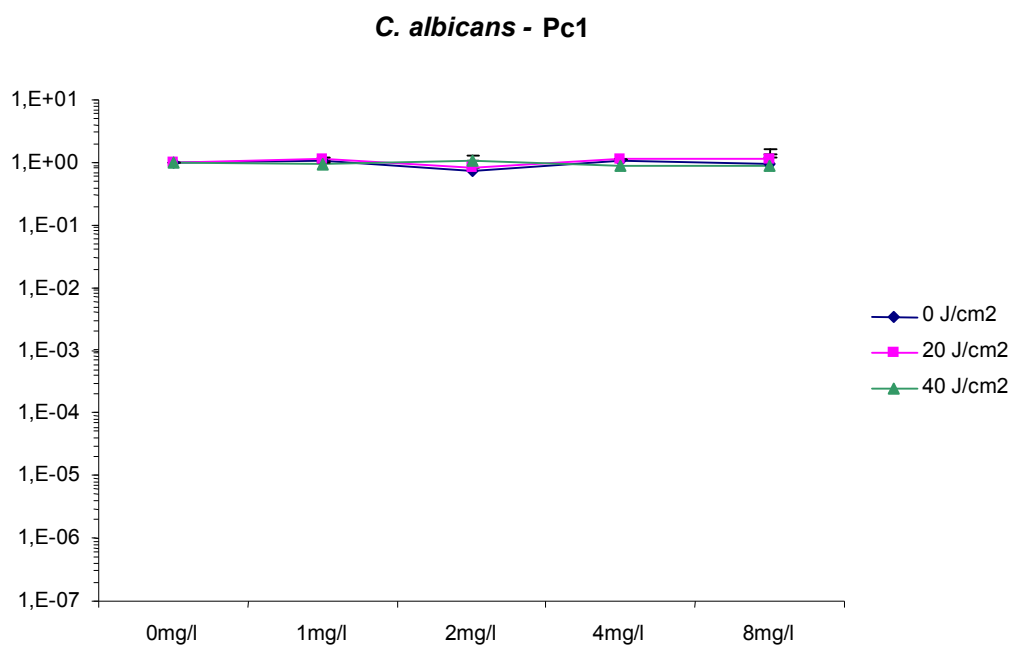
6.1.1 Pc1 - Amonná sůl disulfonovaného ftalocyaninu zinku



Graf č. 1. Fotoinaktivační efekt Pc1 vůči *S. aureus*



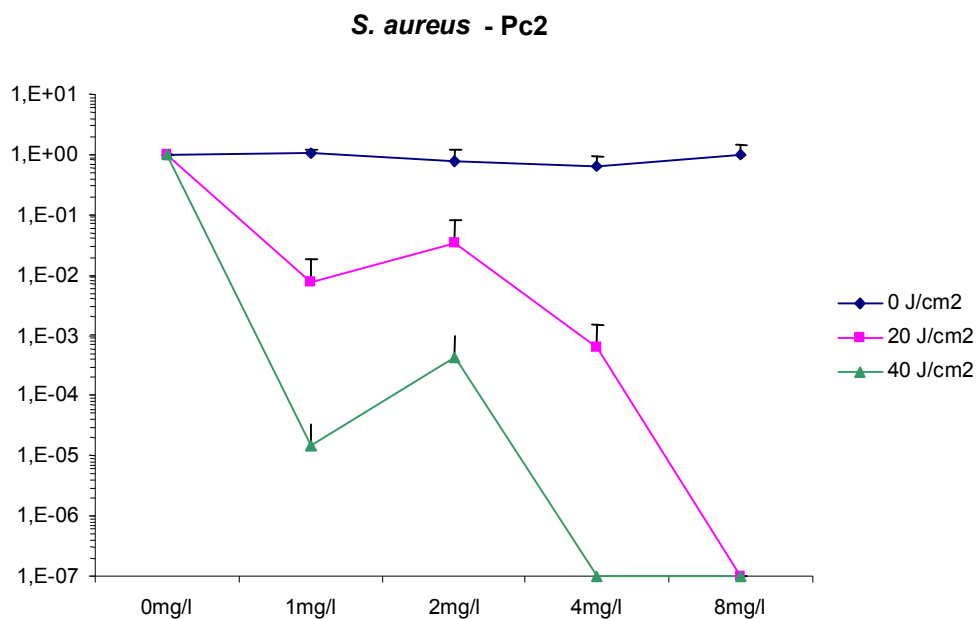
Graf č. 2. Fotoinaktivační efekt Pc1 vůči *E. coli*



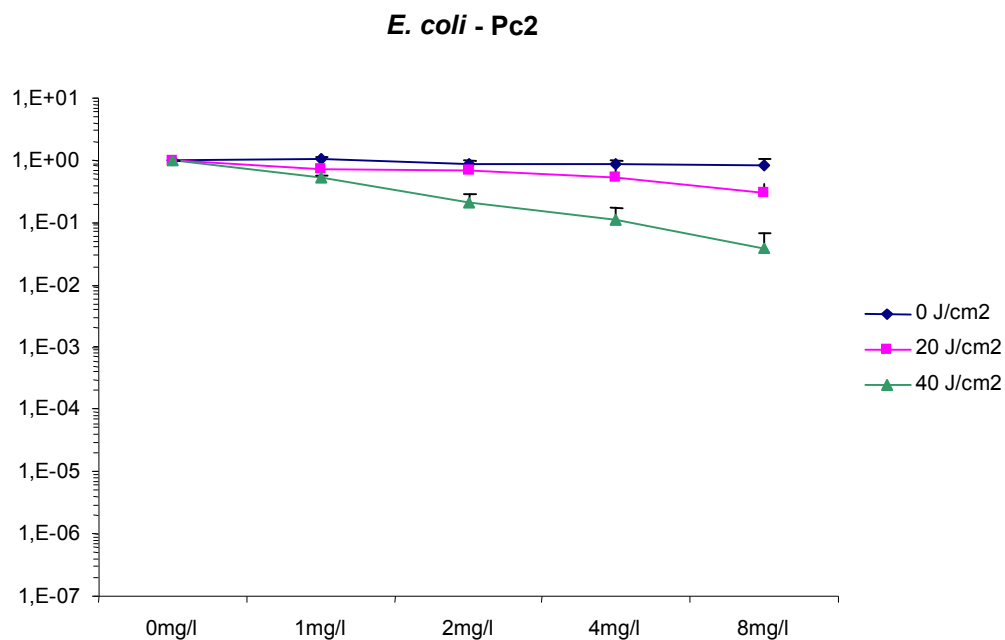
Graf č. 3. Fotoinaktivační efekt Pc1 vůči *C. albicans*

Pc1 vykazovala schopnost fotoinaktivace *S. aureus* v nejvyšší testované koncentraci (8 mg/l). Po ozáření dávkou světla 40 J/cm² docházelo ke snížení počtu bakterií o 7 řádů (viz graf č.1). V pokusu s *E. coli* i *C. albicans* se tato látka při fotoinaktivaci naopak neprojevila vůbec (viz Graf č.2, 3).

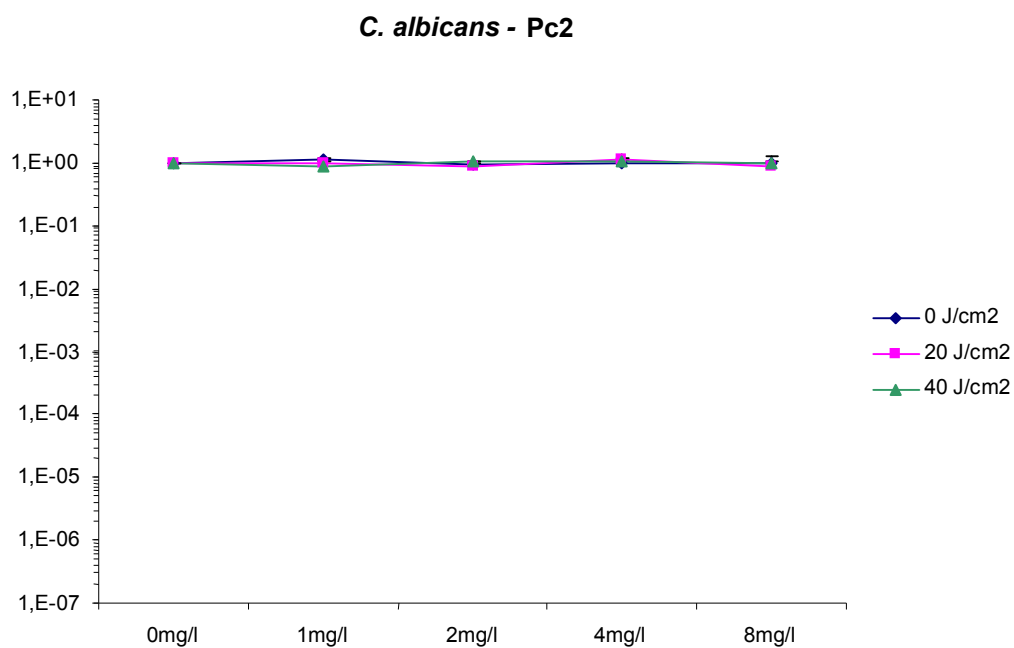
6.1.2 Pc2 - Sulfonovaný tetramethylamoniumhydroxylitý ftalocyanin



Graf č.4. Fotoinaktivační efekt Pc2 vůči *S. aureus*



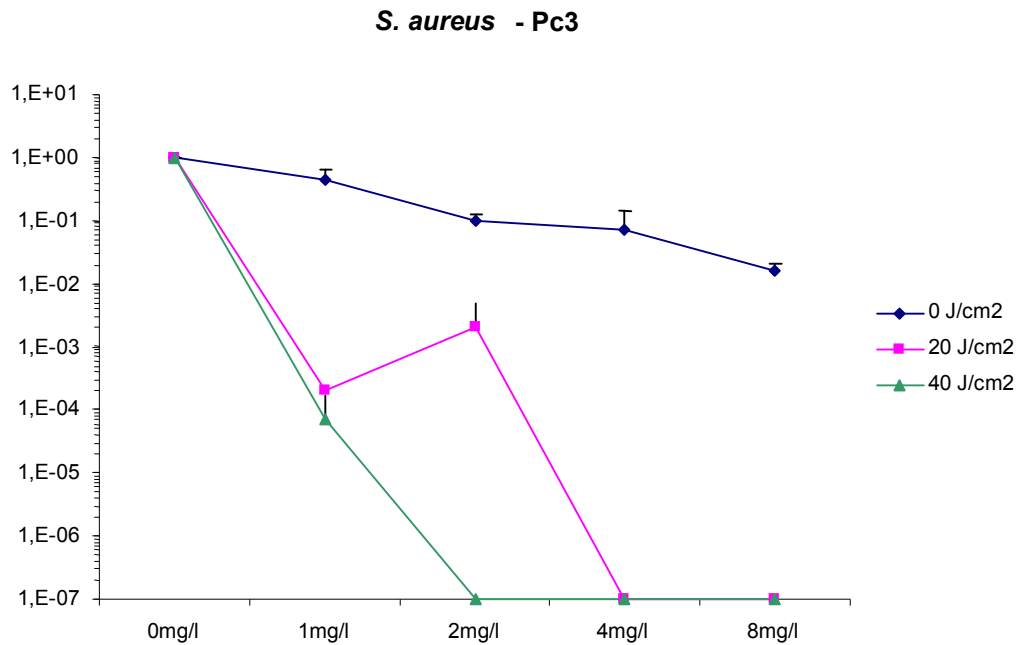
Graf č. 5. Fotoinaktivační efekt Pc2 vůči *E. coli*



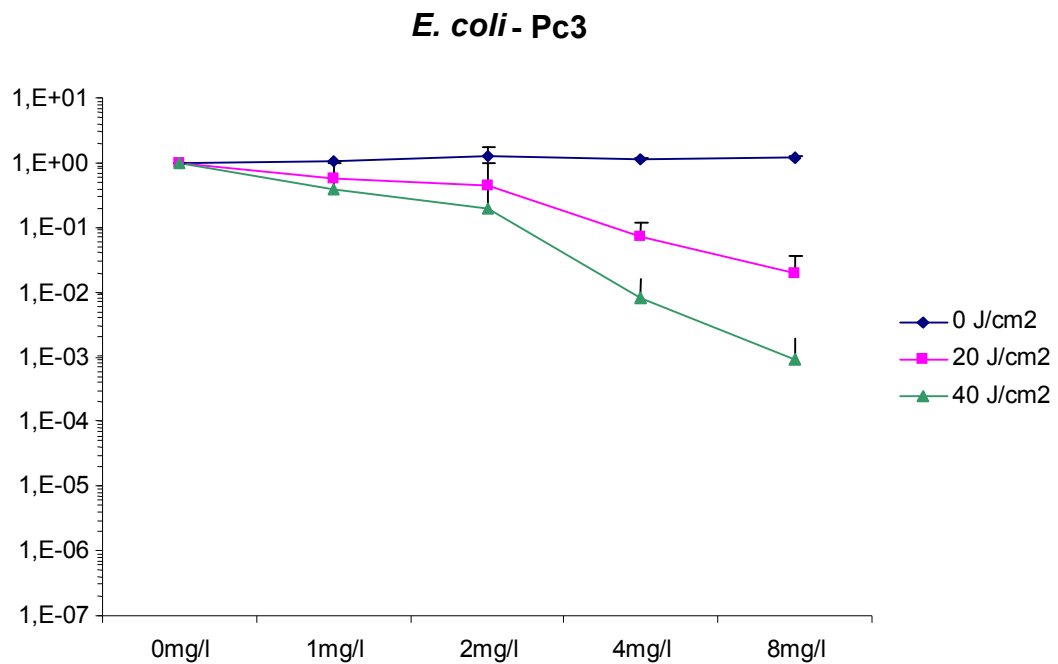
Graf č.6. Fotoinaktivační efekt Pc2 vůči *C. albicans*

Látka Pc2 vykázala výrazný antibakteriální efekt při fotoinaktivaci kmene *S. aureus*, v nejvyšší testované koncentraci (8 mg/l) a po ozáření dávkou světla 40 J/cm² došlo k úplné eliminaci bakterií (viz Graf č. 4), za stejných podmínek dokázala tato látka v pokusech s kmenem *E. coli* snížit počet bakterií o 1 řád (viz graf č.5) a v pokusech s *C. albicans* zůstala úplně bez efektu.

6.1.3 Pc3 - sulfonovaný [(3-diethylamonium)-propylsulfonamid] ftalocyaninu zinku

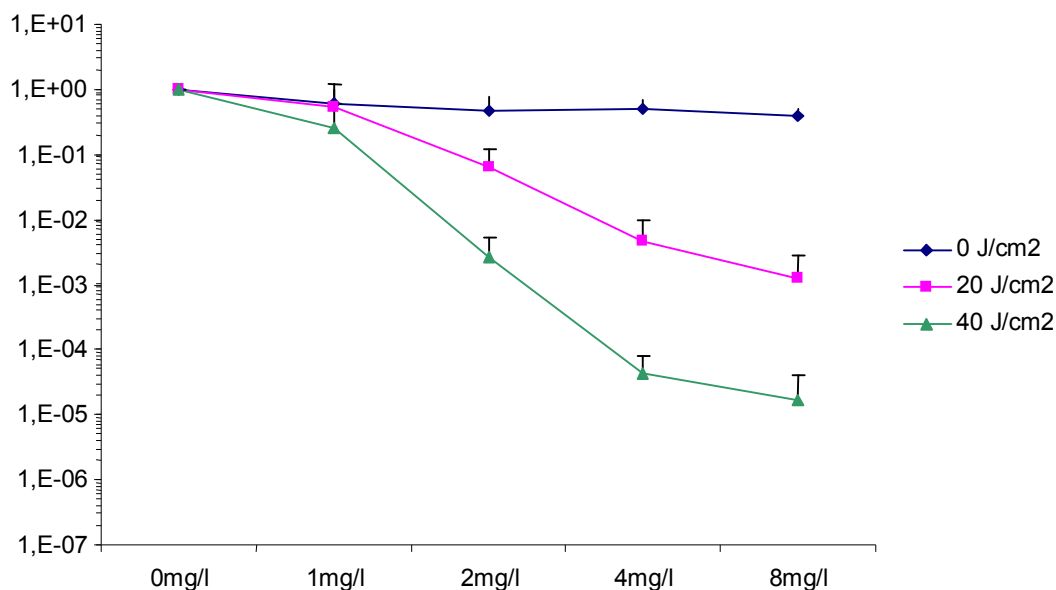


Graf č.7. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči *S. aureus*



Graf č.8. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči *E. coli*

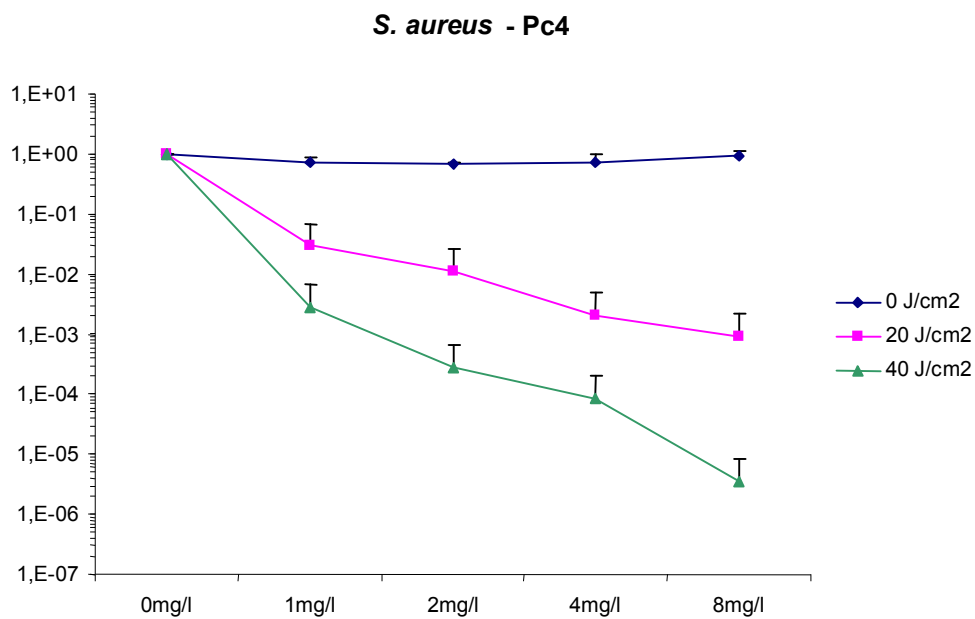
C. albicans - Pc3



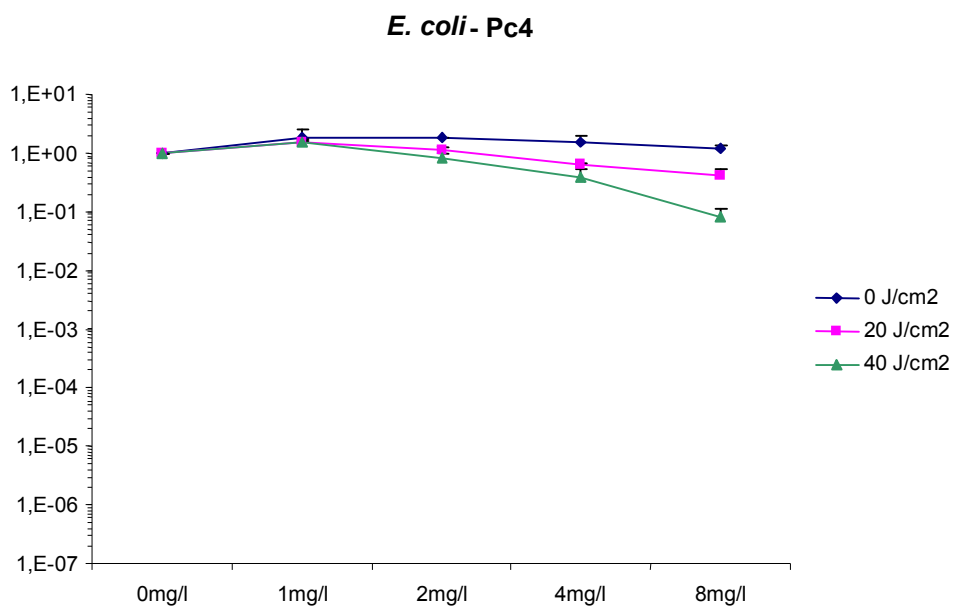
Graf č.9. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči *C. albicans*

Látka Pc3 vykazovala antibakteriální efekt vůči *S. aureus* i *E. coli*, v nejvyšší testované koncentraci (8 mg/l) a po ozáření dávkou světla 40 J/cm² dochází k úplné eliminaci bakterií kmene *S. aureus* (viz Graf č.7). U kmene *E. coli* došlo k poklesu počtu bakterií o 3 řády (viz Graf č.8). Pc3 také vykazovala schopnost fotoaktivovat *C. albicans*, v nejvyšší testované koncentraci (8 mg/l) a po ozáření dávkou světla 40 J/cm² dochází ke zmenšení počtu kvasinek o 4 řády (viz Graf č.9).

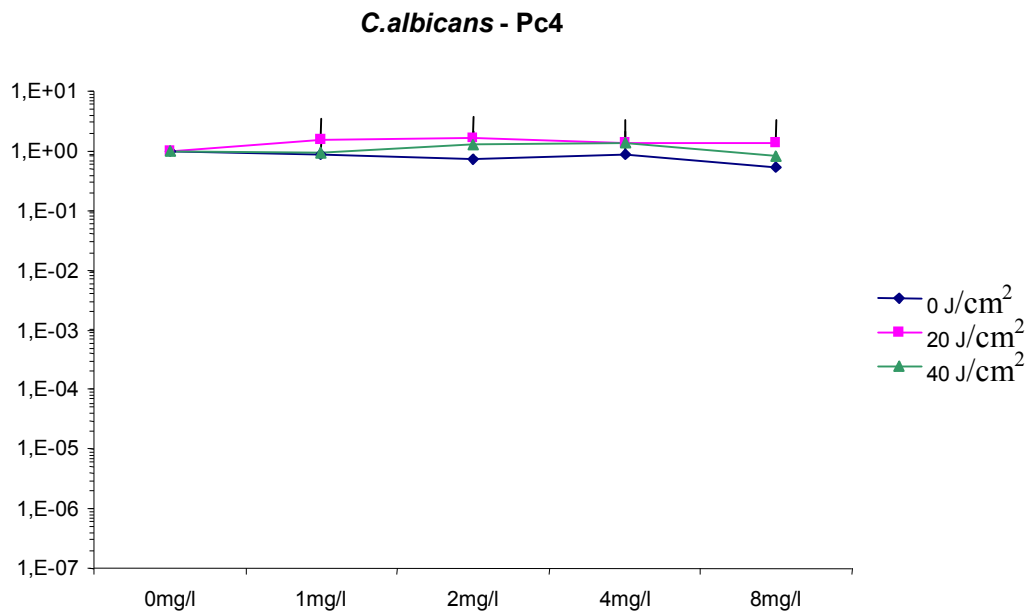
6.1.4 Pc4 - sodná sůl disulfonovaného ftalocyaninu hliníku



Graf č. 10. Fotoinaktivační efekt Pc4 vůči *S. aureus*



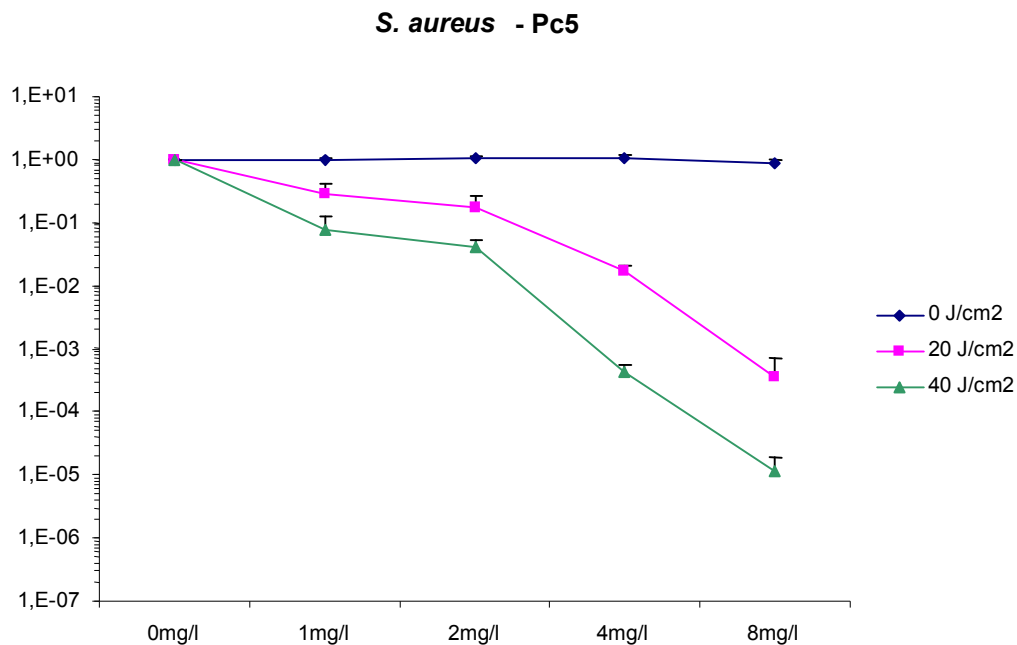
Graf č.11. Fotoinaktivační efekt Pc4 vůči *E. coli*



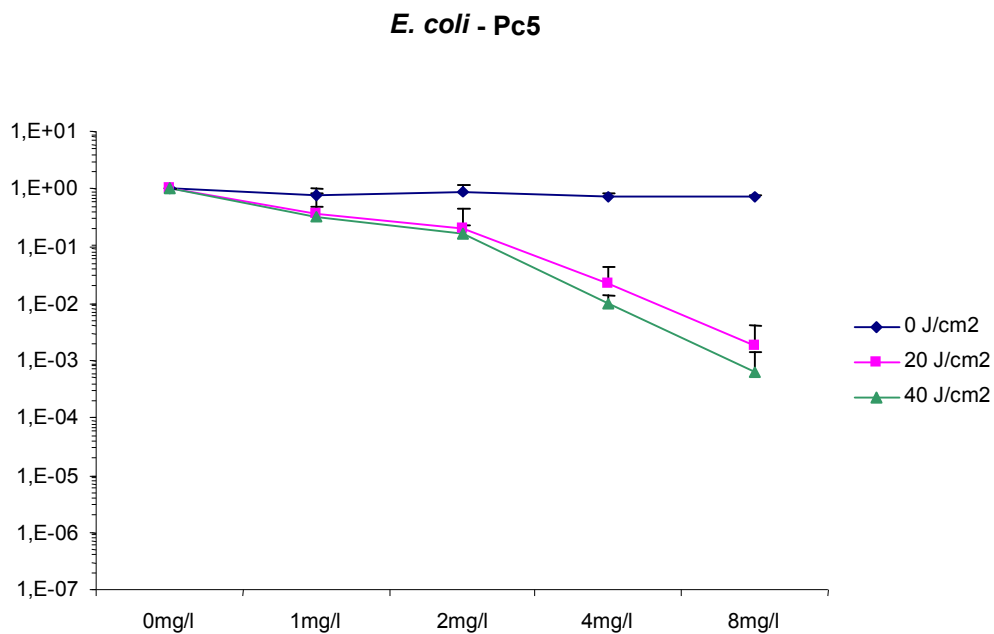
Graf. č.12. Fotoinaktivační efekt Pc4 vůči *C. albicans*

Látka Pc4 působila efektivně na inokulum *S. aureus*, v nejvyšší testované koncentraci (8 mg/l) a po ozáření dávkou světla 40 J/cm² došlo k poklesu počtu bakterií o 5 řádů (viz Graf č. 10), za stejných podmínek látka Pc4 vykazovala jen minimální vliv na kmen *E. coli* – došlo ke snížení počtu buněk o řád (viz Graf č.11), v pokusech s kmenem *C. albicans* nevykázala látka Pc4 žádný efekt.

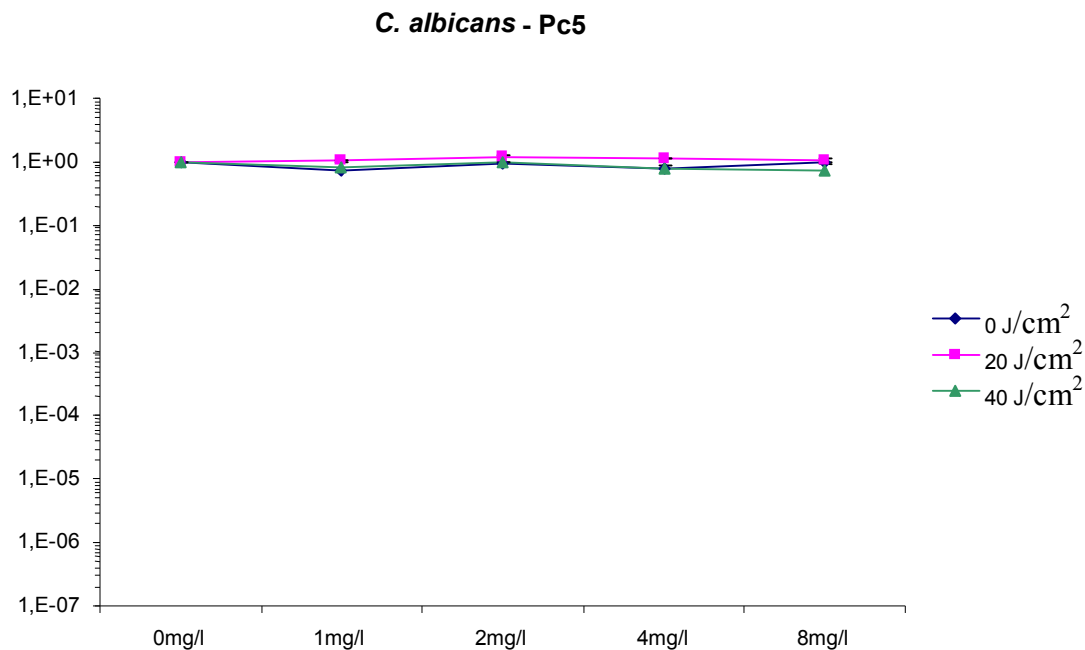
6.1.5 Pc5 - Sulfonovaný bis(*N*-2-hydroxyethyl)-aminoethylsulfonamid hlinitého ftalocyaninu



Graf č. 13. Fotoinaktivační efekt Pc5 vůči *S. aureus*



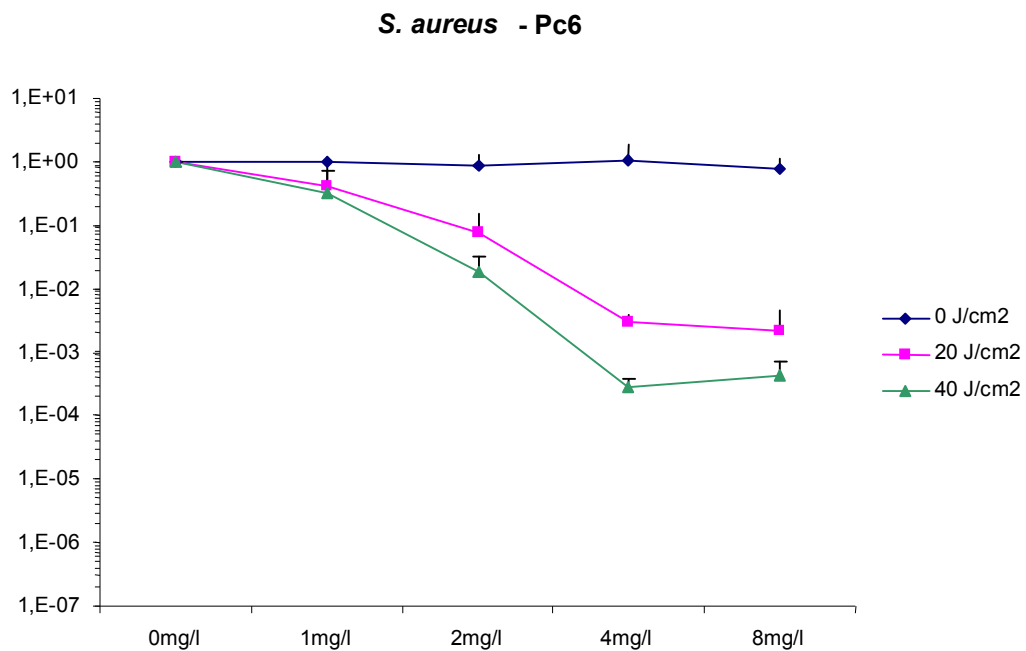
Graf č. 14. Fotoinaktivační efekt Pc5 vůči *E. coli*



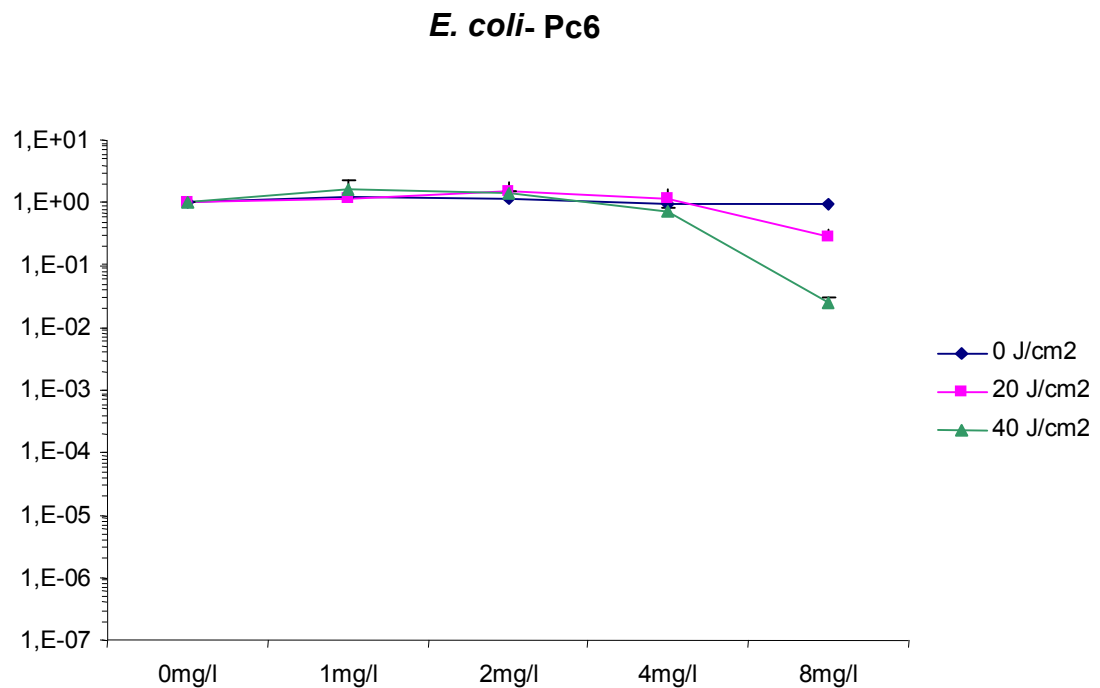
Graf č. 15. Fotoinaktivační efekt Pc5 vůči *C. albicansi*

Látka Pc5 se uplatnila v pokusech se *S. aureus* i *E. coli*, v nejvyšší testované koncentraci (8 mg/l) a po ozáření dávkou světla 40 J/cm² došlo k poklesu počtu bakterií kmene *S. aureus* o 5 řádů (viz Graf č.13) a u kmene *E. coli* o 3 řády (viz Graf č.14). V pokusech s *C. albicans* zůstala látka Pc5 bez efektu.

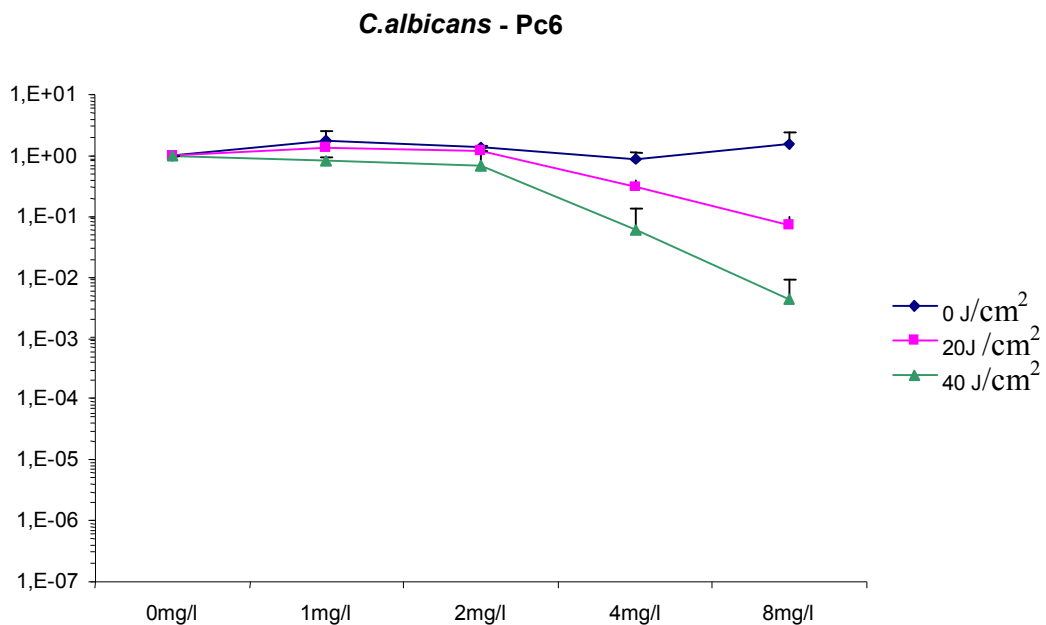
6.1.6 Pc6 - tetrakis(trimethylamonium)-jodid zinečnatého ftalocyaninu



Graf č.16. Fotoinaktivační efekt Pc6 vůči *S. aureus*



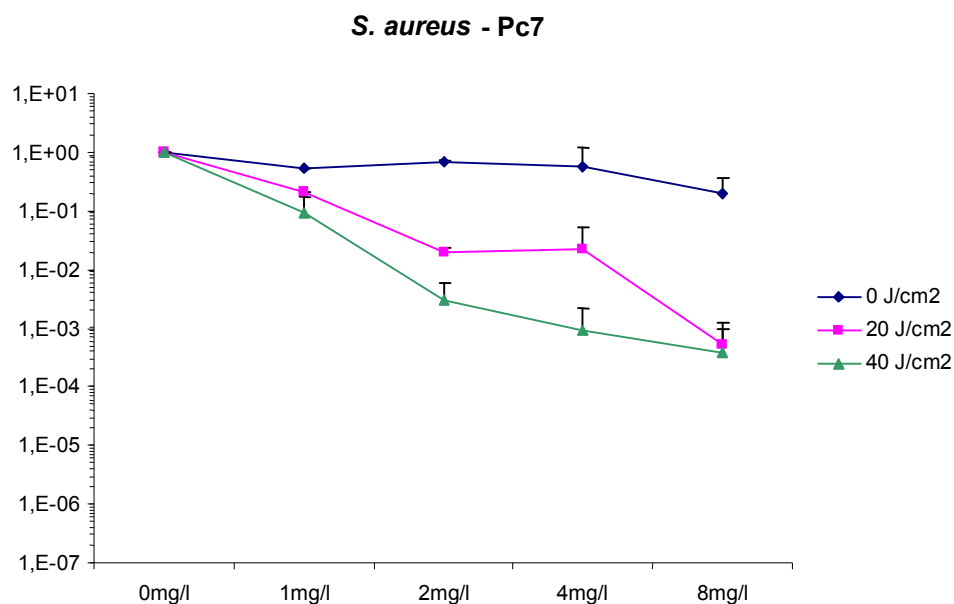
Graf č. 17. Fotoinaktivační efekt Pc6 vůči *E. coli*



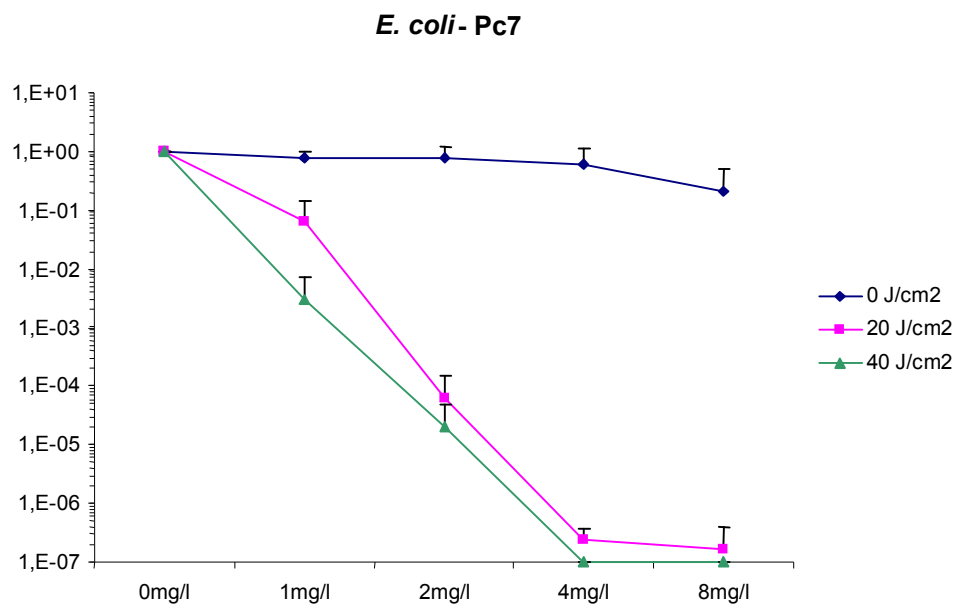
Graf č. 18. Fotoinaktivační efekt Pc6 vůči *C. albicans*

Látka Pc6 vykazuje schopnost fotoinaktivovat *S. aureus*, v nejvyšší testované koncentraci (8 mg/l) a po ozáření dávkou světla 40 J/cm² dochází ke zmenšení počtu bakterií o 3 řády (viz Graf č.16). V pokusech s *E. coli* za stejných podmínek tato látka snížila počet bakterií o 1 řád (viz Graf č.17). V pokusech s *C. albicans* za stejných podmínek dokázala snížit inokulum o 2 řády (viz Graf č.18).

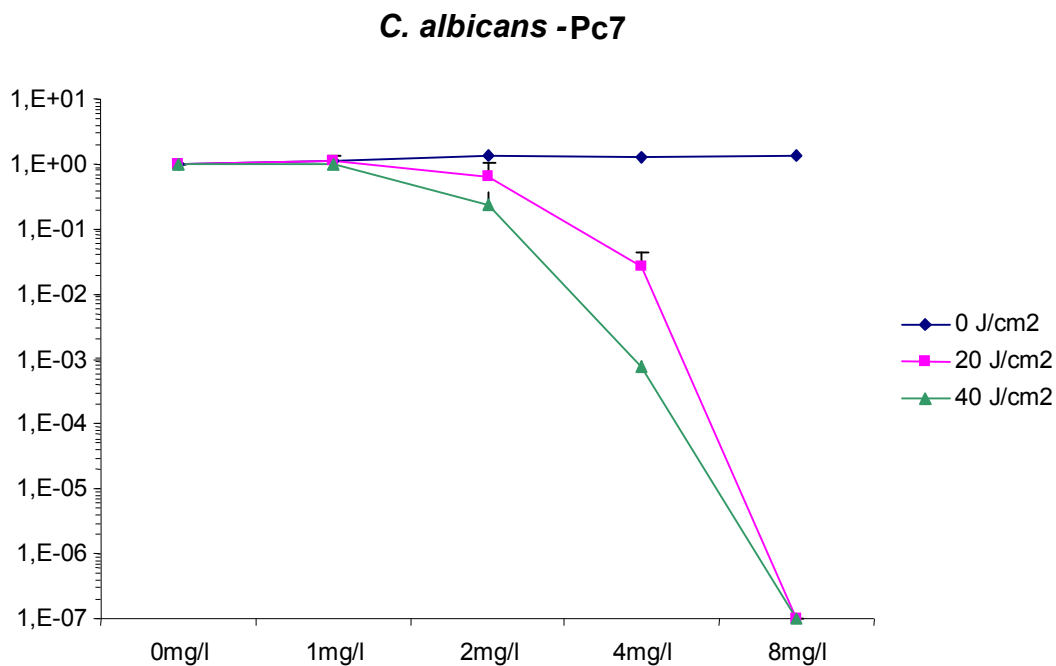
6.1.7 Pc7 - tetramethylenpyridinium chlorid hydroxyhlinitého ftalocyaninu



Graf č. 19. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči *S. aureus*



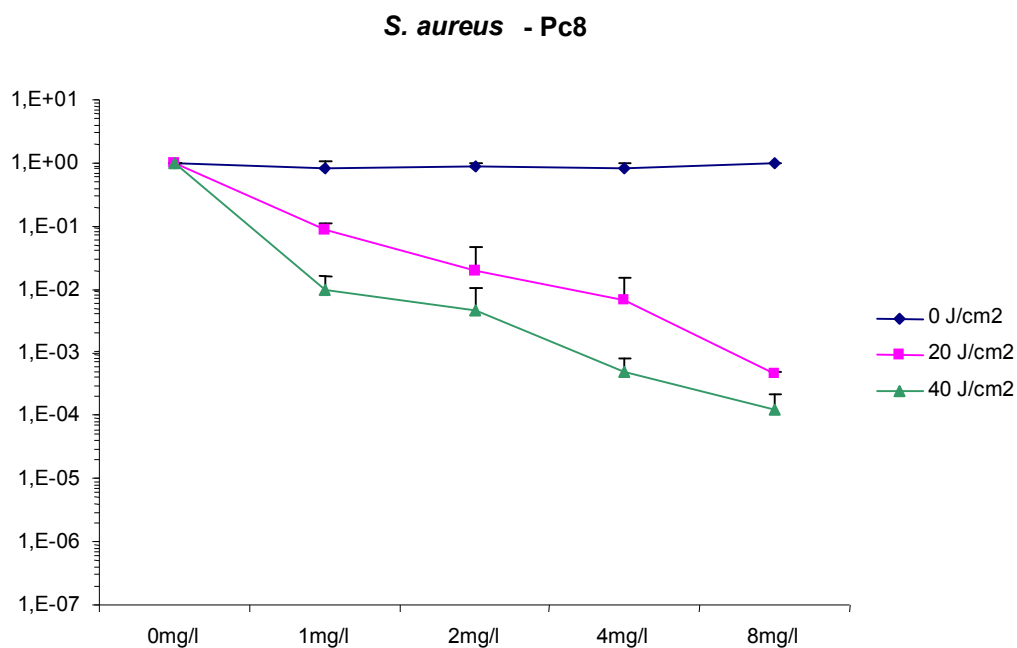
Graf č. 20. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči *E. coli*



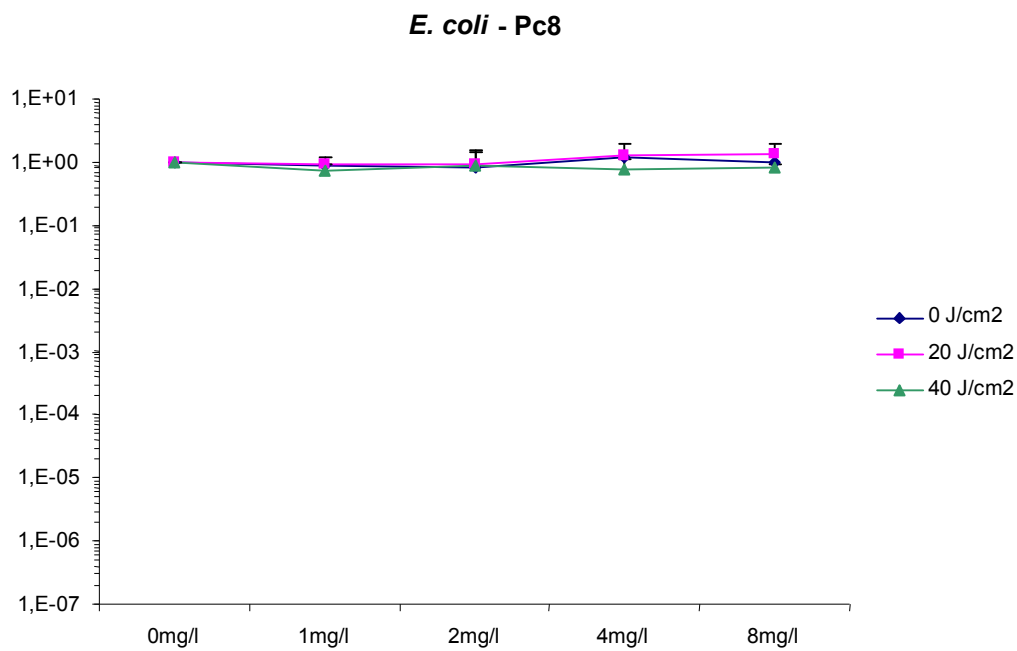
Graf č. 21. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči *C. albicans*

Látka Pc7 vykazovala schopnost fotoinaktivovat *S. aureus* i *E. coli*, v nejvyšší testované koncentraci (8 mg/l) a po ozáření dávkou světla 40 J/cm² došlo k poklesu počtu bakterií kmene *S. aureus* o 3 až 4 řády (viz Graf č.19), za stejných podmínek se u kmene *E. coli* snížil počet bakterií o 7 řádů (viz Graf č.20). Tato látka vykazovala antibakteriální efekt i bez ozáření (u *S. aureus* došlo ke snížení počtu mikrobů o 81% vůči kontrolnímu vzorku, u *E. coli* o 79%). Látka Pc7 vykazovala i výrazný antifungální efekt při fotoinaktivaci kmene *C. albicans*, v nejvyšší testované koncentraci (8 mg/l) a po ozáření dávkou světla 40 J/cm² došlo k úplné eliminaci kvasinek (viz Graf č. 21).

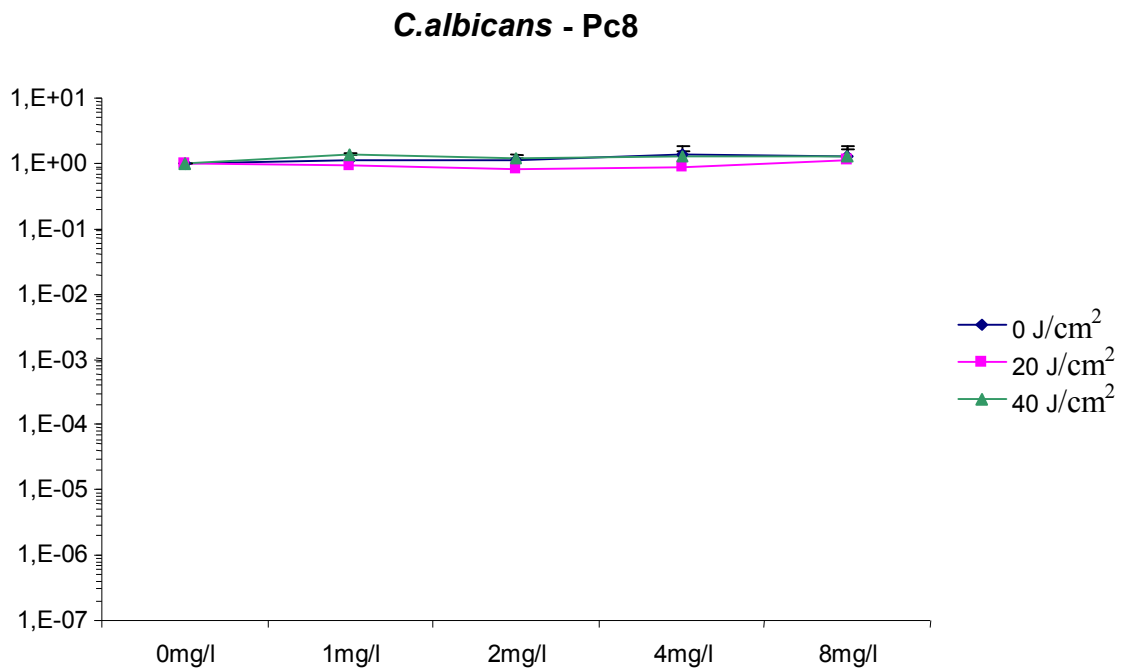
6.1.8 Pc8 - Amonná sůl trisulfonovaného ftalocyaninu zinku



Graf č. 22. Fotoinaktivační efekt Pc8 vůči *S. aureus*



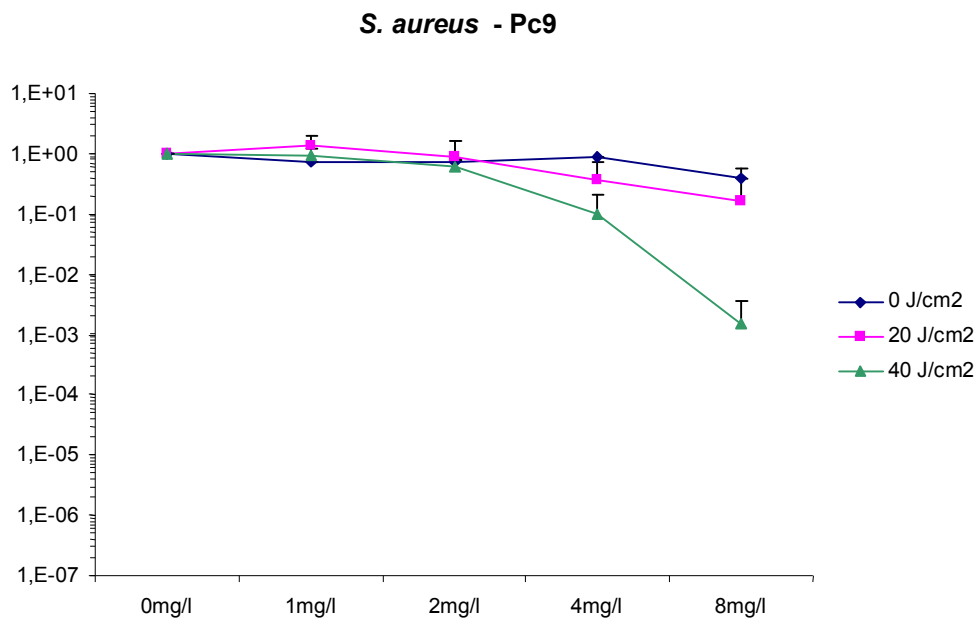
Graf č. 23. Fotoinaktivační efekt Pc8 vůči *E. coli*



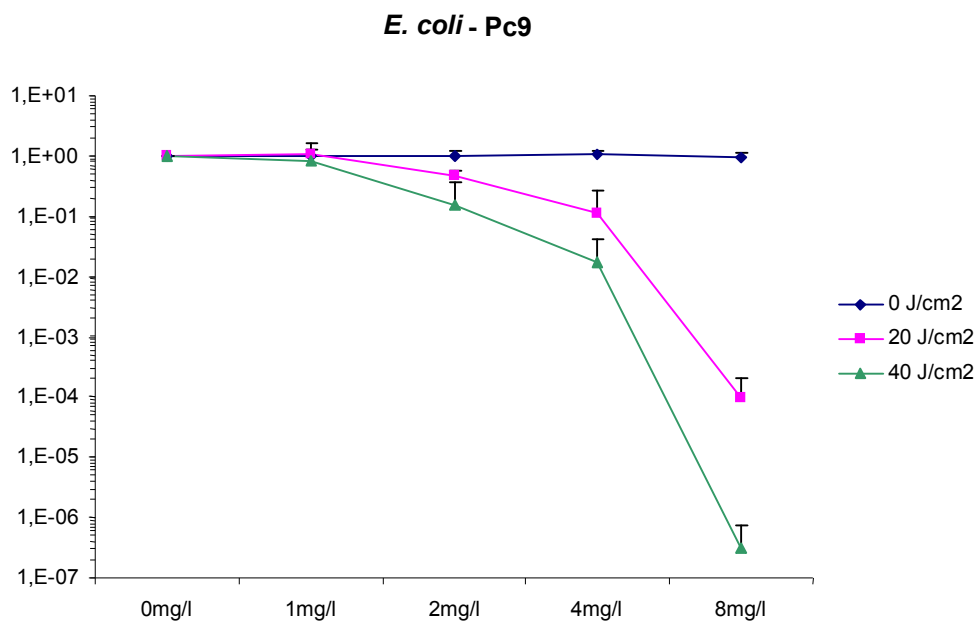
Graf č. 24. Fotoinaktivační efekt Pc8 vůči *C. albicans*

Látka Pc8 vykazovala schopnost fotoaktivovat *S. aureus*, v nejvyšší testované koncentraci (8 mg/l) a po ozáření dávkou světla 40 J/cm² došlo k poklesu počtu bakterií o 4 řády (viz Graf č.22). V pokusu s *E. coli* i *C. albicans* zůstala bez efektu (viz Graf č. 23, 24).

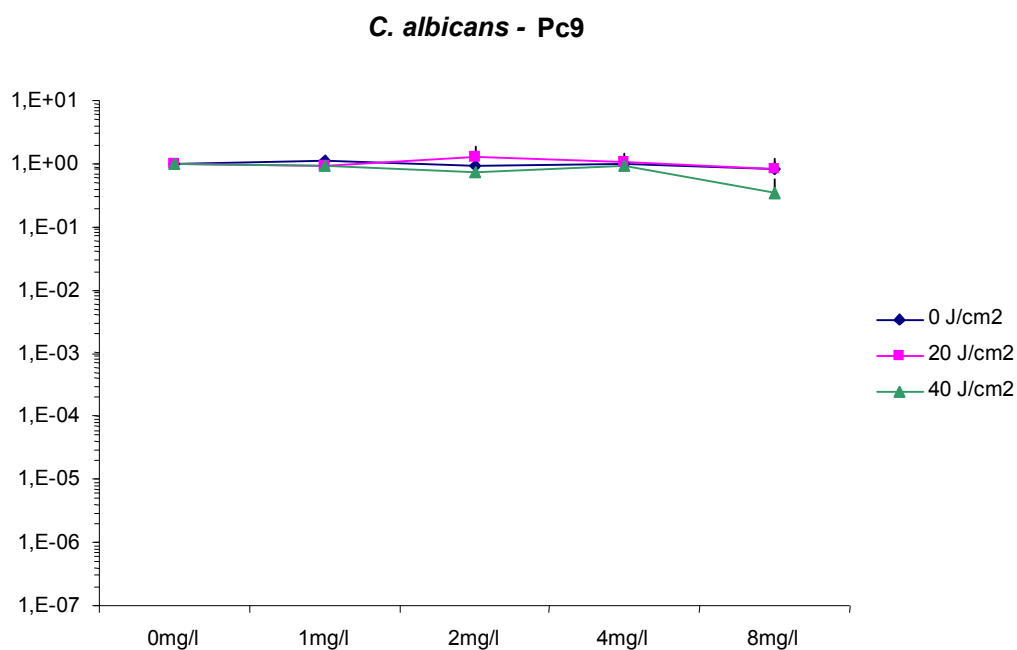
6.1.9 Pc9 - tetrakis(N-methylpyridium -3-oxy)-jodid zinečnatého ftalocyaninu



Graf č. 25. Fotoinaktivační efekt Pc9 vůči *S. aureus*



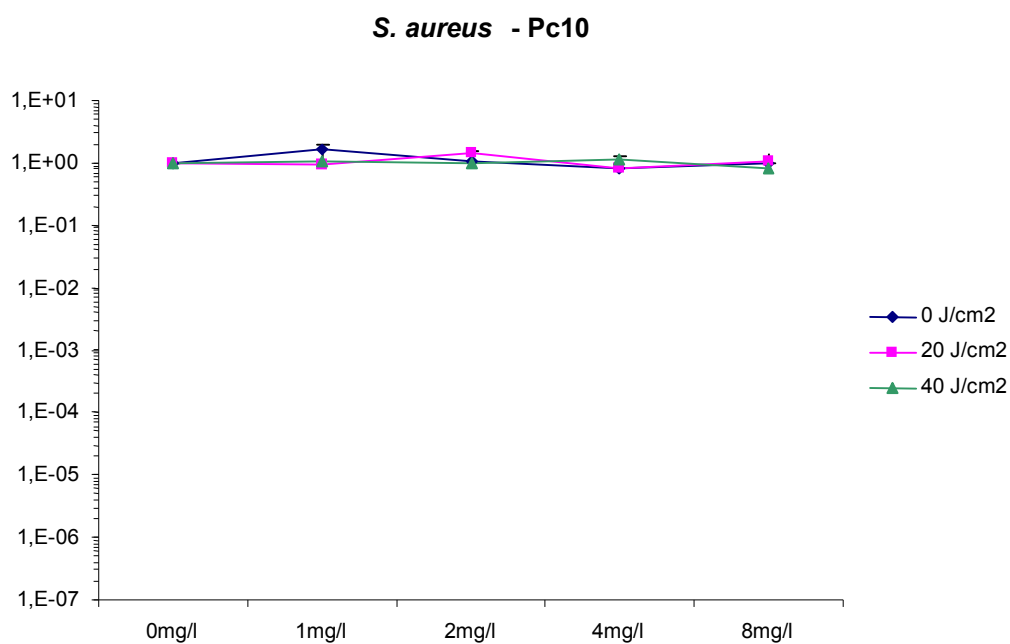
Graf č. 26. Fotoinaktivační efekt Pc9 vůči *E. coli*



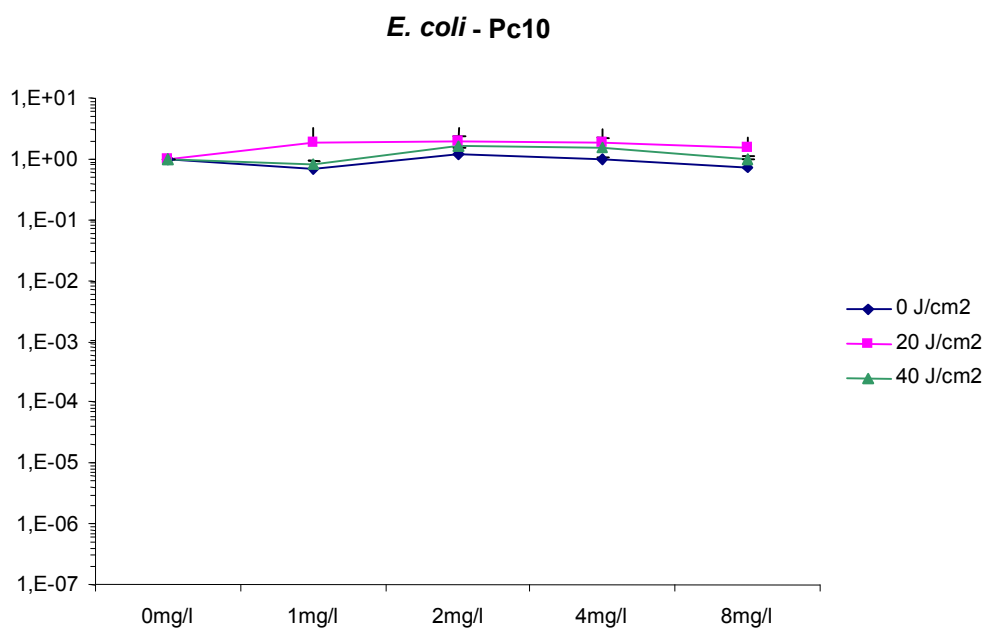
Graf č. 27. Fotoinaktivační efekt Pc9 vůči *C. albicans*

Látka Pc9 vykazovala antibakteriální efekt proti *S. aureus* i *E. coli* v nejvyšší testované koncentraci (8 mg/l) a po ozáření dávkou světla 40 J/cm² došlo ke snížení počtu bakterií kmene *S. aureus* o 3 řády (viz Graf č. 25) a u kmene *E. coli* o 6 řádů (viz Graf č. 26). Při pokusech s *C. albicans* zůstala tato látka bez efektu.

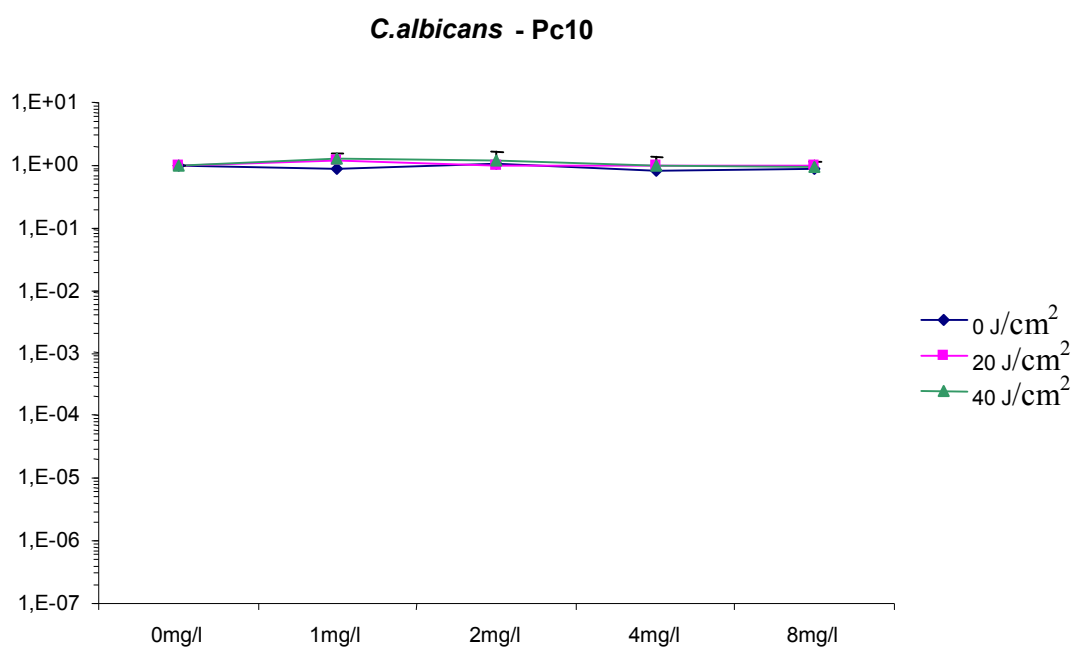
6.1.10 Pc10 - Sodná sůl tetrasulfonovaného bezkovového ftalocyaninu



Graf č.28. Fotoinaktivační efekt Pc10 vůči *S. aureus*



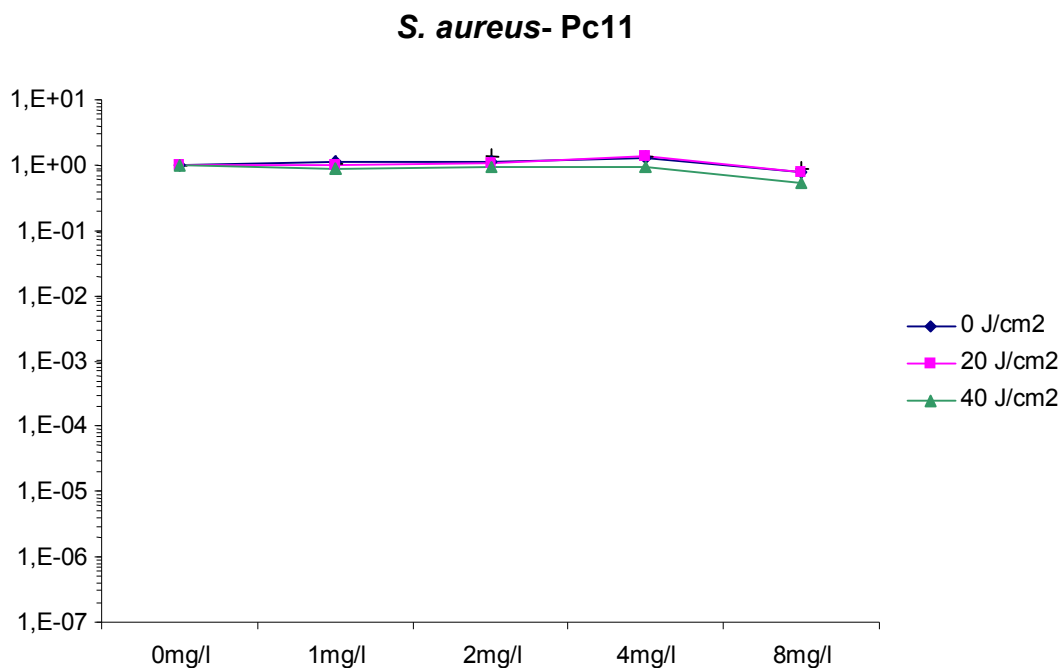
Graf č. 29. Fotoinaktivační efekt Pc10 vůči *E. coli*



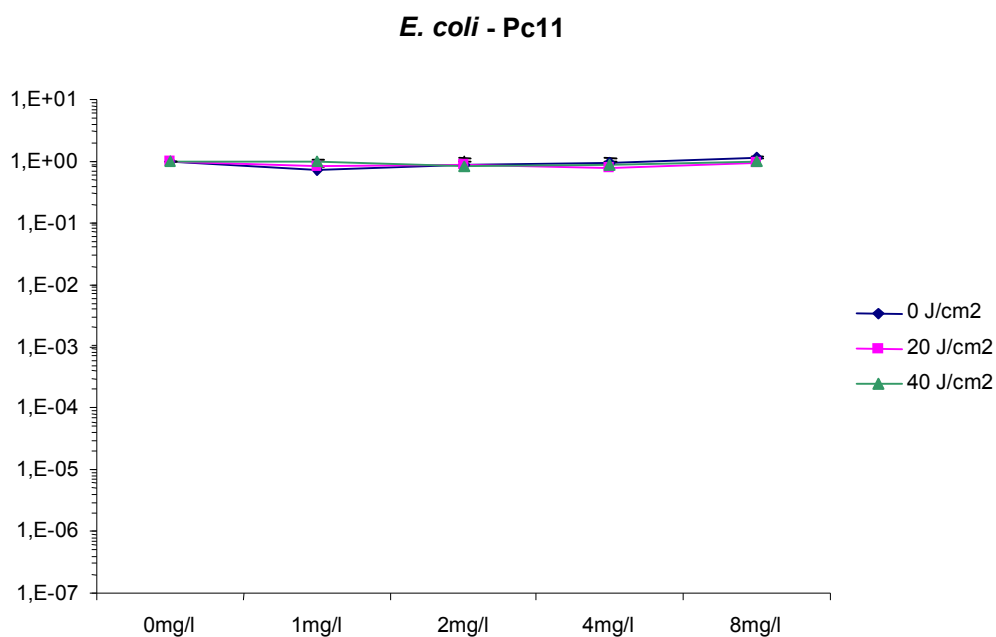
Graf č. 30. Fotoinaktivační efekt Pc10 vůči *C. albicans*

Látka Pc10 v pokusech s kmeny *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans* nevykázala při fotoinaktivaci žádný antimikrobní efekt.

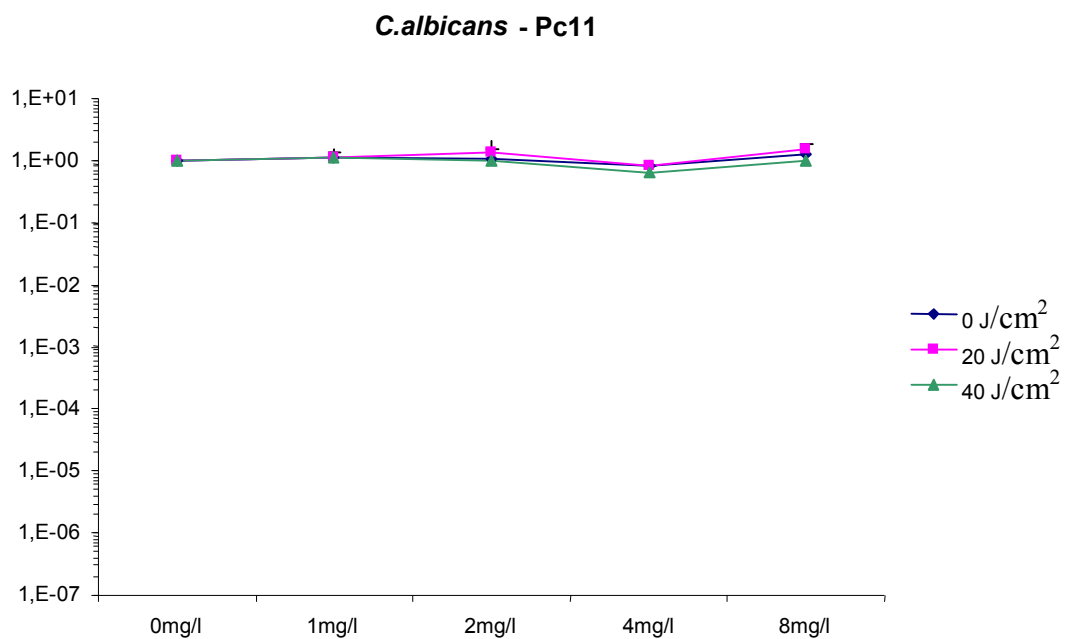
6.1.11 Pc11 - Tetrajodid tetrakis(4-*N,N,N*-trimethylamoniumfenylazo)zinečnatý ftalocyanin



Graf č. 31. Fotoinaktivační efekt Pc11 vůči *S. aureus*



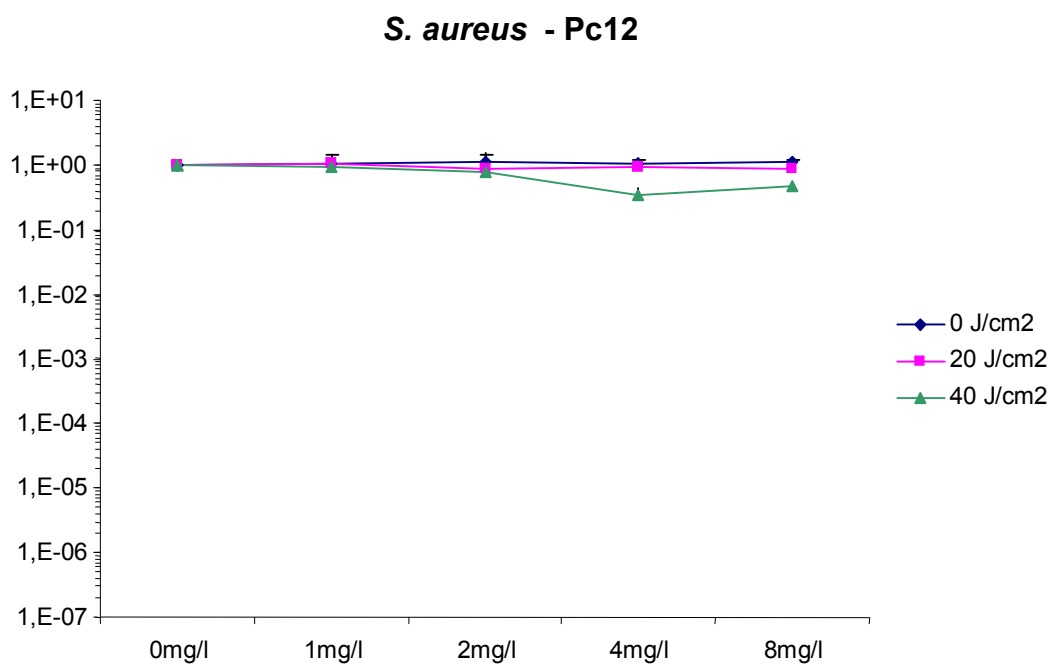
Graf č. 32. Fotoinaktivační efekt Pc11 vůči *E. coli*



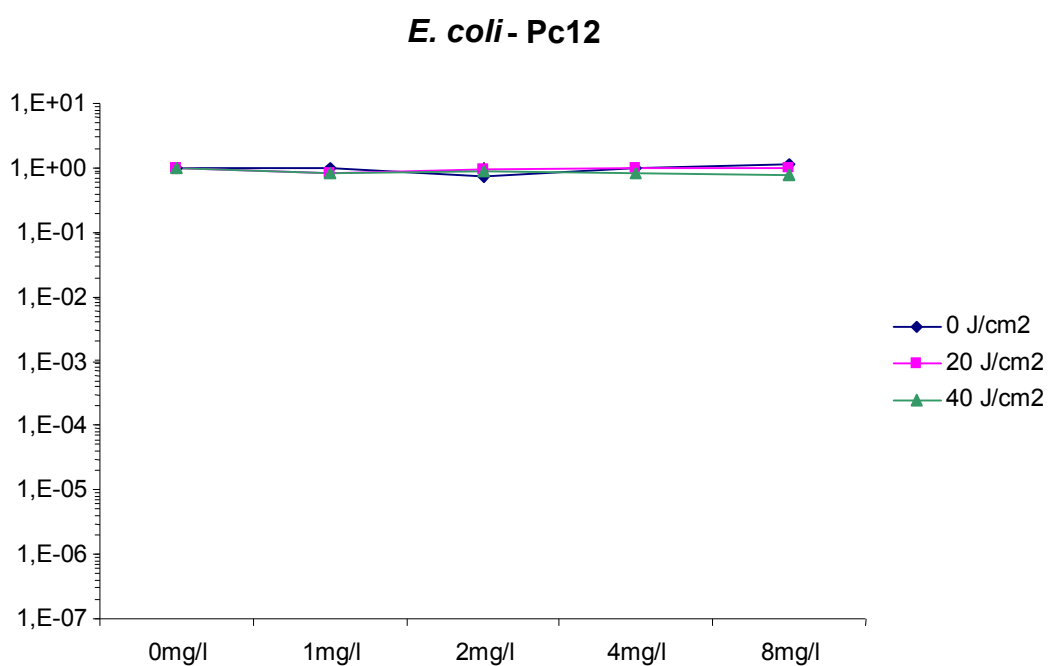
Graf č. 33. Fotoinaktivační efekt Pc11 vůči *C. albicans*

Látka Pc11 v pokusech s kmeny *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans* nevykázala při fotoinaktivaci žádný antimikrobní efekt.

6.1.12 Pc12 - Tetrakis(diethylfosfonato)zinečnatý ftalocyanin

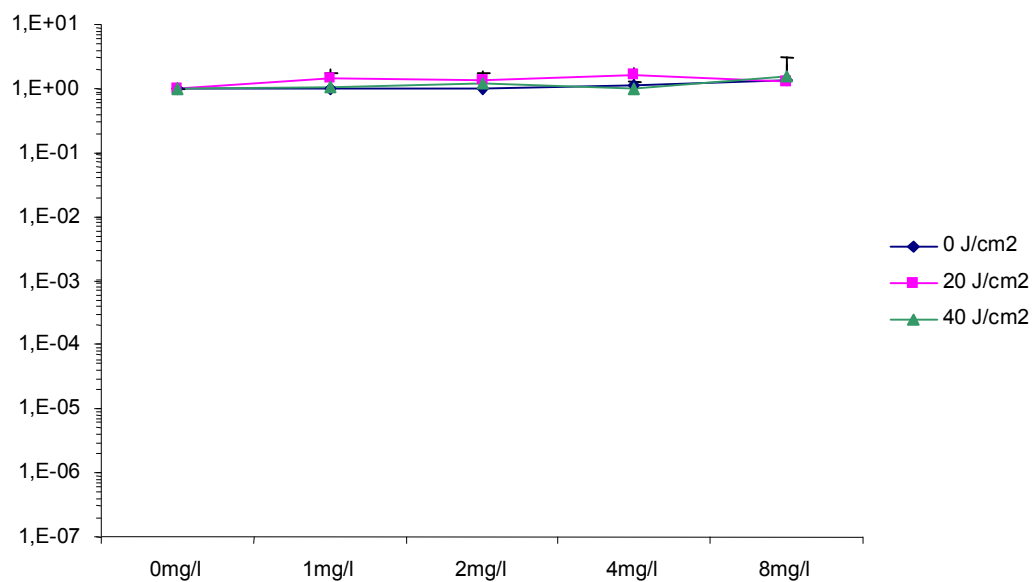


Graf č.34. Fotoinaktivační efekt Pc12 vůči *S. aureus*



Graf č. 35. Fotoinaktivační efekt Pc12 vůči *E. coli*

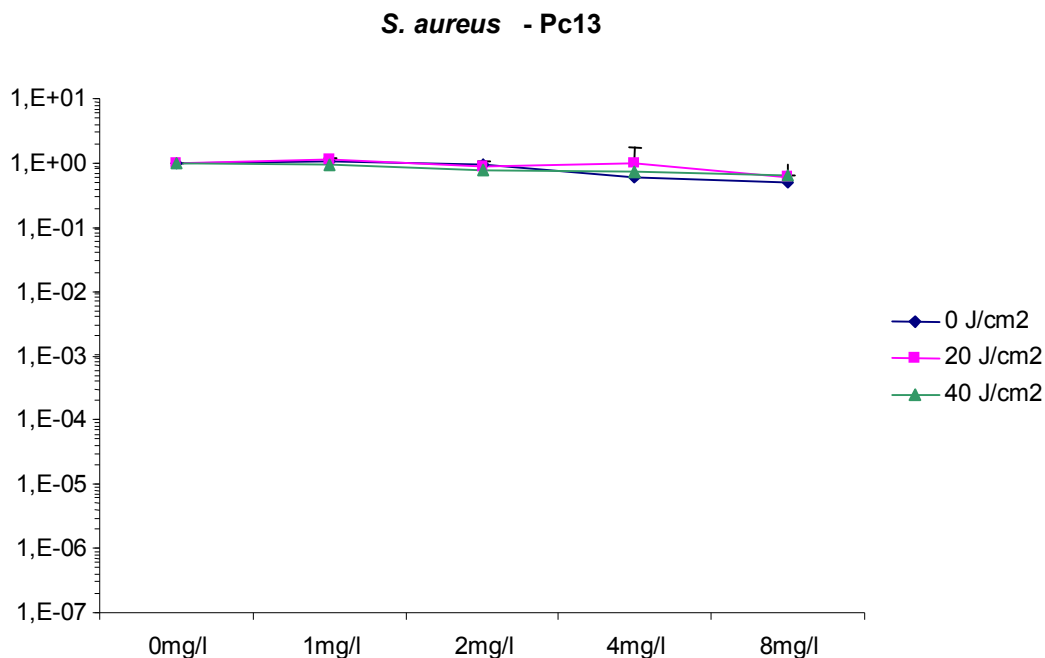
C. albicans - Pc12



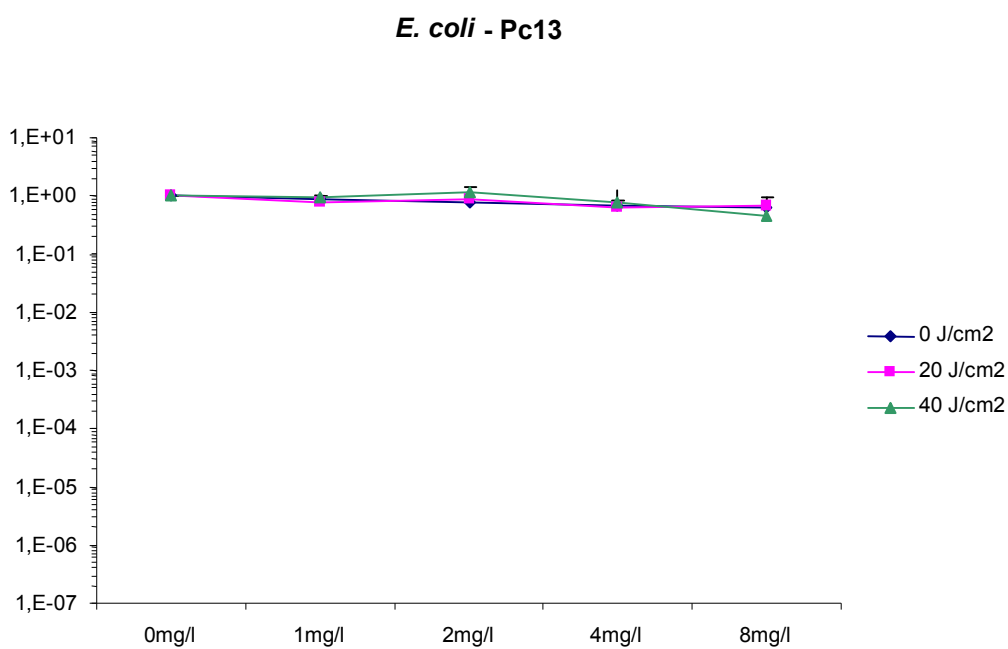
Graf č. 36. Fotoinaktivační efekt Pc12 vůči *C. albicans*

Látka Pc12 v pokusech s kmeny *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans* nevykázala při fotoinaktivaci žádný antimikrobní efekt.

6.1.13 Pc13 - Tetrakis(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-deoxy-*D*-glukosyl)zinečnatý ftalocyanin

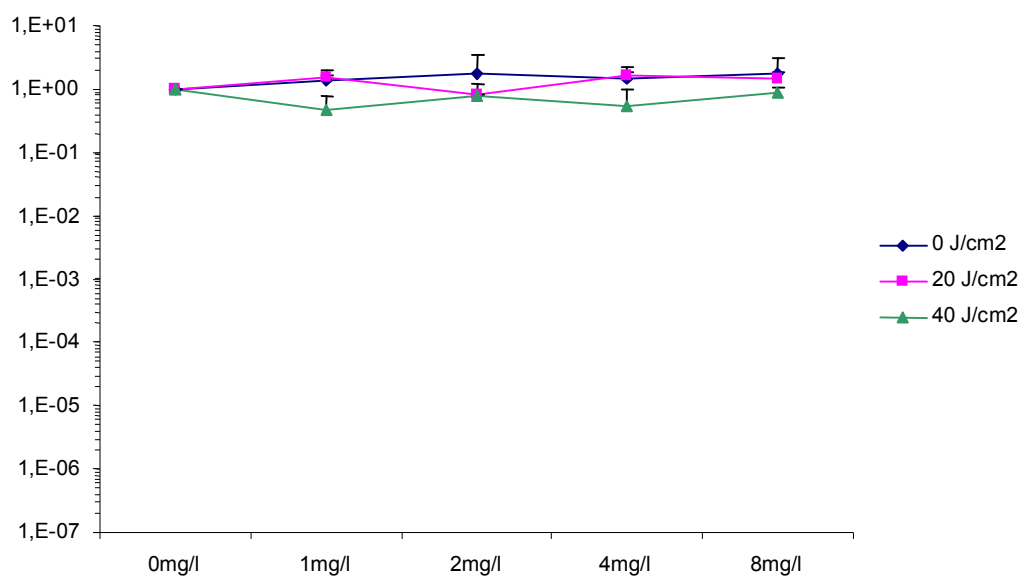


Graf č.37. Fotoinaktivační efekt Pc13 vůči *S. aureus*



Graf č. 38. Fotoinaktivační efekt Pc13 vůči *E. coli*

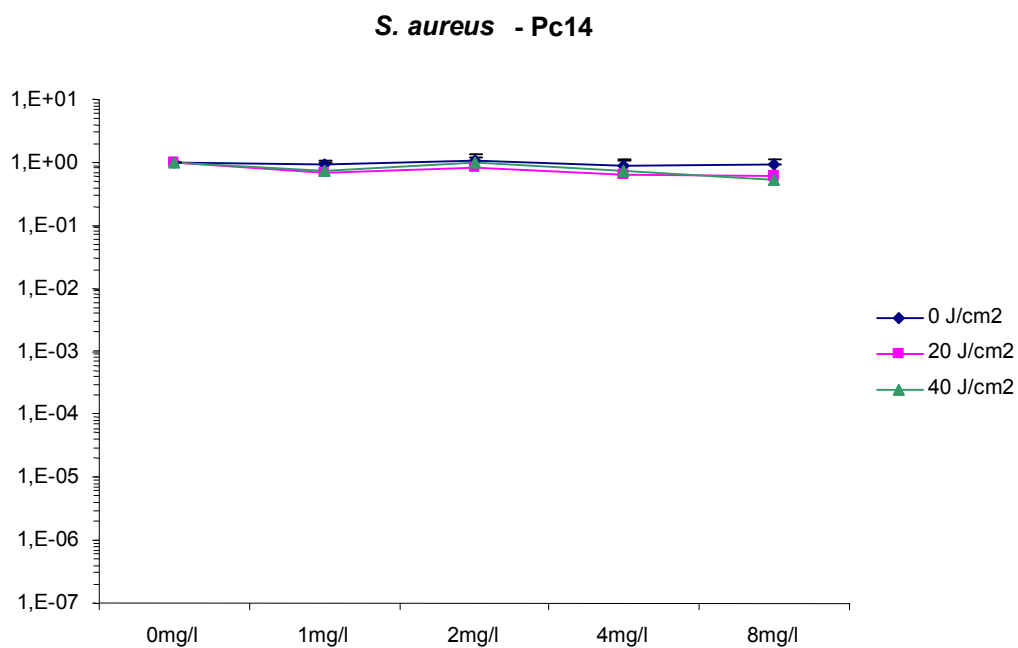
C. albicans - Pc13



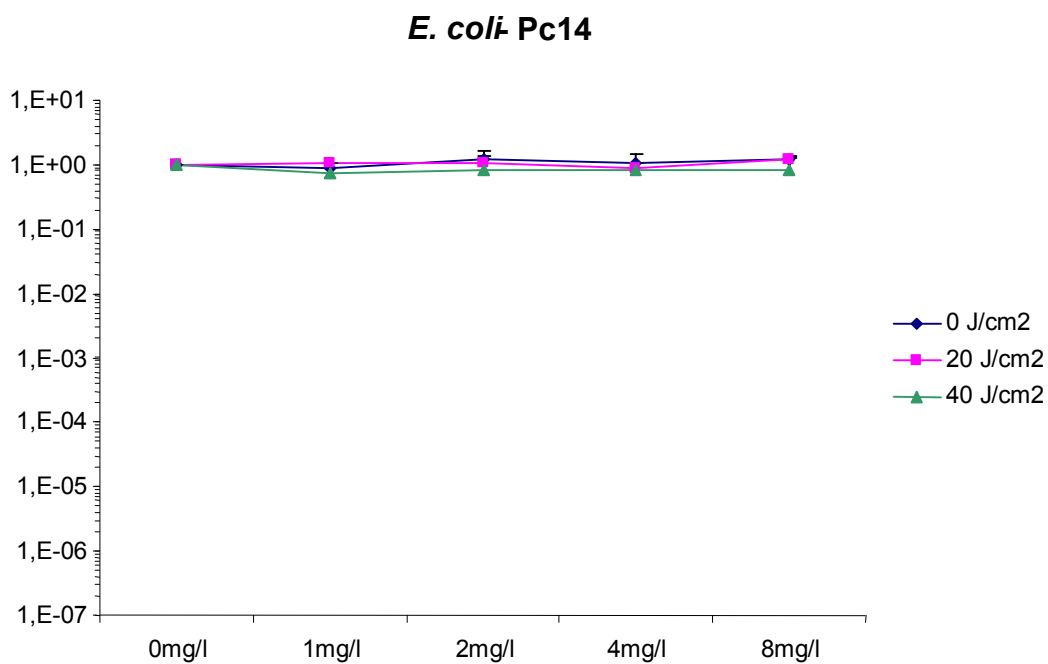
Graf č. 39. Fotoinaktivační efekt Pc13 vůči *C. albicans*

Látka Pc13 v pokusech s kmeny *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans* nevykázala při fotoinaktivaci žádný antimikrobní efekt.

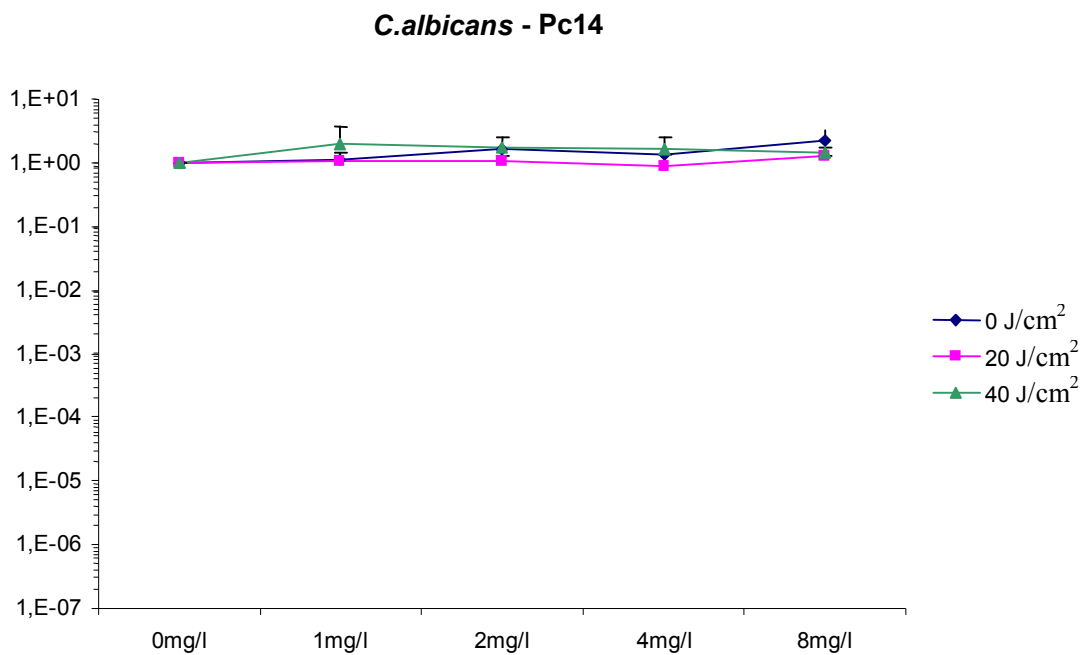
6.1.14 Pc14 - Tetrakis(*D*-glukopyranosyl)zinečnatý ftalocyanin



Graf č. 40. Fotoinaktivační efekt Pc14 vůči *S. aureus*



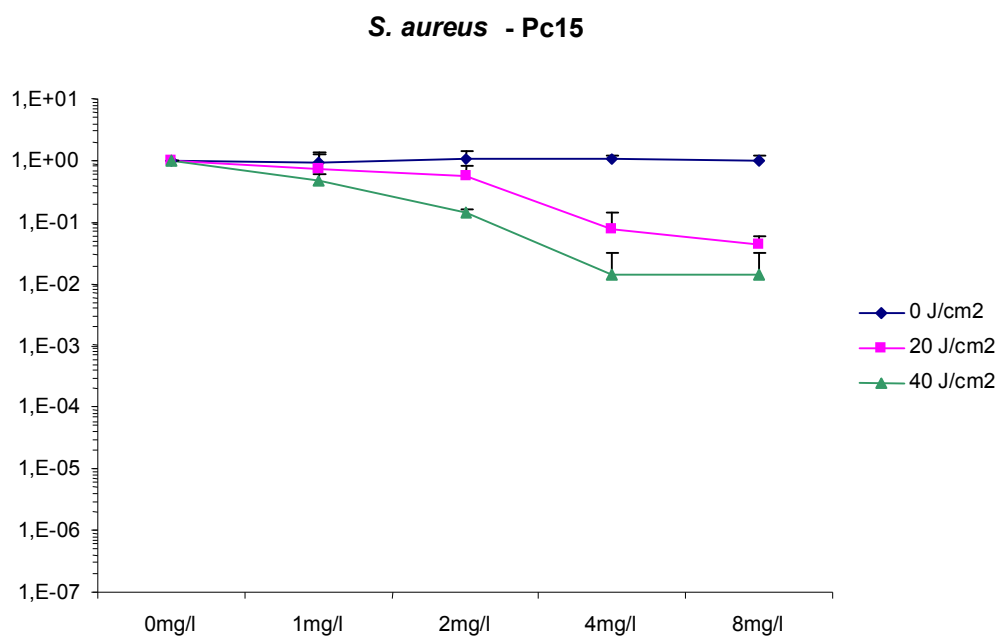
Graf č. 41. Fotoinaktivační efekt Pc14 vůči *E. coli*



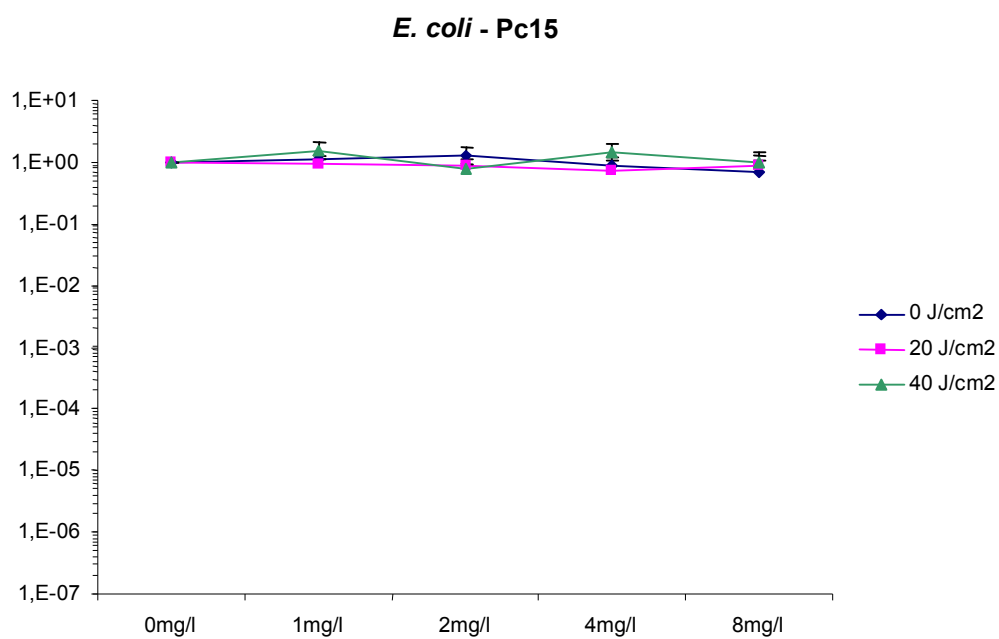
Graf č. 42. Fotoinaktivační efekt Pc14 vůči *C. albicans*

Látka Pc14 v pokusech s kmeny *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans* nevykázala při fotoinaktivaci žádný antimikrobní efekt.

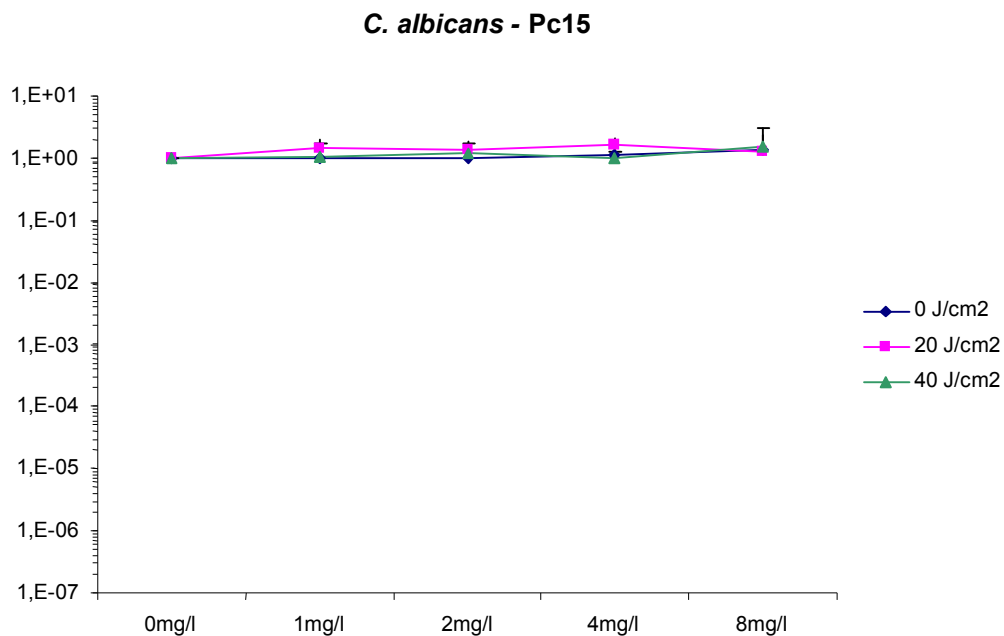
6.1.15 Pc15 - Sodná sůl trisulfonovaného ftalocyaninu hliníku



Graf č. 43. Fotoinaktivační efekt Pc15 vůči *S. aureus*



Graf č. 44. Fotoinaktivační efekt Pc15 vůči *E. coli*



Graf č. 45. Fotoinaktivační efekt Pc15 vůči *C. albicans*

Látka Pc15 vykazovala antimikrobní efekt pouze v pokusech se *S. aureus*, v nejvyšší testované koncentraci (8 mg/l) a po ozáření dávkou světla 40 J/cm² došlo ke snížení počtu bakterií o 2 řády (viz Graf č. 43). Při testech s *E. coli* i *C. albicans* zůstala látka Pc15 bez efektu (viz Graf č. 44, 45).

6.1.16 Hodnocení základního skriningové vyšetření fotoinaktivační schopnosti derivátů Pc

Tab. č . 4 Antimikrobní efekt derivátů ftalocyaninu (Pc) při fotoinaktivaci kmenů *S. aureus*, *E. coli* a *C. albicans*

Ftalocyaniny (Pc)	Frakce viabilních buněk v experimentech s ftalocyaniny v koncentraci 8 mg/l po ozáření laserem dávkou světla 20 J/cm ² a 40 J/cm ²					
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Candida albicans</i>	
	20 J/cm ²	40 J/cm ²	20 J/cm ²	40 J/cm ²	20 J/cm ²	40 J/cm ²
Pc1	9,6E-05	1E-07	0,85	0,85	0,96	0,88
Pc2	0	0	0,3	0,039	1	0,85
Pc3	0	0	0,02	0,00091	0,0012	1,7E-05
Pc4	0,0009	3,4E-06	0,41	0,082	1	0,81
Pc5	0,00037	1,1E-05	0,0018	0,00061	0,98	0,75
Pc6	0,00046	0,00012	0,28	0,025	0,074	0,0043
Pc7	0,00053	0,00039	1,7E-07	1E-07	1E-07	1E-07
Pc8	0,00046	0,00012	0,98	0,81	1	1
Pc9	0,17	0,0015	9,9E-05	3E-07	0,84	0,33
Pc10	1	0,83	1	0,97	0,96	0,94
Pc11	0,76	0,54	1	0,92	1	0,99
Pc12	0,86	0,47	0,97	0,76	1	1
Pc13	0,6	0,66	0,68	0,47	1	0,88
Pc14	0,59	0,53	1,2	0,83	1	1
Pc15	0,045	0,015	1	0,88	1	0,86

Z grafického znázornění výsledků jednotlivých derivátů ftalocyaninů i z přehledové tabulky vyplývá, že se jako nejúčinnější fotosenzitivní látky při fotoinaktivaci *S. aureus* projevíly amonná sůl disulfonovaného ftalocyaninu zinku (**Pc1**), sulfonovaný tetramethylamoniumhydroxyhlinitý ftalocyanin (**Pc2**) a sulfonovaný [(3-diethylamonium)-propylsulfonamid]ftalocyaninu zinku ve formě citrátu (**Pc3**). Tyto preparáty dokázaly při použití nejvyšší koncentrace a dávky ozáření úplně eliminovat kmen *S. aureus*. Dalšími účinnými látkami byly sodná sůl disulfonovaného ftalocyaninu hliníku (**Pc4**), který za

stejných podmínek způsobil pokles počtu bakterií o 5 řádů, a sulfonovaný bis(*N*-2-hydroxyethyl)-aminoethylsulfonamid hlinitého ftalocyaninu (**Pc5**), který dosáhl proti *S. aureus* stejného výsledku.

Při pokusech s *E. coli* se jako účinné fotosenzitivní látky projeví preparáty tetramethylenpyridinium chlorid hydroxyhlinitého ftalocyaninu (**Pc7**) a tetrakis (N-methylpyridium-3-oxy)-jodid zinečnatého ftalocyaninu (**Pc9**), při jejichž testování v nejvyšší koncentraci a maximální dávky světla došlo k významnému baktericidnímu efektu (pokles o 7 řádů, resp. o 6 řádů). Slibné výsledky ukázaly pokusy se sulfamidickými ftalocyaniny (**Pc3** - sulfonovaný [(3-diethylamonium)-propylsulfonamid]ftalocyaninu zinku ve formě citrátu, **Pc5** - sulfonovaný bis(*N*-2-hydroxyethyl)-aminoethylsulfonamid hlinitého ftalocyaninu), které působily efektivně proti *S. aureus* i *E. coli*.

Významný antifungální účinek vykazaly pouze látky **Pc3** a **Pc7**.

6.2 Výsledky dalších testů vybraných ftalocyaninů

Po ukončení pokusů s 15 základními deriváty ftalocyaninů byly na podkladě výsledků k dalšímu testování s vybranými patogeny (*Streptococcus mutans*, MRSA, *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*) zvoleny látky Pc3 a Pc7, které dle zvoleného kritéria (snížení inokula testované mikrobiální kultury o minimálně 3 řády) působily efektivně proti *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans*.

Výsledky pokusů fotoinaktivace vybraných skrínigových agens jednotlivými deriváty ftalocyaninů jsou znázorněny v grafech, v tabulce č. 5 jsou pak sumarizovány výsledky pokusů při použití nejvyšší koncentrace testovaného derivátu ftalocyaninu (8 mg/l) a maximální dávky světla 20 J/cm² a 40 J/cm².

Při hodnocení výsledků bylo zjištěno, že oba deriváty byly účinné při fotoinaktivaci grampozitivních bakterií a kvasinek, ale jen Pc7 působil efektivně při fotoinaktivaci gramnegativních bakterií.

Z grafického znázornění výsledků dodatečných experimentů s látkami Pc3 a Pc7 i z přehledové tabulky (viz Tab. č. 5) vyplývá, že oba deriváty byly účinné při fotoinaktivaci grampozitivních bakterií, při použití koncentrace 8 mg/l a dávky světla 40 J/cm² dokázaly efektivně působit na kmen streptokoka i MRSA.

Při pokusech s gramnegativními bakteriemi *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa* se jako účinná fotosenzitivní látka projevila látka Pc7, v experimentech s koncentrací ftalocyaninu 8 mg/l a dávkou světla 40 J/cm² dokázala úplně eliminovat testované kmeny. Látka Pc3 v testech s *E. coli* dokázala v experimentech s koncentrací ftalocyaninu 8 mg/l a dávkou světla 40 J/cm² snížit inokulum o tři řády, v pokusech s *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa* dokázala snížit inokulum testovaného kmene pouze o 98 %, resp. o 91%.

Při pokusech s kvasinkami *C. glabrata* a *C. krusei* prokázaly výrazný antifungální účinek látky Pc3 i Pc7. Za stejných podmínek dokázaly úplně eliminovat inokulum obou testovaných kmenů.

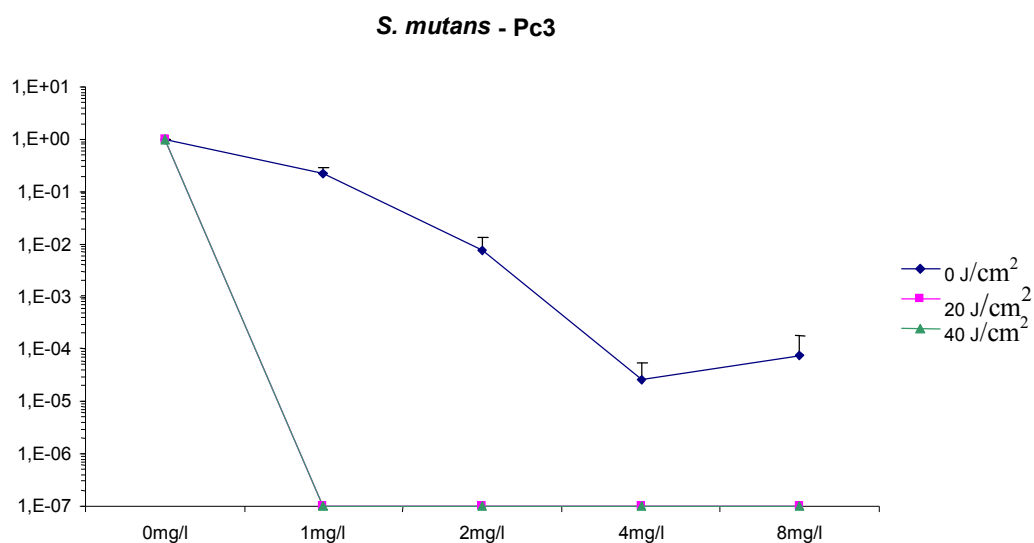
Antimikrobní efekt testovaných ftalocyaninových preparátů byl ve všech pokusech přímo úměrný dávce světla použitého k ozáření bakteriální kultury. Zároveň byla velikost antibakteriálního efektu přímo závislá i na koncentraci testované látky. Samotné ozáření testované kultury bez přítomnosti Pc nemělo vliv na viabilitu vyšetřovaných mikroorganismů, ale stejně jako v základním skrínigu oba deriváty Pc prokázaly určitý antibakteriální efekt i bez následného ozáření. V případě Pc3 šlo především o efekt vůči grampozitivním mikrobům,

v koncentraci 8 mg/l dokázala zmenšit inokulum *S. mutans* o 99,92% (viz Graf č. 46) a MRSA o 100% (viz Graf č. 47). Látka Pc7 ve stejné koncentraci ovlivnila kulturu *K. pneumoniae* o 99,99% (viz Graf č. 54) a kulturu *Ps. aeruginosa* o 99,27% (viz Graf č. 55).

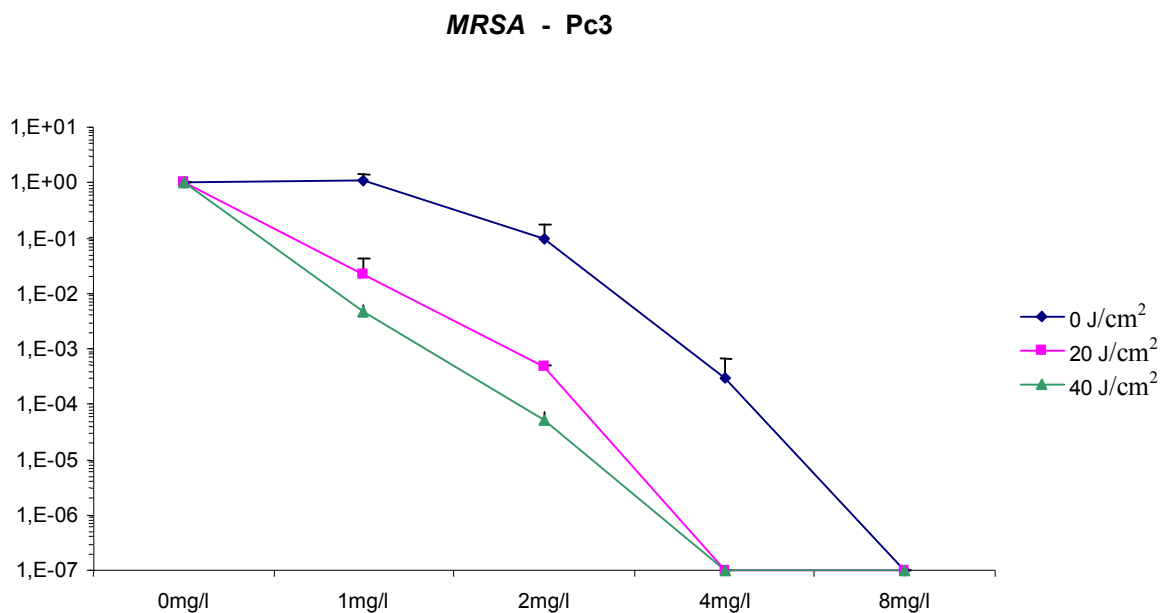
Tab. č. 5 Přehled *in vitro* antimikrobní aktivity testovaných ftalocyaninů proti vybraným kmenům bakterií a kvasinek.

Ftalocyanin	Mikroorganismus	Frakce viabilních buněk při koncentraci FTC 8 mg/l	
		20 J/cm ²	40 J/cm ²
Pc 3	<i>Streptococcus mutans</i>	0	0
	MRSA	0	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,084	0,021
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,17	0,087
	<i>Candida glabrata</i>	0,00028	0
	<i>Candida krusei</i>	0	0
Pc 7	<i>Streptococcus mutans</i>	0	0
	MRSA	0,0035	0,0001
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0
	<i>Candida glabrata</i>	0	0
	<i>Candida krusei</i>	0,00078	0

6.2.1 Pc3 - sulfonovaný [(3-diethylamonium)-propylsulfonamid] ftalocyaninu zinku

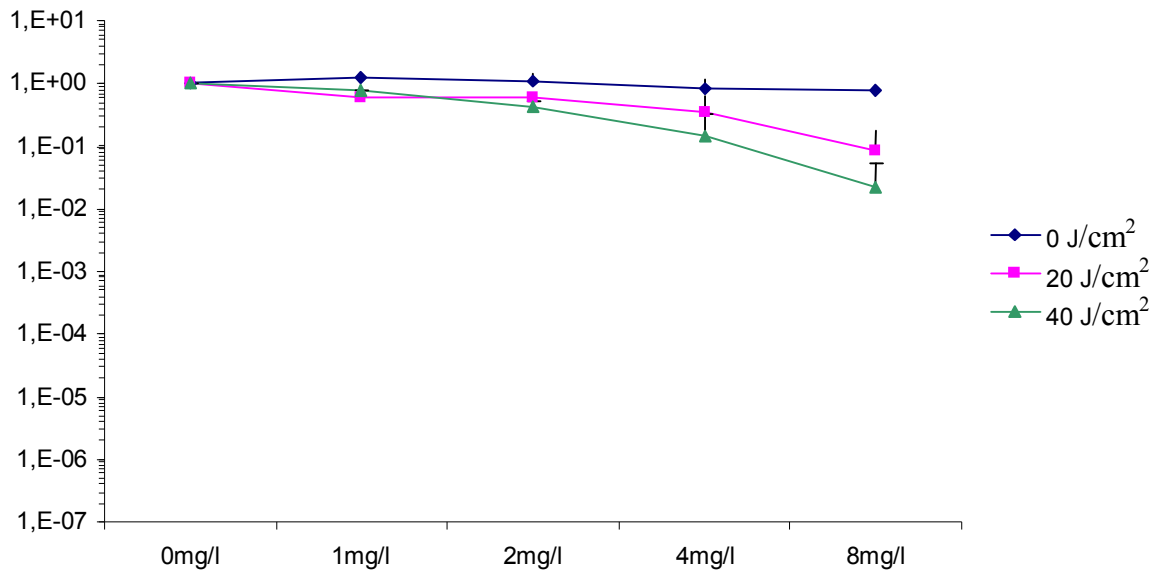


Graf č. 46. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči *Str. mutans*



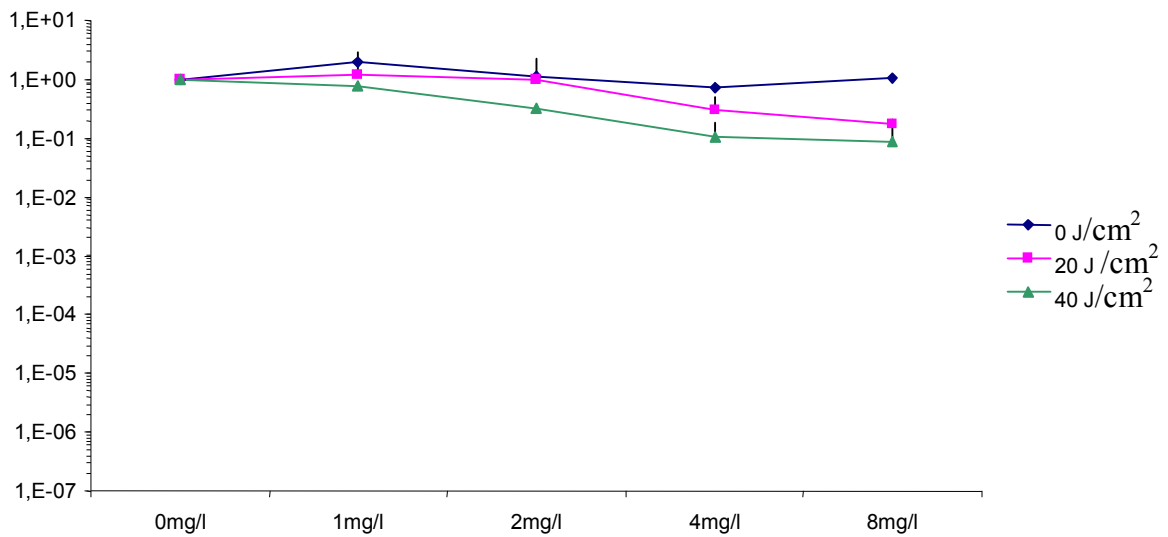
Graf č. 47. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči MRSA

***K. pneumoniae* - Pc3**



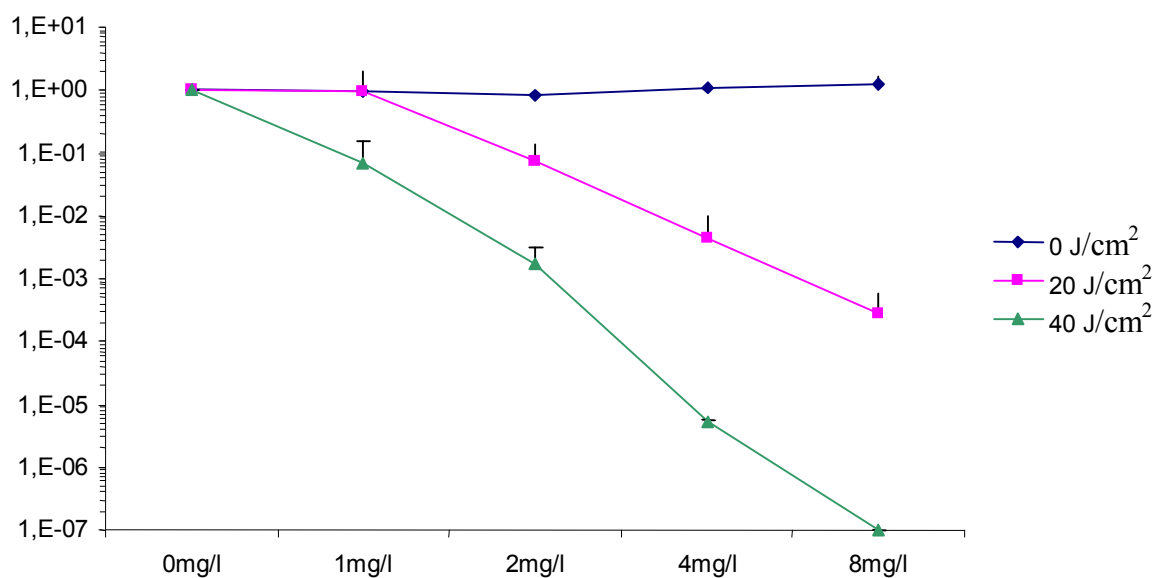
Graf č. 48. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči *K. pneumoniae*

***Ps. aeruginosa* - Pc3**



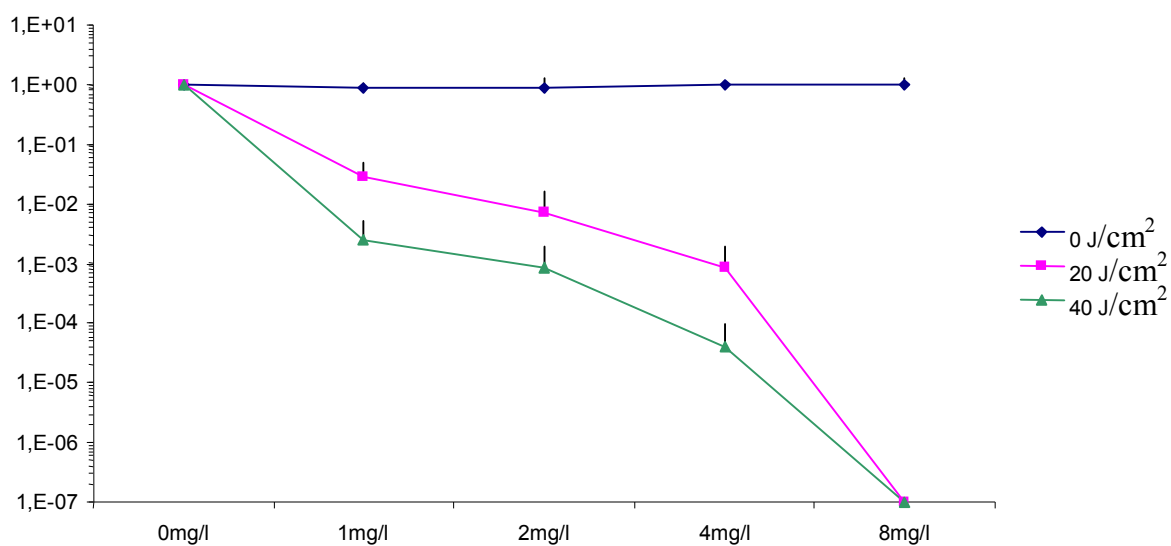
Graf č. 49. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči *Ps. aeruginosa*

C. glabrata - Pc3



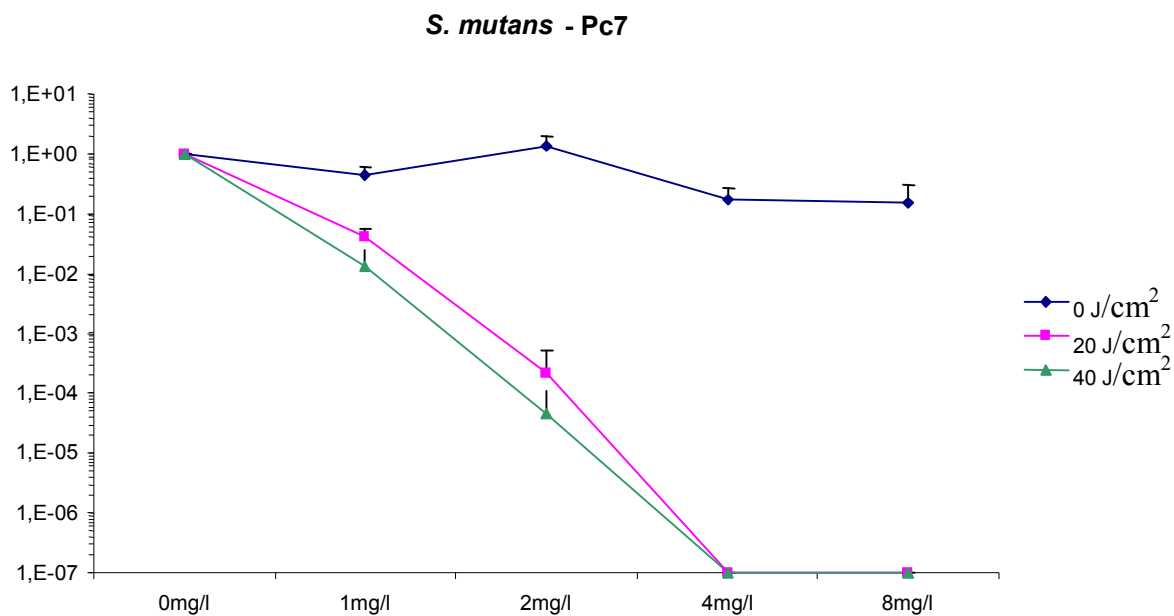
Graf č. 50. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči *C. glabrata*

C. krusei - Pc3

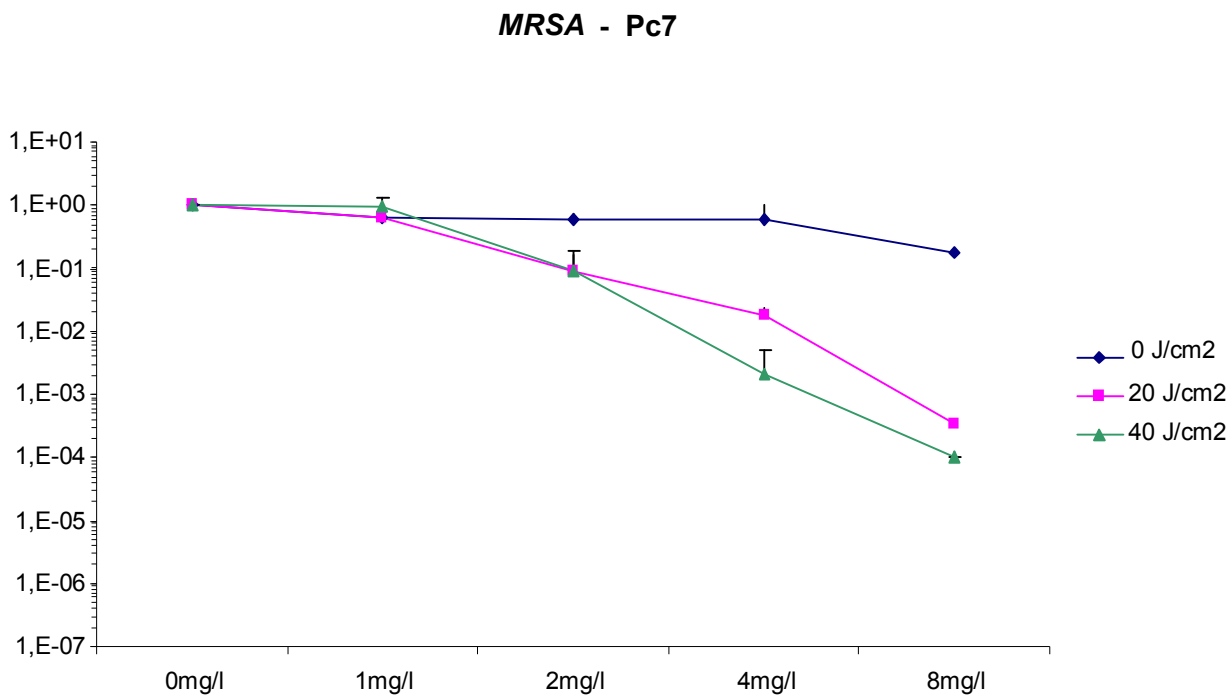


Graf č. 51. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči *C. krusei*

6.2.2 Pc7 - tetramethylenpyridinium chlorid hydroxyhlinitého ftalocyaninu

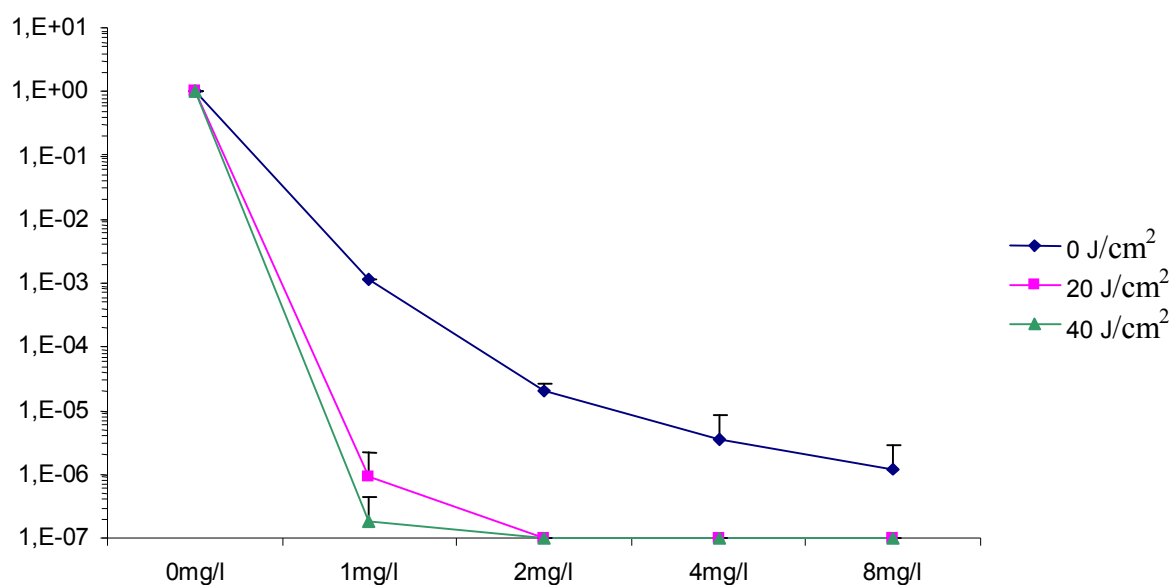


Graf č. 52. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči *Str. mutans*



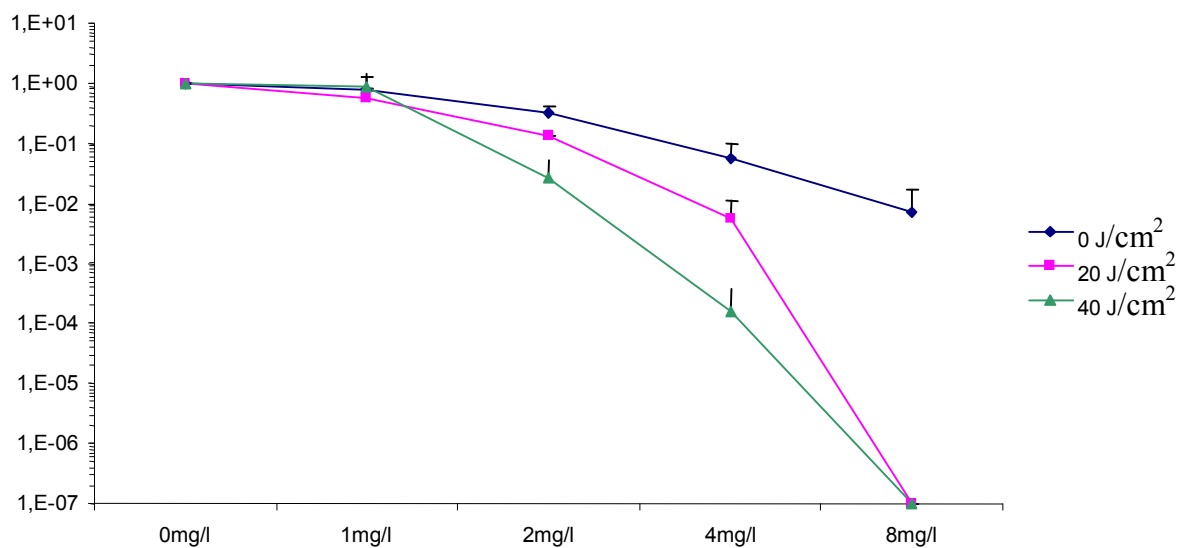
Graf č. 53. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči MRSA

K. pneumoniae - Pc7



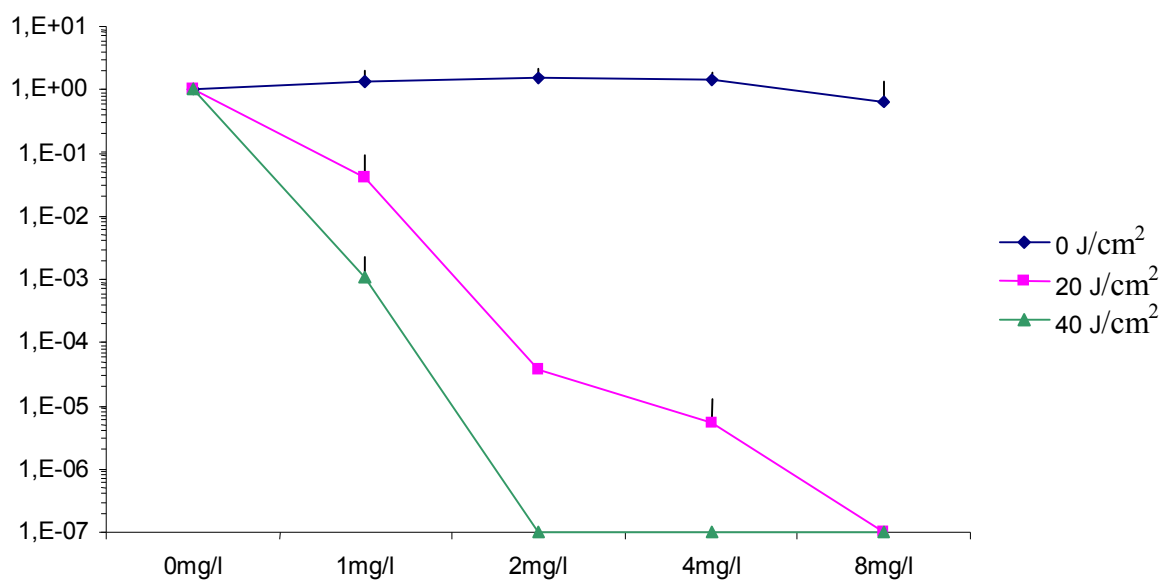
Graf č. 54. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči *K. pneumoniae*

Ps. aeruginosa - Pc7



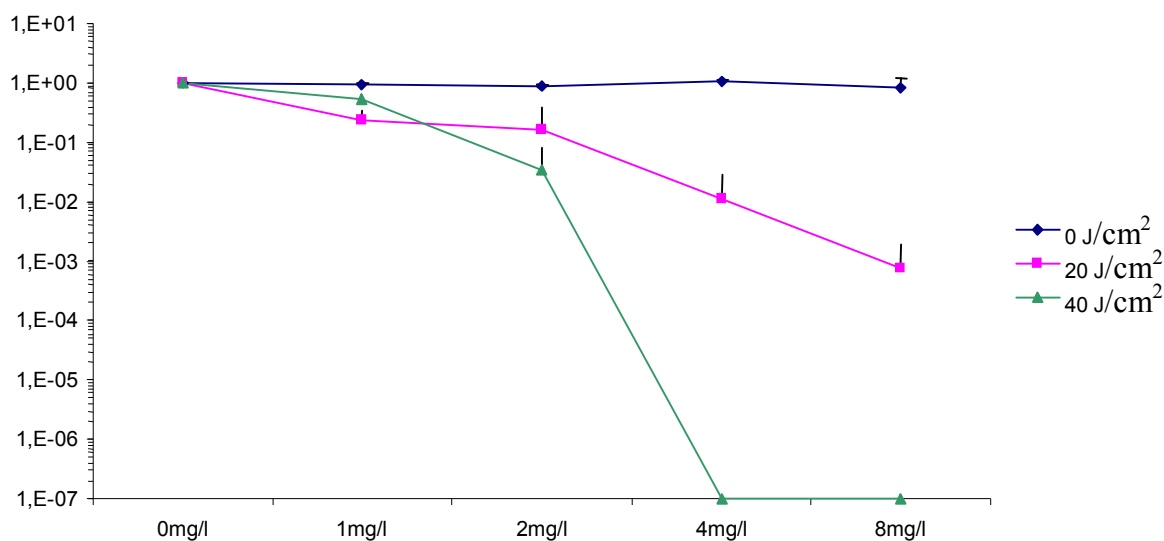
Graf č. 55. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči *Ps. aeruginosa*

C. glabrata - Pc7



Graf č. 56. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči *C. glabrata*

C. krusei - Pc7



Graf č. 57. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči *C. krusei*

6.3 Výsledky testování ftalocyaninů na nosiči

V následujících experimentech byl sledován antimikrobní efekt derivátu ftalocyaninu Pc7 po navázání na nosič, jako který byla zvolena hydroxypropylmethylcelulóza (HPMC). Byly testovány dvě koncentrace gelu - 1,5% HPMC s hydroxyhlinitým ftalocyaninem substituovaným pyridiniem – s koncentrací Pc7 20 mg na 1000g gelu (**H3**) a 3% HPMC s Pc7 – se dvěma různými koncentracemi účinné látky – 10 mg (**H2**) a 20 mg (**H1**) na 1000 g gelu. Testy byly prováděny s kulturami základního skríningu – s kmeny *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Candida albicans*. Testované kultury byly inkubovány 30 min, 2 a 24 hod, ozařovány byly konstantně dávkou světla 40 J/cm².

Výsledky pokusů fotoinaktivace Pc7 na nosiči jsou znázorněny v tabulce č. 6.

Při hodnocení výsledků bylo zjištěno, že antimikrobní fotoinaktivační efekt Pc7 je ovlivněn koncentrací účinné látky, vazbou na HPMC i její koncentrací v gelu. Z tabulky č. 6 je zřejmé, že dle zvolené kritéria (snížení inokula testované mikrobiální kultury o minimálně 3 řády) působil gel H1 efektivně vůči *S. aureus*, gel H3 s nižší koncentrací HPMC pak byl účinný především vůči *E. coli*.

Antimikrobní efekt testovaných gelů byl větší za použití ozáření světlem, ale výrazný antibakteriální efekt gelů byl zaznamenán i bez následného ozáření.

Gel H1 v experimentu vykazoval výrazný antibakteriální efekt vůči *S. aureus* i bez ozáření, po inkubační době 30 minut dokázal snížit inokulum o 99,95 %, podobně gel H2 s nižší koncentrací účinné látky dokázal totéž – o 95,8 %. Po ozáření dávkou světla 40 J/cm² dokázal gel H1 ještě o něco zvýšit antibakteriální efekt a došlo ke snížení inokula testované kultury o řády a u gelu H2 o 3 řády. Gel H3 dokázal ovlivnit kulturu *S. aureus* při inkubační době 30 minut pouze o 56% a při 2-hodinové inkubaci o 64%.

V pokusech s *E. coli* se naopak jako účinnější projevil gel H3, kdy po 30 minutové inkubaci a ozáření došlo k úplné eliminaci testované kultury, téhož efektu však bylo dosaženo i bez ozáření. Gely H1 i H2 dokázaly ovlivnit kulturu za stejných podmínek o 98,9 %, resp. 96,3 %.

V pokusech s *C. albicans* projevil mírný antifungální efekt pouze gel H3 – došlo k ovlivnění testované kultury po 30-minutové inkubaci o 22%, po 24-hodinové inkubaci až o 78%. Zbývající dva gely antifungální efekt nevykázaly.

24-hodinová inkubace se s výjimkou gelu H3 při působení na *C. albicans* ukázala jako nevhodná, antimikrobní efekt gelů při této inkubační době byl menší nebo žádný.

Tab. č. 6 Přehled *in vitro* antimikrobní aktivity Pc7 po navázání na nosič vůči kmenům *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Candida albicans*

Pc7 na nosiči	Testovaný mikroorganismus	Frakce viabilních buněk					
		ID 30min		ID 2 hod		ID 24 hod	
		0 J/cm ²	40 J/cm ²	0 J/cm ²	40 J/cm ²	0 J/cm ²	40 J/cm ²
H1	<i>S. aureus</i>	0,00045	0,00037	0,00018	0,000090	1	0,30
	<i>E. coli</i>	0,015	0,011	0,55	0,50	0,18	0,24
	<i>C. albicans</i>	1	1	1	1	1	1
H2	<i>S. aureus</i>	0,042	0,0033	0,20	0,062	0,42	0,43
	<i>E. coli</i>	0,14	0,037	0,66	0,15	0,50	0,18
	<i>C. albicans</i>	1	1	1	1	1	1
H3	<i>S. aureus</i>	1	0,44	0,50	0,36	1,12	1,12
	<i>E. coli</i>	0	0	5,1E-06	7,1E-07	0,011	0,00096
	<i>C. albicans</i>	0,79	0,78	0,73	0,72	0,42	0,22

7 Diskuse

Fotodynamická antimikrobní terapie představuje lokální, cílenou, neinvazivní metodu vhodnou k terapii povrchových infekcí, která by se v budoucnu mohla stát u vybraných infekcí a jejich klinických forem účinnou alternativou použití antibiotik a antiseptik. V současné době narůstající rezistence bakterií k antibiotikům se zájem o PACT stupňuje a stává se předmětem studia mnohých prací. Hledají se především nové účinné fotosenzitivní látky a vhodné lékové formy a možnosti jejich aplikace s ohledem na spektrum mikrobu citlivých k fotoinaktivaci.

V této práci je předmětem studia skupina derivátů ftalocyaninů, které jsou známy jako slibné fotosenzitizéry se schopností tvořit velké množství singlet kyslíku. Fotoinaktivační schopnost některých těchto ftalocyaninových derivátů byla zkoumána již v pracích jiných autorů - disulfonovaný ftalocyanin zinku (48), disulfonovaný ftalocyanin hliníku (43, 45, 46), tetrakis (N-methylpyridium -3-oxy)-jodid zinečnatého ftalocyaninu (25, 48, 95), použití ostatních preparátů námi studovaného souboru pro fotoinaktivaci mikrobu ještě nebylo doposud v literatuře popsáno. V této práci srovnáváme fotoinaktivační efekt ftalocyaninů z našeho souboru s již publikovanými výsledky.

Naše výsledky potvrdily, že zásadní vliv na efektivitu testovaných fotosenzitivních látek má na jedné straně molekulární struktura (28), elektrický náboj (23, 31) a velikost dávky ozáření, na straně druhé rozdíly v citlivosti mezi jednotlivými druhy a skupinami infekčních agens. Stejně jako v dostupné literatuře byl i v naší práci zaznamenán velký rozdíl v citlivosti grampozitivních i gramnegativních bakterií (57) a kvasinek (28).

Grampozitivní bakterie byly k fotoinaktivaci poměrně citlivé. Z výsledků je zřejmé, že osm z 15 zkoumaných látek se mohlo hodnotit jako efektivní PS při fotoinaktivaci *S. aureus*. Antimikrobní efekt byl dosažen při fotoinaktivaci zprostředkované různými fotosenzitivními látkami, účinné byly anionické, kationické i amfifilní PS. Mezi nejúčinnější fotosenzitivní látky pro fotoinaktivaci *S. aureus* v naší práci patřily amonná sůl disulfonovaného ftalocyaninu zinku (Pc1) a sulfonovaný tetramethylamoniumhydroxyhlinitý ftalocyanin (Pc2) – anionické preparáty, a sulfonovaný [(3-diethylammonium)-propylsulfonamid]ftalocyaninu zinku ve formě citrátu (Pc3) – primárně anionická molekula s navázaným kladně nabitým řetězcem. Tyto preparáty dokázaly úplně eliminovat bakteriální kulturu *S. aureus*. Disulfonovaný ftalocyanin zinku byl již v literatuře popsán a naše výsledky odpovídaly zjištěním ostatních autorů (48). I další ftalocyaniny z našeho souboru se záporným nábojem – sodná sůl disulfonovaného ftalocyaninu hliníku (Pc4), sulfonovaný

bis(*N*-2-hydroxyethyl)-aminoethylsulfonamid hlinitého ftalocyaninu (Pc5), amonná sůl trisulfonovaného ftalocyaninu zinku (Pc8), sodná sůl trisulfonovaného ftalocyaninu hliníku (Pc15) – také vykazovaly alespoň do určité míry antibakteriální efekt při fotoinaktivaci *S. aureus*. V literatuře byly popsány výsledky pokusů se sulfonovanými ftalocyaniny zinku a disulfonovaným ftalocyaninem hliníku. Naše výsledky získané při pokusech s těmito látkami (viz Tab. č. 4) odpovídají poznatkům prezentovaným v těchto pracích (43, 45, 48). Záporně nabitá ftalocyaniany jsou schopná fotoinaktivovat grampozitivní mikroby, ale velikost účinku se mezi jednotlivými preparáty liší v závislosti na jejich molekulární struktuře (28). Bylo rovněž zdokumentováno, že fotosenzitivní látky mohou účinkovat také proti grampozitivním bakteriím rezistentním k antibiotikům (44) a rostoucím v biofilmu (60).

Gramnegativní *E. coli* byla k fotoinaktivaci odolnější, z 15 testovaných Pc byly při fotoinaktivaci hodnoceny jako účinné pouze čtyři deriváty (viz Tab. č. 4). Ze čtyř účinných fotosenzitivních látek byly dvě substance kationické a další dvě amfifilní. Kationické preparáty, které se díky svému náboji považují za vhodnější k působení na gramnegativní mikroby, byly v našem souboru testovaných ftalocyaninů čtyři (Pc6, Pc7, Pc9, a Pc11).

Tetrakis (*N*-methylpyridium-3-oxo)-jodid zinečnatého ftalocyaninu (**Pc9**) byl již testován jinými autory, většinou testoval efekt zmiňovaného ftalocyaninu při fotoinaktivaci gramnegativních mikrobů a jejich výsledkům odpovídají i naše zjištění, že tato látka působí efektivně proti gramnegativním mikrobům (49, 95). Podle Minnocka (49) je to způsobeno přítomností kladně nabitá *N*-methylpyridylové skupiny umožňující vazbu ftalocyaninu na lipopolysacharid gramnegativních bakterií. V práci Mantarevové (95) prováděli testy se stejnou látkou na kmenech *S. aureus*, MRSA, *P. aeruginosa* a *Candida albicans*. Tetrakis (*N*-methylpyridium-3-oxo)-jodid zinečnatého ftalocyaninu měl za srovnatelných podmínek schopnost kompletně inaktivovat kulturu *S. aureus* a *C. albicans* (1,5 μM , 12 J/cm²). U testované kultury *Pseudomonas aeruginosa* došlo také k významnému zmenšení inokula (o 4 řády), ale až při použití vyšší koncentrace FTC a větší dávce světla (6 μM , 60 J/cm²). Ačkoliv i v naší práci Pc9 dokázal v pokusech (při koncentraci 8 mg/l a 40 J/cm²) částečně ovlivnit testovanou kulturu *S. aureus* (SF 0,0015; tj. o necelé tři řády) a *C. albicans* (SF 0, 33), nemohli jsme ho hodnotit jako účinný.

Podobný nálezn jako v naší práci zaznamenali autoři, Ragás a kol. (24) a Demidova a kol. (31), kdy jiná kationická látka, poly-L-lysine chlorin(e6) (konjugát poly-L-lysinu s chlorinem), byla také účinnější při fotoinaktivaci *E. coli* (0,75 μM , 0,2 J/cm²) než při fotoinaktivaci *S. aureus*. Pro dosažení srovnatelných výsledků při pokusech se *S. aureus* bylo třeba zvýšit dávku ozáření až na 20 J/cm². Oba případy by mohla vysvětlovat větší

molekulární hmotnost konjugátu, která umožňuje vazbu na lipopolysacharid gramnegativní *E. coli*, ale nedovoluje překonat peptidoglykanovou vrstvu *S. aureus*.

Tetramethylenpyridinium chlorid hydroxyhlinitého ftalocyaninu (**Pc7**) je také kationický derivát. Kladný náboj je dán přítomností skupiny - **pyridinium**, která je podobná skupině *N*-methylpyridyl udělující kladný náboj derivátu Pc9. Pc7 vykazoval srovnatelnou baktericidní aktivitu jako předchozí látka. Tato konkrétní látka nebyla v literatuře doposud testována na antimikrobní aktivitu. Pc7 byl také v pokusech, podobně jako Pc9, účinnější při fotoinaktivaci *E. coli* než při fotoinaktivaci *S. aureus*, ale dosáhl za stejných podmínek lepších výsledků, navíc vykázal i výrazný antifungální účinek (viz Graf č. 21).

Další kationická látka v našem souboru - **Pc6** – tetrakis (trimethylamonium)-jodid zinečnatého ftalocyaninu byla hodnocena jako účinná při fotoinaktivaci *S. aureus* (v nejvyšší testované koncentraci (8 mg/l) a po ozáření dávkou světla 40 J/cm² docházelo ke zmenšení počtu bakterií o 3 řády). V pokusech s *E. coli* za stejných podmínek tato látka snížila počet bakterií pouze o 97,5% (o necelé 2 řády) a v pokusech s *C. albicans* dokázala snížit inokulum také jen o 2 řády. Kladný náboj tohoto derivátu je dán přítomností trimethylamoniové skupiny, která zřejmě není schopná zajistit takovou vazbu na stěnu gramnegativních bakterií jako zprostředkuje skupina s pyridiniem.

Jako efektivní proti *E. coli* jsme hodnotili také dva sulfamidické deriváty – sulfonovaný [(3-diethylamonium)-propylsulfonamid]ftalocyaninu zinku ve formě citrátu (**Pc3**) a sulfonovaný [(3-diethylamonium)-propylsulfonamid]ftalocyaninu zinku ve formě citrátu (**Pc5**). Jedná se o primárně záporně nabitě látky s navázaným postranním neutrálním, resp. kladně nabitým řetězcem. Tyto látky také nebyly dosud v literatuře popsány, dá se však očekávat podobný princip fotoinaktivace gramnegativních bakterií jako u disulfonovaného ftalocyaninu hliníku. Anionický disulfonovaný ftalocyanin hliníku byl v práci Laceyho a kol. (50) podrobně studován v pokusech s kmenem *E. coli*, a bylo prokázáno, že tento anionický ftalocyanin dokáže do určité míry působit i na gramnegativní bakterie. Při použití vyšších koncentrací FTC (35 mg/l) došlo k redukci počtu bakteriálních buněk o 51%, při frakcionovaném ozařování došlo k redukci až o 86%. Vysvětlením je zřejmě skutečnost, že disulfonovaný ftalocyanin hliníku má amfifilní molekulu, která se dokáže částečně navázat na vnější membránu gramnegativních buněk a způsobit iniciální poškození buněčné membrány a při delším, frakcionovaném podání má možnost pronikat poškozenou stěnou do buněk. Podle našich výsledků disulfonovaný ftalocyanin hliníku (Pc4) také vykázal jen menší efekt vůči *E. coli*, ale u obou sulfamidických derivátů Pc byl fotoinaktivační efekt výraznější a oba deriváty mohly být hodnoceny jako účinné. Kladný náboj umožňující vazbu

ke gramnegativním bakteriím je zprostředkován sulfamidickou skupinou, která je přítomná v postranním řetězci u Pc3 i Pc5. Pc3 dosahoval lepšího fotoinaktivačního efektu i přes menší schopnost produkovat singletový kyslík než Pc5, což může být vysvětleno jeho menší molekulou a kladně nabitým nábojem, které Pc3 umožňují vyšší afinitu ke stěně gramnegativní *E. coli* a lepší průnik do buňky.

Mezi bakteriemi a kvasinkami je rozdíl nejen ve velikosti buňky (kvasinka je 100× větší), ale i v přítomnosti jaderné membrány a struktury buněčné stěny - dalších bariér, které je nutné překonat fotosenzitivní látkou. O vyšší odolnosti kvasinek k fotoinaktivaci svědčí potřeba vyšší koncentrace PS i větší dávky světla k dosažení uspokojivého účinku (28). V našem souboru Pc jsme za zvolených podmínek fotoinaktivace (8 mg/l, 40 J/cm²) našli jen dvě účinné fotosenzitivní látky s výrazným antifungálním efektem. Jednalo se o kationickou Pc7 a látku Pc3, která má navázanou kationickou skupinu na základní anionické struktury. Obě tyto látky současně patří i mezi největší producenty singletového kyslíku.

Následné testování derivátů Pc3 a Pc7 s kmeny bakterií multirezistentními inherentně nebo v důsledku získané rezistence (MRSA, *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL, *Pseudomonas aeruginosa*) mělo ověřit jejich účinnost a potvrdit tak předpoklad, že v průběhu PACT jsou tyto kmeny inaktivovány stejně účinně jako divoké (96).

PACT byla jako slibná terapeutická metoda pro fotoinaktivaci MRSA již opakovaně studována (97) - jako logický krok navazující na zvyšující se počet nemocných infikovaných MRSA v nemocnicích i v komunitě a při limitovaných možnostech antibiotické léčby. Z výsledků našeho testování derivátů Pc3 a Pc7 vyplývá, že obě látky bylo možné považovat za účinné při fotoinaktivaci skriningového kmene *S. aureus* (citlivého k methicilinu) i MRSA. V poslední době se však objevily práce, kdy byla zjištěna rozdílná odpověď kmenů *S. aureus* při fotoinaktivaci. V práci Grinholce a kol. (98) byla z této variability podezřívána přítomnost specifických typů *agr* genů (kofaktor při aktivaci genů virulence) a SCCmec (mobilní genetický element – stafylokoková chromozomální kazeta, nese i gen kódující rezistenci k betalaktamovým antibiotikům, *mecA*). Při PACT zprostředkované porfyrinem se jim na souboru různých kmenů *S. aureus* podařilo potvrdit variabilitu odpovědi, ale uvedenou souvislost se prokázat nepodařilo. V navazující práci byla pozorována souvislost variabilní odpovědi s určitými klonálními komplexy a spa typy (99).

PACT byla studována experimentálně i pro fotoinaktivaci gramnegativních bakterií. V práci Schastaka a kol. (100) prokázali stejnou efektivitu tohoto postupu při použití porfyrinového derivátu při pokusech s *E. coli* i s kmenem *Pseudomonas aeruginosa*, v obou případech došlo ke snížení inokula o 6 řádů. Podobný výsledek zaznamenal Fotinos a kol.

(101), kdy v experimentech s kys. deltaaminolevulovou došlo při fotoinaktivaci k 99,9% redukci kultury *E. coli* i *Ps. aeruginosa*. Stejně tak Tseng a kol. (102) na souboru 60 kmenů *Ps. aeruginosa* popsal, že kmeny rezistentní k antibiotikům byly vůči PACT stejně citlivé. Z našich ftalocyaninových derivátů byl stejně efektivní vůči *E. coli*, *K. pneumonie* a *Ps. aeruginosa* pouze Pc7, Pc3 za stejných podmínek (v koncentraci 8 mg/l a ozáření 40 J/cm²) působil efektivně pouze proti *E. coli*, v experimentu s *K. pneumonie* a *Ps. aeruginosa* došlo ke snížení inokula testované kultury pouze o 97,9%, resp. 91,3%.

V experimentech s mykotickými agens *Candida glabrata* a *C. krusei* - rezistentními k flukonazolu byly deriváty Pc3 i Pc7 stejně účinné jako ve skrínigovém experimentu s *C. albicans*. Podobné výsledky zaznamenal ve své práci Dovigo (103), který také studoval kmeny kvasinek citlivých i rezistentních k azolovým antimykotikům, i Mang a kol. (104). V této práci pracovali se souborem izolátů kvasinek od HIV pacientů, mezi nimiž byly kmeny vysoce rezistentní k flukonazolu i amfotericinu B. Při fotoinaktivaci s komerčně dostupným porfyrinem (Photofrin) byly izoláty kvasinek k PACT citlivé a nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi testovanými kmeny.

V rámci studia vývoje aplikační formy byla testována hydroxypropylmethylcelulóza (HPMC). HPMC je částečně methylovaný a částečně hydroxypropylovaný derivát celulózy, dobře rozpustný ve vodě, který se běžně používá ve farmaceutickém průmyslu k řízenému uvolňování léčiv. Po vazbě Pc7 na námi zvolený nosič došlo k nepříznivému ovlivnění výsledků fotoinaktivace, jejíž výsledek byl závislý nejen na koncentraci účinné látky, ale i koncentraci nosiče a době působení. Za námi zvolených podmínek se nepodařilo připravit takovou formu gelu, která by působila po ozáření účinně na zvolené skrínigové kmeny.

8 Závěr

Cílem této práce bylo připravit laboratorní postup vhodný pro testování a ověření fotoinaktivační schopnosti ftalocyaninů na souboru kmenů bakterií a kvasinek i rezistentních k antibiotikům a antimykotikům, včetně studia účinnosti ftalocyaninu po navázání na vhodný nosič umožňující posouzení efektivity potenciální aplikační formy

Testované ftalocyaniny měly různou chemickou strukturou, zastoupeny byly látky neutrální, anionické, kationické i látky s amfifilní strukturou (s navázaným postranním řetězcem, který má jiný elektrický náboj než základní struktura). Skríníngem fotoinaktivačního působení 15-ti ftalocyaninových látek v podmínkách *in vitro* se nám podařilo potvrdit výrazný antimikrobní účinek vůči vybraným potenciálně patogenním agens u 9-ti z nich. Osm z testovaných ftalocyaninů bylo efektivních vůči *S. aureus*, ale pouze čtyři deriváty působily vůči *E. coli* a pouze dva vůči *C. albicans*. Výsledky této práce ukázaly, že jenom dva ftalocyaninové deriváty - kationický derivát Pc7 (tetramethylenpyridinium chlorid hydroxyhlinitého ftalocyaninu) a amfifilní Pc3 (sulfonovaný [(3-diethylammonium)-propylsulfonamid]ftalocyaninu zinku ve formě citrátu) byly schopné účinně fotoinaktivovat vybrané skríníngové mikroorganismy.

Pomocí experimentů jsme ověřili antimikrobní účinnost derivátů ftalocyaninů při fotoinaktivaci zvolených kmenů bakterií a kvasinek rezistentních k antibiotikům a antimykotikům. Výsledky prokázaly, že obě tyto látky byly také schopny efektivně působit i proti jiným testovaným grampozitivním i gramnegativním bakteriím a kvasinkám, ale pouze derivát Pc7 bylo možno hodnotit jako účinný proti všem testovaným agens.

Další řešenou problematikou bylo otestování antimikrobní účinnosti ftalocyaninu po navázání na vhodné nosiče s cílem posoudit efektivitu potenciální aplikační formy. Dosažené výsledky prokázaly, že po vazbě na námi zvolený nosič (hydroxypropylmethylcelulóza) došlo k nepříznivému ovlivnění účinnosti látky Pc7. Je tedy třeba dále zkoumat a hledat, proč po vazbě na zvolený nosič došlo k negativnímu ovlivnění antimikrobní účinnosti ftalocyaninu Pc7 a jak by bylo možné tento důsledek vyřešit.

Experimentální testování potvrdilo výbornou antimikrobní účinnost preparátu Pc7 (tetramethylenpyridinium chlorid hydroxyhlinitého ftalocyaninu). Ftalocyanin Pc7 byl efektivní jak v experimentu při fotoinaktivaci zvolených mikrobů, tak jako účinná fotosenzitivní látka působící proti spektru potenciálně patogenních agens včetně těch rezistentních k antibiotikům a antimykotikům. Naše laboratorní výsledky potvrzují, že testovaný ftalocyanin Pc7 je potenciálně vhodným kandidátem k fotodynamické antimikrobní

terapii, jejíž slibné in vitro výsledky bude třeba ještě ověřit v pokusech in vivo na zvířecích modelech.

9 Seznam použité literatury

1. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), *J Antimicrob Chemother.* 1998;42:13-28.
2. Wainwright M. Photoantimicrobials—so what's stopping us? *Photodiagn Photodyn Ther*, 2009; 6:167-169.
3. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, et al. Photodynamic therapy for infections: clinical application. *Lasers Surg Med.* 2011;43(7):755-767.
4. Kostovič K, Pastar Z, Ceovič R, et al. Photodynamic therapy in dermatology: current treatments and implications. *Coll Antropol.* 2012 Dec;36(4):1477-81.
5. Studnička J. Věkem podmíněná okulární degenerace. *Interní Med.* 2008;10(5):240–244.
6. Jori G, Fabris C, Soncin M, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006;38(5):468-481.
7. Jori G, Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2006;25(1-2):505-519.
8. Luksiene Z. New approach to inactivation of harmful and pathogenic microorganisms by photosensitization. *Food Technol Biotechnol.* 2005;43(4):411-418.
9. Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC, et al. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol.* 2011;38:1106-1114.
10. Dai T, Tegos GP, Zhiyentayev T, et al. Photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a mouse skin abrasion model. *Lasers Surg Med.* 2010;42:38-44.
11. Braun A, Dehn C, Krause F, et al. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial, *J Clin Periodontol.* 2008;35(10):877-884.
12. Cappuyns I, Cionca N, Wick P, et al. Treatment of residual pockets with photodynamic therapy, diode laser, or deep scaling. A randomized, split-mouth controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2012;27(5):979-986.

13. Tardivo JP, Baptista MS. Treatment of osteomyelitis in the feet of diabetic patients by photodynamic antimicrobial chemotherapy. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(1):145-150.
14. Lang K, Mosinger J, Wagnerová DM. Singletový kyslík v praxi – současnost a perspektiva. *Chem Listy.* 2006;100:169 – 177.
15. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2004;1(4):279-293.
16. Nevřelová P, Kolářová H, Bajgar R, et al. Measurement of reactive oxygen species after photodynamic therapy in vitro. *Skripta medica (Brno).* 2005;78(5): 281-290.
17. Kessel D, Reiners J. Light-Activated Pharmaceuticals: Mechanisms and Detection. *Isr J Chem.* 2012; 52(8-9): 674–680.
18. Bertoloni G, Lauro FM, Cortella G, et al. Photosensitizing activity of hematoporphyrin on *Staphylococcus aureus* cells. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1475:169–174.
19. Kolarova H, Bajgar R, Tomankova K, et al. Comparison of sensitizers by detecting reactive oxygen species after photodynamic reaction in vitro. *Toxicol In Vitro.* 2007;21(7):1287-91.
20. Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci.* 2009;24(2):259-68.
21. Garcia FS, Tedesco AC, Bentley MV. Phthalocyanine dyes: importance and future directives for use in photodynamic therapy of cancer. *Trends in Photochem Photobiol.* 2003;10:77-82.
22. Komerik N., Wilson M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. *J Appl Microbiol.* 2002;92:618-623.
23. Alves E, Costa L, Carvalho CM, et al. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol.* 2009;9:70.

24. Ragás X, Sánchez-García D, Ruiz-González R, et al. Cationic porphycenes as potential photosensitizers for antimicrobial photodynamic therapy, *J Med Chem.* 2010;53(21):7796-7803.
25. Scalise I, Durantini EN. Synthesis, properties, and photodynamic inactivation of *Escherichia coli* using a cationic and a noncharged Zn (II) pyridyloxypthalocyanine derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2005;13(8):3037-3045.
26. Pereira JB, Carvalho EF, Faustino MA, et al. Phthalocyanine thio-pyridinium derivatives as antibacterial photosensitizers, *Photochem Photobiol.* 2012;88(3):537-47.
27. Dostálová T, Jelínková H, Houšková D, et al. Desinfekce při endodontickém ošetření pomocí Er:YAG laseru. *Laser partner.* 2001.
28. Chiti G, Dei D, Fantetti L, et al. In vitro photosensitizing efficacy of cationic phthalocyanine derivatives against *C. albicans*: effect of serum albumins. *J Porphyrins Phthalocyanines.* 2005; 9:463-469.
29. Gad F, Zahra T, Hasan T, et al. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of Gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(6):2173-2178.
30. Bhatti M, MacRobert A, Henderson B, et al. Antibody-targeted lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(10):2615-2618.
31. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(6):2329-2335.
32. Tegos GP, Anbe M, Yang C, et al. Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorine (e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(4):1402-1410.
33. Rovaldi CR, Pievsky A, Sole NA, et al. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(12):3364-3367.
34. Embleton ML, Nair SP, Heywood W, et al. Development of a novel targeting system for lethal photosensitization of antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49 (9):3690-3696.

35. Friedberg JS, Skema C, Baum ED, et al. In vitro effects of photodynamic therapy on *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48:105-107.
36. Huijuan Y, Yingxin L, Yongtang Z, et al. Photoinactivation of cell-free human immunodeficiency virus by hematoporphyrin monomethyl ether. *Lasers Med Sci*. 2012; 27(5): 943–950.
37. Banerjee I, Douaisi MP, Mondal D, et al. Light-activated nanotube-porphyrin conjugates as effective antiviral agents. *Nanotechnology*. 2012;23(10):105101.
38. Sperandio FF, Marotti J, Aranha AC, et al. Photodynamic therapy for the treatment of recurrent herpes labialis: preliminary results. *Gen Dent*. 2009;57(4):415-9.
39. Wainwright M. Photoinactivation of viruses. *Photochem Photobiol Sci*. 2004;3(5):406-11.
40. Nucci V, Torchia D, Cappugi P. Treatment of anogenital condylomata acuminata with topical photodynamic therapy: report of 14 cases and review. *Int J Infect Dis*. 2010;14 Suppl 3:e280-2. doi: 10.1016/j.ijid.2009.11.031.
41. Wagner SJ. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes. *Transfus Med Rev*. 2002;16(1):61-6.
42. Sujoy D, Debalina R, Bala KK, et al. Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminum phthalocyanine chloride for photolysis in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(11):4474-4484.
43. Griffiths MA, Wren BW, Wilson M. Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro using aluminium disulphonated phthalocyanine, a light-activated antimicrobial agent. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:873-876.
44. Soncin M, Fabris C, Buseti A, et al. Approaches to selectivity in the Zn(II)-phthalocyanine-photosensitized inactivation of wild-type and antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Photochem Photobiol Sci*. 2002;1(10):815-819.
45. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. *J Dent*. 1994;22(5):273-278.
46. Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol*. 1993;8:182-187.
47. Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, et al. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(3):932-940.

48. Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, et al. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 1990;59(1-2):149-155.
49. Minnock A., Vernon DI, Schofield J, et al. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(3):522-527.
50. Lacey AJ, Philips D. The photosensitisation of *Escherichia coli* using disulphonated aluminium phthalocyanine. *J Photochem Photobiol A: Chem.* 2001;142: 145-150.
51. Minnock A, Vernon DI, Schofield J, et al. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 1996;32(3):159-164.
52. Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *Internat Dent J* 1994, 44:181-189.
53. Hamblin MR, Viveiros J, Yang CH, et al. *Helicobacter pylori* accumulates photoactive porphyrins and is killed by visible light. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(7):2822-2827.
54. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM, et al. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterization of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 2007;86:59-69.
55. Lustigman S, Ben-Hur E. Photosensitized inactivation of *Plasmodium falciparum* in human red cells by phthalocyanine. *Transfusion.* 1996;36(6):543-546.
56. Ferro S, Coppellotti O, Roncucci G, et al. Photosensitized inactivation of *Acanthamoeba palestinensis* in the cystic stage. *J Appl Microbiol.* 2006;101(1):206-212
57. Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, et al. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49:941-951.
58. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious diseases?? *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3:436-450.
59. Wilson M, Burns T, Pratten J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother.* 1996;37:377-381.

60. Senda N, Ito K, Sugano N, et al. Inhibitory effect of yellow He-Ne laser irradiation mediated by crystal violet solution on early plaque formation in human mouth. *Lasers Med Sci.* 2000;15:174-180.
61. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2004;17(3):245-254.
62. Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3:412-418.
63. Makela PH, Hovi M, Saxén H, et al. *Salmonella*, complement and mouse macrophages. *Immunol Lett.* 1988;19(3):217-222.
64. Tegos GP, Hamblin MR. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug substrates pumps. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(1):196-203.
65. Tegos GP, Masago K, Aziz F, et al. Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps Potentiate Antimicrobial Photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(9):3202–3209.
66. Votava M. Lékařská mikrobiologie obecná. Neptun, Brno 2001. str. 105. ISBN 80-902896-2-2.
67. Lewis K. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* Apr 2001; 45(4): 999–1007.
68. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol.* 2009;11(7):1034-43.
69. Wood S, Nattress B, Kirkham J, et al. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 1999;(50):1-7.
70. Fontana CR, Abernethy AD, Som S, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontal Res.* 2009;44(6):751–759.
71. Müller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *Eur J Oral Sci.* 2007;115(1):77-80.
72. Costa AC, de Campos Rasteiro VM, Pereira CA, et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. *Arch Oral Biol.* 2011;56(11):1299-305.

73. Gonzales FP, Felgenträger A, Bäumlér W, et al. Fungicidal photodynamic effect of a twofold positively charged porphyrin against *Candida albicans* planktonic cells and biofilms. *Future Microbiol.* 2013;8(6):785-97.
74. Gad F, Zahra T, Francis KP, et al. Targeted photodynamic therapy of established soft-tissue infections in mice. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(5):451-458.
75. Lambrechts SA, Demidova TN, Aalders MC, et al. Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. *Photochem Photobiol Sci.* 2005;4(7):503-509.
76. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, et al. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;93(2):155-160.
77. Dai T, Bil de Arce VJ, Tegós GP, et al. Blue dye and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous *Candida albicans* infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(12):5710-5717.
78. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontology* 2000;51:109 - 140.
79. Al-Zahrani MS, Bamshmous SO, Alhassani AA, et al. Short-term effect of photodynamic therapy on periodontal status and glycemic control of patients with diabetes. *J Periodontol.* 2009;10: 1568 - 573.
80. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: A preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol.* 2007;78(6):965–973.
81. Garcez AS, Nunez SC, Hamblin MR, et al. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod.* 2008;34(2):138–142.
82. Slezák R, Ryšková L, Paulusová V, et al. Nové možnosti ve farmakoterapii chorob parodontu a ústní sliznice. *Czech Stomatology & Practical Dentistry/Ceska Stomatologie a Prakticke Zubni Lekarstvi.* 2012;112(1).
83. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Capezzera R, et al. Photodynamic therapy of interdental mycoses of the feet with topical application of 5-aminolevulinic acid. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2004;20(3):144–147.
84. Sotiriou E, Panagiotidou D, Ioannides D. 5-Aminolevulinic acid photodynamic therapy treatment for tinea cruris caused by *Trichophyton rubrum*: Report of 10 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009;23(3):341–342.

85. Watanabe D, Kawamura C, Masuda Y, et al. Successful treatment of toenail onychomycosis with photodynamic therapy. *Arch Dermatol*. 2008;144(1):19–21.
86. Wiegell SR, Kongshoj B, Wulf HC. *Mycobacterium marinum* infection cured by photodynamic therapy. *Arch Dermatol*. 2006;142(9):1241–1242.
87. Clayton TH, Harrison PV. Photodynamic therapy for infected leg ulcers. *Br J Dermatol*. 2007;156(2):384–385.
88. Asilian A, Davami M. Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paromomycin in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: A placebo-controlled, randomized clinical trial. *Clin Exp Dermatol*. 2006;31(5):634–637.
89. Lembo AJ, Ganz RA, Sheth S, et al. Treatment of *Helicobacter pylori* infection with intra-gastric violet light phototherapy: A pilot clinical trial. *Lasers Surg Med*. 2009;41(5):337–344.
90. Vera DM., Haynes H, Ball AR, et al. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. *Photochem Photobiol*. 2012; 88(3): 499–511.
91. Soukos NS, Wilson M, Burns T, et al. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med*. 1996;18(3):253-259.
92. Zeina B, Greenman J, Corry D, et al. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes in vitro. *Br J Dermatol*. 2002;146(4):568-573.
93. Cerny J, Karaskova M, Rakusan J, et al. Reactive oxygen species produced by irradiation of some phthalocyanine derivatives. *J Photochem Photobiol A: Chem*. 2010;210(1):82-88.
94. Jett BD, Hatter KL, Huzcke MM, et al. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. *BioTechniques*. 1997;23:648-650.
95. Mantareva V, Kussovski V, Angelov I, et al. Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms. *Bioorg Med Chem*. 2007;15(14):4829-4835.
96. St. Denis TG, Dai T, Izikson L, et al. All you need is light. Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. *Virulence*. 2011;2(6):509–520.

97. Fu XJ, Fang Y, Yao M. Antimicrobial Photodynamic Therapy for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:159157.
98. Grinholm M, Richter M, Nakonieczna J, et al. The connection between agr and SCCmec elements of *Staphylococcus aureus* strains and their response to photodynamic inactivation. *Photomed Laser Surg*. 2011;29(6):413-419.
99. Rapacka-Zdonczyk A, Rhod Larsen A, Empel J, et al. Association between susceptibility to photodynamic oxidation and the genetic background of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33: 577–586.
100. Schastak S, Ziganshyna S, Gitter B, et al. Efficient Photodynamic Therapy against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Using THPTS, a Cationic Photosensitizer Excited by Infrared Wavelength. *PLoS One*. 2010;5(7):e11674.
101. Fotinos N, Convert M, Piffaretti J, et al. Effects on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria Mediated by 5-Aminolevulinic Acid and 5-Aminolevulinic Acid Derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(4):1366–1373.
102. Tseng SP, Teng LJ, Chen CT, et al. Toluidine blue O photodynamic inactivation on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Lasers Surg Med*. 2009;41:391–397.
103. Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EG, et al. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses*. 2011;54(2):123-130.
104. Mang TS, Mikulski L, Hall RE. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2010;7(2):98-105.

10 Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázky:

Obr. č. 1. Toluidinová modř.....	str. 11
Obr. č. 2. Základní struktura porfyrinu.....	str. 11
Obr. č. 3. Základní struktura ftalocyaninu.....	str. 12
Obr. č. 4. Struktura derivátů ftalocyaninu, umístění substituentů v pozici R1-R4.....	str. 25
Obr. č. 5. Laser MAESTRO/CCM.....	str. 27

Tabulky:

Tab. č. 1. Přehled fotosenzitivních látek a mikroorganismů testovaných pro PACT....	str. 15
Tab. č. 2. Testované deriváty ftalocyaninu – název a chemický vzorec.....	str. 23
Tab. č. 3 Charakteristika testovaných ftalocyaninů – centrální atom a jednotlivé substituenty v pozici R1-R4.....	str. 25
Tab. č. 4 Antimikrobní efekt derivátů ftalocyaninu (Pc) při fotoinaktivaci kmenů <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> a <i>C. albicans</i>	str. 61
Tab. č. 5 Antimikrobní efekt testovaných ftalocyaninů při fotoinaktivaci vybraných bakterií a kvasinek.....	str. 64
Tab. č. 6 Přehled <i>in vitro</i> antimikrobní aktivity Pc7 po navázání na nosič vůči kmenům <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> a <i>Candida albicans</i>	str.72

Grafy:

Graf č. 1. Fotoinaktivační efekt Pc1 vůči <i>S. aureus</i>	str. 31
Graf č. 2. Fotoinaktivační efekt Pc1 vůči <i>E. coli</i>	str. 31
Graf č. 3. Fotoinaktivační efekt Pc1 vůči <i>C. albicans</i>	str. 32
Graf č. 4. Fotoinaktivační efekt Pc2 vůči <i>S. aureus</i>	str. 33
Graf č. 5. Fotoinaktivační efekt Pc2 vůči <i>E. coli</i>	str. 33
Graf č. 6. Fotoinaktivační efekt Pc2 vůči <i>C. albicans</i>	str. 34
Graf č. 7. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči <i>S. aureus</i>	str. 35
Graf č. 8. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči <i>E. coli</i>	str. 35
Graf č. 9. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči <i>C. albicans</i>	str. 36
Graf. č.10. Fotoinaktivační efekt Pc4 vůči <i>S. aureus</i>	str. 37

Graf č. 11. Fotoinaktivační efekt Pc4 vůči <i>E. coli</i>	str. 37
Graf č. 12. Fotoinaktivační efekt Pc4 vůči <i>C. albicans</i>	str. 38
Graf č. 13. Fotoinaktivační efekt Pc5 vůči <i>S. aureus</i>	str. 39
Graf č. 14. Fotoinaktivační efekt Pc5 vůči <i>E. coli</i>	str. 39
Graf č. 15. Fotoinaktivační efekt Pc5 vůči <i>C. albicans</i>	str. 40
Graf č. 16. Fotoinaktivační efekt Pc6 vůči <i>S. aureus</i>	str. 41
Graf č. 17. Fotoinaktivační efekt Pc6 vůči <i>E. coli</i>	str. 41
Graf č. 18. Fotoinaktivační efekt Pc6 vůči <i>C. albicans</i>	str. 42
Graf č. 19. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči <i>S. aureus</i>	str. 43
Graf č. 20. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči <i>E. coli</i>	str. 43
Graf č. 21. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči <i>C. albicans</i>	str. 44
Graf č. 22. Fotoinaktivační efekt Pc8 vůči <i>S. aureus</i>	str. 45
Graf č. 23. Fotoinaktivační efekt Pc8 vůči <i>E. coli</i>	str. 45
Graf č. 24. Fotoinaktivační efekt Pc8 vůči <i>C. albicans</i>	str. 46
Graf č. 25. Fotoinaktivační efekt Pc9 vůči <i>S. aureus</i>	str. 47
Graf č. 26. Fotoinaktivační efekt Pc9 vůči <i>E. coli</i>	str. 47
Graf č. 27. Fotoinaktivační efekt Pc9 vůči <i>C. albicans</i>	str. 48
Graf č. 28. Fotoinaktivační efekt Pc10 vůči <i>S. aureus</i>	str. 49
Graf č. 29. Fotoinaktivační efekt Pc10 vůči <i>E. coli</i>	str. 49
Graf č. 30. Fotoinaktivační efekt Pc10 vůči <i>C. albicans</i>	str. 50
Graf č. 31. Fotoinaktivační efekt Pc11 vůči <i>S. aureus</i>	str. 51
Graf č. 32. Fotoinaktivační efekt Pc11 vůči <i>E. coli</i>	str. 51
Graf č. 33. Fotoinaktivační efekt Pc11 vůči <i>C. albicans</i>	str. 52
Graf č. 34. Fotoinaktivační efekt Pc12 vůči <i>S. aureus</i>	str. 53
Graf č. 35. Fotoinaktivační efekt Pc12 vůči <i>E. coli</i>	str. 53
Graf č. 36. Fotoinaktivační efekt Pc12 vůči <i>C. albicans</i>	str. 54
Graf č. 37. Fotoinaktivační efekt Pc13 vůči <i>S. aureus</i>	str. 55
Graf č. 38. Fotoinaktivační efekt Pc13 vůči <i>E. coli</i>	str. 55
Graf č. 39. Fotoinaktivační efekt Pc13 vůči <i>C. albicans</i>	str. 56
Graf č. 40. Fotoinaktivační efekt Pc14 vůči <i>S. aureus</i>	str. 57
Graf č. 41. Fotoinaktivační efekt Pc14 vůči <i>E. coli</i>	str. 57
Graf č. 42. Fotoinaktivační efekt Pc14 vůči <i>C. albicans</i>	str. 58
Graf č. 43. Fotoinaktivační efekt Pc15 vůči <i>S. aureus</i>	str. 59
Graf č. 44. Fotoinaktivační efekt Pc15 vůči <i>E. coli</i>	str. 59

Graf č. 45. Fotoinaktivační efekt Pc15 vůči <i>C. albicans</i>	str. 60
Graf č. 46. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči <i>Str. mutans</i>	str. 65
Graf č. 47. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči MRSA.....	str. 65
Graf č. 48. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči <i>K. pneumoniae</i>	str. 66
Graf č. 49. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči <i>Ps. aeruginosa</i>	str. 66
Graf č. 50. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči <i>C. glabrata</i>	str. 67
Graf č. 51. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči <i>C. krusei</i>	str. 67
Graf č. 52. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči <i>Str. mutans</i>	str. 68
Graf č. 53. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči MRSA.....	str. 68
Graf č. 54. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči <i>K. pneumoniae</i>	str. 69
Graf č. 55. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči <i>Ps. aeruginosa</i>	str. 69
Graf č. 56. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči <i>C. glabrata</i>	str. 70
Graf č. 57. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči <i>C. krusei</i>	str. 70