

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



Fotodynamická antimikrobní terapie

Lenka Ryšková

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program

Lékařská mikrobiologie

Hradec Králové

2014

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Lékařská mikrobiologie na Ústavu klinické mikrobiologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Lenka Ryšková, Ústav klinické mikrobiologie LF a FN HK

Školitel: Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.
Ústav klinické mikrobiologie LF a FN HK

Školitel konzultant: Doc. MUDr. Radovan Slezák, CSc.,
Stomatologická klinika LF a FN HK

Oponenti: doc. RNDr. Vanda Boštíková, Ph.D.
Katedra epidemiologie, Fakulta vojenského zdravotnictví
Univerzita obrany, Třebešská 1575, Hradec Králové

PharmDr. Petr Jílek, CSc.
Katedra biologických a lékařských věd
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Tato práce vznikla za podpory grantu: Projekt č. 2B06104, Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy: Fotosenzibilizátory v zubním lékařství

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská mikrobiologie

1 Obsah

1	Obsah	3
2	Souhrn	4
3	Summary	5
4	Fotodynamická antimikrobní terapie - úvod do problematiky	6
5	Cíle disertační práce	8
6	Materiál a metodika	9
6.1	Ftalocyaniny	9
6.2	Kmeny bakterií a kvasinek	10
6.3	Testování fotoinaktivační schopnosti ftalocyaninů	10
6.4	Testování vybraných ftalocyaninů na nosiči	11
7	Výsledky	12
7.1	Výsledky skriningového testování ftalocyaninů	12
7.2	Výsledky dalších testů vybraných ftalocyaninů	17
7.3	Výsledky testování ftalocyaninů na nosiči	18
8	Diskuse	19
9	Závěr	23
10	Literatura	24

2 Souhrn

Úvod: Fodynamická antimikrobní terapie (PACT) představuje potenciální léčebnou metodu k terapii povrchových infekcí. Vzdávající rezistence mikrobů k antibiotikům vede k hledání nových alternativních eradikačních postupů, jako je PACT. Zatímco grampozitivní bakterie jsou k fotoinaktivaci obvykle citlivé, gramnegativní bakterie a mikroskopické houby bývají odolnější. Výzkum na poli PACT vede k hledání účinných antimikrobních preparátů s širokým spektrem postihujícím bakterie i mykotická agens. Ftalocyaniny představují slibnou skupinu fotosenzitivních látek, které by se mohly vykazovat signifikantní antimikrobní fotoinaktivační efekt.

Cílem této práce bylo otestovat antimikrobiální efekt 15 derivátů ftalocyaninů (Pc) při fotoinaktivaci.

Metoda: fotoinaktivační schopnost 15 Pc byla testována na kmenech *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Candida albicans*. Po 30 – minutové inkubaci s Pc v koncentraci: 1 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l, byly kultury ozářeny světlem z low-power laseru (o vlnové délce 670 nm) v celkové dávce 20 J/cm² a 40 J/cm²). Účinnost při fotoinaktivaci byla hodnocena velikostí řádového poklesu viabilních bakterií v poměru ke kontrolnímu vzorku bez ozáření a Pc.

Výsledky: Osm z testovaných ftalocyaninů bylo efektivních vůči *S. aureus*, ale jen čtyři deriváty působily vůči *E. coli* a pouze dva vůči *C. albicans*. Efekt při fotoinaktivaci byl závislý na dávce světla. Dva ftalocyaninové deriváty - kationický derivát Pc7 (hydroxyhlinitý ftalocyanin substituovaný pyridiniem) a amfifilní Pc3 (sulfamidický ftalocyanin hliníku) byly schopné účinně fotoinaktivovat vybrané skriningové mikroorganismy. Pouze Pc7 působila efektivně i na další mikroby.

Závěr: Byla nalezena účinná fotosenzitivní látka – Pc7, která působila efektivně na vybrané mikroby a představuje tak slibný derivát ftalocyaninu pro potenciální využití při PACT

3 Summary

Photodynamic antimicrobial therapy

Background: Photodynamic antimicrobial therapy is proposed as a potential topical, noninvasive approach suitable for treatment of locally occurring infection. The fact that bacteria are becoming increasingly resistant to antibiotics and antiseptics has led to an increased interest in the field of developing new alternative eradication methods, such as PACT. Whereas gram-positive bacteria are generally sensitive to photoinactivation, gram-negative bacteria and fungi are usually less susceptible. Research of photosensitizers (PS) as well as development has been going on with the aim to find effective antimicrobial substances, which would have a broad-spectrum potency. The aim of this paper is to evaluate the antibacterial and antifungal effect of fifteen Pc derivatives.

Methods: Fifteen different Pc were investigated. Their photokilling activity was tested on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. After treating of microbial cells with Pc in the concentrations: 1 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l for 30 minutes, the cultures were irradiated with low-power laser light wavelength of 670 nm (20 J/cm², 40 J/cm²). The effectiveness of photoinactivation was evaluated based on the decrease of a number (log₁₀) of viable bacteria.

Results: Eight tested Pc showed antibacterial effect against *S. aureus*, but only four tested Pc were effective against *E. coli* and two Pc against *C. albicans*. Killing of bacterial and fungal strains was found to be dependent on the light dose. The most effective photosensitizers were amphiphilic sulphonated zinc Pc [(3-diethylammonium)-propylsulphonamide citrate (Pc3) and cationic tetramethylenepyridinium chloride of hydroxyaluminum Pc (Pc7). Only Pc7 was effective against another microbes tested.

Conclusion: The most efficient phthalocyanine - Pc7 causes a significant decrease of viable counts of all tested microbes and represent promising drug for potential use in the PACT of infectious disease.

4 Fotodynamická antimikrobní terapie - úvod do problematiky

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 oranžie proti prvoku *Paramecium caudatum* (1). Fotodynamická terapie se dá definovat jako eradikace cílových mikrobu v důsledku působení světla na fotosenzitivní látku (2). 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 $^1\text{O}_2$. 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 (3).

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 (4).

Fotodynamická antimikrobní terapie (PACT) představuje 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 dosah paprsků světelného zdroje a možnost jen lokálního použití PS - protože komplikací celkového podání PS je vznik systémové kožní fotosenzibilizace (5).

Proces fotoinaktivace mikrobu je především závislý na fotosenzitivní látce a na zdroji světla. 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 a methylenová modř, porfyriny - hematoporfyrin, kyselina deltaaminolevulová, xanteny, psoraleny, chloriny a ftalocyaniny (6).

Ftalocyaniny jsou heterocyklické sloučeniny skládající se ze čtyř benzindolových jader spojených dusíkovými můstky (chemicky tetrabenzotetraazaporfyriny). Jsou to účinné fotosenzitivní látky, po jejich ozáření se vytváří velké množství singletového kyslíku, větší než při použití standardních fotosenzitivních látek jako je methylenová nebo toluidinová modř.

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).

Možnost fotoinaktivovat bakterie v rámci PACT byla již mnohokrát experimentálně prokázána (7, 8, 9). Dalším potenciálním cílem jsou i mikroskopické houby, včetně kvasinky *Candida albicans* (10). Experimentálně byla také opakovaně prokázána možnost efektivně fotoinaktivovat virové částice – volné i intracelulárně uložené (11).

Byl zaznamenán signifikantní rozdíl v účinnosti PACT při fotoinaktivaci gram pozitivních a gram negativních bakterií. Gram pozitivní 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). Gram negativní bakterie byly k fotoinaktivaci více rezistentní, u řady druhů účinněji odolávající letálnímu poškození než gram pozitivní bakterie (7, 12). Ftalocyaniny mohou být transformovány mezi kationické látky navázáním pozitivně nabitého postranního řetězce na tetraazaindolové jádro. Tato skupina fotosenzitivních látek v současné době představuje slibné PS vhodné pro využití při PACT, probíhá výzkum na objevení nových účinných PS (13).

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 (14, 15). Několik prací popisuje užití PACT na zvířecích modelech, kde se zkoumá vliv PACT v určitých situacích – u infikovaných ran, popálenin, infekcí měkkých tkání (16, 17). V poslední době i popisy užití této metody u pacientů s chronickou parodontitidou nebo diabetickou nohou (18, 19).

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, pro terapii zánětlivých afekcí v dutině ústní vznikajících v souvislosti s přítomností dentálního plaku - při komplexní léčbě parodontitidy a povrchového zubního kazu.

5 Cíle disertační práce

Cílem předložené práce je studium in vitro 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

6 Materiál a metodika

6.1 Ftalocyaniny

Bylo otestováno celkem 15 různých derivátů ftalocyaninu (Pc) syntetizovaných v laboratořích Výzkumného ústavu organických syntéz (VUOS) v Pardubicích. Jednotlivé Pc jsou blíže charakterizovány v Tab. č. 1., včetně náboje molekuly a množství vyprodukovaného singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$). Množství produkovaného singletového kyslíku bylo měřeno jodidovou metodou (20).

Tab. č. 2. Testované deriváty ftalocyaninu (Pc)

derivát Pc	Schematický vzorec	Systematický název	Náboj Pc	produkce $^1\text{O}_2$ (J^{-1})
Pc1	$\text{ZnFTC}(\text{SO}_3\text{NH}_4)_2$	amonná sůl disulfonovaného ftalocyaninu zinku	A*	0,363
Pc2	$\text{AlOHFTC}(\text{SO}_3\text{H}) [\text{SO}_3^- \text{N}^+(\text{CH}_3)_4]$	sulfonovaný tetramethylammóniumhydroxyhlinitý ftalocyanin	A*	2,483
Pc3	$\text{ZnFTC}(\text{SO}_3\text{H}) [\text{SO}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2] \text{ citrate}^-$	sulfonovaný [(3-diethylammonium)-propylsulfonamid]ftalocyaninu zinku ve formě citrátu	A* + K*	0,123
Pc4	$\text{AlOHFTC}(\text{SO}_3\text{Na})_2$	sodná sůl disulfonovaného ftalocyaninu hliníku	A*	1,746
Pc5	$\text{AlOHFTC}(\text{SO}_3\text{H}) (\text{SO}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$	sulfonovaný bis(<i>N</i> -2-hydroxyethyl)-aminoethylsulfonamid hlinitého ftalocyaninu	A* + N*	2,879
Pc6	$\text{ZnFTC}[\text{N}^+(\text{CH}_3)_3]_4 \text{ I}_4^-$	tetrakis(trimethylamonium)-jodid zinečnatého ftalocyaninu	K*	-----
Pc7	$\text{AlOHFTC}(\text{CH}_2\text{C}_5\text{H}_5\text{N}^+\text{Cl}^-)_4$	tetramethylenpyridinium chlorid hydroxyhlinitého ftalocyaninu	K*	1,562
Pc8	$\text{ZnFTC}(\text{SO}_3\text{NH}_4)_3$	amonná sůl trisulfonovaného ftalocyaninu zinku	A*	2,044
Pc9	$\text{ZnFTC}(\text{OC}_5\text{H}_4\text{N}^+\text{CH}_3)_4 \text{ I}_4^-$	tetrakis (<i>N</i> -methylpyridium -3-oxo)-jodid zinečnatého ftalocyaninu	K*	0,471
Pc10	$\text{H}_2\text{FTC}(\text{SO}_3\text{Na})_4$	sodná sůl tetrasulfonovaného bezkovového ftalocyaninu	A*	0,277
Pc11	$\text{ZnFTC}[\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3]_4 \text{ I}_4^-$	tetrajodid tetrakis(4- <i>N,N,N</i> -trimethylamoniumfenylazo)zinečnatý ftalocyanin	K*	-----
Pc12	$\text{ZnFTC}[\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2]_4$	tetrakis(diethylfosfonato)zinečnatý 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

6.2 Kmeny bakterií a kvasinek

Pro základní testování Pc byly zvoleny bakteriální kmeny *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Candida albicans* z České národní sbírky typových kultur. Pro následné testování byly použity izoláty z humánních vzorků. Jednalo se o kmeny bakterií *Streptococcus mutans*, methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* (kmen s produkcí širokospektré betalaktamázy ESBL), *Pseudomonas aeruginosa*, a kvasinek *Candida glabrata* a *C.krusei*, vybrané pro sníženou citlivost resp. rezistenci k flukonazolu.

6.3 Testování fotoinaktivační schopnosti ftalocyaninů

Schéma pokusu bylo upraveno podle Tegose a kol. (8).

Příprava testovaných mikrobiálních kmenů

Byl použit kultivační způsob přípravy testované bakteriální suspenze – bakteriální kmeny byly naočkovány do BHI bujónu (Brain-Heart Bouillon, BioMerieux), kmeny kvasinek do Sabouraudova bujónu (BioMerieux) a kultivovány 18 – 24 hodin při 36°C. Po pomnožení byla 18–24-hodinová kultura přeočkována do čerstvého bujónu a kultivována do dosažení mid-log fáze růstu.

Příprava ftalocyaninů

Testovaný Pc byl rozpuštěn ve sterilní destilované vodě. Posléze byly připraveny pracovní koncentrace 2, 4, 8, 16 mg/l.

Inkubace s PS

Dalším krokem byla inkubace 1ml testované kultury s 1ml Pc (konečné testované koncentrace Pc byly 1 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l a 8 mg/l) po dobu 30 min při pokojové teplotě a ve tmě.

Ozařování laserem

100 µl 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. Při pokusech byl použit laserový systém MAESTRO/CCM (MediCom, a.s.).

Hodnocení baktericidního účinku

Po ozáření bylo z jamky mikrotitrační destičky odsáto 100 µl testované kultury a přeneseno do zkumavky s 900 µl fosfátového pufru. Byla připravena ředící řada - série šesti ředění (log₁₀) pro každou testovanou koncentraci a dávkou světla. Z každého ředění byly vyočkovány dva vzorky po 100 µl na Petriho misku s vhodným kultivačním médiem (Mueller-Hinton 2 agar pro kultivaci bakterií, Sabouraudova půda pro kvasinky). Po 24-hodinové inkubaci u bakterií a 48-hodinové inkubaci u kvasinek byly spočítány narostlé kolonie (v ředění, ve kterém se počet vyrostlých kolonií pohyboval v rozmezí 20 až 200 (21).

Látky byly testovány ve dvou nezávislých pokusech, součástí pokusů byly i kontrolní testy s působením samotného Pc a světla. Účinnost fotoinaktivace byla hodnocena porovnáním počtu viabilních bakterií po ovlivnění bakteriální kultury Pc 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 (8).

6.4 Testování vybraných ftalocyaninů na nosiči

Pc7 vybraný ze základního skríningu byl navázán na nosič (hydroxypropylmethylcelulózu, HPMC) ve formě 1,5% gelu (**H3** - koncentrace Pc 20 mg na 1000 g gelu) a 3% gelu (koncentrace Pc 20 mg na 1000 g gelu - **H1**, koncentrace Pc 10 mg na 1000 g gelu – **H2**)

Postup:

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

7 Výsledky

7.1 Výsledky skriningového testování ftalocyaninů

V základním skriningu byl hodnocen fotoinaktivační účinek 15 derivátů Pc vůči - *S. aureus*, *E. coli* a *C. albicans*. Výsledky testovaných Pc 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 Pc 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.

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 %, 81 % a 62 % a ve stejné koncentraci ovlivnily kulturu *E. coli* o 79 % .

Výsledky pokusů fotoinaktivace vybraných skriningových agens jednotlivými Pc jsou sumarizovány v Tab. č. 2, v grafech (viz Graf č.1, 2, 3, 4, 5,6) jsou znázorněny výsledky derivátů Pc3 a Pc7 (na ose x jsou uvedeny testované koncentrace Pc, na ose y počet viabilních CFU/ml).

Z přehledové tabulky vyplývá, že se jako nejúčinnější fotosenzitivní látky při fotoinaktivaci *S. aureus* projeví 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 dávce světla došlo k významnému baktericidnímu efektu (pokles o 7 řádů, resp. o 6 řádů). Slibné výsledky ukázaly pokusy se sulfamidickými ftalocyaniny (**Pc3** -

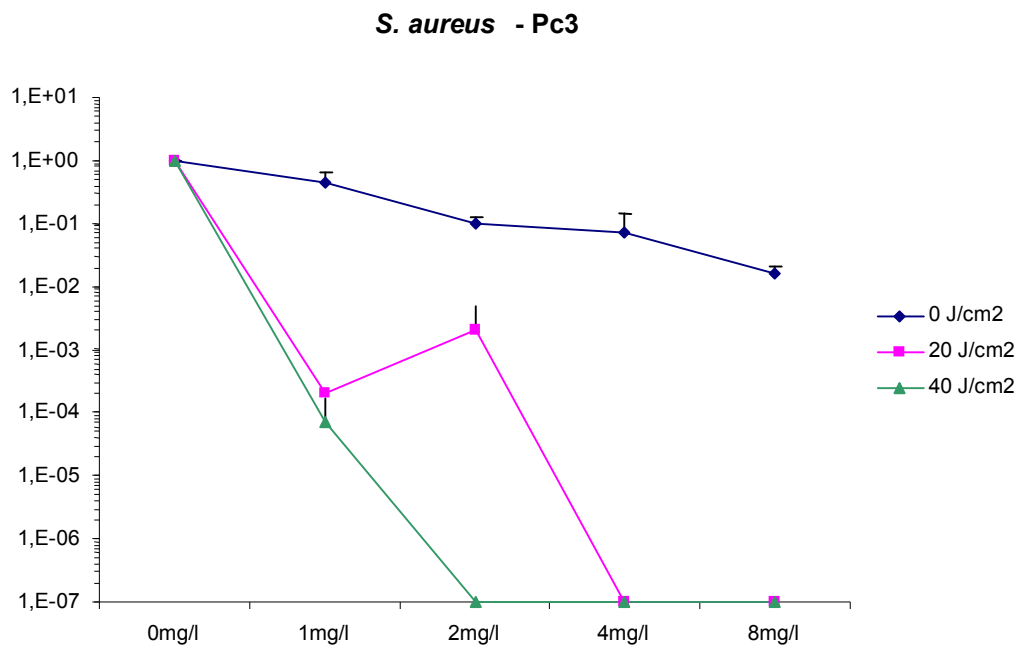
sulfonovaný [(3-diethylamonium)-propylsulfonamid]ftalocyaninu zinku ve formě citrátu, **Pc5** - sulfonovaný bis(*N*-2-hydroxyethyl)-aminoethylsulfonamid hlinitého ftalocyaninu), které působily efektivně proti *S. aureus* i *E. coli*.

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

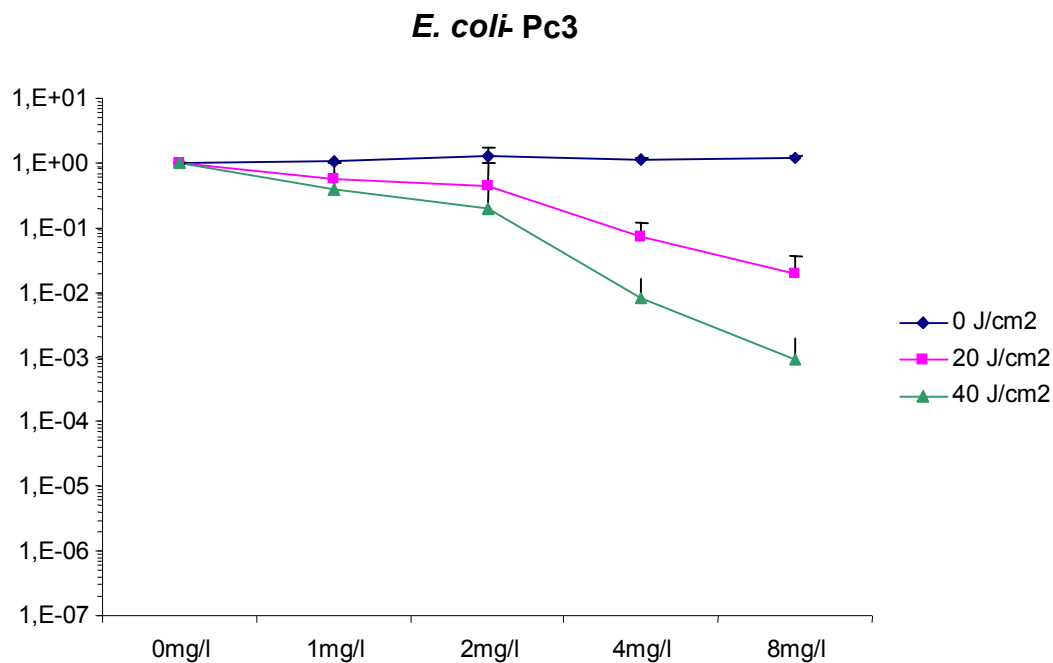
Tab. č. 2 Antimikrobní efekt derivátů ftalocyaninu (Pc) při fotoinaktivaci kmenů *S. aureus*, *E. coli* a *C. albicans*

Ftalocyaniny (Pc)	Frakce viabilních buněk*					
	<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

* v experimentech s ftalocyaniny v koncentraci 8mg/l po ozáření laserem dávkou světla 20 J/cm² a 40 J/cm²

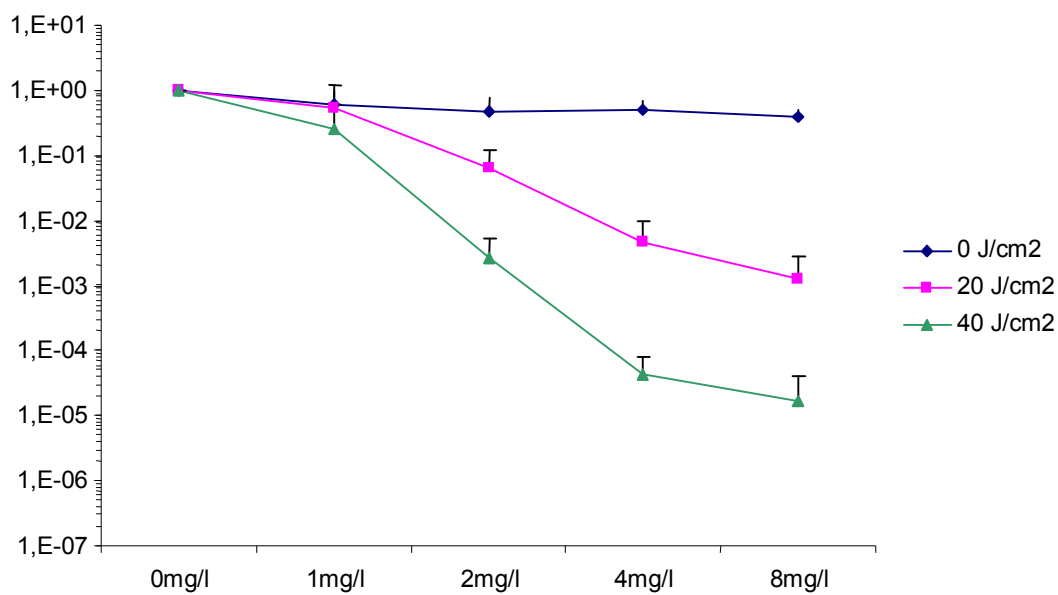


Graf č.1. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči *S. aureus*



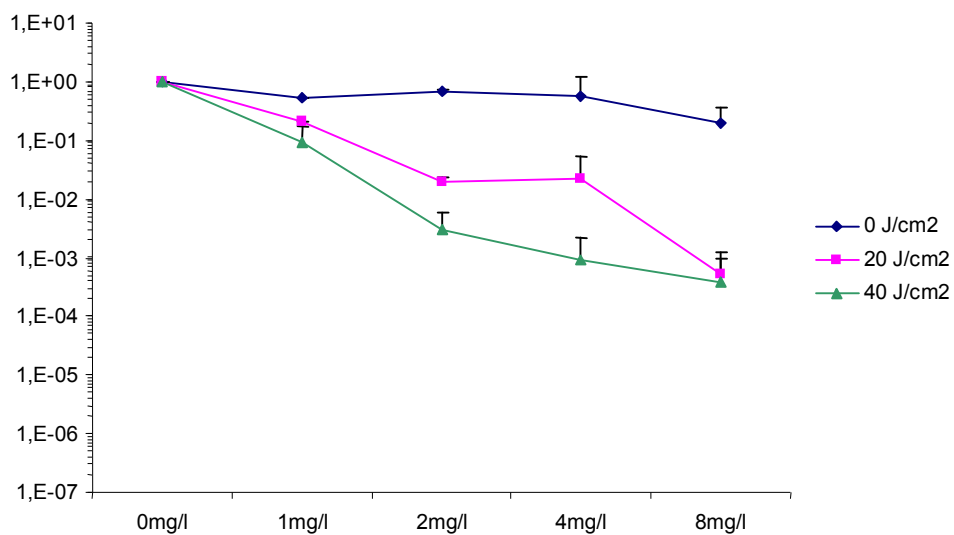
Graf č.2. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči *E. coli*

C. albicans - Pc3

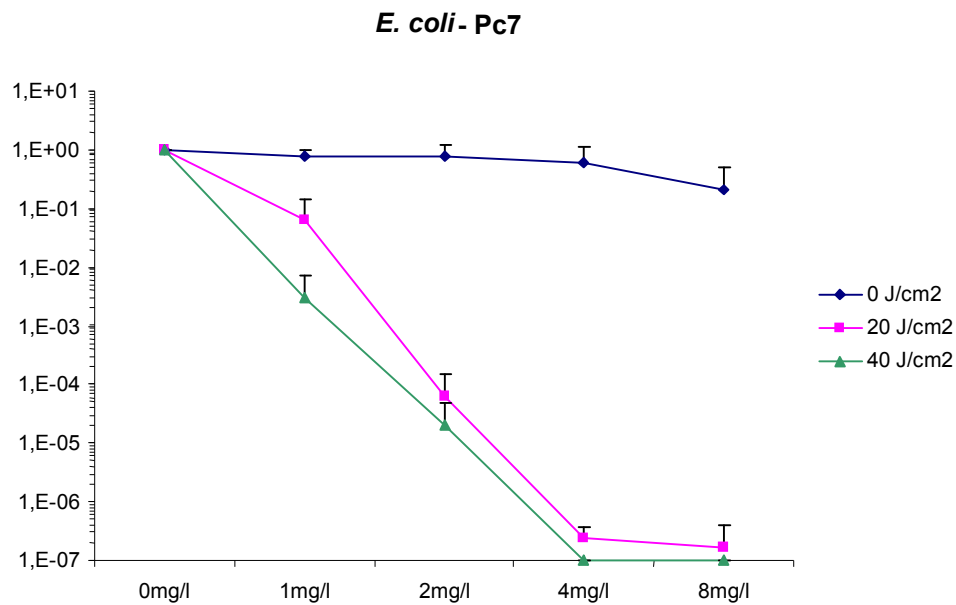


Graf č.3. Fotoinaktivační efekt Pc3 vůči *C. albicans*

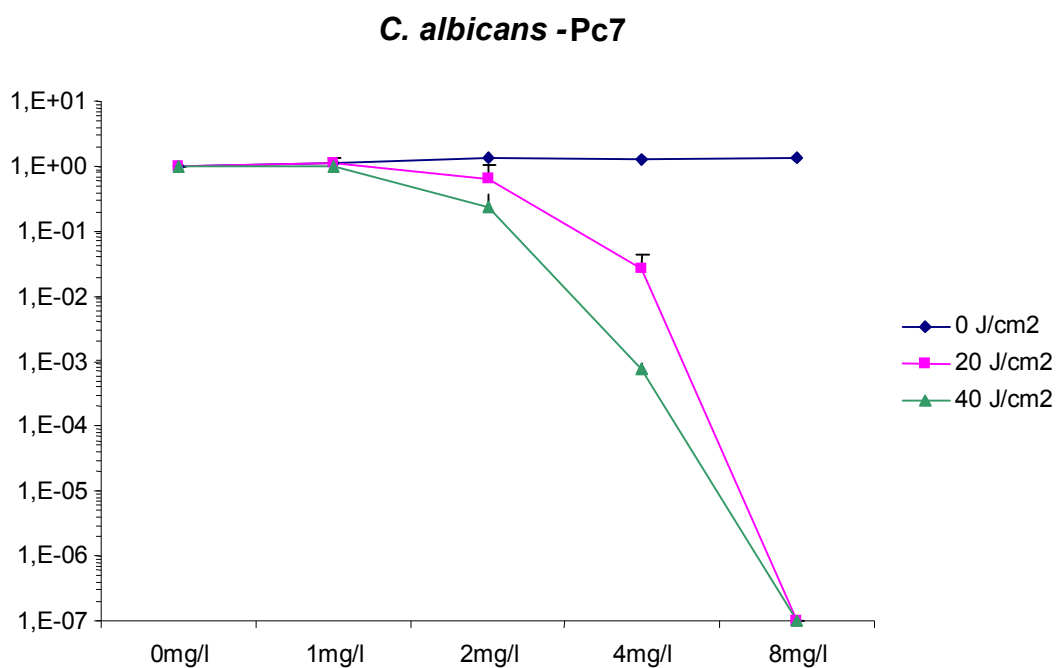
S. aureus - Pc7



Graf č. 4. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči *S. aureus*



Graf č. 5. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči *E. coli*



Graf č. 6. Fotoinaktivační efekt Pc7 vůči *C. albicans*

7.2 Výsledky dalších testů vybraných ftalocyaninů

Po ukončení skriningového testování byly 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.

Výsledky pokusů fotoinaktivace vybraných skriningových agens jednotlivými deriváty ftalocyaninů jsou znázorněny v Tab. č. 3.

Tab. č. 3 Přehled *in vitro* antimikrobní aktivity testovaných Pc proti vybraným mikrobům.

Pc	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

Při hodnocení výsledků bylo zjištěno, že oba deriváty byly účinné při fotoinaktivaci gram pozitivních bakterií a kvasinek, ale jen Pc7 působil efektivně při fotoinaktivaci *E. coli*.

Z přehledové tabulky (viz Tab. č. 3) vyplývá, že oba deriváty byly účinné při fotoinaktivaci gram pozitivních bakterií, při použití koncentrace 8 mg/l a dávky světla 40 J/cm² dokázaly efektivně působit na kmen streptokoka i MRSA. Při pokusech s gram negativními 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 *C. glabrata* a *C. krusei* prokázaly výrazný antifungální účinek látky Pc3 i Pc7. Za stejných podmínek dokázaly úplně eliminovat inokulum obou testovaných kmenů.

7.3 Výsledky testování ftalocyaninů na nosiči

V následujících experimentech byl sledován antimikrobiální efekt derivátu ftalocyaninu Pc7 po navázání hydroxypropylmethylcelulózu (HPMC). Výsledky pokusů fotoinaktivace Pc7 na nosiči jsou znázorněny v Tab. č. 4.

Při hodnocení výsledků bylo zjištěno, že antimikrobní efekt Pc7 je ovlivněn koncentrací účinné látky, vazbou na HPMC i její koncentrací v gelu. Z Tab. č. 4 je zřejmé, že dle zvoleného kritéria (pokles viabilních CFU o minimálně 3 řády) působil gel H1 působí efektivně vůči *S. aureus*, gel H3 s nižší koncentrací HPMC pak byl účinný především vůči *E. coli*. 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%. Zbylé dva gely antifungální efekt nevykázaly.

Antimikrobní efekt testovaných gelů byl větší za použití ozáření světlem, ale výrazný antibakteriální efekt gelů byl zaznamenán bez následného ozáření. 24-hodinová inkubace se s výjimkou gelu H3 při působení na *C. albicans* ukázala jako nevhodná, antimikrobiální efekt gelů při této inkubační době byl menší nebo žádný.

Tab. č. 4 Přehled *in vitro* antimikrobiální aktivity Pc7 po navázání na nosič

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

8 Diskuse

V této práci je předmětem studia skupina derivátů ftalocyaninů, které jsou známy jako slibné fotosenzibilizátory se schopností tvořit velké množství singletového kyslíku. Fotoinaktivační schopnost některých těchto ftalocyaninových derivátů byla zkoumána již v pracích jiných autorů - disulfonovaný ftalocyanin zinku (22), disulfonovaný ftalocyanin hliníku (23), tetrakis (*N*-methylpyridium -3-oxy)-jodid zinečnatého ftalocyaninu (24), použití ostatních preparátů námi studovaného souboru pro fotoinaktivaci mikrobů 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 (10), elektrický náboj (25) 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 (12) a kvasinek (10).

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*. Antimikrobiální 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 Pc1 a Pc2 – anionické preparáty, a Pc3 – primárně anionická molekula s navázaným kladně nabitým řetězcem. Tyto preparáty dokázaly úplně eliminovat bakteriální kulturu *S. aureus*. I další ftalocyaniny z našeho souboru se záporným nábojem – Pc4, Pc5, Pc8, Pc15 – také vykazovaly alespoň do určité míry antibakteriální efekt při fotoinaktivaci *S. aureus*. Záporně nabitě ftalocyaniny jsou schopné fotoinaktivovat grampozitivní mikroby, ale velikost účinku se mezi jednotlivými preparáty liší v závislosti na jejich molekulární struktuře (10).

Gramnegativní *E. coli* byla k fotoinaktivaci odolnější, z 15 testovaných Pc byly při fotoinaktivaci hodnoceny jako účinné pouze čtyři deriváty. 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).

Pc9 byl již testován jinými autory (24), většinou byl testoval efekt zmiňovaného Pc při fotoinaktivaci gramnegativních mikrobů a jejich výsledkům odpovídají i naše zjištění, že tato látka působí efektivně proti gramnegativním mikrobům. Podle Minnocka (26) je to způsobeno přítomností kladně nabitě *N*-methylpyridylové skupiny umožňující vazbu ftalocyaninu na

lipopolysacharid gramnegativních bakterií. V práci Mantarevové (24) prováděli testy se stejnou látkou na kmenech *S. aureus*, MRSA, *P. aeruginosa* a *Candida albicans*. Pc9 měl za srovnatelných podmínek schopnost kompletně inaktivovat kulturu *S. aureus* a *C. albicans* (1,5 μM , 12 J/cm²). U testované kultury *P. aeruginosa* došlo také k významnému zmenšení inokula (o 4 řády), ale až při použití vyšší koncentrace Pc 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 nálezný jako v naší práci zaznamenali autoři, Ragás a kol. (27) a Demidova a kol. (28), kdy jiná kationická látka, poly-L-lysine chlorin(e6) byla také účinnější při fotoinaktivaci *E. coli* než při fotoinaktivaci *S. aureus*. Oba případy by mohla vysvětlovat větší molekulární hmotnost konjugátu, která umožňuje vazbu na lipopolysacharid gramnegativní *E. coli*, ale nedovoluje překonat peptidoglykanovou vrstvu *S. aureus*.

Pc7 je také kationický derivát. Kladný náboj je dán přítomností skupiny - **pyridinium**, která je podobná skupině *N*-methylpyridyl. 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.

Další kationická látka v našem souboru - **Pc6** – byla hodnocena jako účinná při fotoinaktivaci *S. aureus*. V pokusech s *E. coli* a *C. albicans* však snížila počet bakterií pouze o 2 řády. Kladný náboj tohoto derivátu je dán přítomností trimethylamoniové skupiny, která zřejmě není schopná zajistit dostatečnou vazbu na stěnu gramnegativních bakterií jako zprostředkuje skupina s pyridiniem.

Jako efektivní proti *E. coli* jsme hodnotili také dva sulfamidické deriváty –**Pc3** a **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. (29) 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 (35mg/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, ale i v přítomnosti jaderné membrány a struktuře buněčné stěny - dalších bariér, které je nutné překonat PS. O vyšší odolnosti kvasinek k fotoinaktivaci svědčí potřeba vyšší koncentrace PS i větší dávky světla k dosažení uspokojivého účinku (10). V našem souboru Pc jsme za zvolených podmínek (8 mg/l, 40 J/cm²) našli jen dva účinné Pc s výrazným antifungálním efektem. Jednalo se o Pc7 a Pc3. 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 (30).

PACT byla jako slibná terapeutická metoda pro fotoinaktivaci MRSA již opakovaně studována (31) - 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 meticilinu) i MRSA.

PACT byla studována experimentálně i pro fotoinaktivaci gramnegativních bakterií. V práci Schastaka a kol. (32) 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. Z našich ftalocyaninových derivátů byl stejně efektivní vůči *E. coli*, *K. pneumonie* a *P. aeruginosa* pouze Pc7, Pc3 za stejných podmínek působil efektivně pouze proti *E. coli*, v experimentu s *K. pneumonie* a *P. 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 skriningovém experimentu s *C. albicans*. Podobné výsledky zaznamenal ve své práci Dovigo (33), který také studoval kmeny kvasinek citlivých i rezistentních k azolovým antimykotikům.

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 na 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.

9 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

Skríníngem fotoinaktivačního působení 15-ti ftalocyaninových látek v podmínkách *in vitro* se nám podařilo potvrdit výrazný antimikrobiální 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 pouze 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 dalších experimentů jsme ověřili antimikrobní účinnost derivátů ftalocyaninů při fotoinaktivaci zvolených kmenů bakterií a kvasinek rezistentních k antibiotikům a antimykotikům. Další výsledky ukázaly, že obě tyto látky ovšem také byly schopny efektivně působit i proti dalším 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 účinnosti ftalocyaninu po navázání na vhodné nosiče s cílem posoudit efektivitu potenciální aplikační formy. Je nutné zkonstatovat, že po vazbě na námi zvolený nosič došlo k nepříznivému ovlivnění účinnosti látky Pc7 a budou nutné další práce na poli přípravy aplikační formy.

Experimentální testování potvrdilo výbornou antimikrobní účinnost preparátu Pc7 (tetramethylenpyridinium chlorid hydroxyhlinitého ftalocyaninu). 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.

10 Literatura

1. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), *J Antimicrob Chemother.* 1998;42:13-28.
2. 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.
3. Bertoloni G, Lauro FM, Cortella G, et al. Photosensitizing activity of hematoporphyrin on *Staphylococcus aureus* cells. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1475:169–174.
4. 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.
5. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, et al. Photodynamic therapy for infections: clinical application. *Lasers Surg Med.* 2011;43(7):755-767.
6. Kessel D, Reiners J. Light-Activated Pharmaceuticals: Mechanisms and Detection. *Isr J Chem.* 2012; 52(8-9): 674–680.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

13. Pereira JB, Carvalho EF, Faustino MA, et al. Phthalocyanine thio-pyridinium derivatives as antibacterial photosensitizers, *Photochem Photobiol.* 2012;88(3):537-47.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Dai T, Bil de Arce VJ, Tegos 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.
18. 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.
19. Clayton TH, Harrison PV. Photodynamic therapy for infected leg ulcers. *Br J Dermatol.* 2007;156(2):384–385.
20. 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.
21. Jett BD, Hatter KL, Huzcke MM, et al. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. *BioTechniques.* 1997;23:648-650.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.

26. 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.
27. 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.
28. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(6):2329-2335.
29. Lacey AJ, Philips D. The photosensitisation of *Escherichia coli* using disulphonated aluminium phthalocyanine. *J Photochem Photobiol A: Chem*. 2001;142: 145-150.
30. 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.
31. Fu XJ, Fang Y, Yao M. Antimicrobial Photodynamic Therapy for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:159157.
32. 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.
33. 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.

Publikace a přednášky

Původní články

Proček T, Ryšková L, Kučera T, Šrot J, Šponer P, Gallo J, Plíšková L. Zhodnocení významu ready-made spaceru s gentamicinem ve vztahu k bakteriologickým nálezům u pacientů s infekcí kloubní náhrady.

Přijato v časopise *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie* do připravovaného čísla 2/2014 (**IF 0,306**)

Ryskova L, Buchta V, Karaskova M, Rakusan J, Cerny J, Slezak R. In vitro antimicrobial activity of light-activated phthalocyanines, *Cent. Eur. J. Biol.*, 2013;8(2):168-177. (**IF 0,818**)

Malý J, Melek J, Bréšková P, Hanousková K, Štěpánová V, Ryšková L, Kokštejn Z, Koudelka J, Štichhauer R, Pozler O: Variabilita klinické manifestace norovirové infekce u novorozence – od perakutní nekrotizující enterokolitidy po asymptomatický průběh. *Čes-slov Pediatr.* 2012;67(3): 147-151.

Studnička J, beránek J, Ryšková L, Rencová E, Hejsek L, Rozsival P: Hodnocení bakteriální kolonizace spojivkového vaku pacientů léčených intravitreálními injekcemi ranibizumabu. *Čes a slov Oftal.* 2012;66: 51-55.

Petráš P, Machová I, Ryšková L, Prášil P. Případy menstruační formy syndromu toxického šoku v České republice v letech 1997–2011. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2011;č. 4:161-166.

Hrochová K, Plíšková L, Ryšková L, Palička V, Čermák P. Využití metody PCR/RFLP pro zrychlení identifikace mykobakterií. *Klin mikrobiol inf lék* 2002;8(1):75-78,

Čermák P, Pozlerová E, Morávková M, Zapomělová L Zkušenosti s provozem poloautomatického hemokultivačního systému BacT/Alert v průběhu tří let (1996-1998) ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. *Klin mikrobiol inf lék* 2000, č.2, ročník 6.

Přehledové články

Ryskova L, Buchta V, Slezak R. Photodynamic antimicrobial therapy, *Cent Eur J Biol*, 2010;5(4): 400-406. (**IF 0,818**)

Slezák R, Ryšková L, Paulusová V, Šustová Z, Berglová I, Buchta V. Nové možnosti ve farmakoterapii chorob parodontu a ústní sliznice. *Česká stomatologie* 2012;č.1:15-22.

Ryška P, Málek V, Schreiberová J, Ryšková L, Ungermann L, Klzo L. Perkutánní vertebroplastika a kyfoplastika, In:Postgraduální medicína 2008;10: 222-227.

Kračmarová R, Ryšková L, Kosina P. Pneumokokové infekce novorozenců. *Pediatr. Praxi* 2011;12(2):80-82.

Kazuistiky

Petráš P, Ryšková R, Machová I, Prášil P. Menstruální syndrom toxického šoku vyvolaný kmenem *Staphylococcus aureus* s produkcí enterotoxinu H. *Zprávy CEM* (SZÚ, Praha) 2011; 20(4): 145–147.

Steiner I, Nikolov D, Havel E, Zapomělová L Active infective endocarditis involving all four cardiac valves. *Cardiovasc. Pathol* 2000;9(5): 293-296. (IF 2,352)

Petráš P, Ryšková L, Kračmarová R. Menstruální případ syndromu toxického šoku. *Zprávy CEM* (SZÚ, Praha) 2000;9(11).

Přednášky

Purulentní meningitidy ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové v letech 1996 - 1997
Tomáškovy dny 98

Haemophilus aphrophilus jako původce mozkového abscesu, Tomáškovy dny 2000

Atypická mykobacteria, Nové pohledy v mikrobiologii, Poděbrady 2000

Testování fotoinaktivace bakterií ftalocyaniny, Den výzkumných prací, Akademický klub – Faustův dům, Karlovo nám. 40, Praha 2, 6. 6. 2008

Laserem aktivované látky s antimikrobiálním účinkem, XII. Sazamovy dny, Hradec Králové, 22. – 23. 11. 2008

Pooperační meningitidy u neurochirurgických pacientů, XI. konferenci Neuro-SKI, Harrachov 2009, 19.–21. března 2009

Meningitidy u neurochirurgických pacientů, XIII. Slovensko – český kongres o infekčních chorobách, Bratislava, 11.- 13.6.2009

Antibakteriální efekt ftalocyaninů při fotodynamické antimikrobiální terapii, Kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí, XVII. Moravsko-slovenské mikrobiologické dny, Olomouc 29.-31.10.2009

Infekce ventrikuloperitoneálního shuntu – kazuistika, XII. NEURO-SKI Harrachov 2010

Infekční endokarditida způsobená *Corynebacterium amycolatum*, XIV. česko-slovenský kongres o infekčních nemocech, Pec pod Sněžkou, 8.-11.6.2010

Periprotetické infekce, XV. česko-slovenský kongres o infekčních chorobách, Martin, 1.- 3.6.2011

Postery

In Vitro Antibacterial and Antifungal Activity of Light-Activated Phthalocyanines
49th ICAAC Meeting 2009, USA

In vitro Photodynamic Inactivation of *Candida* spp. Using Phthalocyanines
Trends in Medical Mycology 2009, Řecko