

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
Katedra Anorganické chemie

Charles University, Faculty of Science
Department of Inorganic Chemistry

Doktorský studijní program / Ph.D. study program
Autoreferát disertační práce / Summary of the Ph.D. Thesis



Fotoaktivní polystyrenové nanomateriály produkující singletový kyslík
Polystyrene photoactive nanomaterials producing singlet oxygen

Mgr. Petr Henke

Školitel/Supervisor:
doc. RNDr. Jiří Mosinger, Ph.D.

Praha, 2017

Obsah

Abstrakt.....	3
Úvod.....	4
Cíle práce	5
Materiál a metodika.....	5
Výsledky a diskuze.....	6
Závěr	10
Abstract	11
Introduction	12
Aims of the study	13
Material and methods	13
Results and discussion.....	14
Conclusions.....	18
Curriculum vitae.....	19
Literatura / References	21

Abstrakt

Rostoucí výskyt multirezistentních kmenů bakterií způsobuje poptávku po alternativě k antibiotické léčbě a obecněji po antimikrobiálních materiálech jako součásti prevence. V popředí zájmu je fotodynamická inaktivace bakterií a dalších patogenů způsobená fotogenerovaným singletovým kyslíkem.

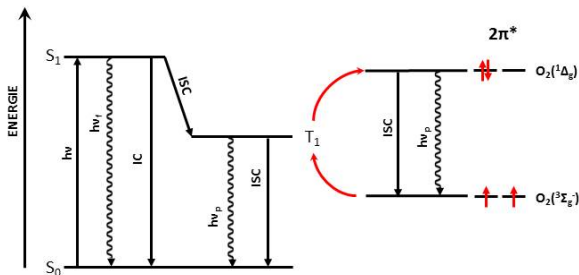
Tato práce je zaměřena na oblast fotoaktivních polymerních nanovláčkových membrán a nanočástic generujících singletový kyslík vhodných pro aplikace v medicíně.

Byly připraveny různé typy modifikovaných fotoaktivních polystyrenových nanovláčkových membrán s enkapsulovaným nebo externě vázaným porfyrinovými fotosensitizery. Tyto materiály efektivně produkují vysoce reaktivní, cytotoxický singletový kyslík, schopný omezené difúze do vnějšího prostředí. Výsledky našeho výzkumu demonstrují zásadní roli smáčivosti tohoto typu materiálů s krátkou difuzní dráhou vznikajícího singletového kyslíku, objasňují vliv teploty a poukazují na jejich možné využití jakožto multifunkčních materiálů. Díky jejich antimikrobiálním vlastnostem jsou tyto materiály vhodnou alternativou k lokálnímu využití antibiotik a antiseptik. Díky dobré prodyšnosti a krátké difuzní dráze singletového kyslíku se dají očekávat dobré výsledky v *in vivo* testech.

Z těchto nanovláčkových materiálů byly také připraveny fotoaktivní, extrémně stabilní polystyrenové nanočástice s enkapsulovanými fotosensitizery, které jsou efektivnější pro sterilizaci nebo oxidaci většího objemu vodných roztoků. Představena byla i metoda využívající připravené nanočástice k citlivé detekci kyslíku ve vodných roztocích. Nanovláčkové membrány mohou sloužit nejen jako výchozí materiál pro přípravu nanočástic, ale i jako filtr pro jejich odstranění z roztoku.

Úvod

Aplikací antibiotik v posledních dekádách došlo k významnému poklesu počtu úmrtí následkem mikrobiálních, především bakteriálních infekcí. Nadužívání antibiotik ale vede ke vzniku rezistentních kmenů bakterií. Nozokomiální nákazy rezistentními bakteriemi představují vážný problém moderního zdravotnictví.^{1,2} Alternativní cestou pro likvidaci bakterií nezahrnující antibiotika je antimikrobiální fotodynamická inaktivace („PhotoDynamic Inactivation“, PDI). Ta spočívá v kombinaci netoxického organického barviva (fotosensitizeru) a viditelného záření, které v přítomnosti kyslíku produkuje vysoce cytotoxické reaktivní kyslíkové částice, jako je singletový kyslík $O_2(^1\Delta_g)$, na základě fotosenzitizované reakce. Fotosensitizer v základním stavu S_0 je excitován absorbovaným světlem do excitovaného singletového stavu S_1 . Tento se může spontánně deaktivovat vyzářením energie ve formě fluorescence ($h\nu_f$) nebo vnitřní konverzí („internal conversion“ IC) přeměnit přebytečnou energii na teplo a vrátit se tak do S_0 stavu v řádu několika nanosekund.³ Dalším deaktivacím procesem je mezisystémový přechod („intersystem crossing“ ISC) do tripletového stavu (T_1) s relativně dlouhou dobou života (v řádu mikrosekund).⁴ Případný zářivý přechod do S_0 se projevuje jako fosforescence ($h\nu_p$), nicméně hlavní deaktivací cestou T_1 stavu je přenos energie na $O_2(^3\Sigma_g^-)$ za vzniku $O_2(^1\Delta_g)$ (Obr. 1).



Obr. 1. Modifikovaný Jablonského diagram zobrazující mechanismus fotosenzitizované reakce. S_0 je fotosensitizer v základním stavu, $h\nu$ je absorbované světelné kvantum, S_1 je excitovaný singletový stav fotosensitizeru, T_1 je tripletový stav fotosensitizeru, ISC je mezisystémový přechod, IC je vnitřní konverze, $h\nu_p$ je fosforescence, $h\nu_f$ je fluorescence.

Současný výzkum antimikrobiálních materiálů se zaměřuje k těm, kde je fotosensitizer vázán na pevný nosič. Tento přístup kombinuje možnost inaktivace bakterií, virů a dalších patogenů s jednoduchou aplikací.

Perspektivními nosiči jsou polymerní nanovláknenné materiály. Excitace fotosensitizeru enkapsulovaného v nanovláknenných membránách pomocí viditelného světla vede ke generování $O_2(^1\Delta_g)$ který efektivně ničí bakterie^{5,6,7} a viry⁸. Nanovláknenný materiál tvořený nanovláknem o průměru v rozsahu 100 – 400 nm, nabízí velký měrný povrch, dobrou permeabilitu pro kyslík a transparentnost pro světlo (v závislosti na polymeru).⁹ Nanovláknenná struktura s mnoha vrstvami neuspořádaných vláken zabraňuje průchodu bakterií a zachytává je na povrchu.¹⁰ Hlavní nevýhodou polymerních nanovláknenných materiálů s enkapsulovaným fotosensitizerem je krátká doba života a z ní plynoucí krátká

difuzní dráha $O_2(^1\Delta_g)$ (typicky desítky až stovky nanometrů),¹¹ což limituje efektivní fotooxidaci chemických nebo biologických substrátů na oblast bezprostředního okolí nanovláčného povrchu.¹²

Cíle práce

Hlavním cílem práce bylo vyvinout nové fotoaktivní polystyrenové nanomateriály (nanovláčné membrány či nanočástice) fotogenerující $O_2(^1\Delta_g)$.

Dílčím cílem bylo modifikovat polystyrenové nanovláčné membrány s enkapsulovaným fotosensitizerem za účelem zvýšení jejich fotooxidačních schopností, případně přidáním nové funkcionality vytvořit multifunkční nanovláčné membrány. Dále, vzhledem k předpokládaným aplikacím nanovláčných membrán jako krycích antibakteriálních materiálů, testovat přímo tyto materiály pro fotoinaktivaci bakterií.

Dalším cílem bylo vyvinout nové fotoaktivní nanočástice pro detekci rozpuštěného kyslíku ve vodných prostředích a fotooxidaci/fotodesinfekci větších objemů vodných roztoků s možností jednoduchého odstranění nanočástic z ozařovaného roztoku.

Důležitým cílem pro oba typy nanomateriálů, bylo přirozeně charakterizovat jejich vlastnosti a popsat vhodné podmínky pro jejich efektivní využití, především pomocí spektrálních metod, včetně časově rozlišených, zaměřených na monitorování excitovaných stavů fotosensitizerů a generovaného $O_2(^1\Delta_g)$.

Materiál a metodika

Nanovláčné materiály ve formě membrán byly připraveny metodou „electrospinning“. Polystyrenové (PS) nanovláčné membrány s nebo bez enkapsulovaného fotosensitizeru byly modifikovány různými metodami (sulfonací, studenou plazmou či polydopaminovou vrstvou). Nanočástice (NPs) byly připraveny precipitační metodou z PS sulfonovaných nanovláčných membrán s enkapsulovaným 5,10,15,20-tetrafenylporfyrinem (TPP).

Morfologie, struktura a fotofyzikální vlastnosti těchto materiálů byly charakterizovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie, „steady-state“ a časově rozlišené fluorescenční a absorpční spektroskopie. Některé materiály byly charakterizovány měřením zdánlivých kontaktních úhlů, dynamického rozptylu světla nebo pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie a infračervené spektroskopie.

Iontově výměnné kapacity byly zjišťovány titračně, adsorpce Pb^{2+} pomocí atomové absorpční spektroskopie.

Pro testy fotooxidace externího substrátu byla využita sodná sůl kyseliny močové, nebo jodidové detekční činidlo. Antibakteriální a virucidní vlastnosti byly testovány vůči *E. coli* K-12 nebo DH5 α , respektive proti neobalenému myšímu polyomaviru a obalenému baculoviru.

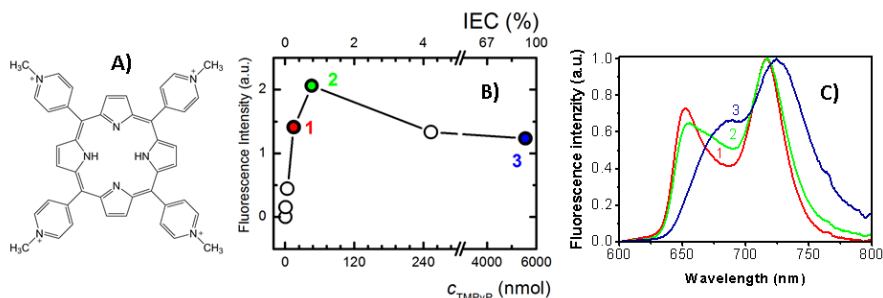
Výsledky a diskuze

Výsledky byly shrnuty ve čtyřech článcích v mezinárodních impaktovaných časopisech:

I) Polystyrenové nanovlákné materiály s externě vázaným fotosensitizerem.

Henke P., Lang K., Kubát P., Šlouf M., Mosinger J.: Polystyrene Nanofiber Materials Modified with an Externally Bound Porphyrin Photosensitizer; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 3776–3783.

Polystyrenové nanovlákné membrány byly připraveny metodou „electrospinning“. Po chlorsulfonaci této membrány a následné hydrolyze byl iontově navázán kationtový fotosensitizer 5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porfyrin (TMPyP; Obr. 2A). Takto byly získány fotoaktivní nanovlákné membrány s velkým specifickým povrchem a vysokou iontově výměnnou kapacitou (IEC = 4 mmol·g⁻¹).



Obr. 2. (A) 5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porfyrinem (TMPyP), (B) závislost intenzity fluorescence na adsorbovaném množství TMPyP, (C) normalizovaná emisní spektra vzorků nanovlákného materiálu s externě vázaným TMPyP ponořeného ve vodě s poměrem TMPyP/-SO₃⁻ (1) 2,5 × 10⁻³, (2) 7,5 × 10⁻³ a (3) 0,93.

Externě vázaný TMPyP vykazuje po ozáření tvorbu tripletových stavů, generuje O₂(¹Δ_g) a singletovým kyslíkem způsobenou zpožděnou fluorescenci (SODF). Fotofyzikální vlastnosti nanovláken jsou závislé na množství navázaného TMPyP.

Analýza fluorescenčních spekter ukázala, že adsorbovaný tetrakation TMPyP se při nižším poměru vůči IEC váže na více -SO₃⁻ skupin, porfyrinový kruh je zřejmě paralelní s povrchem polystyrenových nanovláken a méně vystaven polárnímu prostředí vodného roztoku, neboť jeho fluorescenční pásy jsou lépe rozlišené. Při vyšším poměru fotosensitizeru k IEC jsou molekuly TMPyP vázány pouze přes jeden kladný náboj N-methylpyridiniové skupiny, porfyrinový kruh je více vystaven/orientován k polárnímu prostředí, což je indikováno jeho nerozlišenými emisními pásy (Obr. 2B, C).

Fotooxidační schopnosti tohoto materiálu byly demonstrovány na sodné soli kyseliny močové a jodidovým detekčním činidlem. Na povrchu membrán byl zjištěn silný antibakteriální účinek vůči bakteriím *Escherichia coli* DH5α. Navzdory tomu, že nanovlákný materiál s vázaným TMPyP fotogeneruje O₂(¹Δ_g) s nižšími dobami života (τ_A ≈ 0.7 μs) než dřívě publikované nanovlákné membrány s fotosensitizerem enkapsulovaným uvnitř vláken (τ_A = 13.5 μs)⁶, oba materiály vykazují porovnatelnou

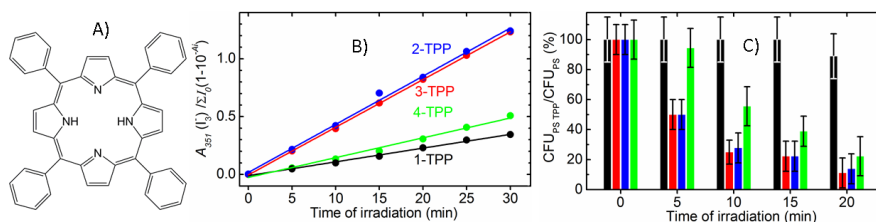
fotooxidaci substrátu ve vodě. Důvodem může být lepší kontakt mezi hydrofilním povrchem nanovláken a vodným prostředím a kratší potřebná difúzní dráha $O_2(^1\Delta_g)$ k cílové molekule substrátu. Vzhledem k velké IEC je možné nanovláčennou membránu (i s pevně vázaným fotosensitizerem) využít pro iontovou výměnu, a to například k odstraňování těžkých kovů (Pb^{2+}) nebo fotooxidačních produktů během čištění a sterilizace vod.

II) Vliv smáčivosti nanovláčenných materiálů s enkapsulovaným fotosensitizerem na antibakteriální efekt.

Henke P., Kozak H., Artemenko A., Kubát P., Forstová J., Mosinger J.: Superhydrophilic Polystyrene Nanofiber Materials Generating $O_2(^1\Delta_g)$: Postprocessing Surface Modifications toward Efficient Antibacterial Effect; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 13007–13014.

Při řešení této části práce byla modifikována dříve publikovaná PS nanovláčenná membrána s enkapsulovaným fotosensitizerem 5,10,15,20-tetrafenylporfyrinem (TPP, Obr. 2A).⁶ Byly použity tři různé modifikace povrchu nanovláčenného materiálu. Pomocí sulfonace, aplikací studené radiofrekvenční kyslíkové plazmy a pokrytím tenkou vrstvou polydopaminu (PD). Všechny modifikace významně zvýšily smáčivost původně hydrofobního PS nanovláčenného materiálu bez poškození nanovláken, vymytí fotosensitizeru nebo změn ve spektrálních charakteristikách TPP, dobách života T_1 stavu nebo $O_2(^1\Delta_g)$. Také nebyla pozorována změna kyslíkové permeability v polymerních nanovláčecích.

Předpoklad, že smáčivost těchto membrán (měřená jako zdánlivý kontaktní úhel) má vliv na účinnost fotooxidace substrátu generovaným $O_2(^1\Delta_g)$ byla testována na jodidovém detekčním činidle (Obr. 2B). Metoda je založena na fotooxidaci I^- na I_3^- ve vodném roztoku. Relativní účinnost fotooxidace (PE) vzorků byla vypočítána jako směrnice závislosti $A(I_3^-)/\Sigma I_0(1-10^{-A_i})$ na ozařovacím čase, kde $A(I_3^-)$ byla absorbance fotoproduktovaného I_3^- při 351 nm a $\Sigma I_0(1-10^{-A_i})$ byla suma absorbované intenzity světla při vlnových délkách λ_i (400-700 nm), tato směrnice pak byla vztažena k směrnici u nemodifikovaného materiálu.



Obr. 3. (A) 5,10,15,20-tetrafenylporfyrin (TPP) (B) Závislost absorbance I_3^- při 351 nm v jodidového detekčního činidla na době ozařování (kinetika tvorby I_3^-) korigovaná na absorbované excitační záření, pro jednotlivé vzorky. (C) Počty životaschopných bakterií (CFU) v procentech ozařované slepé kontroly (bez TPP). Odečtených po inkubaci bakteriálního inokula ozařovaného na povrchu jednotlivých vzorků solárním simulátorem. (1, černá) - nemodifikovaný vzorek nanovláčenné membrány, (2, modrá) - sulfonovaný vzorek, (3, červená) - vzorek ošetřený studenou plazmou a (4, zelená) - vzorek pokrytý vrstvou PDA (převzato z¹²)

PE hydrofobního nemodifikovaného vzorku (1,0) byla výrazně nižší než u modifikovaných vzorků. Sulfonovaný vzorek (PE = 3,47) a vzorek modifikovaný studenou plazmou (PE = 3,50) měly téměř identické hodnoty. Nižší hodnoty PE měl vzorek s PD

filmem ($PE = 1,44$), to je způsobeno vrstvou PD filmu, který redukuje (oproti nemodifikovanému vzorku) transmitanci v oblasti, ve které TPP absorbuje, o 8 - 14,5 %.

Všechny modifikace podstatně zvýšily fotoindukovanou antibakteriální účinnost nanovláčkových materiálů vůči bakteriím *Escherichia coli* K-12 (Obr. 2C). Rozdíly rostou s ozařovacím časem, například u plazmovaného vzorku po 20 minutách ozařování solárním simulátorem (simulujícím denní světlo) klesl počet životaschopných bakterií měřený počtem vzniklých kolonií CFU („colony forming units“) pod 10 % hodnoty nalezené pro stejný vzorek udržovaný ve tmě. Oproti tomu počet CFU odečtených po ozařování nemodifikované membrány s TPP za stejných podmínek představoval pouze 90 % jeho temné kontroly.

III) Vliv teploty na fotofyzikální a antibakteriální vlastnosti nanovláčkových materiálů

Suchanek J., Henke P., Mosinger J., Zelinger Z., Kubat P.: Effect of Temperature on Photophysical Properties of Polymeric Nanofiber; *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118, 6167–6174.

Byl pozorován významný vliv teploty na účinnost fotooxidace a antibakteriálních vlastností připravených nanovláčkových materiálů s enkapsulovaným či externě vázaným porfyrinovým fotosensitizerem. Teplota má vliv na fotofyzikální parametry fotosensitizeru (doby života tripletových stavů), a na vlastnosti jeho bezprostředního okolí (např. je ovlivněna permeabilita pro kyslík v polymerech¹³ a na rozpouštědlo závislé nezáživé deaktivace $O_2(^1\Delta_g)^{14}$).

Kinetika $O_2(^1\Delta_g)$, a tripletových stavů fotosensitizeru generovaných ozářením nanovláčkového materiálu na vzduchu a ve vzduchem nasycené vodě byla měřena pomocí časově rozlišené spektroskopie v rozsahu 5 - 60°C. U testovaných membrán s enkapsulovaným TPP vede zvýšení teploty ke zvýšení difúze kyslíku v polymerních nanovláčkách. To se projeví v kratších dobách života tripletových stavů fotosensitizeru (τ_T), kratších dobách života $O_2(^1\Delta_g)$ (τ_Δ) a zesílenému signálu zpožděné fluorescence fotosensitizeru („Singlet Oxygen Delayed Fluorescence“ SODF). Kratší τ_T při vyšší teplotě jsou dány tím, že tripletové stavy fotosensitizeru jsou efektivněji zhaseny, především kyslíkem $O_2(^3\Sigma_g^-)$ za vzniku $O_2(^1\Delta_g)$. Snadnější dostupnost $O_2(^1\Delta_g)$ k tripletovým stavům sousedních molekul fotosensitizeru je příčinou zesíleného signálu SODF. Důvod kratší τ_Δ při vyšší teplotě má komplexnější vysvětlení, a závisí na okolí nanovláček. Je způsobena zvýšeným, teplotně závislým neradičním zhasením $O_2(^1\Delta_g)$ molekulami polymeru, ale i tím, že $O_2(^1\Delta_g)$ snadněji difunduje z polymerních nanovláček do vnějšího prostředí (např. H_2O), kde má kratší dobu života. Nanovláčkové membrány s externě vázaným porfyrinovým fotosensitizerem (TMPyP) měly významně nižší závislost τ_Δ na teplotě než polymerní nanovláčkové membrány s enkapsulovaným porfyrinem.

Fotofyzikální data, především rostoucí kyslíkový difúzní koeficient s rostoucí teplotou, odpovídají rostoucí antibakteriální účinnosti PS nanovláčkových membrán s enkapsulovaným TPP.

Bylo zjištěno, že SODF je vhodnou metodou pro sledování kinetiky $O_2(^1\Delta_g)$ v polymerních maticích.

IV) Polymerní nanočástice s enkapsulovaným fotosensitizerem připravené z nanovláčkových materiálů.

Henke P., Kirakci K., Kubát P., Fraiberk M., Forstová J., Mosinger J.: Antibacterial, Antiviral, and Oxygen-Sensing Nanoparticles Prepared from Electrospun Materials; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 25127–25136.

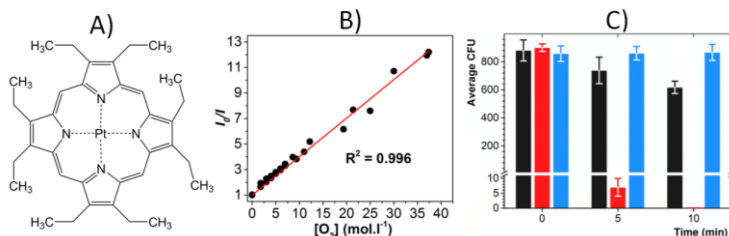
Velmi stabilní fotoaktivní polystyrenové nanočástice (NPs) byly připraveny ze sulfonované PS nanovláčkové membrány s enkapsulovaným TPP nebo Pt-oktaethylporfyrinem (Pt-OEP, Obr. 4A). Nanočástice byly připravené vysrážením přidávkem vody z roztoku THF, v němž byla rozpuštěna dlouhodobě sulfonovaná polystyrenová nanovláčková membrána s enkapsulovaným porfyrinem. Připravené NPs (30 ± 10 nm) mají negativní povrchový náboj kvůli dlouhodobé sulfonaci výchozího materiálu, díky tomu nepodléhají agregaci ani sedimentaci ve vodné suspenzi.

Nanočástice s TPP mají vysoký antibakteriální a virucidní účinek při ozáření viditelným světlem a mohou být použity pro fotooxidaci externího substrátu pomocí $O_2(^1\Delta_g)$. Při porovnání s nanovláčkovými membránami s limitovaným fotooxidačním účinkem na povrchu jsou NPs schopné fotooxidovat/sterilizovat celý objem chemického či biologického substrátu.

Antibakteriální a virucidní účinek NPs s TPP byl ověřen na *Escherichia coli*, neobalených myších polyomavirech a obalených rekombinantních pVL-VP1 baculovirech. Při antibakteriálních testech poklesl po pětiminutovém ozářování bakteriální suspenze s NPs TPP viditelným světlem počet CFU z cca 900 na 7 (Obr. 4C). Po desetiminutovém ozáření nebyly žádné CFU pozorovány. Viry se ukázaly být ještě citlivější na přítomnost fotogenerovaného $O_2(^1\Delta_g)$. Zvláště neobalený polyomavirus byl velmi snadno fotoinaktivován v přítomnosti NPs s TPP, pravděpodobně díky lepší dostupnosti aminokyselin, které jsou snadno oxidovány $O_2(^1\Delta_g)$, jelikož neobalené viry jsou chráněny pouze proteinovou kapsidou⁸

Polystyrenové NPs jsou transparentní pro viditelné světlo a mají vysokou permeabilitu pro kyslík,⁶ toho lze také využít pro konstrukci kyslíkového nanosenzoru. Koncentrace kyslíku ve vodných roztocích může být snadno monitorována pomocí luminiscence enkapsulovaného Pt-OEP v NPs. Připravené NPs s Pt-OEP vykazovaly lineární odezvu luminiscence na koncentraci kyslíku ve vodných roztocích (v celém rozsahu, Obr. 4B).

Bylo též demonstrováno, že nanovláčkové membrány mohou být využity nejen jako výchozí materiál pro přípravu NPs, ale také k jejich efektivnímu odstranění z roztoku.



Obr. 4. (A) Pt-oktaethylporfyrin (B) Stern–Volmer závislost luminiscence NPs s Pt-OEP na koncentraci rozpuštěného kyslíku ve vodě. (C) Průměrný počet CFU odečtený pro bakteriální suspenze ozářované s NPs bez TPP (černá) a s TPP (červená) a suspenze NPs TPP ponechané ve tmě (modrá).

Závěr

Nanovláknenné PS materiály sulfonované pomocí HSO_3Cl jsou ideálními nosiči pro kationtové fotosensitizery (např. TmPyP). Kombinace nanovláknenného materiálu a pevně iontově vázaných fotosensitizerů umožňuje využít výhody velkého specifického povrchu nanomateriálu, snadné expozice molekul fotosensitizerů světlu a kyslíku, flexibility, nízké hmotnosti a vysoké porozity nanovláknenných materiálů. Efektivní fotogenerace $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ pro fotooxidaci chemických substrátů či antibakteriální aplikace tak může být doplněna o další funkcionalitu, využívající iontově výměnou kapacitu, např. pro snadné vychytávání kontaminujících kationtů těžkých kovů z vodných prostředí.

Další možností směrem k efektivnějším fotoaktivním nanovláknenným PS materiálům je modifikace jejich povrchu. Povrchy materiálů byly modifikovány sulfonací, působením radiofrekvenční kyslíkové studené plazmy a pokrytím polydopaminovým filmem. Takto modifikované nanovláknenné membrány efektivně fotogenerují $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Modifikace silně zvyšují smáčivost hydrofobních polystyrenových nanovláken. Zvýšená hydrofilicita/smáčivost povrchu generujícího $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ s krátkou difúzní drahou má klíčovou roli pro dosažení efektivní fotooxidace chemického substrátu/ biologického terče ve vodných prostředích.

Byl studován vliv teploty na kinetiku generace a deaktivace $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ po ozáření porfyrinových fotosensitizerů uvnitř nebo na povrchu polymerních nanovláknenných materiálů. Se zvyšující se teplotou u testovaných membrán s enkapsulovaným TPP dochází ke zvýšení difúze kyslíku v polymerních vláknech. To se projeví v kratších dobách života tripletových stavů fotosensitizeru (τ_T), kratších dobách života $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (τ_Λ) a zesílenému signálu SODF. Nebyl však pozorován vliv teploty na kvantové výtěžek $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Pro nanovláknenné materiály s externě vázaným fotosensitizerem (TmPyP) závisí doba života $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ τ_Λ na teplotě výrazně méně než pro polymerní nanovláknenné materiály s enkapsulovaným TPP, kde $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ musí difundovat skrze polymer s teplotně závislou permeabilitou. V případě membrán s enkapsulovaným TPP byl pozorován významně silnější antibakteriální účinek s rostoucí teplotou, v souladu s rostoucí kyslíkovou difúzí v PS nanovláknenných membránách.

Dále byla představena jednoduchá “top-down” metoda přípravy fotoaktivních polystyrenových NPs z nanovláknenných membrán. Nanočástice s TPP mají při ozáření silné antibakteriální a virucidní vlastnosti. V porovnání s nanovláknennými membrány s limitovaným fotooxidačním účinkem na povrchu jsou NPs schopné fotooxidovat/sterilizovat celý objem chemického či biologického substrátu. Nanočástice s enkapsulovaným Pt-OEP vykazují reverzibilní luminiscenci s lineární Stern–Volmerovou závislostí na koncentraci rozpuštěného kyslíku a mohou být použity pro stanovení kyslíku. Bylo též demonstrováno, že polyuretanové nanovláknenné membrány mohou být aplikovány jako účinné filtry k odstraňování bakterií a nanočástic z vodných roztoků.

Abstract

The increasing number of multidrug-resistant strains of bacteria call for alternatives to antibiotic therapy and, more generally, for the antimicrobial material as a component of prevention. Of particular interest is the photodynamic inactivation of bacteria and other pathogens caused by photogenerated singlet oxygen.

This work is focused on the field of photoactive polymer nanofiber membranes and nanoparticles, generating singlet oxygen, suitable for medical applications. We prepared different types of photoactive modified polystyrene nanofiber membranes with encapsulated or externally bound porphyrin photosensitizers. These materials efficiently produce highly reactive and cytotoxic singlet oxygen capable of restricted diffusion into to the external environment. Our results demonstrate the crucial role of wettability for materials of this type with a short diffusion length of generated singlet oxygen, illustrate the effect of temperature and indicate their potential use as multifunctional materials. Due to their antimicrobial properties, these materials are suitable alternative to antibiotics and local antiseptics. With good breathability and short diffusion length of singlet oxygen good results can be expect in *in vivo* tests.

From these nanofiber materials we also prepared photoactive extremely stable polystyrene nanoparticles with encapsulated photosensitizers that are effective for sterilizing/oxidation of a larger volume of aqueous solutions. We also presented method which is using nanoparticles for sensitive detection of oxygen in aqueous solution. The nanofiber material can be applied not only as source of nanoparticles but also as an effective filter for their removal from solution.

Introduction

For several decades, antibiotics have been critical in the fight against infectious disease caused by bacteria. The overuse of antibiotics has allowed many pathogens to develop resistances to these drugs. A Nosocomial infection (healthcare associated infections) caused by resistant bacteria poses a serious problem for modern health care.^{1,2} Alternative way to kill bacteria not involving antibiotics is antimicrobial photodynamic inactivation. It is the combination of non-toxic organic dyes (photosensitizers) and harmless visible light that, in the presence of oxygen, produce highly toxic reactive species such as singlet oxygen $O_2(^1\Delta_g)$ by process called photodynamic effect. During this process photosensitizer absorbs visible light and is promoted from a lower-energy “ground state” (S_0) to a higher energy singlet state (S_1). This state can be spontaneously deactivated by emitting energy in the form of light by fluorescence ($h\nu_f$) or by internal conversion (IC) converts excess energy into heat and returns back to the S_0 state in a matter of nanoseconds.³ Another deactivation process is intersystem crossing (ISC) to the triplet state (T_1) with a relatively long life (microseconds) due to spin-forbidden transition to S_0 .⁴ Radiative deactivation to S_0 manifests as phosphorescence ($h\nu_p$), but the main deactivation way is electron energy transfer from T_1 state to oxygen in ground state $O_2(^3\Sigma_g^-)$ resulting in $O_2(^1\Delta_g)$ (Fig. 1).

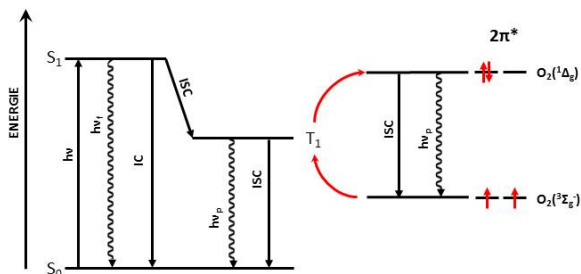


Fig. 1. Modified Jablonski showing with mechanism photosensitized reaction. S_0 is photosensitizer in the ground state; $h\nu$ is absorbed quantum of light; S_1 is excited singlet state of photosensitizer; T_1 is triplet state of photosensitizer; ISC is intersystem crossing; IC is internal conversion; $h\nu_p$ is phosphorescence and $h\nu_f$ is fluorescence.

Recently, research efforts have been extended toward the design of novel materials in which photosensitizers are fixed to a solid support. This approach combines high efficiency in killing bacteria and viruses with a simple application.

Excitation of photosensitizers encapsulated in electrospun nanofiber membranes by visible light leads to the formation of $O_2(^1\Delta_g)$ that efficiently kill the bacteria^{5,6,7} and viruses.⁸ The membranes are characterized by a high surface area, transparency to light; high oxygen diffusion coefficient and nanoporous structure,⁹ which prevent passing bacteria and other pathogens through the nanofiber membranes as they are detained on the surface.¹⁰ The main drawback of these polymeric nanofiber membranes with encapsulated photosensitizer is a low lifetime and diffusing length of $O_2(^1\Delta_g)$ (typically tens to hundreds nm),¹¹ which limits efficient photooxidation of chemical/biological targets only to close proximity of nanofiber surfaces.¹²

Aims of the study

The main aim of the thesis was to develop new photoactive polystyrene nanomaterials (nanofiber membranes or nanoparticles) based on photogenerated $O_2(^1\Delta_g)$.

Partial goal was to modify polystyrene nanofiber membranes with encapsulated photosensitizers in order to increase their ability to photo-oxidate, or by adding new functionality to create a multi-functional nanofiber membranes. Also we wanted directly test these materials for photoinactivation of bacteria, because expected applications of nanofiber membrane are antibacterial materials for covering wounds.

Another aim was to develop new photoactive nanoparticles for detection of dissolved oxygen in the aqueous media and for photooxidation/photodisinfection of larger volumes of aqueous solutions with a simple method for removal of nanoparticles from the irradiated solution.

An important goal for both types of nanomaterials, was to characterize their properties and describe appropriate conditions for their effective use, especially by using spectral methods, including time-resolved methods aimed at monitoring the excited states of photosensitizers and generated $O_2(^1\Delta_g)$.

Material and methods

Nanofibrous materials in the form of membranes were prepared by the electrospinning. The surface of electrospun polystyrene (PS) nanofiber materials with or without photosensitizer was modified by sulfonation, RF oxygen plasma, and polydopamine coating. Nanoparticles were prepared by simple nanoprecipitation method.

The morphology, structure, and photophysical properties of these nanofiber materials were characterized by scanning electron microscopy and steady-state and time-resolved fluorescence and absorption spectroscopies. Some materials were characterized by apparent contact angle measurements, Fourier transforms infrared spectroscopy, confocal fluorescence or fluorescence lifetime imaging microscopic methods and by dynamic light scattering.

Ion Exchange Capacity (IEC) of the sulfonated materials was determined by titration. Atomic absorption spectroscopy was used for determining Pb^{2+} adsorptions.

Photo-oxidation ability was tested against iodide detection solution and uric acid. Antibacterial tests were made on a culture of *E. coli* K-12 or DH5 α suspended in phosphate buffer saline. Nonenveloped mouse polyomavirus and enveloped recombinant pVL-VP1 baculovirus were used for testing of antiviral effect of NPs.

Results and discussion

The results were summarized in four articles in international peer-reviewed journals:

I) Polystyrene Nanofiber Materials Modified with an Externally Bound Porphyrin Photosensitizer. Henke P., Lang K., Kubát P., Šlouf M., Mosinger J.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 3776–3783.

Polystyrene ion-exchange nanofiber materials with large surface areas and adsorption capacities ($\text{IEC} = 4 \text{ mmol g}^{-1}$) were prepared by electrospinning followed by the sulfonation with chlorosulfonic acid and adsorption of a cationic 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin (TMPyP, Fig. 2A) photosensitizer on the nanofiber surfaces. The externally bound TMPyP can be excited by visible light to form triplet states and singlet oxygen $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ and singlet oxygen sensitized delayed fluorescence (SODF). The photophysical properties of the nanofibers were strongly dependent on the amount of bound TMPyP molecules and their organization on the nanofiber surfaces.

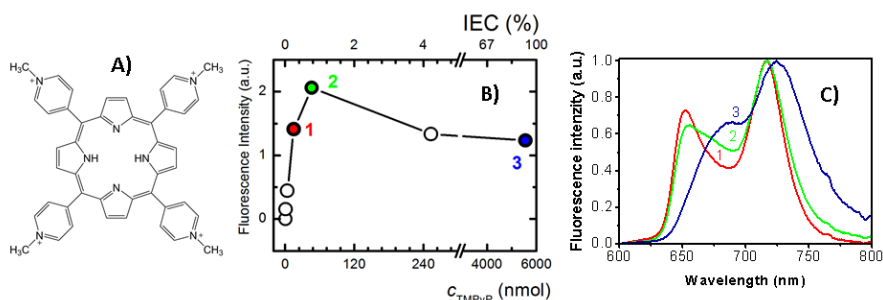


Fig. 2. (A) 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin (TMPyP) (B) Fluorescence intensity as a function of adsorbed TMPyP on the sulfonated nanofibers for different TMPyP/IEC. (C) Normalized fluorescence (excited at 430 nm) spectra of the TMPyP nanofiber material immersed in water for (1) low ($\text{TMPyP}/\text{SO}_3^- = 2.5 \times 10^{-3}$), (2) medium ($\text{TMPyP}/\text{SO}_3^- = 7.5 \times 10^{-3}$), and (3) high ($\text{TMPyP}/\text{SO}_3^- = 0.93$) loadings of TMPyP.

Our results showed that the adsorption of tetracationic TMPyP molecules from aqueous solution started preferentially with the multiple binding of TMPyP to a few $-\text{SO}_3^-$ groups, where most porphyrin units were parallel/nearly parallel to the nanofiber surface. Thus, the contact between water molecules and porphyrin rings located near the surface was limited, and the effect of a less polar environment was accompanied by well resolved fluorescence bands. At high loading, the TMPyP molecules can be attached to the surface by only one N-methylpyridinium group and the porphyrin rings are inclined or perpendicular to the surface. Orientation toward more polar environments is indicated by the unresolved fluorescence bands (Fig. 2B, C).

The nanofibers demonstrated photooxidative activity toward inorganic and organic molecules and antibacterial activity against *Escherichia coli* DH5 α due to the sensitized formation of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ that is an effective oxidation/cytotoxic agent. Despite that the TMPyP nanofiber materials generate $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ with lower lifetimes ($\tau_\Delta \approx 0.7 \mu\text{s}$) than the previously

reported nanofiber material with porphyrin immobilized inside the polystyrene nanofibers ($\tau_{\Delta} = 13.5 \mu\text{s}$)⁶, both materials exhibited a comparable photooxidation activity in aqueous media. The reasons can consist in a good contact of the hydrophilic surface of the TMPyP nanofiber materials with biological targets or polar chemical substrates and in the fact that $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ does not diffuse through the polymer bulk to aqueous media. The nanofiber materials also adsorbed heavy metal cations (Pb^{2+}) and removed them from the water environment.

II) Superhydrophilic Polystyrene Nanofiber Materials Generating $\text{O}_2(^1\Delta_g)$: Postprocessing Surface Modifications toward Efficient Antibacterial Effect.

Henke P., Kozak H., Artemenko A., Kubát P., Forstová J., Mosinger J.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 13007–13014

In this part of project we modified exist hydrophobic polystyrene (PS) nanofiber materials with encapsulated 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin (TPP, Fig. 2A). We used three post-electrospinning modifications: sulfonation, oxygen plasma treatment and the application of a thin polydopamine coating on the surface of the nanofiber material. All modifications strongly increased the wettability/hydrophilicity of the hydrophobic PS nanofibers without causing damage to the nanofibers, leakage of the photosensitizer or any change in the spectral characteristics of TPP, the lifetime of the triplet state or singlet oxygen or even the oxygen permeability of the polymer nanofibers.

The assumption that the wettability (inversely proportional to the apparent contact angles) contributes to the photo-oxidation capability of the nanofiber materials was tested using a sensitive method based on the photo-oxidation of I^- to I_3^- in aqueous solutions (Fig. 2B). The relative photo-oxidation efficacy (PE) of the samples was calculated as the slope of the dependence of $A(\text{I}_3^-)/\Sigma I_0(1-10^{-A_i})$ on irradiation time, where $A(\text{I}_3^-)$ is the absorbance of the photoproduct I_3^- at 351 nm and $\Sigma I_0(1-10^{-A_i})$ is the sum of all absorbed light intensities at wavelengths λ_i (400-700 nm), which was compared with that of the unmodified sample.

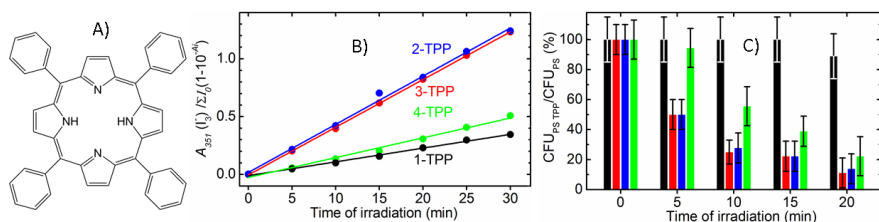


Fig. 3. (A) 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin (TPP) (B) Time profiles of I_3^- absorbance at 351 nm related to absorption of excitation light in iodide detection solution. (C) Photoantibacterial activity estimated as a proportion of the CFU of *E. coli* observed on agar plates after inoculation with bacteria collected from the surfaces of sample with and without TPP. (1, black) – unmodified membrane, (2, blue) – sulfonated membrane, (3, red) – sample after oxygen plasma treatment (4, green) – sample with PD. (adapted from¹²)

The PE of the hydrophobic sample was accelerated by all post-processing modifications. For samples with sulfonation (PE = 3.47) and plasma treatment (PE = 3.50), the increase in photo-oxidation was nearly identical. The lower PE of sample with PD coating (PE = 1.44) can be primarily attributed to the filter effect of the light grey PD

coating, which reduced the transmittance of the pristine PS material in the TPP absorption region by 14.5-8 %.

Although the antibacterial efficiencies of the samples with and without the photosensitizer can be directly compared under the same experimental conditions, the efficiencies of samples with different surfaces are difficult to compare with each other. In addition to the lack of homogeneity of the samples with a defined degree of derivatization and different intakes of nutrients, we also must consider the filter effect of the PD coating. Nevertheless, the results clearly indicate that all hydrophilic modifications strongly increased the photo-antibacterial activity toward *Escherichia coli* K-12 (Fig. 2C). The differences arise with irradiation time. For example, 20 min of irradiation of material modified with oxygen plasma treatment under simulated daylight caused a significant decrease in the number of colony forming units CFUs (approximately 0-10% of the corresponding CFUs in the dark) in contrary to unmodified material (approximately 90% of the corresponding CFUs in the dark).

III) Effect of Temperature on Photophysical Properties of Polymeric Nanofiber

Suchanek J., Henke P., Mosinger J., Zelinger Z., Kubat P.: *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118, 6167–6174.

We also expected that the photooxidation and/or antibacterial efficiency of prepared nanofiber materials (with encapsulated or externally bound porphyrin photosensitizers) are influenced by temperature-dependent changes in photophysical parameters of the photosensitizer and the properties of its environment (e.g. diffusion of oxygen in polymers¹³ and solvent-dependent channel for nonradiative deactivation of $O_2(^1\Delta_g)$ ¹⁴).

The kinetics of formation and the decay of both singlet oxygen $O_2(^1\Delta_g)$ and porphyrin triplet states that are generated by irradiation of nanofiber materials in an air atmosphere or in an air-saturated aqueous solution were measured and evaluated by luminescence and transient absorption spectroscopy in the temperature range between 5 and 60 °C. We found shortening of the $O_2(^1\Delta_g)$ lifetime and a significant increase in singlet oxygen-sensitized delayed fluorescence at higher temperatures. Nanofiber materials with externally bound porphyrin have a considerably weaker temperature dependence for $O_2(^1\Delta_g)$ lifetimes than polymeric nanofiber materials with encapsulated porphyrin. These photophysical data show an increase in the diffusion coefficient for $O_2(^1\Delta_g)$ with temperature, and they are consistent with a stronger antibacterial effect of the nanofiber material with TPP on *Escherichia coli* at higher temperature. The diffusion of $O_2(^1\Delta_g)$ toward bacteria control the antibacterial properties of PS nanofiber materials with encapsulated TPP.

SODF is a very sensitive method for sensing of $O_2(^1\Delta_g)$ in trace concentrations inside polymeric objects; however, the exact calculation of lifetimes of the porphyrin triplet states and $O_2(^1\Delta_g)$ may provide different values than phosphorescence and transient absorption measurements. A significant increase in SODF at high temperature corresponds with higher diffusion of $O_2(^1\Delta_g)$ toward triplet porphyrin molecules in the polymer matrix.

IV) Antibacterial, Antiviral, and Oxygen-Sensing Nanoparticles Prepared from Electrospun Materials. Henke P., Kirakci K., Kubát P., Fraiberk M., Forstová J., Mosinger J.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 25127–25136.

In respect of drawbacks of nanofibers mentioned before, polymeric nanoparticles (NPs) are advantageous thanks to size effects that allow overcoming singlet oxygen diffusion limitations

The simple nanoprecipitation method was used for preparation of stable photoactive polystyrene NPs (diameter 30 ± 10 nm) from sulfonated electrospun polystyrene nanofiber membranes with encapsulated TPP or Pt-octaethylporphyrin (Pt-OEP, Fig. 4A). Resulting NPs have a negative charged surface due to extensive sulfonation, which prevent aggregation in aqueous environment and allows to travel and release of $O_2(^1\Delta_g)$ in the close proximity of the chemical/biological targets. As prepared NPs with TPP have strong antibacterial and antiviral properties and can be applied for photooxidation of external substrates based on photogenerated singlet oxygen. In contrast to nanofiber membranes with limited photooxidation ability nearby the surface, NPs are able to travel towards target species/structures. The antiviral and antibacterial effect of NPs with TPP was evaluated for *Escherichia coli*, non-enveloped mouse polyomavirus and enveloped recombinant pVL-VP1 baculovirus as described in publication. During antibacterial test, after 5 minute of irradiation by visible light, the number of CFUs drops from *ca* 900 to 7. No colonies were found after 10 min of irradiation (Fig. 4C). Viruses appeared to be even more sensitive to $O_2(^1\Delta_g)$ caused inactivation. Especially, non-enveloped polyomaviruses are extremely sensitive to the presence of irradiated NPs TPP, probably due to higher accessibility of the amino acid residues that are sensitive to $O_2(^1\Delta_g)$ as non-enveloped viruses are enclosed in protective, protein-only capsids.⁸

Polystyrene core is transparent to visible light, has a high oxygen diffusion coefficient⁶ and the oxygen concentration can be easily monitored by luminescence of encapsulated Pt-OEP. NPs with Pt-OEP can be used for oxygen sensing in aqueous media and they presented high and linear responses to a broad range of oxygen concentrations (Fig. 4C). The nanofiber membranes can be applied not only as a source of NPs but also as an effective filter for their removing from the solution.

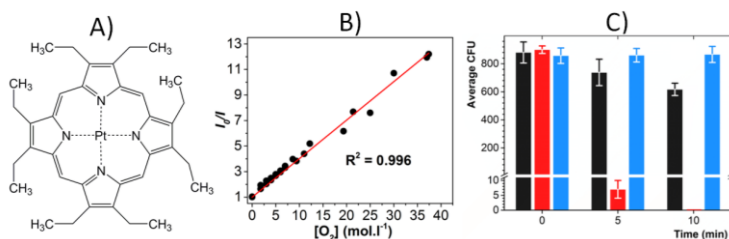


Fig. 4. (A) Pt-octaethylporphyrin (Pt-OEP) (B) Stern-Volmer plot for NPs Pt-OEP luminescence intensity and dissolved oxygen concentrations. (C) Photoantibacterial activity estimated as an average number of the CFUs of *Escherichia coli* observed on agar plates after irradiation by visible light. NPs without TPP (blue), with TPP (red) and NPs TPP stored at dark (blue).

Conclusions

The electrospun polystyrene nanofiber materials sulfonated with chlorosulfonic acid are ideal substrates for the adsorption of porphyrin assemblies (namely TMPyP) that can effectively generate singlet oxygen. The combination of the electrospinning technique and electrostatic assembly allows us to take advantage of the highly specific surface area, easy exposure of the porphyrin molecules to light and oxygen, flexibility, lightweight, and high porosity of the nanofiber materials while simultaneously providing versatile properties that can be fine-tuned by varying the porphyrin/ $-\text{SO}_3^-$ ratio, including the rapid, selective adsorption of cationic species, such as heavy metal cation contaminants or organic pollutants, and the killing of bacteria by singlet oxygen.

Second approach to more efficient antibacterial effect was focused on modification of existing electrospun polystyrene nanofiber materials with encapsulated TPP photosensitizer. Materials were modified through sulfonation, radio-frequency oxygen plasma treatment and polydopamine coating. The nanofiber materials exhibited efficient photogeneration of singlet oxygen. The post-processing modifications strongly increased the wettability of the pristine hydrophobic PS nanofibers. The increase in the surface wettability yielded a significant increase in the photo-oxidation of external polar substrates and in the antibacterial activity of the nanofibers in aqueous surroundings. The results reveal the crucial role played by surface hydrophilicity/wettability in achieving the efficient photo-oxidation of a chemical substrate/biological target at the surface of a material generating $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ with a short diffusion length.

We studied the influence of temperature on the generation and decay of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ by irradiation of porphyrin photosensitizers inside and outside of polymeric nanofiber materials. It provides insight into a potential application of photoactive nanofiber materials at different temperatures. An increase in temperature led to an increase in diffusion of the $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ and oxygen in the ground state toward quenchers (quenching groups, porphyrin triplets) and a corresponding shortening in its lifetime but did not significantly influence the yield of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ formation. In conclusion photoantibacterial properties increase at higher temperature. Nanofiber materials with externally bound porphyrin have a considerably weaker temperature dependence for $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ lifetimes than polymeric nanofiber materials with encapsulated porphyrin.

We have demonstrated a fast and simple top-down process for fabrication of stable photoactive polystyrene NPs from polystyrene electrospun nanofiber material. NPs with TPP had strong antibacterial and antiviral properties. Reasons were short lifetime of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (several microsecond in aqueous media) and NPs ability to “travel” to close proximity of the chemical/biological targets and allow their more efficient photooxidation than those for electrospun membranes with limited oxygen diffusion to the target structures. NPs with encapsulated Pt-OEP exhibited reversible luminescent response and linear Stern–Volmer quenching behavior over the whole range of dissolved oxygen concentrations and can be applied for oxygen sensing. The polyurethane nanofiber membranes prepared by industrial electrospinning method can be used as an efficient filter to remove bacteria and prepared NPs from solution.

Curriculum vitae

Personal information

Name **Petr Henke**

Address **Moravská 1791, Říčany, 251 01, Czech Republic**

Email **petr.henke@natur.cuni.cz**

Date of birth **30.05.1986**

Nationality **Czech**

Education

From 2011 **PhD.** programme Inorganic chemistry
Faculty of Science, Charles University in Prague
(supervisor: doc. RNDr. Jiří Mosinger, Ph.D.)

2009 – 2011 **Mgr.** programme Clinical and Toxicological Analysis
Faculty of Science, Charles University in Prague
(supervisor: doc. RNDr. Jiří Mosinger, Ph.D.)

2006 – 2009 **Bc.** programme Clinical and Toxicological Analysis
Faculty of Science, Charles University in Prague
(supervisor: doc. RNDr. Jiří Mosinger, Ph.D.)

Language skills

English **FCE** passed September 2015

Conferences

Henke P., Mosinger J.: Modified Photoactive Nanofiber Materials with Antibacterial Activity; 13th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies, Thessaloniki, Greece, 5-8 July **2016**. Presentation

Henke P., Mosinger J.: Antibakteriální nanočástice připravené z nanovláknenných materiálů; 68. Sjezd chemiků, Prague, Czech Republic, 4-7 September **2016**. Poster (č. 5P-04; str. 240).

Henke P., Kubat P., Mosinger J.: Modifikace zvyšující antibakteriální účinek fotoaktivních nanovlákných vrstev; 67. Zjazd chemikov, Vysoké Tatry, Slovak Republic, 7-11 September **2015**. Poster (č. 2Po05; str. 127).

Henke P., Kubat P., Mosinger J.: Modifications of Nanofiber Materials toward Efficient Antibacterial Effect; 6th International conference on Advanced Nanomaterials, Aveiro, Portugal, 20-22 July **2015**. Poster (č. 260; str. 234).

Henke P., Kubat P., Mosinger J.: Photoactive Nanofibers with Surface Modification; 11th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies, Thessaloniki, Greece, 8-11 July **2014**. Poster (č. P2-39; str. 234).

Henke P., Kubat P., Mosinger J.: Modified Photoactive Polystyrene Nanofibers; 65. zjazd chemikov, Tatranské Matliare, Slovak Republic, 9-13 September **2013**. Poster (č. 2Po46; str. 190).

Henke P., Kubat P., Mosinger J.: Photoactive Ion Exchange Polystyrene Nanofiber Textiles; *Congress of the European Association for Chemical and Molecular Sciences*, Prague, Czech Republic, 26-30 August **2012**. Poster (č. P - 0725; str. 1225).

List of publications

Henke P., Kirakci K., Kubát P., Fraiberk M., Forstová J., Mosinger J.: Antibacterial, Antiviral, and Oxygen-Sensing Nanoparticles Prepared from Electrospun Materials; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 25127-25136. (IF₂₀₁₅ = 7,145)

Dolanský J., Henke P., Kubát P., Fraix A., Sortino S., Mosinger J.: Polystyrene Nanofiber Materials for Visible-Light-Driven Dual Antibacterial Action via Simultaneous Photogeneration of NO and O₂(¹Δ_g); *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7, 22980–22989. (IF₂₀₁₅ = 7,145)

Henke P., Kozak H., Artemenko A., Kubát P., Forstová J., Mosinger J.: Superhydrophilic Polystyrene Nanofiber Materials Generating O₂(¹Δ_g): Postprocessing Surface Modifications toward Efficient Antibacterial Effect; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 13007–13014. (IF₂₀₁₅ = 7,145)

Plištil L., Henke P., Kubát P., Mosinger J.: Anion Exchange Nanofiber Materials Activated by Daylight with a Dual Antibacterial Effect; *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, 13, 1321–1329. (IF₂₀₁₅ = 2,235)

Suchanek J., Henke P., Mosinger J., Zelinger Z., Kubat P.: Effect of Temperature on Photophysical Properties of Polymeric Nanofiber; *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118, 6167–6174. (IF₂₀₁₅ = 3,187)

Henke P., Lang K., Kubát P., Šlouf M., Mosinger J.: Polystyrene Nanofiber Materials Modified with an Externally Bound Porphyrin Photosensitizer; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 3776–3783. (IF₂₀₁₅ = 7,145)

Literatura / References

- ¹ Magill SS., et al.: Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections; *N Engl J Med* **2014**, 370, 1198–1208.
- ² Chen L., Todd R., Kiehlbauch J., Walters M., Kallen A.: Notes from the field: pan-resistant New Delhi metallo-beta-lactamase-producing klebsiella pneumoniae — Washoe County, Nevada 2016; *Morb Mortal Wkly Rep* **2017**, 66, 33–33.
- ³ Lang K., Mosinger J., Wagnerová DM.: Photophysical Properties of Porphyrinoid Sensitizers Noncovalently Bound to Host Molecules; Models for Photodynamic Therapy; *Coord. Chem. Rev.* **2004**, 248, 321–350.
- ⁴ Kenawy ER., Bowlin GL., Mansfield K., Layman J., Simpson DG., Sanders EH., Wnek GE.: Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend; *J. Control. Release.* **2002**, 81, 57–64.
- ⁵ Mosinger J., Lang K., Kubat P., Sýkora J., Hof M., Plíštil L., Mosinger B.: Photofunctional Polyurethane Nanofabrics Doped by Zinc Tetraphenylporphyrin and Zinc Phthalocyanine Photosensitizers; *J. Fluoresc.* **2009**, 19, 705–713.
- ⁶ Jesenská S., Plíštil L., Kubát P., Lang K., Brožová L., Popelka S., Szatmáry L., Mosinger J.: Antibacterial nanofiber materials activated by light; *J Biomed Mater Res A.* **2011**, 99, 676–683.
- ⁷ Arenbergerova M., Arenberger P., Bednar M., Kubat P., Mosinger J.: Light-activated nanofibre textiles exert antibacterial effects in the setting of chronic wound healing; *Exp. Dermatol.* **2012**, 21, 619–624.
- ⁸ Lhotáková Y., Plíštil L., Morávková A., Kubát P., Lang K., Forstová J., Mosinger J.: Virucidal Nanofiber Textiles Based on Photosensitized Production of Singlet Oxygen; *PLoS One* **2012**, 7, 49226–49226.
- ⁹ Greiner A., Wendorff JH., Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibres; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, 5670–5703.
- ¹⁰ Henke P., Lang K., Kubát P., Šlouf M., Mosinger J.: Polystyrene Nanofiber Materials Modified with an Externally Bound Porphyrin Photosensitizer; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 3776–3783.

-
- ¹¹ Mosinger J., Lang K., Plíštil L., Jesenská S., Hostomský J., Zelinger Z., Kubát P.: Fluorescent polyurethane nanofabrics: a source of singlet oxygen and oxygen sensing; *Langmuir* **2010**, 26, 10050–10056.
- ¹² Henke P., Kozak H., Artemenko A., Kubát P., Forstová J., Mosinger J.: Superhydrophilic Polystyrene Nanofiber Materials Generating O₂(¹Δ_g): Postprocessing Surface Modifications toward Efficient Antibacterial Effect; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 13007–13014.
- ¹³ Gao Y., Baca AM., Wang B., Ogilby PR.: Activation Barriers for Oxygen Diffusion in Polystyrene and Polycarbonate Glasses: Effects of Low Molecular Weight Additives Macromolecules; *Macromolecules* **1994**, 27, 7041–7048..
- ¹⁴ Jensen RL., Holmegaard L., Ogilby PR.; Temperature effect on radiative lifetimes: the case of singlet oxygen in liquid solvents *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 16227–16235.