

Inkorporace antibiotik do biodegradabilních nanovláknenných vrstev pro nové medicínské aplikace

Diplomová práce

Studijní program:

Autor práce:

Vedoucí práce:

N0723A270001 Textilní inženýrství

Bc. Senta Múllerová

Ing. Markéta Klíčová

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů





Zadání diplomové práce

Inkorporace antibiotik do biodegradabilních nanovláknenných vrstev pro nové medicínské aplikace

Jméno a příjmení: **Bc. Senta Müllerová**
Osobní číslo: T19000051
Studijní program: N0723A270001 Textilní inženýrství
Zadávací katedra: Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů
Akademický rok: **2020/2021**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování řešerše na zadané téma: metody inkorporace aktivních látek do nanovláknenných scaffoldů.
2. Experimentální část: vývoj a výroba biokompatibilních vláknenných scaffoldů pomocí bezjehlového elektrostatického zvlákňování; výběr vhodného antibiotika pro danou aplikaci a jeho inkorporace do scaffoldů a charakterizace připravených materiálů.
3. Zpracování získaných výsledků do podoby odborné diskuse, porovnání závěrů se současnou literaturou.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování práce:
Jazyk práce:

dle potřeby dokumentace
40-60 dle potřeby
tištěná/elektronická
Čeština



Seznam odborné literatury:

- [1] BACA KOVA Lucie, Elena FILOVA, Martin PARIZEK, Tomas RUML a Vaclav SVORCIK, 2011. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* [online]. 29(6), 739767. ISSN 1873-1899. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.004.
- [2] PISANI, Silvia, Rossella DORATI, Enrica CHIESA, Ida GENTA, Tiziana MODENA, Giovanna BRUNI, Pietro GRISOLI a Bice CONTI, 2019. Release Profile of Gentamicin Sulfate from Polylactide-co-Polycaprolactone Electrospun Nanofiber Matrices. *Pharmaceutics* [online]. 11(4) [cit. 2021-01-13]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics11040161.
- [3] ROSENDORF, Jachym, Jana HORAKOVA, Marketa KLICOVA, Richard PALEK, Lenka CERVENKOVA, Tomas KURAL, Petr HOSEK, Tomas KRIZ, Vaclav TEGE, Vladimira MOULISOVA, Zbynek TONAR, Vladislav TRESKA, David LUKAS a Vaclav LISKA, 2020. Experimental fortification of intestinal anastomoses with nanofibrous materials in a large animal model. *Scientific Reports* [online]. 10(1), 1–12 [vid. 2020-01-30]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-58113-4.

Vedoucí práce:

Ing. Markéta Klíčová
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání práce:

1. listopadu 2020

Předpokládaný termín odevzdání:

28. května 2021

doc. Ing. Vladimír Bajzík, Ph.D.
děkan

L.S.

Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci jsem vypracovala samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Jsem si vědoma toho, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má diplomová práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědoma následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

26. května 2021

Bc. Senta Müllerová

Poděkování

Mnohokrát děkuji vedoucí mé diplomové práce Ing. Markétě Klíčové za odborné vedení a konzultace, trpělivost, vstřícnost, připomínky a cenné rady během psaní a vypracovávání této práce. Děkuji také za možnost pracovat na zajímavém tématu.

Také moc děkuji Ing. Andree Klápšťové za věnovaný čas a pomoc při výrobě materiálů. Dále mnohokrát děkuji Mgr. Janě Melicheríkové za věnovaný čas pro provedení elementární analýzy, Ing. Janě Müllerové, Ph.D. za čas věnovaný pro provedení FTIR analýzy a Ing. Michaele Petržílkové za cenné rady a spolupráci na antibakteriálních testech.

Dále děkuji prof. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D. za cenné rady a věnovaný čas pro stanovení obsahu antibiotika ve vrstvách.

Děkuji také prof. Ing. Jaroslavovi Hrabákovi, Ph.D. a prof. MUDr. Václavovi Liškovi, Ph.D. za konzultaci a cenné rady.

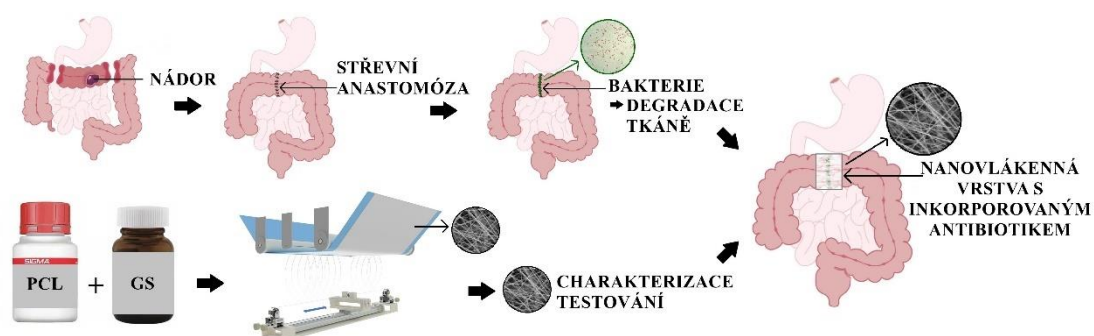
Děkuji za podporu v rámci projektu s registračním číslem NU20J-08-00009 pod Agenturou pro zdravotnický výzkum České Republiky.

Poděkování také patří mé rodině, přátelům a mé spolubydlící za podporu během psaní této práce a celého studia.

Abstrakt

V této diplomové práci byl vyvinut a otestován nanovláknenný materiál s inkorporovaným antibiotikem, který by mohl být slibným řešením nebezpečných pooperačních komplikací v gastrointestinální chirurgii spojených s výskytem bakterií. Na bezjehlovém elektrostatickém zařízení Nanospider™ byly zvlákněny polymerní roztoky poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL) s přidavkem antibiotika Gentamicin sulfát (GS) o koncentraci 0; 1; 3; 5; 7,5 a 10 hm. %. Vyrobené vrstvy byly charakterizovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie a byla měřena jejich smáčivost. Obsah antibiotika ve vrstvách byl testován pomocí elementární analýzy, infračervené spektroskopie (FTIR), UV-spektrofotometrie a vysoce-účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Byla sledována absorpce destilované vody a simulované střevní tekutiny vyrobených materiálů, hodnotila se cytotoxicita extraktů materiálů, a i samotného antibiotika GS v médium, na buněčné linii 3T3 myší fibroblasty. Vrstvy byly vyhodnoceny jako cytokompatibilní. Materiály byly také testovány *in vitro*, kdy po 2, 7, 14 a 21 dnech byla hodnocena adheze a proliferace 3T3 buněk pomocí metabolického testu CCK-8 a fluorescenční a skenovací elektronové mikroskopie. Byly provedeny antibakteriální testy, které potvrdily přítomnost, uvolňování a účinnost antibiotika GS z nanovláknenných vrstev. Během celého experimentu byl také sledován vliv sterilizace ethylenoxidem na nanovláknenné vrstvy s inkorporovaným antibiotikem. Sterilizace nezpůsobila žádné významné změny nanovláknenných materiálů s inkorporovaným antibiotikem a sterilní vrstvy měly antibakteriální účinky.

Grafický abstrakt

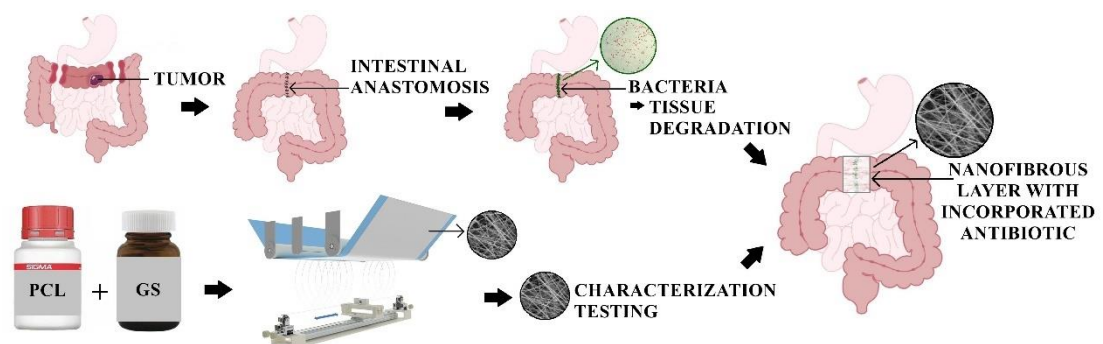


Klíčová slova: Nanovláknenné vrstvy, poly- ϵ -kaprolakton, elektrostatické zvláknění, inkorporace, antibiotikum, Gentamicin sulfát, antibakteriální

Abstract

In this diploma thesis, a nanofibrous material with an incorporated antibiotic was developed and tested. The introduced structure could serve as promising prevention of the life-threatening postoperative in gastrointestinal surgery associated with the occurrence of bacteria. Polymer solutions of poly- ϵ -caprolactone (PCL) with antibiotic Gentamicin sulfate (GS), in concentrations 0; 1; 3; 5; 7,5 and 10 wt. % were electrospun via needleless Nanospider™ device. The produced layers were characterized by scanning electron microscopy and their wettability was measured. The amount of antibiotic in the layers was tested by elemental analysis, infrared spectroscopy (FTIR), UV-spectrophotometry and high-performance liquid chromatography (HPLC). The absorption of water and simulated intestinal liquid of the materials was monitored, the cytotoxicity of the material extracts was evaluated, as well as the cytotoxicity of the GS antibiotic in the medium, on the 3T3 mouse fibroblast cell line. The layers were evaluated as cytocompatible. The materials were also tested *in vitro*, where after 2, 7, 14 and 21 days, the cell adhesion and proliferation was assessed using the CCK-8 metabolic assay and fluorescence and scanning electron microscopy. Antibacterial tests were performed to confirm the presence release and efficiency of the antibiotic GS from the nanofiber layers. The effect of ethylene oxide sterilization on nanofibrous layers with incorporated antibiotic was also studied throughout the experiment part. Sterilization did not cause any significant changes in the nanofibrous materials with an incorporated antibiotic, and the sterile layers had antibacterial properties.

Graphical abstract



Key words: Nanofibrous layers, poly- ϵ -caprolacton, electrospinning, incorporation, antibiotics, Gentamicin sulfate, antibacterial

Obsah

Seznam zkratk	10
ÚVOD	12
TEORETICKÁ ČÁST	14
1. Nanovláknenné materiály ve tkáňovém inženýrství.....	14
1.1. Tkáňové inženýrství.....	14
1.2. Nanovláknenné materiály	16
1.2.1. Syntetické biodegradabilní polymery	17
1.2.1.1. Poly- ϵ -kaprolakton.....	19
1.3. Výroba nanovláknenných materiálů	20
1.3.1. Elektrostatické zvlákňování	20
1.3.1.1. Parametry ovlivňující proces elektrostatického zvlákňování	22
2. Inkorporace aktivních látek do nanovláknenných materiálů	24
2.1. Metody inkorporace	26
2.1.1. Smíchání	27
2.1.2. Enkapsulace	28
2.1.3. Navázání aktivní látky na povrch	29
2.1.4. Koaxiální elektrostatické zvlákňování.....	30
2.2. Uvolňování aktivních látek z nanovláknenných materiálů.....	30
2.2.1. Mechanismy uvolňování aktivních látek	30
2.2.2. Kinetika uvolňování aktivních látek	33
2.3. Inkorporace antibiotik do nanovláknenných vrstev	34
3. Antibiotika	37
3.1. Mechanismus působení antibiotik	37
3.2. Aminoglykosidy.....	38
3.2.1. Gentamicin sulfát.....	39
4. Bakterie.....	40
4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
5. Aplikace nanovláknenného materiálu s inkorporovaným antibiotikem	43
5.1. Střevní anastomóza	43
5.2. Další možné aplikace nanovláknenných materiálů s inkorporovaným antibiotikem	47
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	48
6. Metody	48
6.1. Příprava polymerních roztoků	48
6.2. Výroba materiálů bezjehlovým elektrostatickým zvlákňováním	49
6.3. Plošná hmotnost.....	49
6.4. Sterilizace materiálů	49

6.5.	Skenovací elektronová mikroskopie	49
6.6.	Měření průměru vláken	49
6.7.	Příprava simulované střevní tekutiny	50
6.8.	Měření kontaktního úhlu	50
6.9.	Elementární analýza	50
6.10.	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací	51
6.11.	UV – spektrofotometrie a vysoko-účinná kapalinová chromatografie	51
6.12.	Absorpce tekutin	52
6.13.	Buněčné testování in vitro	53
6.13.1.	Cytotoxicita extraktů	53
6.13.2.	Cytotoxicita Gentamicinu sulfátu v médiu	54
6.13.3.	Test buněčné adheze a proliferace	54
6.14.	Antibakteriální testy	56
6.15.	Statistické vyhodnocení dat	57
7.	Výsledky	59
7.1.	Výroba nanovlákných vrstev s inkorporovaným antibiotikem	59
7.2.	Charakterizace zvlákněných nanovlákných vrstev	61
7.2.1.	Morfologie nanovlákných vrstev	62
7.2.2.	Průměr vláken	63
7.2.3.	Smáčivost vrstev	64
7.3.	Testování obsahu a účinku antibiotika ve vrstvách	65
7.3.1.	Chemické složení nanovlákných vrstev s antibiotikem	66
7.3.2.	Obsah antibiotika v nanovlákných vrstvách	68
7.3.3.	Absorpce tekutin a změna hmotnosti vlivem absorpce	70
7.3.4.	Cytotoxicita extraktů materiálů	73
7.3.5.	Cytotoxicita Gentamicinu sulfátu v médiu	74
7.3.6.	In vitro test buněčné adheze a proliferace	76
7.3.7.	Antibakteriální testy	80
8.	Diskuse výsledků	84
8.1.	Výběr polymeru a antibiotika	84
8.2.	Výroba nanovlákných vrstev s inkorporovaným antibiotikem	85
8.3.	Testování obsahu a účinku antibiotika v nanovlákných vrstvách	86
8.4.	Antibakteriální účinky nanovlákných vrstev s antibiotikem	88
8.5.	Vliv sterilizace na nanovlákné vrstvy s antibiotikem	89
ZÁVĚR		91
Literatura		93
Seznam obrázků		104
Seznam tabulek		106
Přílohy		107

Seznam zkratek

ANOVA	Analýza rozdílnosti
ACN	Acetonitril
ATR – FTIR	Infračervený spektrometr s Fourierovou transformací s technikou zeslabeného úplného odrazu
BSA	Bovinní sérový albumin
CCD kamera	Kamera s vázanými náboji (charge-couple device)
CCK-8	Cell counting kit – 8
CHEKO	Rozpouštědlový systém chloroform/ethanol/kyselina octová
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DMEM	Dubelccovo modifikované eagle medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dH ₂ O	Destilovaná voda
ECM	Extracelulární matrix
FBS	Fetální bovinní sérum
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FITC	Phalloidin-fluorescein izothiokyanát
GS	Gentamicin sulfát
HDPE	Vysokohustotní polyethylen
hm. %	Hmotností procento
HPLC	Vysoko-účinná kapalinová chromatografie
KTJ/ml	Kolonie tvořící jednotky na 1 ml
mRNA	Messengerová ribonukleová kyselina
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
Mw	Molekulová hmotnost
NC	Negativní kontrola
NH	Ninhydrin
NIN	Roztok ninhydrinu
PBS	Fosfátový pufr
PC	Pozitivní kontrola

PCL	Poly- ϵ -kaprolakton
PDX	Polydioxanon
PEO	Polyethylenoxid
PGA	Kyselina polyglykolová
PHB	Polyhydroxybutyrát
PLA	Kyselina polymléčná
PVA	Polyvinylalkohol
RNA	Ribonukleová kyselina
RGD	Arginin-glycin-asparagová kyselina
rpm	Otáčky za minutu
SD	Směrodatná odchylka
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
TBX agar	Trypton Bile X-Glucuronid agar
TCD detektor	Tepelně vodivostní detektor
Tg	Teplota skleného přechodu
TI	Tkáňové inženýrství
Tm	Teplota tání
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
UHMWPE	Ultravysokomolekulární polyethylen
UV	Ultrafialové záření
WTS-8	(2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium, monosodná sůl)
w/v %	Hmotnostně-objemová procenta

ÚVOD

Jelikož se medicína neustále posouvá, vytváří se tak nové požadavky na zdravotnické výrobky. Je snaha zlepšit a urychlit hojení a předcházet života ohrožujícím pooperačním komplikacím. V reakci na požadavky se tak vyvíjí nové materiály s vhodnými vlastnostmi a zlepšuje se jejich efektivita. Materiálové výzkumy, které probíhají v oblasti tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny, v poslední době směřují svůj zájem na nanovláknenné materiály. Nanovláknenné materiály mají mnoho unikátních vlastností jako je například velký měrný povrch či struktura podobná nativní mezibuněčné hmotě. I přes jejich výjimečné vlastnosti, samotná nanovláknna přestávají stačit. Zvýšit jejich efektivitu lze například pomocí různých povrchových modifikací či inkorporací aktivních látek do nanovláken.

Vložením neboli inkorporací různých aktivních látek či léčiv do nanovláknenných materiálů, dojde ke zvýšení jejich efektivity, ale také k rozšíření možnosti aplikace těchto materiálů. Aktivní látkou inkorporovanou do nanovláken mohou být například antibiotika. Antibiotika se využívají pro léčbu infekčních onemocnění, které způsobují mikroorganismy – bakterie. Častým problémem při léčbě bakteriálních infekcí je rezistence bakterií vůči antibiotikům a nežádoucí vedlejší účinky. To by mohlo být alespoň částečně zmírněno působením antibiotik lokálně na určitém místě a řízeným uvolňováním. Nanovláknenné vrstvy z biodegradabilních polymerů se tak jeví jako vhodný nosič pro antibiotika, jelikož po aplikaci již není nutná reoperace a opětovné vyjímání a uvolňování se dá řídit strukturou a vlastnostmi nosiče.

Vhodnou metodou pro výrobu nanovláknenných vrstev a také pro inkorporaci aktivních látek je bezjehlové elektrostatické zvláknňování. Tato metoda je již průmyslově využívaná a její hlavní výhodou je vysoká produkce. Využití této metody pro výrobu nanovláknenných materiálů s inkorporovaným antibiotikem by mohlo v budoucnu usnadnit převod takového materiálů do průmyslové výroby.

Aplikace nanovláknenného materiálu s inkorporovaným antibiotikem může být široká. V této práci je přesně takový materiál vyvíjen pro aplikaci v gastrointestinální chirurgii. Při nádorových onemocněních či autoimunitních onemocněních střev je v mnoha případech nutné poškozené místo chirurgicky odstranit. Po odstranění jsou konce střev sešity zpět k sobě a tento spoj je nazýván střevní anastomóza. S tou se pojí některé

pooperační komplikace jako její netěsnost, adheze tkání či přítomnost bakterií. Právě bakterie mohou zabraňovat hojení střevní anastomózy, jelikož produkují enzymy, které štěpí hojící se tkáň, a to vede dalším komplikacím jako je únik obsahu střev do břišní dutiny. Možným řešením je tedy takový materiál, který zpevní střevní anastomózu, bude podporovat hojení nové tkáně a zároveň zabráni úniku obsahu střev, adhezím tkání a vzniku bakteriální infekce.

Tato diplomová práce je rozdělena na dvě části: teoretickou a experimentální. Teoretická část práce je vypracována jako rešerše literatury na problematiku, které bylo nutné porozumět pro sestavení a provedení experimentální části práce. V experimentální části práce jsou vyrobeny, charakterizovány a testovány nanovlákněné vrstvy s inkorporovaným antibiotikem. Zvolený polymer pro výrobu nanovlákněných vrstev byl poly- ϵ -kaprolakton, jelikož předchozí *in vivo* studie potvrdily jeho biokompatibilitu. Pomocí bejzohlového elektrostatického zvláknění bylo do nanovlákněných vrstev inkorporováno antibiotikum Gentamicin sulfát. Toto antibiotikum působí, mimo jiné, na bakterie, které se nachází ve střevech a způsobují komplikace při hojení tkáně.

Tato práce také spadá pod projekt Agentury pro zdravotnický výzkum v České Republice (AZV): Prevence střevního anastomotického leaku a pooperačních adhezí pomocí nanovlákněných biodegradabilních materiálů.

TEORETICKÁ ČÁST

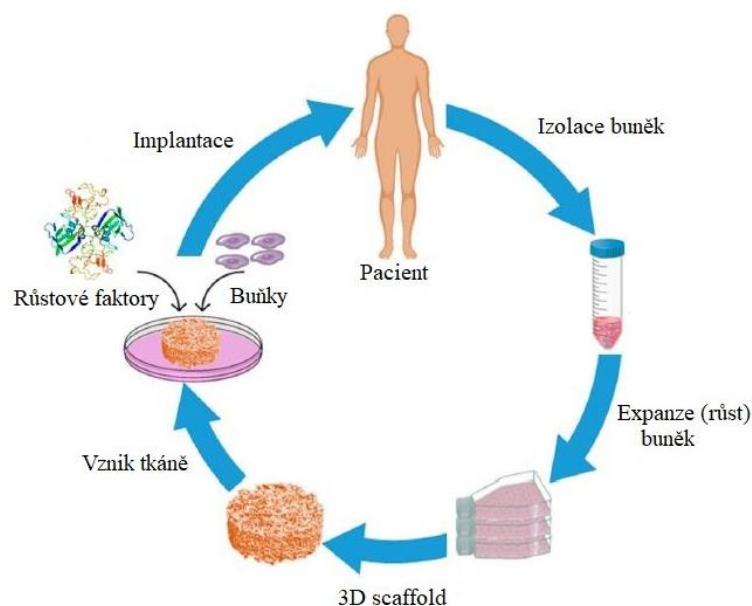
Teoretická část obsahuje rešerši literatury na danou problematiku. Má celkem pět kapitol. Kapitoly popisují problematiku tkáňového inženýrství, nanovláknenných materiálů a jejich výrobu, možnosti inkorporace aktivních látek do nanovláknenných materiálů, mechanismy uvolňování aktivních látek, rešerši aktuální literatury popisující inkorporaci antibiotik do nanovláknenných materiálů, antibiotika a jejich vlastnosti a mechanismy účinku, bakterie a aplikace nanovláknenných materiálů s inkorporovaným antibiotikem.

1. Nanovláknenné materiály ve tkáňovém inženýrství

1.1. Tkáňové inženýrství

Právě komplikované léčby tkání a nedostatek tkání a orgánů k transplantacím daly impuls ke vzniku vědnímu oboru zvaném tkáňové inženýrství. Tento obor spojuje znalosti z oborů jako je medicína, biologie, chemie, farmakologie a materiálové inženýrství. Díky spojení těchto oborů je možné lépe a rychleji hojit poškozenou tkáň, nahradit poškozenou tkáň a v budoucnu třeba nahradit i celý orgán (*Lanza et al. 2020; Sethuraman et al. 2017*).

Při poškození tkáně se využívá, pokud je to možné, transplantace zdravé tkáně z pacientova těla na postižené místo. Tkáň je odebrána z jiného místa a transplantát je pak nazýván autograft. Při transplantaci tkáně od jiného pacienta se využívá allograftů a transplantát z jiného živočišného druhu je nazýván xenograft. Využití allograftů a xenograftů nemusí být vždy úspěšné, může dojít k odmítnutí transplantátu, infekci či dalším komplikacím (*Lanza et al. 2020*). To vede k tomu, že je snaha poškozenou tkáň spíše regenerovat než transplantovat. Tkáňové inženýrství má tři pilíře: buňky, scaffoldy (nosiče) a růstové faktory. Principem tkáňového inženýrství, který je schematicky zobrazen na Obrázku 1, je izolovat buňky ze zdravé tkáně, následně nasadit buňky na scaffold neboli nosič, nechat buňky proliferovat s pomocí růstových faktorů a následně scaffold vložit do těla na poškozené místo (*Asadian et al. 2020; Lanza et al. 2020*).



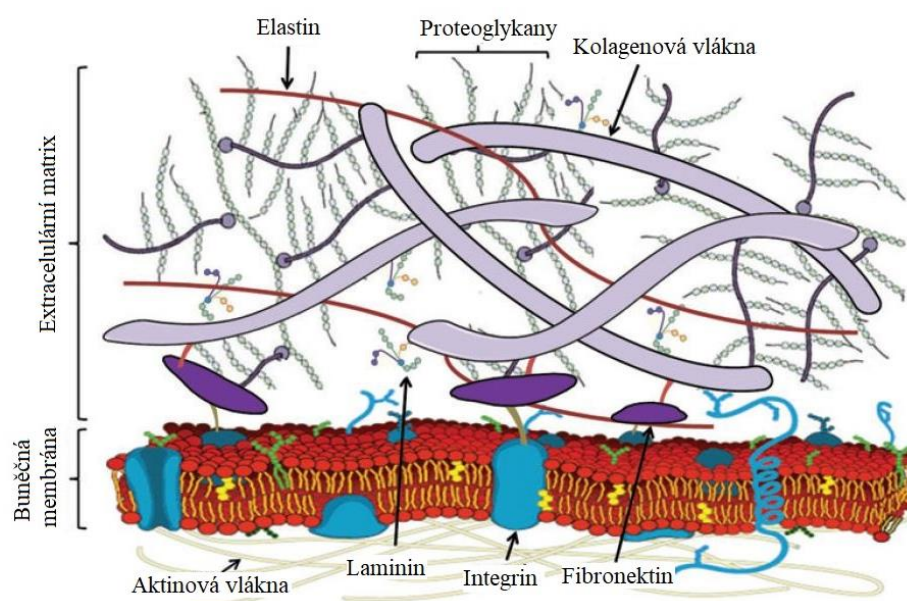
Obrázek 1: Schéma principu tkáňového inženýrství (Převzato ze Asadian et al. 2020).

Požadavky na scaffoldy jsou různé a velmi variabilní podle konkrétní aplikace. Je snaha zajistit takový scaffold, který je biokompatibilní s tkání, má vhodné mechanické vlastnosti a svojí strukturou je nejvíce podobný nativnímu prostředí pro buňky (Xu et al. 2004, Wolfová et al. 2005). Pokud je požadavek na biodegradabilní scaffold, produkty degradace by neměly vyvolávat imunitní odpovědi a být toxické. Degradace a kinetika degradace by měla být přizpůsobena místu aplikace. Pokud je snaha tkáň regenerovat, scaffold by měl podporovat proliferaci buněk a hojení tkáň (Patel et al. 2011). Pro zlepšení proliferace a interakce buněk se scaffoldy, je vhodné scaffold funkcionalizovat růstovými faktory neboli biochemickými látkami, což mohou být například peptidy či polysacharidy (Asadian et al. 2020; Coimbra et al. 2019). Pokud má naopak scaffold sloužit jako krycí materiál či antiadhezivní materiál, je vhodné povrch scaffoldu modifikovat pro získání požadovaných vlastností (Suzuki a Ikada 2010). Pokud je aplikace scaffoldu místo, kde je možnost vzniku bakteriálního zánětu, může zde scaffold sloužit jako nosič aktivních látek například antibiotik a tím zánětu zabraňovat (Kim et al. 2004).

Ve tkáňovém inženýrství se využívá pro výrobu scaffoldu takových materiálů, které jsou biokompatibilní s živou tkání a s lidským tělem. Nesmí vyvolávat imunitní reakce a zasahovat do funkcí tkání (Wolfová et al. 2015).

1.2. Nanovláknenné materiály

Nanovláknna jsou vlákna o průměru menším než 1 μm (Williams *et al.* 2018). Díky jejich struktuře a průměru v řádu nanometrů, připomínají strukturu mezibuněčné hmoty (extracelulární matrix). Extracelulární matrix, schematicky zobrazena na Obrázku 2, se nachází okolo buněk, slouží jako jejich nosič a předává mezi buňkami informace. Skládá se, mimo jiné, z proteinových vláken kolagenu, elastinu a fibronektinu o průměrech v řádu nanometrů (Alberts 1998; Xu *et al.* 2004; Xue *et al.* 2015). Buňky mají tendenci na nanovláknenném materiálu adherovat, proliferovat a diferenciovat díky této podobnosti. Nanovláknenné scaffolds tak mají velký význam ve tkáňovém inženýrství (Ma *et al.* 2005; Pham *et al.* 2006; Ravichandran *et al.* 2012). Další mimořádnou vlastností nanovláken je jejich velký měrný povrch a malá velikost pórů. To umožňuje nanovláknna využít i v dalších aplikacích jako je filtrace, textilní membrány, sorpční a obvazové materiály, kompozity, biosenzory a elektronika (Nayak *et al.* 2011; Thakkar *et al.* 2017).



Obrázek 2: Schéma buněčné membrány a extracelulární matrix která obsahuje vláknenné proteiny (kolagenová, elastinová a fibrinová vlákna), proteoglykany a adhezní bílkoviny (Převzato z Xue *et al.* 2013)

Aplikace nanovláken ve tkáňovém inženýrství se týkají především kardiovaskulární oblasti, kostí, chrupavek, vazů a šlach a kůže (Dahlin *et al.* 2011). Je však důležité pečlivě vytvořit a přizpůsobit nanovláknenný materiál pro konkrétní místo aplikace. Není úplně možné využít univerzální materiál. Každá tkáň má jinou strukturu, vlastnosti, funkci, a proto vyžaduje materiál jí přizpůsobený (Bacakova *et al.* 2011).

Materiály používané ve tkáňovém inženýrství a medicínských aplikacích, pro tvorbu nanovláken, mohou být přírodní či syntetické, biodegradabilní či nedegradabilní. Je důležité, aby byly biokompatibilní, netoxické a nevyvolávaly reakce v organismu (Ashghari et al. 2017; Wolfová et al. 2005). Mezi přírodní materiály se řadí celulóza, kolagen, kyselina hyaluronová chitin a chitosan. Nedegradabilní syntetické materiály v medicíně zastupuje polyethylen (HDPE, UHMWPE), polypropylen, či polytetrafluorethylen (Ashghari et al. 2017; Doppalapudi et al. 2014; Shastri 2003). Avšak velmi častým požadavkem na materiály pro tkáňové inženýrství jiné právě jejich degradabilita, proto jsou syntetické biodegradabilní materiály podrobněji představeny v další kapitole (Wolfová et al. 2005).

1.2.1. Syntetické biodegradabilní polymery

Výhoda syntetických materiálů je především možnost jejich reprodukovatelnosti, tedy kdy je vždy jisté, že další výrobní šarže bude mít stejné vlastnosti jako ta předešlá. Dají se jednodušeji funkcionalizovat, optimalizovat jejich mechanické vlastnosti a je možné řídit jejich degradaci (Chawla 2018; Wolfová et al. 2015). To však nelze zajistit u přírodních materiálů. U přírodních materiálů také není možné zcela řídit jejich strukturu jako u syntetických materiálů. Proto i přes to, že přírodní materiály mají dobrou kompatibilitu s lidským tělem, mají syntetické polymery více výhod, a to je činní více vhodnými pro aplikaci v tkáňovém inženýrství a dalších medicínských aplikacích (Ashghari et al. 2017; Guo a Ma 2014).

Do skupiny syntetických biodegradabilních materiálů patří polyestery, například kyselina polyglykolová (PGA), kyselina polymléčná (PLA), poly- ϵ -kaprolakton (PCL), polydioxanon (PDX), polyhydroxybutyrát (PHB) a jejich kopolymery. Polyestery se vyznačují esterovou vazbou a jejich degradace probíhá hydrolyticky. Jejich hlavní výhodou je právě možnost řízení jejich degradace a biokompatibilita. Dále se využívá polyvinylalkohol (PVA) a polyethylenoxid (PEO) (Doppalapudi et al. 2014; Gunatillake a Adhikari 2003). Rychlost degradace biodegradabilních polymerů je závislá na stupni krystalizace, konfigurační struktuře, molekulové hmotnosti, pórovitosti, morfologii a místu aplikace. Je důležité sledovat také produkty degradace, zdali nejsou toxické pro tkáň a organismus (Gunatillake a Adhikari 2003). Právě možnost řízení degradace těchto polymerů, jim dává možnost využití jako nosiče pro aktivní látky s řízeným uvolňováním (Ghafoor et al. 2018).

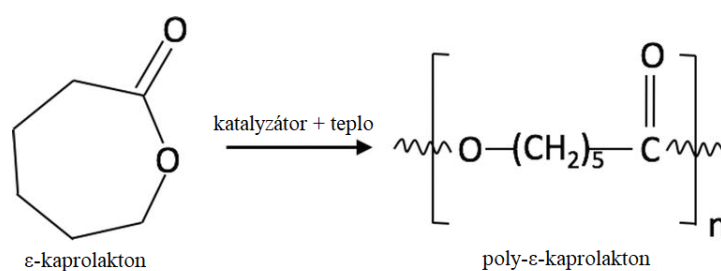
V následující Tabulce 1 jsou představeny biodegradabilní polymery používané ve tkáňovém inženýrství, jejich vlastnosti, způsob degradace a aplikace. Polymer poly-ε-kaprolakton je samostatně představen v následující kapitole, jelikož s ním bylo pracováno v experimentální části.

Tabulka 1: Přehled biodegradabilních polymerů (Boland et al. 2005; Chan et al. 2017; Doppalapudi et al. 2014; Fakirov 2015; Gunatillake a Adhikari 2003; Kroisová 2009; Prokopová 2007; Ratner 2004; Sekthiselvan a Madhumathi 2019; Teixeira et al. 2019)

Polymer	Vzorec	Vlastnosti	Aplikace v TI
PGA		Skoro nerozpustná v organických rozpouštědlech, krystalinita až 75 %, Tg = 30 °C, Tm = 225 °C	Kardio-vaskulární oblast, cévní náhrady
PLA		Pomalejší hydrolytická degradace, Tg = 40-70 °C, Tm = 130-180 °C	Kosti, cévní náhrady
P(D/L-laktid)		Vlastnosti závisí na poměru D a L – laktidu, amorfní struktura	Kůže, cévní náhrady
PLGA		Vlastnosti závisí na poměru PGA a PLA	Kůže, Drug Delivery
PCL		Semikrystalický, dlouhá doba degradace, Tg = - 60 °C, Tm = 54 - 60 °C, viz kapitola 1.2.1.1.	Kůže, Drug Delivery
PDX		Degradace hydrolyticky (do 6 měsíců), Tg = 0 – 10 °C, Tm = 110 - 115 °C	Šicí nitě, stenty
PHB		Pomalá degradace, hydrofobní, produkován mikroorganismy, Tg = 0°C, Tm = 140 - 180°C	Šicí nitě, stenty
PVA		Rozpustný ve vodě, vlastnosti závislé na stupni hydrolyzy acetátových skupin, Tg = 85 °C, Tm = 265 °C	Kůže, Drug Delivery
PEO		Rozpustný ve vodě, PEO s nižší molekulovou hmotností je polyethylenglykol (PEG)	3D hydrogelové scaffoldy

1.2.1.1. Poly-ε-kaprolakton

Poly-ε-kaprolakton (dále PCL) je semikrystalický biodegradabilní polyester. Připravuje se polymerizací za otevření kruhu z monomeru ε-kaprolaktonu, při použití různých katalyzátorů, jako je například 2-ethylhexanoát cínatý, kterými lze upravovat molekulovou hmotnost výsledného polymeru. Schéma polymerizace je na Obrázku 3. Molekulová hmotnost PCL se může pohybovat od 3000 g/mol až po 80000 g/mol (Azimi et al. 2014, Woodruff a Hutmacher 2010).



Obrázek 3: Syntéza PCL (Převzato z Azimi et al. 2014)

Díky dlouhému uhlovodíkovému řetězci má PCL hydrofobní charakter, což může zpomalovat rychlost uvolňování inkorporovaných aktivních látek (Ceylan et al. 2017). Teplota skelného přechodu PCL je $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplota tání okolo $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rozpouští se ve chloroformu, dichlormethanu, tetrachlormetanu, benzenu, toluenu a cyklohexanu. Hůře se rozpouští v acetonu, ethylacetátu, acetonitrilu a dimethylformamidu a je nerozpustný v alkoholu a diethyletheru. Jeho důležité vlastnosti jsou biodegradabilita, biokompatibilita, kompatibilita s dalšími polymery pro tvorbu kopolymerů a dobrá zpracovatelnost do různých struktur a forem jako jsou právě nanovlákná (Azimi et al. 2014; Woodruff a Hutmacher 2010). Degradace PCL probíhá hydrolýzou esterové vazby ve dvou fázích, kdy produktem degradace je karboxylová kyselina a alkohol. Ve srovnání s ostatními biodegradabilními polyestery degraduje pomaleji, rychlost degradace je ovlivněna místem aplikace a molekulovou hmotností. Samotný homopolymer PCL může degradovat dva až čtyři roky (Azimi et al. 2014; Kroisová 2009).

Tento polymer je certifikovaný úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro využití v medicíně. Využívá se jako materiál pro výrobu scaffoldů v tkáňovém inženýrství ať už vlákněných či 3D struktur a jako vstřebatelné chirurgické nitě (Azimi et al. 2014; Janmohammadi a Nourbakhsh 2019; Kweon et al. 2003). Další aplikací PCL jsou systémy řízeného uvolňování aktivních látek (drug delivery systémy), právě díky jeho

biokompatibilitě, kompatibilitě s jinými polymery a dlouhé době degradace (*Woodruff a Hutmacher 2010*).

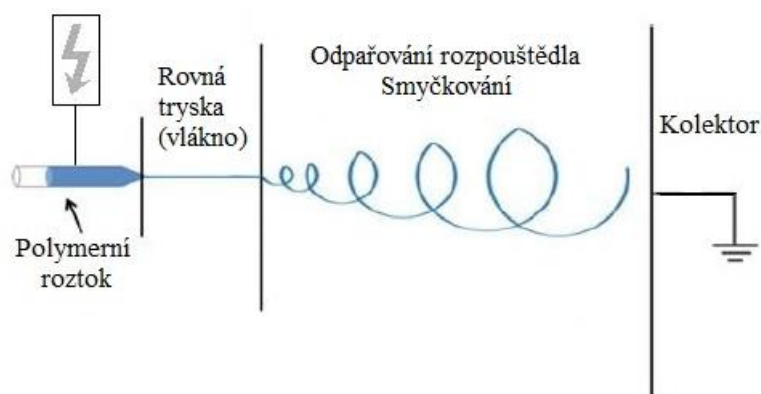
1.3. Výroba nanovláknenných materiálů

Nanovláknena se dají vyrobit mnoha způsoby. Například metodami drawing, fázová separace, syntéza přes šablonu (template synthesis), samosestavování molekul (self – assembly), odstředivé zvlákňování (forcespinning), melt-blown a elektrostatické zvlákňování (electrospinning). Každou metodou vzniká nanovláknenná vrstva s jinými vlastnostmi a morfologií (*Nayak et al. 2011; Ramakrishna 2005*). Metody melt-blown, odstředivé zvlákňování a elektrostatické zvlákňování se využívají průmyslově. Ostatní vyjmenované metody jsou využívány laboratorně a mají mnohem menší výrobnost (*Yu et al. 2017*). Metody se dají i kombinovat, například kombinace melt-blown a elektrostatického zvlákňování (*Erben et al. 2014*).

1.3.1. Elektrostatické zvlákňování

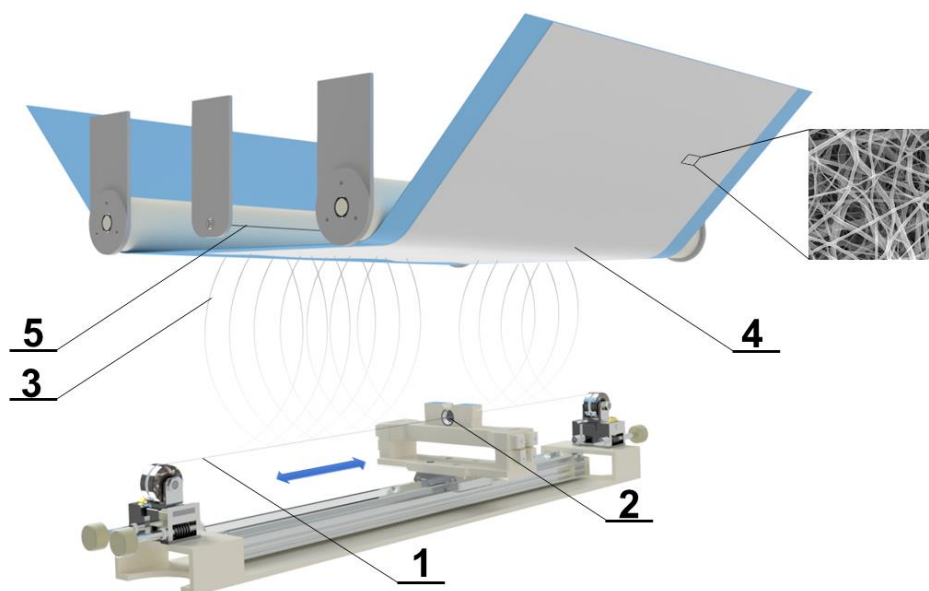
Fyzikální jev elektrostatického zvlákňování je znám od roku 1600. Další elektrohydrodynamické experimenty byly realizovány na přelomu 19. a 20. století. V roce 1934 A. Formhals princip elektrostatického zvlákňování patentoval (*Ramakrishna 2005*).

Při výrobě vláken klasickým zvlákňováním působí na polymerní taveninu nebo roztok mechanická síla, při elektrostatickém zvlákňování je potřeba přivést do polymerní taveniny či roztoku elektrický náboj (*Haghi 2012; Li et al. 2013*). Principem je tedy nabití polymerního roztoku či taveniny stejným nábojem. Vlivem Coulombova zákona se náboje odpuzují. Avšak povrchové napětí polymerního roztoku má za následek přitahování molekul. Elektrická síla se tak snaží překonat povrchové napětí roztoku. Nabitý polymer se tak hraně trysky (kapiláry, jehly, tyčky, válce nebo struny) formuje do Taylorova kužele. Když dojde k překročení kritického napětí dochází k vytrysknutí vlákna. Z Taylorova kužele vychází nejprve rovné vlákno, viz Obrázek 4. Následně vlákno ztrácí náboj, odpařuje se rozpouštědlo a vlákno smyčkuje. Poté polymerní nanovlákneno vlivem rozdílných polarit elektrod dopadá na uzemněný nebo záporně nabitý kolektor (*Haghi 2012; Lukáš et al. 2009; Pham et al. 2006; Ramakrishna 2005*).



Obrázek 4: Stabilní a nestabilní oblast při elektrostatičtém zvlákňování (Li et al. 2013)

Zvlákňovací elektrody mohou mít různý tvar, je-li elektrodou jehla či tryska, jedná se o jehlové zvlákňování. Bezjehlové zvlákňování využívá jiných tvarů elektrody, než je jehla. To může být válec či struna. Schéma bezjehlového elektrostatičtého zvlákňování je na Obrázku 5. Na struně (1) se pohybuje cartridge neboli zásobník (2) s polymerním roztokem, který je na strunu nanášen. Vlivem nabití struny, a tedy i roztoku jsou vytrysknuta nanovlákná (3) směrem k uzemněnému nebo opačně nabitému kolektoru, kterým je opět struna (5). Před strunou je podkladový materiál (netkaná textilie) na kterou zvlákněná nanovlákná dopadají (4). Tento princip využívá zařízení Nanospider™ od firmy Elmarco s.r.o. (Česká Republika), na kterém byly vyrobeny materiály pro experimentální část.



Obrázek 5: Schéma zařízení bezjehlového elektrostatičtého zvlákňování – zařízení Nanospider™ kde: 1 – zvlákňovací elektroda (struna), 2 – zásobník na polymerní roztok, 3 – vytrysknutá nanovlákná, 4 – nanovláknenné vrstva na podkladové textilii, 5 – uzemněná elektroda (struna) (Převzato od Klíčová et al. 2020)

Výhodou bezjehlového elektrostatického zvlákňování je vyšší produktivita. Na zvlákňovací elektrodě (válcí či struně) vzniká více trysek najednou, kdežto při zvlákňování jehlou se zvlákňuje pouze jednou tryskou a je zde potřeba dávkovací pumpa pro vytlačení polymerního roztoku z trysky. Bezjehlové elektrostatické zvlákňování je možné využívat průmyslově (Petřík 2011). Elektrostaticky zvlákněná nanovlákná jsou na podkladovém materiálu nahodile orientovaná. Výsledné nanovláknenné vrstvy a jejich vlastnosti se dají optimalizovat pomocí změny parametrů stroje a vstupních materiálů (Williams et al. 2018).

1.3.1.1. Parametry ovlivňující proces elektrostatického zvlákňování

Nastavení stroje a vlastnosti vstupních materiálů velmi ovlivňují výslednou nanovláknennou vrstvu. Parametry se dělí na procesní a materiálové.

Procesní parametry (Haghi 2012; Li 2013; Pelipeko et al. 2013; Pham et al. 2006; Ramakrishna 2005; Vrieze et al. 2009; Williams et al. 2018; Yu et al. 2017):

- Velikost napětí
Napětí musí být takové, aby překonalo povrchové napětí polymerního roztoku a došlo k vytvoření Taylorova kužele a ke zvlákňování. Ke zvlákňování dochází při kritickém napětí, které je různé podle zvlákňovaného polymerního roztoku. Velikost použitého napětí se také liší na základě použité elektrody, pro bezjehlové zvlákňování je možné použít vyšší napětí.
- Vzdálenost kolektoru od zvlákňovací elektrody
Krátká vzdálenost mezi elektrodami může způsobit neúplné vypaření rozpouštědla. Při kratší vzdálenosti je také větší elektrické pole mezi elektrodami.
- Rychlost odtahu
Rychlost odtahu ovlivňuje především ovlivňuje plošnou hmotnost výsledné nanovláknenné vrstvy.
- Teplota a vlhkost
Vyšší teplota umožňuje molekulám více energie, což zvýší elektrickou vodivost a sníží povrchové napětí a viskozitu. Vyšší teplota má také za následek menší průměry vláken. Rozpouštědla se rychleji odpařují při vyšších teplotách a nízké vlhkosti.

- Rychlost dávkování
Rychlejší dávkování může způsobovat, že vlákna mají větší průměr, jelikož je dávkováno více roztoku za jednotku času. Stejně tak nemusí dojít k úplnému vypaření rozpouštědla.
- Tvar zvlákňovací elektrody
Pro jehlové zvlákňování se používají jehly s průměrem pod 2 mm (*Williams et al. 2018*). Může dojít k ucpání jehly. Bezjehlové elektrody struna či váleček mají větší výrobnost.
- Tvar kolektoru
Kolektory zachycují nanovlákná a o jejich tvaru rozhoduje také výsledná aplikace nanovláknenné vrstvy. Kolektory mohou být deskové (textilie, mřížky či fólie) nebo rotující válce.

Materiálové parametry (*Ramakrishna 2005; Pham et al. 2006; Haghi 2012; Williams et al. 2018*):

- Koncentrace polymerního roztoku
Je vhodné najít kritickou minimální koncentraci polymeru, při které bude možné zvlákňovat vlákna. Při nižší, než kritické koncentraci polymeru v roztoku vznikají sférické kapičky a dochází tak k elektrosprayingu.
- Molekulová hmotnost polymeru
Molekulová hmotnost souvisí s viskozitou roztoku. Čím má polymer vyšší molekulovou hmotnost, tím bude vyšší viskozita roztoku. Nižší molekulová hmotnost polymeru naopak vede k nižší viskozitě, a tak při zvlákňování může dojít opět k elektrosprayingu.
- Viskozita roztoku
Viskozita opět ovlivňuje tvorbu vláken či sférických kapek. S nižší viskozitou vznikají kapičky. Avšak existuje i horní hranice viskozity polymerních roztoků, při které již není možné zvlákňovat, jelikož nedojde k vytvoření kužele a zvlákňovací trysky.
- Povrchové napětí
Při elektrostatickém zvlákňování dochází vlastně k překonávání povrchových sil u polymerního roztoku, povrchové napětí je proto velmi důležitý parametr. Náboje, kterými je polymerní roztok nabitý se odpuzují, a přitom musí překonat právě povrchové napětí polymerního roztoku, aby došlo ke zvlákňování. S vyšším

povrchovém napětí roztoku dochází při zvlákňování ke rozpadu polymerní trysky na kapičky a opět dochází k elektrosprayingu. Povrchové napětí lze snížit přidáním povrchově aktivní látky do polymerního roztoku (*Williams et al. 2018*).

- Elektrická vodivost roztoku

Polymerní roztoky musí být schopné vést náboj, aby došlo k odpuzení stejně nabitých nábojů a vytvořil se kužel a následně zvlákňovací tryska. Po zvýšení vodivosti lze do polymerního roztoku přidat například malé množství anorganických solí (*Williams et al. 2018*). Polymerní roztoky, které nejsou vodivé nejde zvlákňovat. Naopak vysoká vodivost způsobuje nestabilní trysku.

- Rozpouštědlo (rozpouštědlový systém)

Dalším důležitým parametrem je i zvolené rozpouštědlo a rychlost jeho vypařování. Volba rozpouštědla ovlivňuje viskozitu, elektrickou vodivost roztoku, ale i vlastnosti dalších látek v polymerním roztoku, určených k inkorporaci do nanovláken.

2. Inkorporace aktivních látek do nanovláknenných materiálů

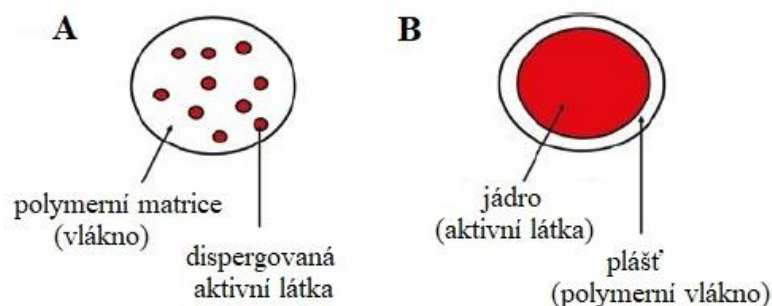
Až 70 % léčiv je podáváno ústně, kdy dochází k okamžitému uvolnění léčivé látky v žaludku a následuje rychlý nástup účinku. To je velmi výhodné například při bolestech, kdy je požadováno okamžité působení léků. Avšak ne vždy je rychlé působení léčiva žádoucí. V některých případech je snaha udržet stejnou koncentraci léčiva po delší časový horizont, toho se dá dosáhnout řízeným uvolňování léčiva (controlled drug release). Prodlouží se doba uvolňování aktivní látky a může se zachovat stejná koncentrace uvolněné látky. Tím také dojde k zajištění delšího terapeutického účinku v případě léčiv (*Kajdič et al. 2019; Williams et al. 2018*). Další využití řízeného uvolňování aktivních látek je, když je požadováno, aby léčivo působilo lokálně, pouze na určitém místě. Působení léčiva či jiné aktivní látky lokálně na určitém místě je označováno jako cílená doprava léčiv (drug delivery systems). Do nosičů, kterými mohou být polymerní materiály, jsou inkorporovány aktivní látky a ty jsou pak dopravovány na určené místo v těle a slouží jako zásobníky aktivní látky, která se řízeně uvolňuje (*Pillai et al. 2001; Williams et al. 2018*). Cílem drug delivery systémů je dopravit aktivní látku, o správném množství, na správné místo ve správný čas (*Ghaffoor et al. 2018*). Vývoj řízeného uvolňování léčiv může být řešením pro problémy se vznikající rezistencí na léčiva (*Chou et al. 2015*).

Inkorporace (v angličtině incorporation nebo loading) aktivní látky znamená vložení či začlenění látky do matrice. Matricí se v tomto případě rozumí nanovláknem (*Williams et al. 2018*). Nanovláknem, jak již bylo zmíněno v přechozí kapitole, mají velký měrný povrch, který se ještě zvětší při zohlednění pórovitosti nanovláken. Velký měrný povrch v kombinaci s pórovitostí a vzájemně propojenou strukturou nanovláknenných vrstev zajišťuje mnohem větší množství uvolněných látek (*Pillay et al. 2013*). Další výhody nanovláken pro cílené uvolňování léčiv je možnost inkorporace velkého množství aktivních látek a možnost vyžití široké škály polymerních materiálů. Dále zajištění jejich kompatibility s inkorporovanými látkami, jejich biokompatibilita s lidským tělem a schopnost řídit uvolňování. Právě biodegradabilní polymery mají značnou výhodu pro řízené uvolnění, jelikož právě dobou a způsobem jejich degradace lze uvolňování řídit (*Chou et al. 2015; Ghafoor et al. 2018; Son et al. 2014*).

Elektrostatické zvlákňování je vhodnou metodou výroby nanovláken s inkorporovanými aktivními látkami, jelikož tento proces je kontinuální a využívaný v průmyslu (*Kajdič et al. 2019*). Do nanovláknenných materiálů se mohou při elektrostatickém zvlákňování inkorporovat antibiotika, protirakovinové látky, další různé léčiva, růstové faktory či proteiny (*Cornejo Bravo et al. 2015; Pillay et al. 2013*). Avšak ne vždy je nutné, aby se aktivní látky uvolňovaly. Růstové faktory, proteiny a další bioaktivní molekuly, sloužící k podpoření adheze a proliferace buněk, jsou většinou navázány na povrch, a tudíž není nutné jejich uvolnění (*Son et al. 2014*).

Nanovláknem s inkorporovanými látkami mají uplatnění při chirurgických zákrocích, léčbě rakoviny, jako scaffoldy v tkáňovém inženýrství, materiály s antibakteriálními či jinými účinky a jako krycí materiály (*Ghafoor et al. 2018*).

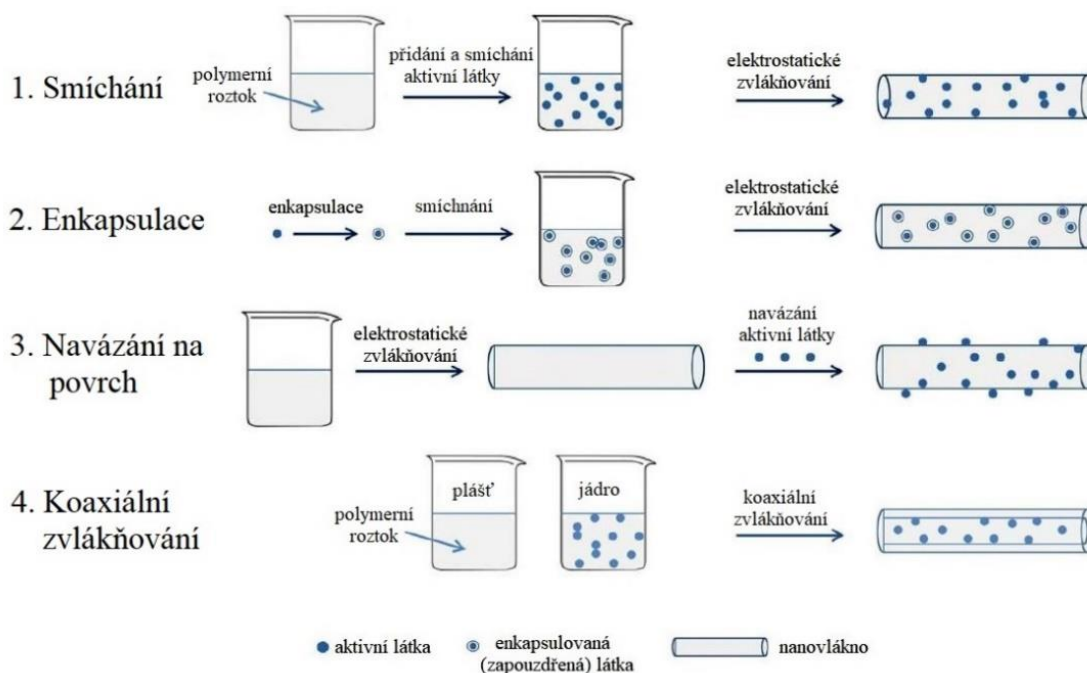
Na Obrázku 6 je schematické rozdělení, jak v nanovláknem mohou být uloženy aktivní látky. Obrázek 6 A zobrazuje rozptýlení aktivní látky v matrici nanovláknem. Druhý případ Obrázek 6 B zobrazuje vlákno jádro/plášť, kdy je aktivní látka v jádru vlákna, a to je obklopeno polymerní membránou (plášť). Tento typ vláken lze vytvořit koaxiálním zvlákňováním (*Pillay et al. 2013; Williams et al. 2018*). Další možností jsou tzv. sendvičové struktury, kdy je na sobě navrstveno několik nanovláknenných vrstev, například mezi dvěma vrstvami je jedna, ve které jsou inkorporované aktivní látky (*Kajdič et al. 2019*). Konkrétní metody inkorporací aktivních látek do polymerních matric a nanovláken jsou popsány v následující kapitole.



Obrázek 6: Schéma možné inkorporace aktivních látek do nanovlákn (řez nanovláknem)
(Převzato z Williams et al 2018)

2.1. Metody inkorporace

Metody inkorporace jsou schematicky zobrazeny na Obrázku 7. První metoda je smíchání (blending), při které se jednoduše do polymerního roztoku přidají aktivní látky, zamíchají se a následně se elektrostaticky zvláknuje. Aktivní látky mohou být rozpuštěné nebo dispergované (Cornejo Bravo et al. 2016; Gao et al. 2014). Druhá metoda je enkapsulace (zapouzdření) aktivní látky do jiného materiálu, například do lipozomu (uzavřená fosfolipidová dvojvrstva) a následné smíchání s roztokem polymeru a zvláknění (Gao et al. 2014; Son et al. 2014). Třetí metodou je navázání neboli funkcionalizace (attachement) kdy se aktivní látky vážou na povrch fyzikálně nebo chemicky až po zvláknění vláken. Poslední metoda je koaxiální zvláknování, kterou lze vytvořit vlákna jádro/plášť, kdy v jádře mohou být aktivní látky (Gao et al. 2014). Mezi další metody se řadí i tzv. elektrospraying neboli elektrostatické sprejování. Při použití polymerního roztoku s nižší viskozitou a koncentrací polymeru a upravení parametrů zvláknování dochází ke zvláknování sférických kapiček (kuliček, kapslí). Aktivní látka může být tak uzavřena v kapičce (Cornejo Bravo et al. 2016). Metody jsou podrobněji popsány v následujících kapitolách.

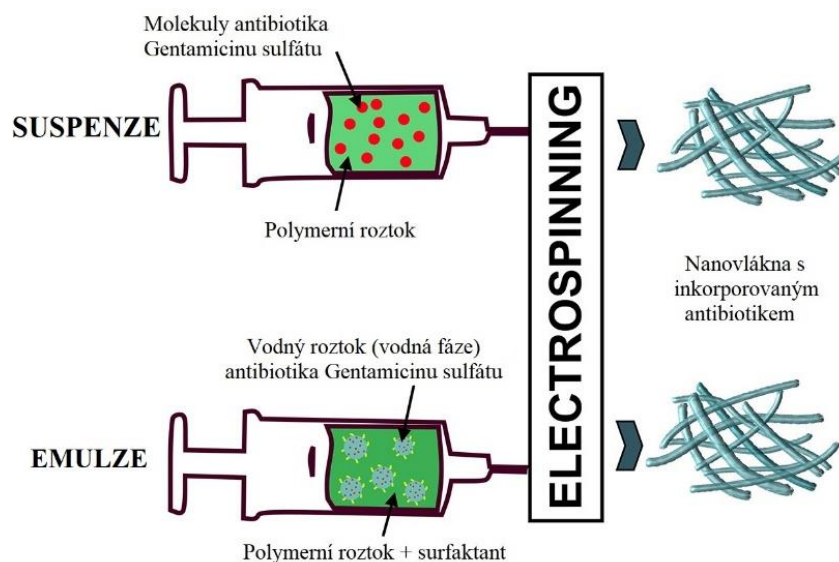


Obrázek 7: Schéma metod inkorporace aktivních látek do nanovláken (Převzato od Gao et al. 2014)

2.1.1. Smíchání

Při smíchání (blendingu) mohou být aktivní látky v polymerním roztoku rozpuštěné či dispergované. Jsou-li aktivní látky nerozpustné v použitém rozpouštědle, které rozpouští polymer, jsou po smíchání dispergované neboli rozptýlené v polymerním roztoku a jedná se tak o suspenzi (Coimbra et al. 2019; Cornejo Bravo et al. 2016).

Pokud aktivní látka není rozpustná v rozpouštědlech polymeru a je požadováno, aby látka byla rozpuštěná, je vhodné látku předem rozpustit v jiném rozpouštědle ve které je rozpustná. Například ve vodě (Coimbra et al. 2019). Vzniká tak vodná fáze a po smíchání s polymerním roztokem vzniká emulze a jedná se tzv. emulzní elektrostatické zvlákňování (Coimbra et al. 2019; Cornejo Bravo et al. 2016). Emulgaci lze označit také jako enkapsulaci, jelikož aktivní látky jsou vlastně zapouzdřeny ve vodné fázi a separované od polymerního roztoku. Obrázek 8 ilustruje rozdíl mezi suspenzí a emulzí (Carmelo et al. 2013).



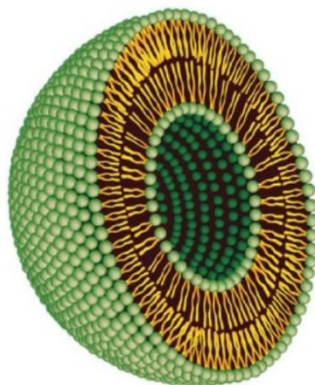
Obrázek 8: Schéma rozdílu mezi suspenzí a emulzí (Převzato z Coimbra et al. 2019)

2.1.2. Enkapsulace

Enkapsulací se rozumí zapouzdření aktivní látky do jiného materiálu. Například do polymerních materiálů. To je umožňuje metoda zvaná elektrospinning. Při upravení parametrů elektrostatického zvlákňování a parametrů polymerního roztoku, je možné zvlákňovat polymerní kapičky sférického tvaru (Valo et al. 2009; Williams et al. 2018). Tento proces ovlivňuje povrchové napětí roztoku, koncentrace roztoku a velikost použitého napětí. Správné parametry pro daný zvlákňovaný polymerní roztok je většinou nutné experimentálně nalézt. Velikost kapek lze kontrolovat, distribuce velikosti kapek je většinou malá a kapičky se vzájemně odpuzují, jelikož jsou nabitě (Jaworek a Sobczyk 2008; Valo et al. 2009; Nguyen et al. 2016). Kapičky mají průměr v mikrometrech či nanometrech. Do kapiček mohou být uzavřeny aktivní látky, léčiva či jiné látky. Enkapsulace pomocí elektrospinningu nachází využití v řízené dopravě léčiv (drug delivery systems), výrobě léčiv a kosmetickém a potravinářském průmyslu (Jaworek a Sobczyk 2008; Nguyen et al. 2016).

Pokud je požadováno zapouzdřit aktivní látky do nějakého materiálu, který může být následně inkorporován do vláken, je možnost enkapsulovat aktivní látky do lipozomů. Lipozom je uzavřená struktura vzniklá orientací lipidové dvojvrstvy. Vznikají ve vodných prostředích, kdy se seskupují na molekuly s amfifilní strukturou. Amifilní molekuly mají jednu část molekuly hydrofilní a druhou hydrofobní. Takové molekuly jsou například fosfolipidy či povrchově aktivní látky. Hydrofobní molekuly se tak ve vodném prostředí přeorientují k sobě a vzniká tak sférická uzavřená struktura, která

je schopná ve svém jádře uzavřít látky. Schematicky je lipozom zobrazen na Obrázku 9. Tyto struktury jsou ale nestabilní a může rychle dojít k jejich rozpadu (*Alavi et al. 2017; Williams et al. 2018*).



Obrázek 9: Schématický obrázek řezem lipozomu (Převzato z *Alavi et al. 2017*)

Další možnost enkapsulace byla popsána v předchozí kapitole, kdy je možné aktivní látku rozptýlit ve vodné fázi, vznikne tak emulze a aktivní látka je oddělena ve vodné fázi od polymerního roztoku (*Carmelo et al. 2013*).

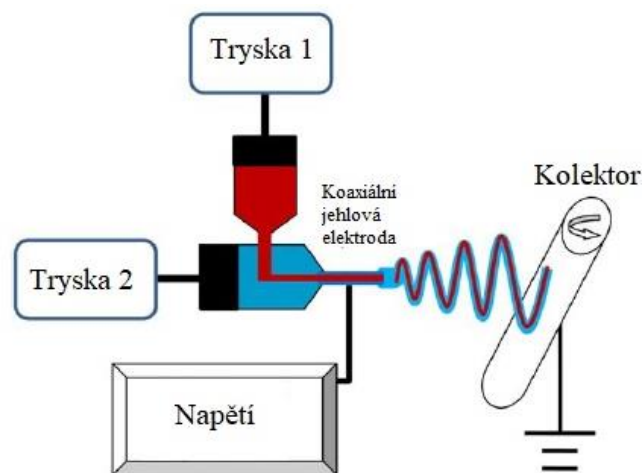
Pro suspenzní či emulzní zvláknování a zvláknování polymerního roztoku s enkapsulovanými aktivními látkami je důležité, aby aktivní látky nebyly usazené například na dně lahvičky s roztokem, ale aby jejich rozptýlení v roztoku bylo homogenní (*Prabu et al. 2020*).

2.1.3. Navázání aktivní látky na povrch

Při metodě navázání neboli přichycení, funkcionalizace, v angličtině *attachement*, dochází k navázání aktivní látky na povrch až po zvláknění nanovláken. Tato metoda se využívá, když není požadované konstantní uvolňování nebo když by aktivní látky inkorporované uvnitř materiálu neměly žádný účinek. Díky elektrostatickému zvláknování může být povrch vláken elektricky nabitý a opačně nabitá aktivní látka se tak může navázat. Další možností je částečná hydrolyza povrchu (například pomocí kyslíkové plazmy či chemická depozice par), kdy vzniknou nové funkční skupiny (například hydroxylové či karboxylové), na které je možné aktivní látku chemicky navázat. Na scaffold lze navázat například různé bioaktivní látky (například RGD peptid), které podporují buněčnou adhezi (*Liu et al 2012*).

2.1.4. Koaxiální elektrostatické zvlákňování

Koaxiálním zvlákňováním lze vytvořit vlákna tzv. jádro/plášť (core/sheath). Když se upraví jehlová zvlákňovací aparatura, podobným způsobem jako je na Obrázku 10, je možné zvlákňovat nanovlákna jádro/plášť. Principem je zvlákňování ze dvou jehel, kdy jedna je ve středu té druhé (Gao *et al.* 2014). Používají se dva různé polymerní roztoky, například do roztoku, který je v jádře vlákna je možné inkorporovat aktivní látky. Oba zvlákňované roztoky by měly nemísitelné, aby nedocházelo ke smíchání, srážení či tuhnutí při zvlákňování. Viskozita a rychlost dávkování roztoku, který je zvlákňován jako plášť by měly být vyšší než u roztoku pro jádro (Yoon *et al.* 2018). Díky plášti, který tvoří bariéru mezi inkorporovanými látkami, se mohou aktivní látky uvolňovat pozvolněji nebo mohou po uvolnění vytvořit na plášti vlákna vhodný povrch k další funkcionalizaci (Cornejo Bravo *et al.* 2016; Gao *et al.* 2014).



Obrázek 10: Schéma zvlákňovací aparatury pro koaxiální elektrostatické zvlákňování (Převzato z Gao *et al.* 2014)

2.2. Uvolňování aktivních látek z nanovláknenných materiálů

2.2.1. Mechanismy uvolňování aktivních látek

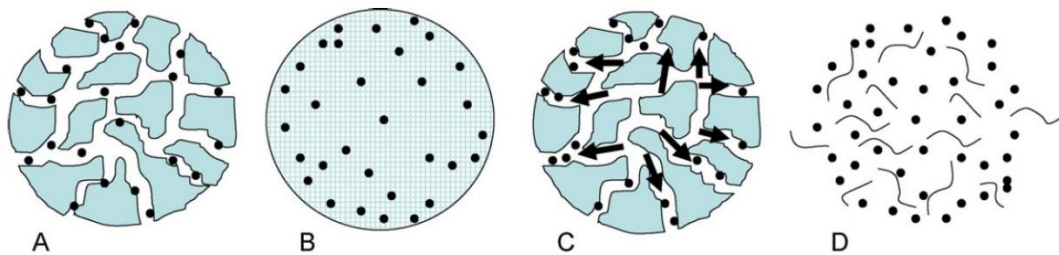
Mechanismů a procesů, kterými dochází k uvolňování aktivních látek je několik a většinou probíhají současně. Publikace Fredenberg *et al.* (2011) popisuje tři možné základní způsoby uvolňování aktivních látek z polymerních matric z PLGA: transport přes vodou zaplněný pór, transport přes polymerní matici a uvolnění zapouzdřené látky v důsledky degradace či rozpuštění polymerní matrice. Tyto způsoby vedou ke čtyřem hlavním mechanismům uvolňování aktivní látky (Fredenberg *et al.* 2011; Williams *et al.* 2018):

- Difúze přes póry
- Difúze přes polymer
- Osmóza
- Eroze (rozpad matrice v důsledku degradace)

Tyto mechanismy jsou schematicky zobrazeny na Obrázku 11. Proto aby došlo k uvolnění aktivních látek, je nutné vodné prostředí. Jakmile je polymer v kontaktu s vodou či jinou kapalinou dojde k zalití pórů. Póry jsou v tuto dobu malé, aby došlo k difúzi látek, avšak díky absorpci vody se zvětšují. Aktivní látky se tedy dostávají do pórů a difundují na povrch matrice jako je na Obrázku 11 A. Difúze je proces, při kterém dochází k náhodným pohybům a přesunům látky v důsledku nerovnoměrné koncentrace látky v prostředí. Když je látka velmi malá a hydrofobní může difundovat přes polymer (Obrázek 11 B) (Fredenberg et al. 2011; Raman et al. 2005).

Uvolňování látek v důsledky osmotického tlaku (Obrázek 11 C) probíhá v materiálech, které mají velmi pohyblivé řetězce a bobtnají. Při vniknutí vody do polymeru, dojde k nabobtnání a zvýšení tlaku. Dojde tak k přeskupení řetězců polymeru a kompenzaci rozdílných tlaků v polymeru a mimo něj. Aktivní látky jsou taky vytlačeny ven, odtékají (Fredenberg et al. 2011).

Na Obrázku 11 D je schéma mechanismu uvolňování látky vlivem eroze neboli degradace. Hydrolyza polymeru nastává okamžitě při kontaktu s vodou a k degradaci dochází současně v celém objemu polymeru. Produktem hydrolyzy jsou kyseliny, které ještě dále katalyzují hydrolyzu, plastifikují polymer a tím zvyšují jeho ohebnost a rychlost absorpce vody. Polymerní řetězce se vlivem degradace zkracují a nakonec se celá matrice rozpadá a aktivní látky se uvolňují (Fredenberg et al. 2011).

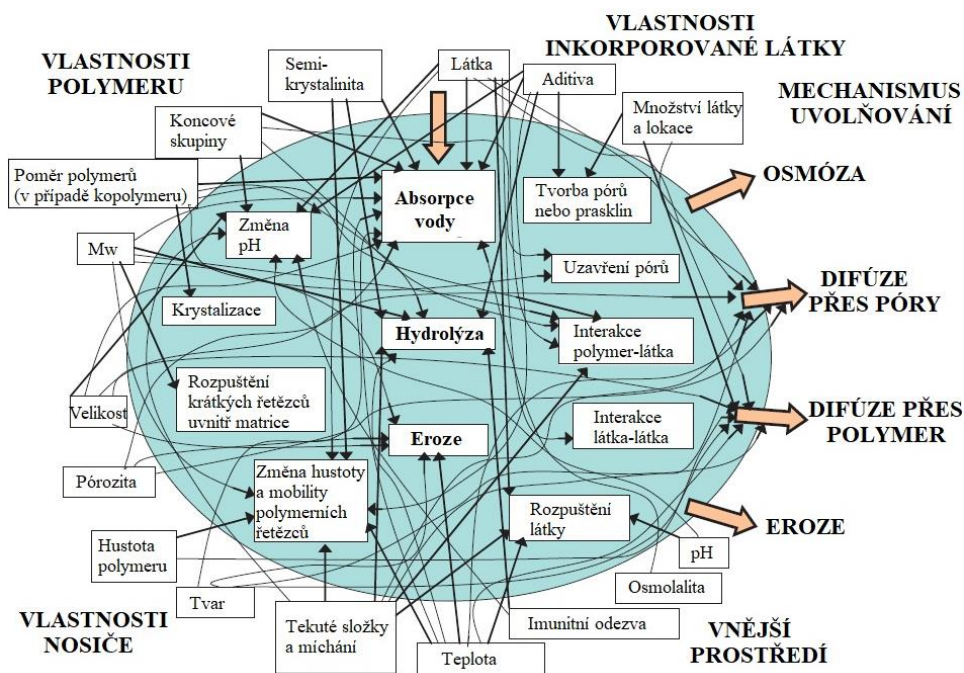


Obrázek 11: Schematicky zobrazeny mechanismy uvolňování látek z polymerní matrice: A – Difúze pórů zaplněnými vodou, B – Difúze látek před polymerní matrici, C – Osmóza, D – Eroze (degradace) (Převzato z Fredenberg et al. 2011)

Je obtížné předurčit, kterým mechanismem bude uvolnění probíhat, který z mechanismů dominuje a jaká bude rychlost uvolňování. Většinou se látky uvolňují více mechanismy najednou (*Fredenberg et al. 2011*). Toto ilustruje Obrázek 12, kde je zobrazeno schéma, které fyzikálně-chemické děje, interakce a vlastnosti materiálu PLGA a inkorporované látky vedou k mechanismu uvolnění a jak spolu souvisí. Jak již bylo zmíněno důležitá je přítomnost vodného prostředí pro difúzní transport a započetí degradace. Produkty degradace také způsobují větší ohebnost a mobilitu řetězců, což způsobuje rychlejší absorpci vody a snižuje transportní odpor a dále zvyšují osmolalitu uvnitř polymeru. Avšak během degradace dochází k rekrystalizaci, což způsobuje horší pronikání vody a tím zpomalení uvolňování (*Fredenberg et al. 2011; Klose et al. 2008*). Vlastnosti materiálu ovlivňují degradaci a tím absorpci a pronikání vody do matrice a uvolňování. Profil uvolňování je možné zajistit vlastnostmi materiálu jako je molekulová hmotnost, nebo v případě kopolymerů poměr polymerů, ohebnost řetězců ve vodném prostředí, hydrofobicita či hydrofilita materiálu a stupeň krystalinity. Více amorfní polymer se rychleji rozpouští a tím dochází k rychlejšímu uvolnění (*Fredenberg et al. 2011; Hrib et al. 2015; Kajdič et al. 2019*).

Další parametr uvolňování je interakce mezi polymerem a aktivní látkou, mezi aktivní látkou samotnou a také množství inkorporované látky. Aktivní látky rozpustné ve vodě mohou usnadnit absorpci vody a tvořit tak více porézní polymerní matrici. Aktivní látky, které nejsou rozpustné ve vodě či lipofilní látky mohou naopak zabraňovat v absorpci vody a tím může dojít i ke zpomalení degradace (*Klose et al. 2008*). Stejně tak mechanismus uvolňování ovlivňují různá aditiva například surfaktanty (povrchově aktivní látky) a plastifikátory, ať už jsou inkorporované nebo v okolním prostředí (*Fredenberg et al. 2011*).

Vliv má také vnější prostředí, degradace a její produkty mění pH prostředí, což může ovlivnit inkorporovanou látku. Vyšší teplota způsobí průběh více chemických reakcí (*Fredenberg et al. 2011*).



Obrázek 12: Komplexní schéma vlastností, dějů a vzájemných interakcí mezi materiálem, aktivní látkou a prostředím při uvolňování vedoucí k mechanismům uvolňování (Převzato z Fredenberg et al. 2011)

V případě uvolňování aktivní látek z polymerních nanovláken, je důležitá jejich pórovitost pro průnik vody pro možnou difúzi. Z vláken s větším průměrem, se budou látky uvolňovat pomaleji (Pillay et al. 2013). K uvolňování aktivních látek z nanovlákných materiálů dochází nejvíce v počátku, což je dáno tím, že nanovlákná mají velký specifický povrch (Coimbra et al. 2019). Rychlost neboli kinetika uvolňování ovšem závisí na mnoha parametrech včetně mechanismu, struktury a vlastností polymeru (Kajdič et al. 2019; Pillay et al. 2013). Této problematice se věnuje následující kapitola.

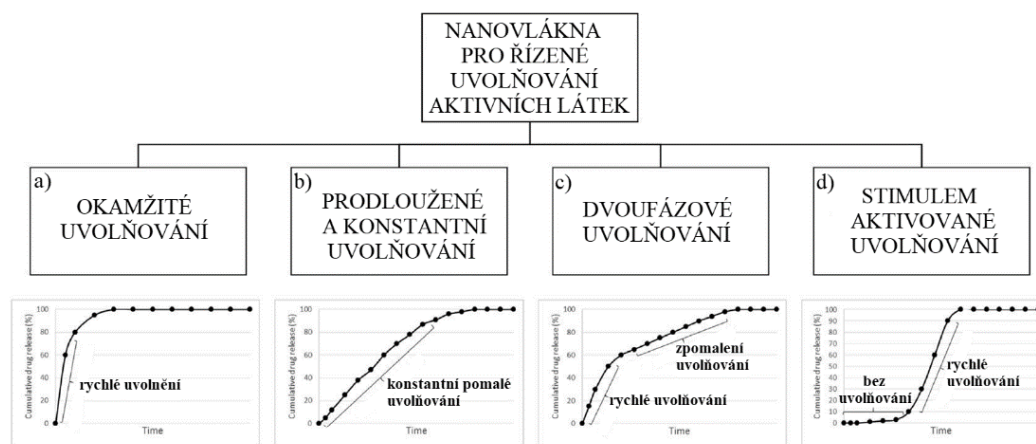
2.2.2. Kinetika uvolňování aktivních látek

Studie Kajdič et al. (2019) popisuje čtyři možné kinetické způsoby uvolňování aktivních látek z nanovláken. Na Obrázku 13 jsou tyto způsoby zobrazeny. K uvolnění aktivní látky z nanovláken může dojít okamžitě (Obrázek 13 a) a tím dojde k účinku látky například léčiva během několika minut, maximálně hodin. Polymerní matrice, ve které je látka inkorporována, by tak měla být smáčivá či velmi rychle degradující. Rychlé uvolnění je možné u polymerů s větším amorfním podílem. Vhodné jsou polymery rozpustné ve vodě (Kajdič et al. 2019).

Naproti tomu je velmi častý požadavek na delší dobu uvolňování nebo konstantní uvolňování aktivních látek z nanovláken (Obrázek 13 b.). Uvolňování léčiva lze

kontrolovat difúzi polymerem v závislosti na typu polymeru a jeho vlastnostech. Také rychlost a způsob degradace ovlivňují rychlost degradace. Degradace může probíhat povrchově nebo tzv. bulkově (v celém objemu). Při povrchové degradaci se budou aktivní látky uvolňovat pomaleji než při degradaci v celém objemu polymeru (Kajdič *et al.* 2019). Třetím způsobem na Obrázku 13 c) je dvojfázové uvolňování, kdy nejprve dojde k rychlému okamžitému uvolnění a následně se zpomalí a prodlouží uvolňování. Prodlouženého a dvojfázového uvolnění lze dosáhnout pomocí koaxiálního zvlákňování, kdy jsou aktivní látky zapouzdřeny v jádře vlákna a plášť vlákna slouží jako bariéra při uvolňování. Také lze inkorporovat aktivní látky do obou částí vlákna jak do jádra, tak i do pláště. Další možností jsou sendvičové struktury (Kajdič *et al.* 2019; Kuang *et al.* 2018).

Stimulem aktivované uvolnění aktivní látky (Obrázek 13 d) znamená, že pro spuštění uvolnění je polymer s aktivní látkou vystaven nějakému podnětu. Dojde tak ke změně fyzikálně-chemických vlastností a tím k uvolnění látky. Takovým podnětem může být změna prostředí, změna pH, teploty, elektromagnetické pole či vystavení světlu (Kajdič *et al.* 2019).



Obrázek 13: Možné kinetické způsoby uvolňování a) okamžité uvolňování, b) prodloužené konstantní uvolňování, c) dvojfázové uvolňování, d) stimulem aktivované uvolňování (Převzato z Kajdič *et al.* 2019)

2.3. Inkorporace antibiotik do nanovláknenných vrstev

Tato kapitola je pojata jako rešerše aktuální literatury týkající se inkorporací antibiotik do nanovláknenných materiálů. Dále představené publikace byly inspirací pro experimentální část této práce. Byly inspirací pro navržení experimentů, a to především

pro zvláknění a testování účinnosti antibiotika Gentamicinu sulfátu (dále GS), se kterým bylo pracováno v experimentální části.

Pisani et al. (2019) inkorporovali antibiotikum Gentamicin sulfát (1 hm. %) do nanovlákněných vrstev z kopolymeru PLA/PCL (poměr 70/30, 14 hm. %) rozpuštěné v dichlormetanu. GS se předem rozpustil v dimethylformamidu, následně přidán do polymerního roztoku a následně se elektrostaticky zvlákněovalo jehlovým zřízením. Výsledkem bylo šest kruhových matic o průměru ($7,0 \pm 0,5$) cm a hmotnosti ($58,0 \pm 2,9$) mg. Kvantifikace GS byla provedena spektrofotometricky pomocí NH testu (ninhydrin test). Experimentálně bylo zjištěno že v jedné matici je ($4,0 \pm 0,9$) mg GS. Matrice byly sledovány skenovacím elektronovým mikroskopem, nanovlákněna mají průměr 700 až 800 nm a morfologie vláken nebyla změněna po přidání antibiotika. Dále bylo sledováno uvolnění antibiotika při *in vitro* testech – statický a dynamický. Při statickém testu byly vzorky ponořeny do fosfátového pufru (PBS) při 37 °C a byl odebírán 1 ml v časových intervalech. Dynamický test byl proveden pomocí dvou silikonových bioreaktorů, kde médium (PBS) protékalo tangenciálně a vertikálně přes vzorek, opět při teplotě 37 °C, při různých rychlostech toku. Uvolňování bylo sledováno po dobu 26 dní. Uvolňování ve statických podmínkách bylo pomalejší než při dynamických. U dynamického testování bylo uvolňování v prvních 24 hodinách rychlejší při vertikálním průtoku nezávisle na rychlosti průtoku. Avšak po prvních 24 hodinách měla rychlost průtoku vliv na uvolňování a vyšší průtoky (0,6 ml/min) způsobily rychlejší uvolňování u obou způsobů průtoků (tangentský nebo vertikální). U nízkých rychlostí průtoku (0,3 ml/min) neměl způsob průtoku vliv na uvolňování. Po dobu *in vitro* testování byla taky sledována antibakteriální aktivita. Testované bakteriální kultury byly *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Kontrolou byla nanovlákněná vrstva bez antibiotika. Byl počítán mikrobicidní účinek po časových úsecích: 1; 6; 24 a 48 hodin. Již po jedné hodině byl antimikrobiální účinek výrazný. Nejvyšší mikrobicidní účinek byl u obou bakteriálních kmenů po 48 hodinách, avšak během prvních 24 hodinách se mikrobicidní účinek velmi rychle zvyšoval, poté se zvyšoval pomaleji.

V publikaci *Ceylan et al. (2017)* bylo inkorporováno antibiotikum GS do nanovlákněných vrstev z PCL (15 hm. %) Koncentrace antibiotika byly 2,5; 5 a 10 hm. %. Byly také zvlákněny vrstvy bez antibiotika. Polymerní roztoky byly zvlákněny jehlovým elektrostatickým zvlákněváním a elektrostatickým sprejováním. Vrstvy byly

charakterizovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie, infračervené spektroskopie (FTIR), termogravimetrickou metodou a diferenciální skenovací kalorimetrií. Hodnotil se antibakteriální účinek vrstev vůči gramnegativním a grampozitivním bakteriím (*E. Coli*, *Salmonella* a *S. epidermidis*). Pro antibakteriální testy byly použity vícevrstvé nanovlákněné vrstvy. Byla hodnocena inhibiční zóna [m²] pro jedno, dvou a třívrstvé nanovlákněné materiály nejprve každých 6 hodin a následně po 24 hodinách. Výsledky ukazují, že během prvních 6 až 12 hodin došlo k rychlému uvolnění. Vrstvy měly nejlepší antibakteriální účinky až po 12 hodinách a byly stále účinné po dobu sedmi dní.

Studie *Sirc et al. (2012)* také hodnotí uvolňování antibiotika GS z nanovlákněných vrstev, avšak použitým polymerem byl polyvinylalkohol a polyuretan. Byl vytvořen třívrstvý materiál kde mezi dvěma vrstvami polyuretanu (10 hm. %) byla vrstva polyvinylalkoholu (11 hm. %) s inkorporovaným GS (10 hm. %). Zvlákněvalo se na zařízení NanospiderTM (Elmarco, Česká Republika). Před testováním byla zkoumána stabilita antibiotika ve vrstvách pomocí hmotové spektrometrie. Spektra GS před zvlákněním byla porovnána se spektry uvolněného GS a byla bez rozdílu, struktura antibiotika po zvlákněním a uvolnění zůstala stejná. Uvolňování antibiotika bylo hodnoceno kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií. Antibakteriální testy byly provedeny na bakteriích *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Inhibiční zóny byly sledovány po 1, 2 a 6 dnech. Bylo hodnoceno uvolňování v čase, kdy docházelo k nejrychlejšímu uvolňování během prvních 10 hodin, kdy se uvolnilo téměř 90 % antibiotika.

Problematice způsobu inkorporace antibiotik do nanovláken se věnuje publikace *Coimbra et al. (2019)*. V této studii jsou sledovány rozdíly mezi suspenzním a emulzním zvlákněním. Při suspenzním zvlákněním byl přidán a rozptýlen GS (10 hm %) v PCL, PLA, PLGA a PLA/PLGA. Při emulzním zvlákněním byl nejprve GS rozpuštěn v destilované vodě a následně přidán do polymerního roztoku. Do roztoku bylo také přidán surfaktant SPAN80 pro lepší rozptýlení vodné fáze v roztoku. Suspenze i emulze byly zvlákněny elektrostaticky pomocí jehly. Byl hodnocen kontaktní úhel, kdy nanovlákněné materiály, které byly zvlákněny emulzním zvlákněním byly více smáčivé v důsledku surfaktantu, který snižuje povrchové napětí. Uvolňování bylo hodnoceno pomocí spektrofotometrie a antibakteriálních testů. K nejrychlejšímu

uvolňování u obou způsobů během prvního testování opět velmi rychle. U materiálů připravených emulzním zvlákněním bylo během prvních 8 hodin procento uvolněného antibiotika lehce nižší, v porovnání s materiály zvlákněných ze suspenze.

Publikace *Khodir et al. (2018)* popisuje vývoj elektrostaticky zvlákněných nanovlákněných vrstev z PCL a kolagenu s antibiotikem GS pro hojení kožních infekcí. Kolagen i PCL byly zvlášť rozpuštěny v chloroformu a ethanolu, následně z nich byl připraven roztok o poměru kolagen: PCL 1:3. Následně byl přidán GS (3 w/v %) a roztok byl jehlově elektrostaticky zvlákněn. Inkorporace GS do nanovláken nijak výrazně neovlivnila průměr vláken. Uvolňování bylo sledováno v *in vitro* podmínkách (destilovaná voda, 37 °C). Hodnocení probíhalo pomocí UV spektrofotometrie. V prvních 24 hodinách bylo uvolněno 87,5 % antibiotika GS. Antibiotikum se uvolňovalo až 72 hodin. Byla testována cytotoxicita materiálů po dobu 1, 3 a 5 dnů pomocí metabolického MTT testu. Materiály vyšly jako necytotoxické.

3. Antibiotika

Antibiotika jsou nízkomolekulární látky, které se používají k léčbě bakteriálních infekcí (*Walsh et al. 2016*). V lékařské praxi se používají od 40. let minulého století, kdy byl využit objev Alexandera Fleminga penicilin a byla vytvořena technologie výroby antibiotik. Antibiotika nesmí působit na eukaryotické buňky ani je jinak poškozovat. Podle působení se antibiotika dělí na bakteriostatická a bakteriocidní. Bakteriostatická antibiotika svým působením zastavují růst dalších bakterií, zatímco bakteriocidní bakterie usmrcují. Ve větších koncentracích mohou být některá bakteriostatická antibiotika usmrcovat bakterie (*Bednář et al. 1996*). Na trhu je v současné době asi 150 druhů antibiotik, nejznámější jsou β -laktamy, kam se řadí penicilin. Další skupiny jsou například tetracykliny, glykopeptidy a aminoglykosidy, kam se řadí gentamicin, se kterým je pracováno v experimentální části práce (*Beneš 2019; Schindler 2014*).

3.1. Mechanismus působení antibiotik

Mechanismus působení antibiotik závisí na skladbě a vlastnostech molekuly. Antibiotika působí tak, že se naváží na určité místo v bakteriální buňce a zabrání jeho funkci. Těmto místům se říká cílové struktury (*Schindler 2014*).

Vybrané mechanismy podle zasažené cílové struktury (*Beneš 2019; Schindler 2014*):

- Syntéza buněčné stěny
Antibiotika se vážou na enzymy syntetizující peptidoglykany, které jsou v buněčné stěně. Tím se poruší buněčná stěna a dojde k destrukci bakterie. Takto působí β -laktamy.
- Syntéza nukleových kyselin
Antibiotika inhibují gyrázu a topoizomerázu, To jsou enzymy, které pomáhají rozplétat, štěpit a kopírovat řetězce DNA. Není tedy vůbec možné provést transkripci. Takto působí chinolony a fluorochinolony.
- Syntéza bílkovin
Aminoglykosidy a tetracykliny působí tak, že narušují proteosyntézu. Navázáním antibiotik na různých místech ribozomů dojde k tomu, že přeruší syntéza bílkovin (proteinů).

3.2. Aminoglykosidy

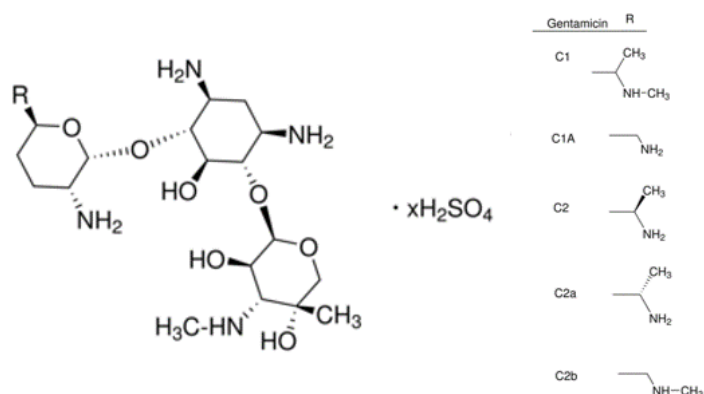
V roce 1944 bylo izolované nové antibiotikum z kultury *Streptomyces griseus*, následně pojmenované streptomycin. Během dalších let byla nalezeny další antibiotika, která mají společný rys, a to chemickou strukturu kdy je na cyklický aminopolyalkohol vázaná molekula aminocukrů glykosidickou vazbou (*Beneš 2018*). Tato skupina antibiotik je účinná především na aerobní gramnegativní bakterie včetně *Pseudomonas aeruginosa* (*Hašek 2012; Bednář et al. 1996*). Mezi aminoglykosidová antibiotika se dále řadí amikacin, netilmicin a tobramycin a gentamicin. Nejúčinnější je amikacin, jelikož si k němu bakterie vytváří rezistivitu velmi pomalu. Rezistivita bakterií k aminoglykosidům je dána enzymy, které acetylují aminoskupiny. Aminoglykosidy se velmi často se používají v kombinaci s β -laktamy (penicilin) (*Bednář et al. 1996; Beneš 2018*). Při pH prostředí 7-7,4 se molekuly aminoglykosidů chovají jako kationty což jim umožňuje vázat se na záporně nabitě fosfátové skupiny, které obsahují fosfolipidy a nukleové kyseliny (ribozomální RNA) (*Beneš 2018*).

Mechanismus účinku aminoglykosidových antibiotik spočívá v nevratném navázání na 30S podjednotku ribozomu bakterie (*Adámková 2016; Walsh et al. 2016*). Účinkem také může být poškození buněčné membrány (*Beneš 2018*). Ribozom je organela zodpovědná za syntézu proteinů v buňce. Ribozomy bakterií a eukaryotických buněk jsou

rozdílné, a tak při působení aminoglykosidových antibiotik nedochází k poškození eukaryot. Bakteriální ribozomy mají dvě podjednotky: menší s označením sedimentačního faktoru 30S a větší označenou 50S. Menší podjednotka hledá na mRNA určitou trojici bází (kodon). Ke kodonu se vždy páruje antikodon (trojice bází a aminokyselina), který nese transferová RNA (tRNA) na velké podjednotce. Usazením podjednotek na sebe vzniká komplex a dochází k proteosyntéze. Pokud se na malou jednotku naváže antibiotikum, neumožní tak hledání kodonu a ani usazení antikodonů z tRNA. Tím se zabrání dalšímu dělení bakterie (Beneš 2018).

3.2.1. Gentamicin sulfát

Gentamicin sulfát (GS) se řadí mezi aminoglykosidová antibiotika, je to jeden z celosvětově nejpoužívanějších antibiotik. Struktura GS, zobrazena na Obrázku 14, je trisacharid obsahující aminocukry a směs molekul označovaných gentamicin C1, gentamicin C1A, gentamicin C2, gentamicin C2A, gentamicin C2B. Byl izolován v roce 1963 z *Micromonospora purpurea* (Beneš 2018). Gentamicin se pro farmaceutické použití připravuje ve formě sulfátu. Farmaceutická substance GS obsahuje 32-35 % sulfátů. GS se snadno rozpouští ve vodě a dimethylformamidu, nerozpouští se v alkoholu a dalších organických rozpouštědlech. Má kationtový charakter. Používá se v chirurgii jako sterilní resorbovatelná houba z kolagenu obsahující GS a velmi často se kombinuje s β -laktamy (Arya 2007; Hašek 2012; Ramos et al. 2012). Dále se používá při léčbě sepsí a závažných infekcí. Také se využívá při kožních infekcích, při popáleninách, na akné a impetiga (Beneš 2018; Pisani et al. 2019). Toto antibiotikum je nefrotoxické neboli poškozující ledviny a ototoxické, což znamená, že poškozuje sluch. Právě použití GS lokálně na určitém místě, by mohlo zmírnit tyto vedlejší účinky (Arya 2007; Pisani et al. 2019).

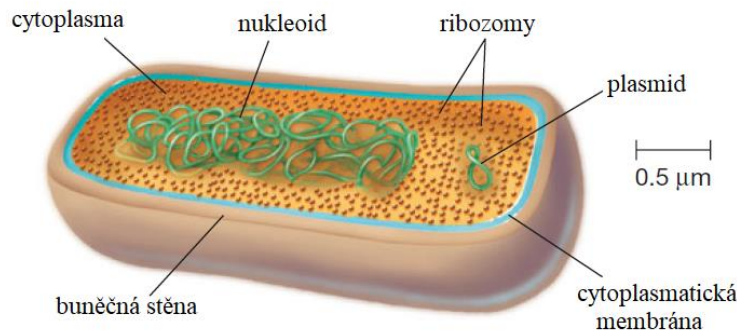


Obrázek 14: Struktura Gentamicinu sulfátu (Převzato ze Sigma Aldrich)

4. Bakterie

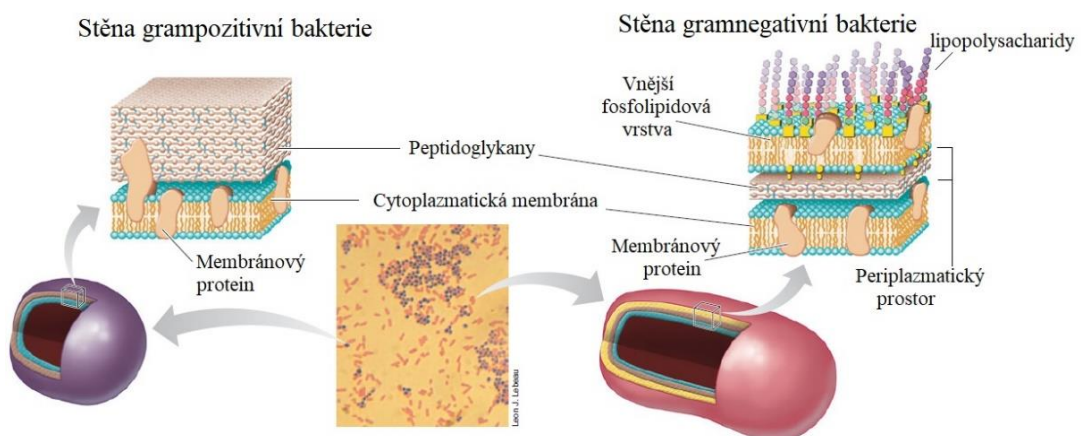
Bakterie se nachází v lidském těle, ve zvířecím těle, v rostlinách, v půdě, ve vodě, ve vzduchu a nemají problém přežít extrémní podmínky. Bakterie mohou být v kontaktu s lidským tělem v symbióze neboli bakterie a lidské tělo spolu spolupracují, anebo bakterie mohou na lidském těle parazitovat. Parazitováním se myslí zneužívání lidského těla pro bakteriální množení. Pokud se přemnoží bakterie, které jsou patogenní neboli jsou schopné vytvořit biochemické prostředky, které způsobí onemocnění, dochází tak k infekcím a zánětům (*Bendář 1996*).

Bakterie jsou jednobuněčné organismy prokaryotického typu, které replikují svoji DNA a tím se dále množí (*Schindler 2014*). V určitých podmínkách k tomu dochází velmi rychle, například v gastrointestinálním traktu se počet bakterií může za 20 minut zdvojnásobit (*Walsh et al. 2016*). Většinou mají kulový, tyčinkový nebo spirálový tvar. Složení bakteriální buňky je od eukaryotické buňky odlišné, jednodušší (*Bednář 1996*). Na Obrázku 15 je schematicky zobrazená bakteriální buňka a její organely. Bakterie neuchovávají DNA v jádru, ale jako tzv. nukleoid, kdy je molekula DNA spletena a není ohraničena membránou. Další organelou bakteriální buňky jsou ribozomy, které mají dvě podjednotky 30S a 50S a jejich funkce je syntéza proteinů (proteosyntéza). Plazmidy jsou organely podobné nukleoidům, mohou nést další DNA. Jedna z jejich vlastností je možnost způsobení rezistence bakterie vůči antibiotikům. Okolo bakteriálních organel je cytoplazma, má viskózní charakter a obsahuje velké množství různých biomolekul. Bakterii ohraničuje cytoplazmatická membrána a následně buněčná stěna. Cytoplazmatická membrána je složená ze dvou vrstev fosfolipidů, zajišťuje transport živin a látek dovnitř a transport katabolitů ven z bakterie. Na membránu navazuje stěna bakterie. Stěna gramnegativních bakterií je složitější, tenká asi 10 až 15 μm . Tvoří ji tenká vrstva peptidoglykanů, nad ní se nachází dvojvrstva fosfolipidů. Vrstva peptidoglykanů se nachází v periplazmatickém prostoru, kde jsou kromě živin a katabolitů i enzymy, které jsou schopné štěpit antibiotika (*Bendář 1996*). Na vnější straně stěny gramnegativní bakterie jsou lipopolysacharidy, ty způsobují toxicitu pro živočišné buňky, jelikož jsou složené z lipidu A, který je označován za tzv. endotoxin gramnegativních bakterií. U grampozitivních bakterií je stěna silnější (20 μm), tvoří ji vrstva peptidoglykanů a mezi nimi řetězce teichoových kyselin (*Bendář 1996; Madigan et al. 2012; Walsh et al. 2016*).



Obrázek 15: Schéma prokaryotické buňky (Převzato z Madigan et al. 2012)

Velikost bakterií je v řádu mikrometrů, nelze je tedy vidět pouhým okem. Pro jejich pozorování se musí použít mikroskopie (Alberts 1998). Pro pozorování a klasifikaci se používají usmrcené a obarvené bakterie. Právě podle barvení nazývané Gramovo barvení můžeme bakterie rozdělit na grampozitivní a gramnegativní. Gram negativní bakterie se obarví červeně, gram pozitivní modrofialově. Tkáně s bakteriemi se barví krystalovou violetí, poté je použit Lugovův jódový roztok, dále se nanáší aceton či etanol. Následně se preparát omyje vodou a nanáší se barviva: Safranin nebo Karbolfuchsin. U gramnegativních bakterií dojde k destrukci fosfolipidů použitím acetonu nebo etanolu a tím k porušení stěny a vymytí krystalové violeti. Následné barvení barviva je zbarví do červena. Grampozitivní bakterie se zbarví fialově, jelikož mají silnější vrstvu peptidoglykanů a nedojde tak k porušení cytoplasmatické membrány z fosfolipidů alkoholem. Schéma složení stěn grampozitivních a gramnegativních bakterií je na Obrázku 16 (Bendář 1996; Madigan et al. 2012). Mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi je kromě jiného složení bakteriální stěny rozdíl i ve vlastnostech a mechanismu infekce (Schindler 2014).



Obrázek 16: Schéma stěn grampozitivních a gramnegativních bakterií (Převzato z Madigan et al. 2012)

Bakterie se množí v tekuté či pevné půdě. Na pevné půdě, například v laboratoři v Petriho misce s agarem, rostou bakterie v koloniích. Bakterie, které jsou nevratně přichycené na pevné podložce, k okolním buňkám nebo k jejich vlastní mezibuněčné hmotě, a mají změněný fenotyp neboli růstové vlastnosti, tvoří biofilm (Schindler 2014). Biofilm je hlenový polysacharidový film, který drží bakteriální buňky dohromady a umožňuje jim se dále množit a tvořit další mikrokolonie. Biofilm je velmi nebezpečný, jelikož bakterie v něm jsou více rezistentní a nedovolí proniknutí antibiotika a jeho působení. Příkladem biofilmu je zubní plak, avšak biofilm se velmi často objevuje na zdravotnických prostředcích a implantátech jako jsou žilní katetry, umělé srdeční chlopně a umělé klouby. Na kontaktních čočkách se usazuje *Pseudomonas aeruginosa*, která je více představena v následující kapitole, jelikož se vyskytuje také ve střevech a způsobuje komplikace při hojení chirurgických operací (Madigan et al. 2012; Schindler 2014).

4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je běžná patogenní bakterie z rodu *Pseudomonas*. Tento rod se řadí do gramnegativních aerobních tyčinek. Tato skupina bakterií je charakteristická dobrou odolností, polárními bičíky, pohyblivostí a roste při teplotě 4 až 42 °C. Je přítomna se v lidském těle, ale i mimo něj. V lidském těle se vyskytuje ve tlustém střevě jako součást flóry. Mimo lidské tělo se vyskytuje i v půdě, přírodních a odpadních vodách, v potravinách či u zvířat. Také se velmi často vyskytuje v nemocničním prostředí, což způsobuje další nákazy a infekce (Bednář et al. 1996; Madigan et al. 2012).

U zdravého člověka většinou nevznikne onemocnění při kolonizaci touto bakterií. Avšak onemocnění může propuknout v důsledku poškození kůže, rozsáhlých popálenin, náročných operací, dlouhodobého zavedení cévních katetrů, podávání kortikoidů a dlouhodobé podávání antibiotik, které způsobí rezistivitu. Vznikají tak infekce s vysokou úmrtností (Bednář et al. 1996; Poole 2011; Schindler 2014).

Tato bakterie produkuje extracelulární enzymy, které štěpí vláknenné proteiny nacházející se v extracelulární matrix. Takovým enzymem je například kolagenáza, která štěpí kolagen, ale dochází i ke štěpení elastinu či fibrinu. Extracelulární matrix a nově vznikající tkáň se rozpadá a dochází ke poškození stěn cév a nekróze tkáně. Bakteriální infekci způsobenou bakterií *Pseudomonas aeruginosa* lze léčit antibiotiky. Například polymyxin B, kolistin a v předchozí kapitole zmíněný gentamicin (Bednář et al. 1996).

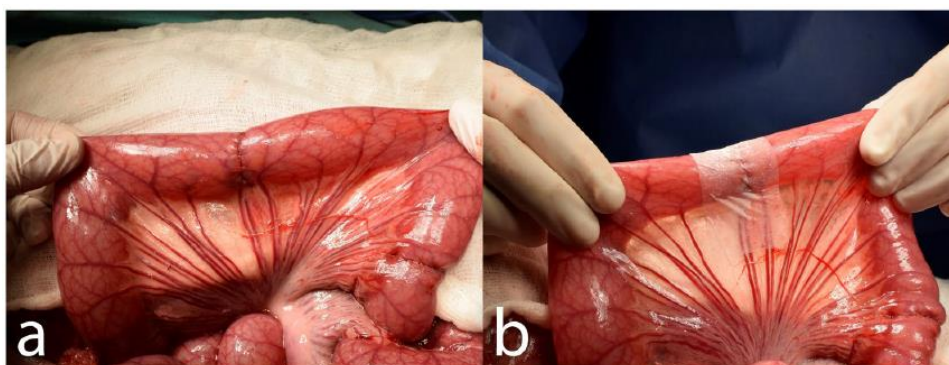
5. Aplikace nanovláknenného materiálu s inkorporovaným antibiotikem

5.1. Střevní anastomóza

Nádorová onemocnění či autoimunitní onemocnění postihující gastrointestinální trakt, a to především tenké a tlusté střevo, vedou většinou k nutným chirurgickým operacím. Nádory, záněty a srůsty je nutné chirurgicky odstranit. Poškozené či nemocné místo je odstraněno a střeva přišita zpět k sobě. Toto místo, kde jsou duté konce střev sešity k sobě se nazývá střevní anastomóza. Anastomóza je tedy spojení dvou konců dutých orgánů, fotografie chirurgicky vytvořené anastomózy je na Obrázku 17 a) (*Gonzales a Cafasso 2018*). Spojení konců střev a vytvoření anastomózy může být různými technikami, například: oběma konci střev k sobě (end-to-end), konec střeva na stranu střeva (end-to-side) a stranami střev k sobě (side-to-side). Anastomóza může být šitá (nitěmi z biodegradabilních polymerů), spojena stapplery (svorky) nebo lepená tkáňovými lepidly (*Blažej et al. 2015; Gonzales a Cafasso 2018; Goulder 2012; Schein et al. 2016*).

Pooperační komplikací střevních anastomóz je anastomotický leak, kdy dojde k úniku obsahu střev do břišní dutiny skrz střevní spoj. To může způsobit další komplikace a v nejhorším případě sepsi a smrt (*Murrell a Stamos 2006; Schein et al. 2016*). K úniku obsahu střev může docházet velmi brzo, ale i později po operaci (*Hyman et al. 2007*). Další komplikací jsou adheze poraněné tkáně k jiné tkáni, což může způsobovat srůsty a neprůchodnost střev (*Goor 2007*). Přítomnost bakterií v místě střevní anastomózy způsobuje infekce, záněty a degradaci nové tkáně, což opět vede k netěsnosti střevní anastomózy a možnému úniku obsahu střev (*Guyton et al. 2019; Kingham a Pachter 2009; Shogan et al. 2015*). Rizika pooperačních komplikací se zvyšují, pokud pacient trpí podvýživou, obezitou, cukrovkou, je vysokého věku a užívá alkohol, steroidy či kouří (*Goulder 2012; Kingham a Pachter 2009*).

V současné době probíhá vývoj nanovláknenného materiálu pro krytí, zpevnění a zabránění vzniku pooperačních komplikací střevních anastomóz. Testování *in vivo* nanovláknenného materiálu na střevní anastomóze je na Obrázku 17 b). Tato práce navazuje na práci Ing. Markéty Klíčové a práci Ing. Zuzany Oulehlové, kde byly vyvíjeny nanovláknenné materiály, pro krytí a zpevnění střevní anastomózy a zabránění úniku obsahu střev a adhezi tkání.



Obrázek 17: a) chirurgicky vytvořená střevní anastomóza na tenkém střevu, b) nanovláknenné materiál umístěný na střevní anastomózu (Převzato z Rosendorf et al. 2020)

Klíčová (2018) ve své práci vyvíjela dvouvrstvý nanovláknenný materiál, kdy jedna vrstva materiálu byla hydrofilní, tato vrstva byla v kontaktu se střevní tkání a střevní anastomózou. Naopak druhá vrstva, hydrofobní, měla zabraňovat v adhezi tkáně k jiným tkáním. První dvouvrstvý materiál byl vyroben z polymerů PVA, který je hydrofilní a PCL, který je hydrofobní. Druhý dvouvrstvý materiál byl z kyseliny hyaluronové (hydrofilní) a PCL (hydrofobní). Pro zlepšení hydrofobicity hydrofilních stran (strany z PVA a kyseliny hyaluronové) byla u obou materiálů provedena plazmatická úprava studeným methanovým plazmatem. Měření kontaktního úhlu potvrdilo vyšší hydrofobicitu hydrofilních stran materiálů a lepší stabilitu nanovláknenných vrstev z hydrofilních polymerů. Plazmatická úprava také zajistila lepší cytokompatibilitu při *in vitro* testech.

Oulehlová (2020) ve své práci vyvíjela nanovláknenný antiadhezivní materiál jako krycí materiál na střevní anastomózu. Každá strana materiálů měla jiné vlastnosti, na rubní straně byly PCL nanovláknena a na lící stranu byly pomocí elektrospayingu naneseny polymerní kapičky o průměrech v řádu mikro a nanometrů. Lící strana byla inspirována efektem lotosového listu, který je díky jemné struktuře hydrofobní. V tomto případě tvořily jemnou strukturu polymerní kapičky. Materiál byl dále modifikován plazmatem pomocí hexamethyldisiloxanu z lící strany, pro zajištění větší hydrofobicity. Plazmatická úprava úspěšně zvýšila hydrofobicitu, která byla ověřena pomocí kontaktního úhlu a absorpčního testu. Adheze byla ověřena pomocí 90° peel testu, kde byl potvrzen účinek hydrofobního povrchu na tenkém střevě z prasete. Testování *in vitro* potvrdilo cytokompatibilitu vyvinutých materiálů.

Již vyšly tři studie *in vivo* testování nanovláknenných materiálů pro zpevnění, zlepšení hojení a zabránění pooperačním komplikacím střevních anastomóz, vyvinutých na TUL Katedře netkaných textilií a nanovláknenných materiálů.

V publikaci *Rosendorf et al. (2020)* byly testovány *in vivo* nanovláknenné vrstvy, z PCL a kopolymeru PLCL (PCL a kyselina polymléčná). Materiály PCL a PLCL byly vyrobeny na zařízení Nanospider™ (Elmarco, Česká Republika). Materiály byly *in vivo* testovány na tenkých střevích selat. U selat byly vytvořeny chirurgicky sešité střevní anastomózy a na ně byl umístěn nanovláknenný materiál PCL nebo PLCL o rozměru 20 × 5 mm. Kontrolou byly anastomózy bez materiálu. Selata byla následně sledována po dobu 21 dní. U žádného selata se během experimentu nedošlo ke komplikacím, gastrointestinální trakt byl průchozí. U vrstev z materiálu PCL nedošlo k žádné infekci, ale u PLCL došlo k jednomu případu infekce. V kontrolní skupině bez materiálu došlo ke dvěma infekcím. Byly zaznamenány adheze u vrstev PCL i PLCL, nejméně adheze bylo v kontrolní skupině.

Dvouvrstvý nanovláknenný materiál PCL/PVA byl *in vivo* testován v publikaci *Rosendorf et al. (2021a)*. Byly použity dva materiály PVA s rozdílným procentem hydrolyzy (98,0 – 98,8 % a 88 %). Materiály byly vyrobeny na zařízení Nanospider™ (Elmarco, Česká Republika) nejprve byl zvlákněn PCL a na přímo na vytvořenou nanovláknennou vrstvu byl pak zvlákněn PVA. Celkem 24 prasat rozdělených do tří skupin bylo použito pro *in vivo* experiment. Na tenkém střevě byla vytvořena anastomóza s defektem. Jedné skupině zvířat byla anastomóza kryta materiál PCL/PVA nižší stupeň hydrolyzy, druhé skupině PCL/PVA vyšší stupeň hydrolyzy a třetí skupina byla kontrolní. Materiály ke tkáni velmi jednoduše přilnuly a nebyla nutná jejich fixace. Některé materiály se lehce posunuly z místa aplikace, ale vždy překrývaly anastomózu. Zvířata následně byla pozorovány tři týdny a všechna zvířata dobu pozorování přežila. Nebyly zaznamenány žádné známky sepse, úniků střevní tekutiny ani jiných vážných komplikací, avšak u některých zvířat došlo k vytvoření abscesů a u jednoho došlo v místě anastomózy k zúžení střeva. Byly přítomné i adheze v místě anastomózy, ale i v okolí.

Rosendorf et al. (2021b) testoval *in vivo* nanovláknenné materiály z PCL zvlákněné na zařízení Nanospider™ (Elmarco, Česká Republika). Podmínky zvláknování byly optimalizované tak aby plošná hmotnost byla 10 g/m². Průměr vláken byl (385 ± 239) nm Materiály byly sterilizované ethylenoxidem a byla sledována *in vitro* buněčná adheze

a proliferace po dobu 21 dní, pomocí kolorimetrického metabolického testu (CCK-8), fluorescenční a skenovací elektronovou mikroskopií. Byl počítán počet buněk na 1 mm² plochy materiálu, kdy největší počet buněk byl 14. den testování a 21. den počet buněk klesl. *In vivo* modelem byla prasata. Na tlustém střevě prasat (v místě sestupného tračníku) byla vytvořena střevní anastomóza s defektem, na kterou byl aplikován nanovláknenný materiál. Prasata byla pozorována po dobu 21 dní, kterou všechna prasata přežila bez žádných velkých komplikací. S nanovláknenným materiálem se manipulovalo snadno, v místě anastomózy přilnul, aniž by byla nutná jakákoliv fixace, avšak u několika zvířat došlo k malé relokaci, ale materiál vždy zůstal v místě anastomózy. Žádné z prasat nemělo žádnou patologickou reakci na nanovláknenný materiál. Bylo zjištěno, že v místě anastomózy se nachází střevní bakterie, které produkují kolagenázu, která způsobuje degradaci kolagenu v místě hojící se tkáně, což může vést k úniku obsahu střev či jiným komplikacím. Ve studii navrhuji použití nanovláknenných materiálů z PCL v kombinaci s antibakteriálními látkami či antibiotiky.

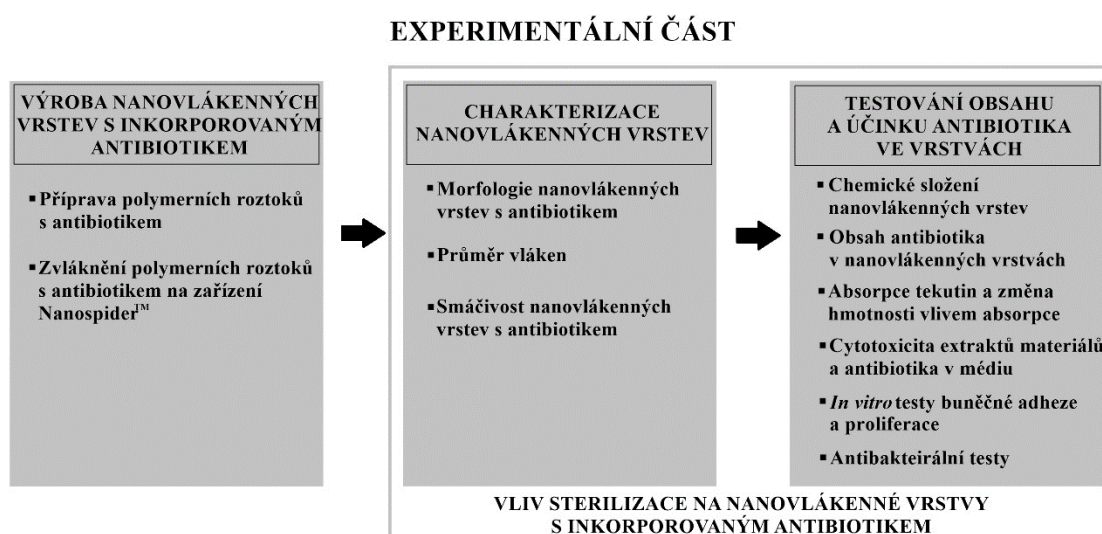
Všechny tyto *in vivo* studie uvádějí nanovláknenné materiály z PCL, PLCL, či PCL/PVA jako vhodné materiály pro zpevnění střevní anastomózy, jelikož ve většině případů neměli žádné nežádoucí imunitní odezvy či jiné negativní vlivy. Materiály se jeví jako biokompatibilní. V publikacích také uvádí snadnou manipulaci s materiály bez nutnosti jejich fixace, jelikož nanovláknenné materiály na tkáň velmi dobře přilínají. Autoři studie *Rosendorf et al. (2021b)* navrhuji použít nanovláknenné materiály s antibakteriálními účinky. Bakterie, jako je například *Pseudomonas aeruginosa* představená v kapitole 4.2., produkuje enzymy kolagenázy, které v místě střevní anastomózy mohou štěpit kolagen v nově vznikající a hojící se tkáni v místě anastomózy (*Guyton et al. 2019; Shogan et al. 2015*). Stěna tlustého střeva je tvořena ze čtyř vrstev: sliznice, podslizniční vazivo, zevní svalová vrstva a poslední vrstva seróza, která obsahuje, mimo jiné, kolagenové vazivo. Právě pevnost serózy je důležitá, dojde-li k degradaci této vrstvy, je pevnost střevního spoje snížena a může docházet k úniku obsahu střev a dalším komplikacím (*Bosmans et al. 2015; Čihák et al. 2013*). Experimentální část této práce popisuje vývoj nanovláknenných materiálů s inkorporovaným antibiotikem, které působí na již zmíněnou bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Takový materiál by mohl být slibným řešením komplikací, které způsobují bakterie v místě střevní anastomózy.

5.2. Další možné aplikace nanovláknenných materiálů s inkorporovaným antibiotikem

Aplikace nanovláknenného materiálu s antibiotikem nemusí být pouze v gastrointestinální chirurgii. Velký potenciál má v místech, kde velmi jednoduše může dojít k infekci a zánětu jako například kůže či ústní dutina. V publikaci *Hughes et al. (2020)* byl vyvíjen nanovláknenný materiál z PCL s inkorporovaným antibiotikem GS a vápníkem pro regeneraci poškozených zubů. Kožní infekce či vážné popáleniny jsou další možnou aplikací těchto materiálů (*Gao et al. 2014; Khodir et al. 2019*). Hlavní výhodou využití nanovláken jako nosiče antibiotika je možnost lokálního působení, což vede k menším koncentracím antibiotika v celém organismu a sníží se tak vedlejší účinky (*Pisani et al. 2019*).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části bylo vytvořit nanovláknennou vrstvu z poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL) s inkorporovaným antibiotikem Gentamicinem sulfátem (GS). Vyrobené vrstvy byly charakterizovány a byl testován obsah a účinnost antibiotika ve vrstvách. Bylo ověřeno, zda v nanovláknenných vrstvách antibiotikum je a uvolňuje se a zdali vrstvy nejsou cytotoxické. Byl také sledován vliv sterilizace ethylenoxidem na vrstvy s antibiotikem. Následující Obrázek 18 zobrazuje schéma experimentální části. V této kapitole jsou popsány metody experimentů, vyhodnoceny výsledky a na závěr jsou výsledky diskutovány.



Obrázek 18: Schéma experimentální části této diplomové práce

6. Metody

Tato kapitola popisuje metody, použité chemikálie a přístroje pro vyhotovení experimentů.

6.1. Příprava polymerních roztoků

Byly připraveno celkem šest polymerních roztoků z granulátu PCL (Mw 45000 g/mol, Sigma Aldrich, USA) o koncentraci 16 hm. % v rozpouštědlovém systému chloroform/ethanol/kyselina octová (vše Penta Chemicals, Česká Republika) o poměru 8/1/1. Do pěti roztoků bylo přidáno práškové antibiotikum GS (Sigma Aldrich, USA) a jeden byl bez antibiotika. Byly zvoleny koncentrace antibiotika 1; 3; 5; 7,5 a 10 hm. %. Koncentrace antibiotika byla počítána z hmotnosti sušiny PCL. Roztoky byly míchány

po dobu 24 hodin a těsně před zvlákněním byly promíchány pomocí ultrazvukové sonotrody. Následně byly ihned zvlákněny.

6.2. Výroba materiálů bezjehlovým elektrostatickým zvlákněním

Připravené polymerní roztoky byly zvlákněny na zařízení NanospiderTM NS 1WS500U (Elmarco, Česká Republika). Klimatické podmínky zajišťovala klimatizace NS AC150 (Elmarco, Česká Republika). Polymerní roztok byl ze zásobníku nanášen na zvláknovací elektrodu, kterou byla struna. Nanovláknenné vrstvy byly zvláknovány na podkladovou netkanou textilii typu spunbond z polypropylenu. Parametry byly optimalizovány tak aby výsledná vrstva měla plošnou hmotnost 10 g/m².

6.3. Plošná hmotnost

Z materiálu byl vystřižen čtverec o rozměrech 10 × 10 cm a zvážen na analytických vahách.

6.4. Sterilizace materiálů

Sterilizace materiálů a vzorků připravených pro různé testování byla pomocí ethylenoxidu (Aprolene, UK) po dobu 12 hodin při 37 °C. Sterilizace byla provedena podle normy ČSN EN ISO 11135-1 Sterilizace výrobků pro zdravotní péči – Sterilizace ethylenoxidem – Část 1: Požadavky na vývoj, validaci a průběžnou kontrolu sterilizačního postupu pro zdravotnické prostředky. Po sterilizaci byly materiály odvětrány po dobu jednoho týdne při pokojové teplotě.

6.5. Skenovací elektronová mikroskopie

Malý vzorek materiálu byl nalepen na kovový terčík a pozlacen, aby byl vodivý. Pozlacení bylo provedeno na přístroji Quorum Q150R ES (Quorum Technologies) a nanasla se vrstva zlata o tloušťce 10 nm. Vzorky byly snímány na skenovacím elektronovém mikroskopu TESCAN VEGA 3 SB Easy Probe (TESCAN, Česka Republika) při různých zvětšeních.

6.6. Měření průměru vláken

Na snímcích ze skenovacího elektronového mikroskopu, o zvětšení 5000x, byly pomocí programu ImageJ měřeny průměry vláken. Pro každý materiál bylo provedeno 300 měření.

6.7. Příprava simulované střevní tekutiny

Simulovaná střevní tekutina má z části simulovat prostředí, kam by měl být aplikován vytvořený materiál. Byla využita k měření kontaktního úhlu a pro sledování absorpce tekutin. Simulovaná střevní tekutina byla připravena podle receptu z Českého lékopisu (Ministerstvo zdravotnictví ČR 2017). Nejprve byl připraven roztok o 250 ml destilované vody a 6,8 g dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4 , Lachema, Česká Republika). Roztok byl smíchán s 77 ml hydroxidu sodného (NaOH, Penta Chemicals, Česká Republika) o koncentraci 0,2 mol/l a 500 ml vody. Následně bylo přidáno 10 g práškového pankreatinu (TCI Chemical, Japonsko). Poté bylo upraveno pH na 6,8 pomocí pH metru (Hanna Instruments, Česká Republika). Po upravení pH byl celý roztok zředěn destilovanou vodou na 1000 ml.

6.8. Měření kontaktního úhlu

Kontaktní úhel byl měřen metodou přisedlé kapky pomocí programu See System 7.6 (Advex Instruments, Česká Republika). Na podložní sklíčko byla nalepena oboustranná páska, na kterou byl následně nalepen testovaný materiál. Pomocí pipety byla kápnuta kapička o objemu 5 μl . CCD kamera snímala kapičku a následně byl v programu hodnocen kontaktní úhel na fotografiích kapiček. Na rozhraní mezi kapkou, vzduchem a povrchem materiálu byly označeny tři body, body byly spojeny, a byla vytvořena kružnice. Velikost kontaktního úhlu se rovná tangenti kružnice. Použitou kapalinou byla destilovaná voda a simulovaná střevní tekutina. Byly testovány jak nesterilní materiály, tak i sterilní materiály. Pro každý materiál bylo provedeno 10 měření.

6.9. Elementární analýza

Pro elementární analýzu byly připraveny 2 vzorky o hmotnosti 5 mg z různých míst každého materiálu. Připravené vzorky byly vloženy do lodičky z aluminiové folie o rozměru 4×11 mm a zváženy, aby hmotnost materiálu byla právě 5 mg. Následně byla lodička složena do tablety znovu převážena a hmotnost byla zaznamenána. Byly také připraveny standardy a kontrolní měření. Standardem byl sulfanilamid a kontrolou byly prázdné lodičky. Měření probíhalo na přístroji Elementar Vario Cube s TCD detektorem po dobu 90 sekund při teplotě 1200 °C. Byly testovány nesterilní materiály i sterilní materiály.

6.10. Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Na určení chemického složení pomocí FTIR byly připraveny vzorky o rozměru 40 × 40 mm. Před testováním byly vzorky pouze sejmuty z podkladové netkané textilie. Měření probíhalo na přístroji Nicolet iZ10 (Thermo Fisher, USA) technikou zeslabeného úplného odrazu (ATR – FTIR) na krystalu z diamantu. Byly měřeny nesterilní materiály, sterilní materiály i čistý prášek antibiotika GS.

6.11. UV – spektrofotometrie a vysoko-účinná kapalinová chromatografie

Pro stanovení antibiotika GS v nanovlákných materiálech UV-spektrofotometrií a vysoko-účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) byl připraven zásobní roztok GS (Sigma Aldrich, USA): 1 mg GS v 1 ml PBS, roztok ninhydrinu (NIN, Sigma Aldrich, USA): 0,1 NIN g ve 20 ml PBS a z nanovlákných materiálů byly naváženy vzorky o hmotnostech 5 mg až 75 mg (v závislosti na materiálu), vloženy do zkumavek a zality 2,5 ml PBS. Kalibrační roztoky byly připraveny ze zásobního roztoku GS do zkumavek o koncentraci 0,075; 0,1 a 0,15 mg/ml a objemu 2,5 ml. Pro UV spektrofotometrii byl připraven blank vzorek 2,5 ml PBS a 2,5 ml roztoku NIN.

Všechny vzorky (i blank vzorek a kalibrační roztoky) byly zahřívány 15 minut při 95 °C a ke všem vzorkům bylo těsně před zahřátím přidáno 2,5 ml roztoku NIN. Při zahřívání došlo k rozpuštění nanovlákných materiálů a uvolnění antibiotika GS. Antibiotikum GS reagovalo s ninhydrinem a vznikl fialově zbarvený komplex gentamicin-ninhydrin. Po zahřátí byly vzorky zchlazeny po tekoucí vodou po dobu jedné minuty. Nanovlákné vzorky se pod tekoucí vodou vysrážely a pro měření bylo nutné vzorky přefiltrovat přes filtrační papír. Vzorky pro kalibraci byly ihned analyzovány.

UV – spektrofotometrie

Na spektrofotometru DLAB SP-V1000 byla pomocí blank vzorku nastavena nulová hodnota při vlnové délce 570 nm. Byla měřena intenzita fialového zbarvení komplexu gentamicin-ninhydrin. Měřením kalibračních roztoků byla získána rovnice kalibrační přímky a byla ověřena linearita. Podle rovnice kalibrační přímky byly vypočteny koncentrace GS ze vzorků nanovláken.

Vysoko-účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Pro HPLC byly použity stejné vzorky jako pro UV-spektrofotometrii. Měření probíhalo na chromatogramu Shimadzu LC-10ADVP. Od každého vzorku proběhl nástřik o objemu 20 µl na analytickou kolonu (Ascentis Express ES-CN, 10 cm × 4,6 mm, 5 µm). Mobilní fázi tvořil acetonitril (ACN, Thermo Fischer, Francie) a destilovaná voda (dH₂O) a jejich poměr se gradientově měnil: nejprve ACN: dH₂O v poměru 5:95 na 100:0 během 3 minut a během 1 minuty se vrátil na původní složení 5:95. Pro další měření bylo nutné kolonu ekvilibrovat po dobu 1 minuty. Každý vzorek byl měřen třikrát. Kalibrační roztoky opět sloužily pro stanovení rovnice kalibrační přímky a ověření linearity. Výsledkem měření byly chromatogramy, ze kterých byly vypočteny plochy píků a pomocí rovnice kalibrační přímky byly vypočteny koncentrace GS v nanovlákněných materiálech.

6.12. Absorpce tekutin

Metodika absorpce tekutin do nanovlákněných vrstev byla stanovena na základě publikace *Choi et al. (2011)*. Experiment probíhal tři dny. Z každého materiálu bylo připraveno 10 vzorků o velikosti 20 × 20 mm. Jednotlivé vzorky byly zváženy, hmotnost byla poznamenána (m_1) a jednotlivé vzorky byly vloženy do zkumavek o objemu 50 ml. Následně byly vzorky zality 20 ml testovanou tekutinou. Testovanou tekutinou byla destilovaná voda a simulovaná střevní tekutina. Pět vzorků od každého materiálu bylo zalito destilovanou vodou a zbylých pět simulovanou střevní tekutinou. Vzorky byly ponechány v tekutinách po dobu 24 hodin při pokojové teplotě. Následně byly vzorky vyndány ze zkumavek, lehce otřeny z obou stran o papírovou utěrku a zváženy (m_2). Následně byly vzorky ponechány v laboratoři (teplota: 21 °C, vlhkost: 32 %) na vyschnutí 24 hodin a poté opět zváženy (m_3).

Následně byla vypočítána procentuální absorpce materiálů podle vzorce:

$$A[\%] = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \cdot 100 \quad (1)$$

kde: m_1 je hmotnost suchého vzorku před testováním (1. den)

m_2 je hmotnost vzorku po 24 hodinách v tekutině (2. den)

Procentuální úbytek hmotnosti byl vypočítán podle vzorce:

$$U[\%] = \frac{m_1 - m_3}{m_1} \cdot 100 \quad (2)$$

kde: m_1 je hmotnost suchého vzorku před testováním (1. den)

m_3 je hmotnost vzorku 3. den po vysušení

6.13. Buněčné testování *in vitro*

Při buněčných *in vitro* testech bylo pracováno s buněčnou linií 3T3 myší fibroblasty, která byla kultivovaná v Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biosera, Francie) do kterého bylo přidáno 10 % fetálního bovinního séra (FBS, Biosera, Francie) a 1% směs antibiotik (penicilin, streptomycin, amfotericin B) a 1 % Glutaminu (Biosera, Francie).

Buňky byly uchovávány v kultivačních lahvičkách v inkubátoru v atmosféře s teplotou 37 °C a 5% obsahem CO₂. Po vytvoření konfluentní vrstvy na dně lahvičky byly buňky pasážovány. Nejprve bylo odsáto médium, poté byly buňky opláchnuty PBS (fosfátový pufr), následně byl přidán trypsin (Lonza, Švýcarsko), který uvolňuje buňky ze dna kultivační lahvičky a působí při 37°C. Lahvičky byly následně uloženy zpět do inkubátoru o teplotě 37 °C na dobu 5 minut. Po inkubaci byly buňky resuspendovány v novém médiu. Pro zjištění počtu buněk bylo odebráno 10 µl buněčné suspenze do mikrozkušavky typu Eppendorf a k tomu bylo přidáno 10 µl tropanové modři. Následně byl na automatickém počítadle LUNATM (Logos Biosystems, Jižní Korea) proveden výpočet živých buněk a buněčné viability.

6.13.1. Cytotoxicita extraktů

Cytotoxicita extraktů materiálů byla provedena podle normy ČSN EN ISO 10993-5: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*.

Byly připraveny materiály o koncentraci 10 mg materiálu/1 ml média do 15ml zkumavek a vysterilizovány ethylen oxidem (Aprolene, UK) po dobu 12 hodin a týden odvětrávány.

Buněčná suspenze (buňky v médiu DMEM) byla nasazena do 96 jamkové destičky. Do jedné jamky bylo nasazeno 10⁴ buněk (pasáž 12). K materiálům bylo přidáno médium (1 ml média na 10 mg materiálu) a byly louhovány po dobu 24 hodin na třepačce (N-Biotek, Jižní Korea) o 60 rpm při teplotě 37 °C.

Po 24hodinovém louhování byly extrakty materiálů přidány k buňkám do 96 jamkové destičky. Jako pozitivní kontrola (PC) bylo k buňkám přidáno médium s 0,1% Tritonem-X, který je cytotoxický. Negativní kontrolou (NC) bylo čisté kompletní médium DMEM. Byly zachovány stejné podmínky jak pro všechny extrakty materiálů, tak pro obě kontroly. Následně byly extrakty materiálů inkubovány s buňkami v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂) po dobu 24 hodin.

Cytotoxicita byla stanovena na základě viability neboli životaschopnosti buněk. Pro stanovení viability byl použit kolorimetrický metabolický test MTT. Principem testu je redukce žlutého rozpustného MTT 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyyl terazolium bromidu na nerozpustné krystaly formazanu fialové barvy. Životaschopné buňky mají na mitochondriálních membránách enzymy, které redukují MTT právě na formazan. Následně se krystalky fialového formazanu rozpustily pomocí isopropylalkoholu a výsledný barevný roztok byl měřen pomocí spektrofotometru při vlnové délce 570 nm (referenční 650 nm). Viabilita byla stanovena procentuálně, kdy negativní kontrola byla 100 %. Hranice cytotoxicity je 70 %, viabilita, která byla nižší než 70 % značila tedy cytotoxicitu extraktu materiálu. Pro každý materiál a kontroly bylo provedeno 12 opakování.

6.13.2. Cytotoxicita Gentamicinu sulfátu v médiu

Společně s extrakty byla sledována cytotoxicita antibiotika GS v médiu. Byly zvoleny koncentrace 1; 5; 10; 15; 20; 40; 60; 80; 100; 250 mg GS v 1 ml média (DMEM).

Koncentrace byly naváženy na 2 ml média do 15ml centrifugačních zkumavek, zality médiem DMEM a louhovány 24 hodin na třepačce o 60 rpm a 37 °C. Následně bylo postupováno stejně jako při hodnocení cytotoxicity extraktů materiálů. Koncentrace GS v médiu byly nasazeny k buňkám a inkubovány 24 hodin, poté byl proveden metabolický test MTT.

6.13.3. Test buněčné adheze a proliferace

Vzorky na *in vitro* test buněčné adheze a proliferace byly připraveny do 24jamkových destiček. Materiály byly odebrány z podkladové vrstvy netkané textilie a nastříhány do tvaru koleček o průměru 1,6 cm, vloženy do jamek a zatěžkány skleněnými kroužky. Bylo připraveno od každého materiálu 5 vzorků na metabolický test, jeden pro negativní kontrolu a po jednom vzorku na fluorescenční a elektronovou mikroskopii. Destičky

s materiály byly sterilizovány 12 hodin ethylenoxidem (Anprolene, UK) a poté týden odvětrány při pokojové teplotě.

K připraveným materiálům v destičkách byla nasazena buněčná suspenze, koncentrace buněk do jedné jamky byla $7 \cdot 10^3$ buněk/ml. Do jedné jamky byl přidán 1 ml buněčné suspenze. Pozitivní kontrolou byly v tomto případě pouze buňky nasazené v jamce bez materiálu a negativní kontrolou byly materiály pouze s médiem, bez buněk.

Buněčná adheze a proliferace byla sledována po dobu 21 dní. Testování probíhalo 2.; 7.; 14. a 21. den. Interakce buněk s materiály byla hodnocena pomocí metabolického testu CCK-8, fluorescenční mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie.

Metabolický test CCK-8

Metabolická aktivita byla sledována 2. 7. 14. a 21. den testování. CCK-8 je kolorimetrický test, kdy je na základě absorbance vyhodnocena viabilita. Vodorozpustná tetrazoliová sůl WST-8 je redukována dehydrogenázovými aktivitami v buňkách a vzniká žlutě zabavený formazan. K materiálům, které byly osazené buňkami, bylo přidáno 1 ml 10% CCK-8 v médiu DMEM. Následně se materiály inkubovaly 3 hodiny v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂). Po inkubaci se od materiálů v CCK-8 v médiu DMEM přepipetovalo 200 µl do nové 96 jamkové destičky. Pomocí spektrofotometru byla pak měřena absorbance při 450 nm a vyhodnocena viabilita, která odpovídá absorbanci.

Fluorescenční mikroskopie

Interakce buněk s materiály byla sledována pomocí fluorescenční mikroskopie 2. 7. 14. a 21. den testování. Vzorky byly nejprve opláchnuty PBS, poté vloženy do 1 ml 2,5 glutaraldehydu na 15 minut, který buňky na materiálu zafixoval. Pro obarvení bylo nejprve nutné narušit buněčnou stěnu, pomocí permeabilizačního roztoku po dobu 5 minut, aby do buňky mohlo proniknout barvivo. Permeabilizační roztok byl připraven z 0,01 g bovinního sérového albuminu (BSA), 10 ml PBS a 0,1 % Tritonu X-100 (Sigma Aldrich, USA).

Barevní cytoskeletu bylo provedeno pomocí barvicího roztoku phalloidin-fluorescein izothiokyanát (FITC, Sigma Aldrich, USA) v permeabilizačním roztoku zředěný 1:1000. Bylo přidáno 300 µl barviva phalloidinu-FITC do každé jamky s materiálem

a inkubováno 30 minut ve tmě (zakryté alobalem). Phalloidin-FITC se váže na aktinová vlákna cytoskeletu a barví je zeleně. Barvení jader bylo pomocí barviva DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol, Sigma Aldrich, USA) zředěný 1:1000. Do každé jamky bylo přidáno 300 μ l barviva DAPI a inkubováno 5 minut ve tmě. Barvivo DAPI barví jadernou DNA modře. Po obarvení byly vzorky propláchnuty PBS, následně v PBS ponechány, zakryty alobalem a uloženy do lednice do snímání.

Vzorky s obarvenými buňkami byly následně pozorovány a snímány na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse-Ti-E (Nikon Imaging, Česká republika). Pro vyhodnocení počtu buněk na 1 mm^2 bylo nasnímáno 10 snímků od každého materiálu a vyhodnoceno v softwaru MATLAB (MathWorks, USA).

Skenovací elektronová mikroskopie

Vzorky pro skenovací elektronovou mikroskopii byly nejdříve opláchnuty PBS a pak vloženy do 1 ml 2,5% glutaraldehydu pro zafixování buněk na materiálu. Následně byly vzorky vysušeny pomocí ethanolové řady: 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100% ethanol, každá koncentrace po dobu 5 minut. Poté se vzorky nechaly vyschnout na parafilmu, nalepily na terčík a pozlatily 10 nm vrstvou. Následně byly snímány na skenovacím elektronovém mikroskopu TESCAN VEGA 3 SB Easy Probe (TESCAN, Česká Republika).

6.14. Antibakteriální testy

Difúzní účinnost antibiotika

Difúzní experiment vycházel z normy AATCC Test Method: 147-2004 - Antibacterial Activity Assessment of Textile materials: Parallel Streak Method, avšak metodika byla podle potřeb testování upravena.

Pro první experiment difúzní účinnosti antibiotika GS v nanovlákných vrstvách byly nastříhány čtyři vzorky od každého materiálu o rozměru 10 \times 10 mm. Pro druhý experiment byly připraveny čtyři vzorky od každého materiálu o rozměru 10 \times 40 mm. Vzorky byly před testování odejmuty z podkladové textilie.

Testované bakteriální kultury byly *Escherichia coli* CCM 7929 (gramnegativní) a *Staphylococcus gallinarum* CCM 3572 (grampozitivní). Byli připraveny Petriho misky s agarem. Pro *Escherichia Coli* byly připraveny Petriho misky s Nutrient agarem a pro

Staphylococcus gallinarum byl připraven Braid Parker agar. Agar slouží jako živná půda pro bakteriální kultury. Bylo připraveno inokulum neboli bakteriální suspenze, kdy se do fyziologického roztoku (NaCl v destilované vodě) přidaly bakterie z vyočkované kolonie kultivované na agaru. Připravená koncentrace inokula byla $1,5 \cdot 10^8$ KTJ/ml (kolonií tvořící jednotky na 1 ml). Koncentrace byla měřena pomocí nefelometru, který měří zákal v jednotkách McFarland (1 McFarland je $3 \cdot 10^8$ KTJ/ml).

Do připravených Petriho misek s agarem byl napipetován 1 ml připraveného inokula s vyočkovanými koloniemi bakterií *Escherichia Coli* a *Staphylococcus gallinarum*. Inokulum bylo rozetřeno po agaru v misce a následně byl do misky vložen materiál. Pro každý materiál a bakteriální kulturu byla připravena dvě opakování. Misky byly vloženy do inkubátoru o 37 °C a inkubovány 24 hodin.

Antibakteriální účinky extraktů materiálů

Byla připravena inokula bakterie *Escherichia coli* CCM 7929 o koncentracích: $3 \cdot 10^8$; $1,5 \cdot 10^8$; $3 \cdot 10^7$; $1,5 \cdot 10^7$ a $3 \cdot 10^6$ KTJ/ml. Materiál PCL + 5 % GS byl nastříhán do zkumavek a zalit inokulem. Materiály byly louhovány 4,5 hodiny při pokojové teplotě. Do Petriho misek byl napipetován 1 ml inokula s louhovaným materiálem o připravených koncentracích. Misky s inokulem byly následně zality agarem TBX (Trypton Bile X-Glucuronid) a zamíchány. Stejně tak byl do Petriho misek napipetován 1 ml inokula bez louhovaného materiálu a zalit agarem TBX. Inkubace probíhala 24 hodin v inkubátoru při 37 °C.

6.15. Statistické vyhodnocení dat

Data byla vyhodnocena pomocí programu GraphPad Prism 7.05 (GraphPad Software, USA).

U všech dat byl nejprve proveden test na ověření normality pomocí Shapiro-Wilkova testu. Pro párové porovnávání skupin byl zvolen u parametrický t-test a neparametrický t-test (Mann-Whitney test). Pro parametrické porovnávání více skupin mezi sebou byl použit ANOVA *Bonferroni* test s hladinou významnosti $p \geq 0,001$. Pro neparametrické porovnání skupiny byl použit ANOVA *Kruskal-Wallis* test. Hvězdičky v grafech nad skupinami značí statisticky významné rozdíly mezi skupinami podle hodnoty p (* $p < 0,0332$; ** $p < 0,0021$; *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$). V případě, že mezi

skupinami nebyl statisticky významný rozdíl ($p < 0,1234$), nebyly nad skupinami žádné hvězdičky vyznačeny.

Data jsou zobrazena ve sloupcových, bodových a krabicových grafech. Krabicové grafy jsou vykresleny pomocí Tukey testu, kdy okraje boxplotu znamenají první a třetí kvartil, uvnitř boxplotu je medián, červeným křížkem je vyznačen průměr a fousy jsou ve vzdálenosti, která odpovídá hodnotě $((\text{třetí} - \text{první kvartil}) \cdot 1,5)$. Samostatné body značí odlehlá měření. Některé vyhodnocené hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm směrodatná odchylka (dále SD). Některé data zobrazují naměřené hodnoty z různých míst materiálů a nejsou zprůměrována.

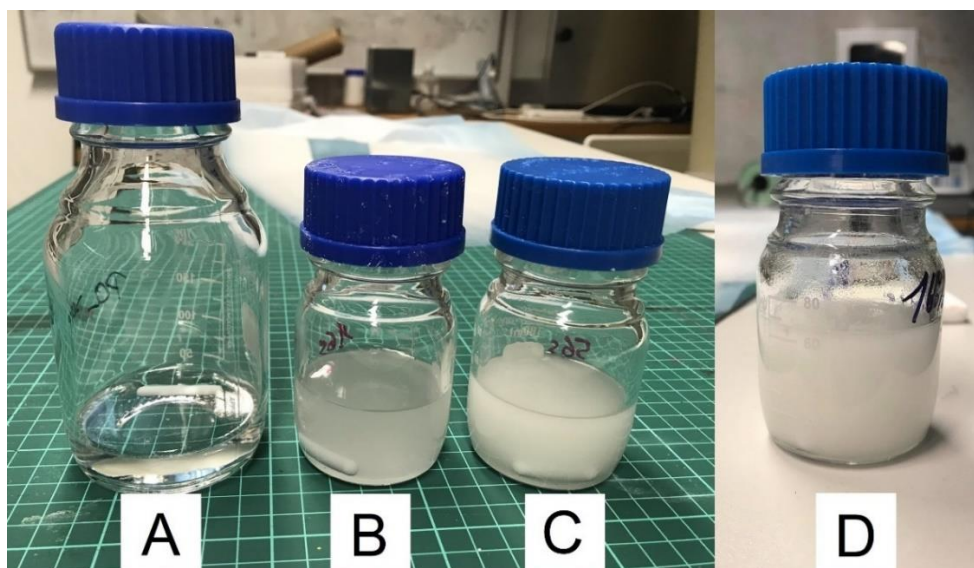
7. Výsledky

V této kapitole jsou interpretovány výsledky z provedených experimentů. Kapitola je rozdělena na tři podkapitoly. První popisuje výrobu nanovlákněných vrstev s inkorporovaným antibiotikem, ve druhé jsou charakterizovány vyrobené nanovlákněné vrstvy a ve třetí jsou výsledky testování obsahu a účinnosti antibiotika v nanovlákněných vrstvách.

Kromě charakteristiky a testování materiálů s inkorporovaným antibiotikem GS, byl také sledován vliv sterilizace ethylenoxidem na vrstvy s antibiotikem. Veškeré materiály, které mají aplikaci v medicíně musí být sterilní. Sterilizací se usmrcují mikroorganismy, které mohou vyvolat imunitní reakci či infekci a jejich sterilizací se tak předchází dalším komplikacím. Většina experimentů byla provedena s nesterilními i sterilními materiály, pro vyhodnocení změny vlastností v důsledku sterilizace.

7.1. Výroba nanovlákněných vrstev s inkorporovaným antibiotikem

Bílý prášek GS byl rozmíchán v polymerním roztoku PCL (16 hm. %) v chloroform/ethanol/kyselina octová (CHEKO) o poměru 8/1/1. Jelikož GS není v použitých rozpouštědlech rozpustný, byl v roztoku rozptýlený a vznikla tak suspenze polymerního roztoku a GS. Na Obrázku 19 jsou připravené polymerní roztoky s antibiotikem. Na Obrázku 19 A je 16% PCL v CHEKO 8/1/1, na Obrázku 19 B je 16% PCL v CHEKO 8/1/1 + 1 % GS, Obrázek 19 C je 16% PCL v CHEKO 8/1/1 + 5 % GS a na Obrázku 19 D je 16% PCL v CHEKO 8/1/1 + 10 % GS. Je vidět, že s vyšší koncentrací GS je polymerní roztok více mléčně zakalený. Před zvlákněním byly roztoky homogenizovány ultrazvukovou sonotrodou. Ihned poté byly roztoky zvlákněny na zařízení NanospiderTM NS 1WS500U (Elmarco, Česká Republika).



Obrázek 19: Připravené polymerní roztoky s rozptýleným antibiotikem GS: A – PCL bez antibiotika, B – PCL + 1% GS, C – PCL + 5% GS, D – PCL + 10% GS vše v CHEKO 8/1/1

V Tabulce 2 jsou parametry zvlákňování. Byly nastaveny a optimalizovány tak, aby výsledná plošná hmotnost vrstev byla 10 g/m^2 . Aby výsledné vrstvy měly požadovanou plošnou hmotnost, bylo nutné, se zvyšující se koncentrací antibiotika GS ve vrstvách, snižovat rychlost odtahu. Při zvlákňování roztoku 16% PCL v CHEKO 8/1/1 + 10 % GS byla rychlost odtahu velmi nízká, zvlákňování probíhalo velmi pomalu a výsledná vrstva byla velmi nehomogenní. Jak vyplývá i z dále uvedených výsledků, koncentrace antibiotika 10 % v nanovlákněných vrstvách, se dá považovat za limitní koncentraci pro zvlákňování.

Tabulka 2: Parametry zvláknování pro jednotlivé roztoky

Polymerní roztok	16% PCL v CHEKO 8/1/1	16% PCL v CHEKO 8/1/1 + 1 % GS	16% PCL v CHEKO 8/1/1 + 3 % GS	16% PCL v CHEKO 8/1/1 + 5 % GS	16% PCL v CHEKO 8/1/1 + 7,5 % GS	16% PCL v CHEKO 8/1/1 + 10 % GS
Rychlost odtahu [mm/min]	70-72	65;72-75	45; 68	45; 75	40; 59	15
Vzdálenost kolektoru [mm]	170	170	170	170	170	170
Napětí na elektrodách [kV]	+40/-10	+40/-10	+40/-10	+40/-10	+40/-10	+40/-10
Průvlak [mm]	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Rychlost pohybu cartridge EMW [mm/s]	550	550	550	550	550	550
Rychlost odtahu struny [mm/min]	15	15	15	15	15	15
Teplota/vlhkost	22 °C/ 52 %	22 °C/ 52 %	22 °C/ 52 %	22 °C/ 52 %	22 °C/ 52 %	22 °C/ 52 %
Plošná hmotnost vlákně vrstvy [g/m ²]	10	10	10	10	10	10

7.2. Charakterizace zvlákněných nanovlákněných vrstev

Bylo připraveno šest nanovlákněných vrstev, pět s různými koncentracemi antibiotika a jedna bez antibiotika. Koncentrace antibiotika jsou vztaženy na sušinu polymeru. Pro lepší přehlednost je vytvořena Tabulka 3. kde jsou popsány zvlákněvané roztoky s koncentrací antibiotika a název vyrobených materiálů používaný dále v práci.

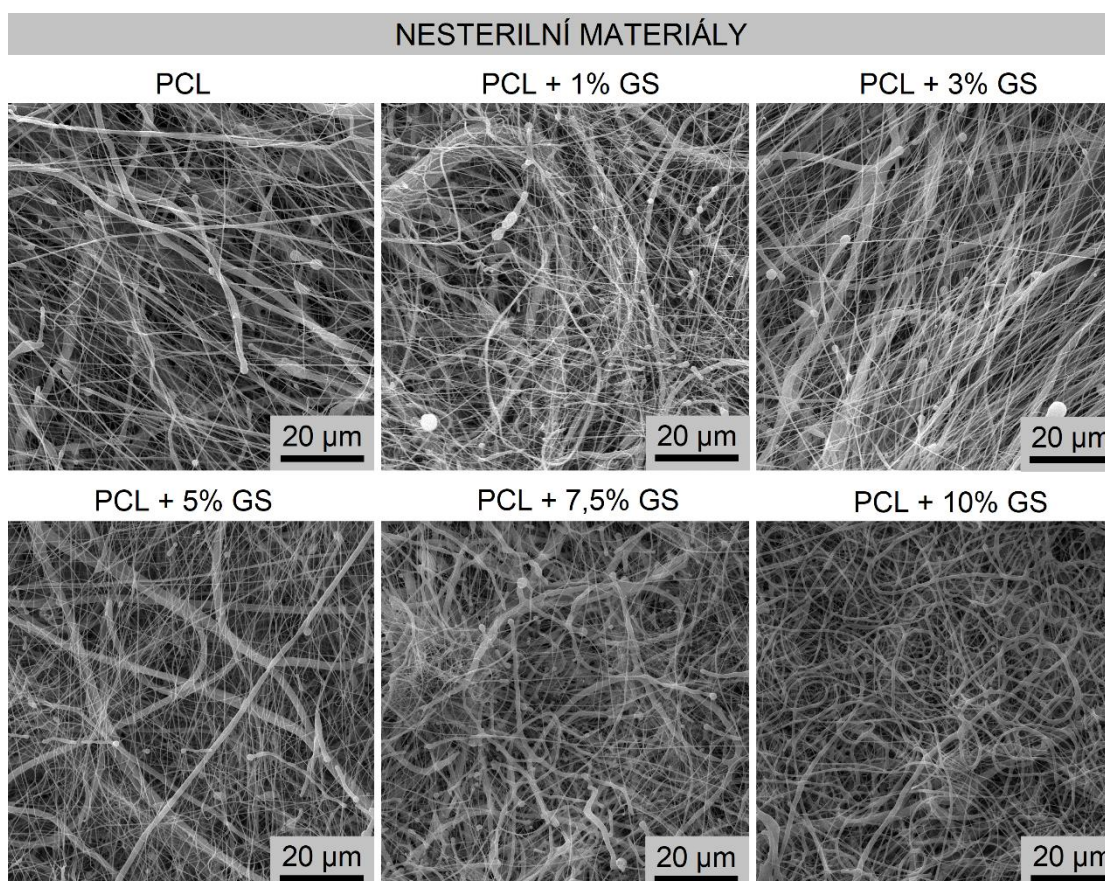
Tabulka 3: Přehled zvlákněných roztoků a název výsledných vrstev dále v práci

Polymerní roztok	Koncentrace antibiotika (počítána ze sušiny PCL)	Název materiálu dále v práci
16% PCL v CHEKO 8/1/1	0%	PCL
16% PCL v CHEKO 8/1/1	1%	PCL + 1% GS
16% PCL v CHEKO 8/1/1	3%	PCL + 3% GS
16% PCL v CHEKO 8/1/1	5%	PCL + 5% GS
16% PCL v CHEKO 8/1/1	7,5%	PCL + 7,5% GS
16% PCL v CHEKO 8/1/1	10%	PCL + 10% GS

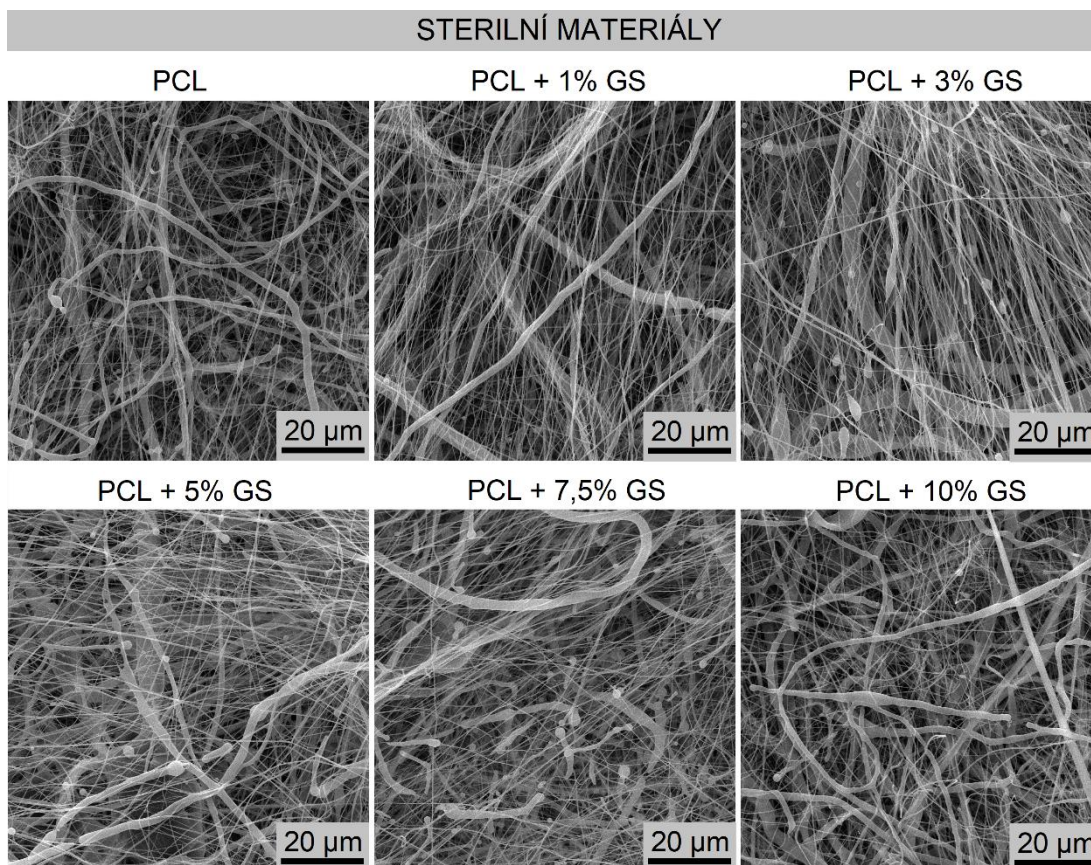
7.2.1. Morfologie nanovláknenných vrstev

Všechny vrstvy mají plošnou hmotnost 10 g/m^2 a jsou zvlákněny na podkladové textilií typu spunbond z polypropylenu. Pro mikroskopický pohled byly vrstvy sledovány a analyzovány skenovacím elektronovým mikroskopem. Na snímcích zvětšených 3000x na Obrázku 20 je vidět rozdílná morfologie nanovláknenných vrstev s různými koncentracemi antibiotika po zvláknění. Vrstvy jsou lehce defektní a je vidět, že se zvyšující se koncentrací jsou vrstvy defektní více a také méně orientované.

Na Obrázku 21 jsou snímky nanovláknenných vrstev po sterilizaci. Při porovnání Obrázku 21 s nesterilními vrstvami na Obrázku 20, lze vidět, že sterilizace ethylenoxidem nijak výrazně neovlivnila morfologii nanovláknenných vrstev.



Obrázek 20: Snímky z SEM nesterilních vrstev, zvětšení 3000x



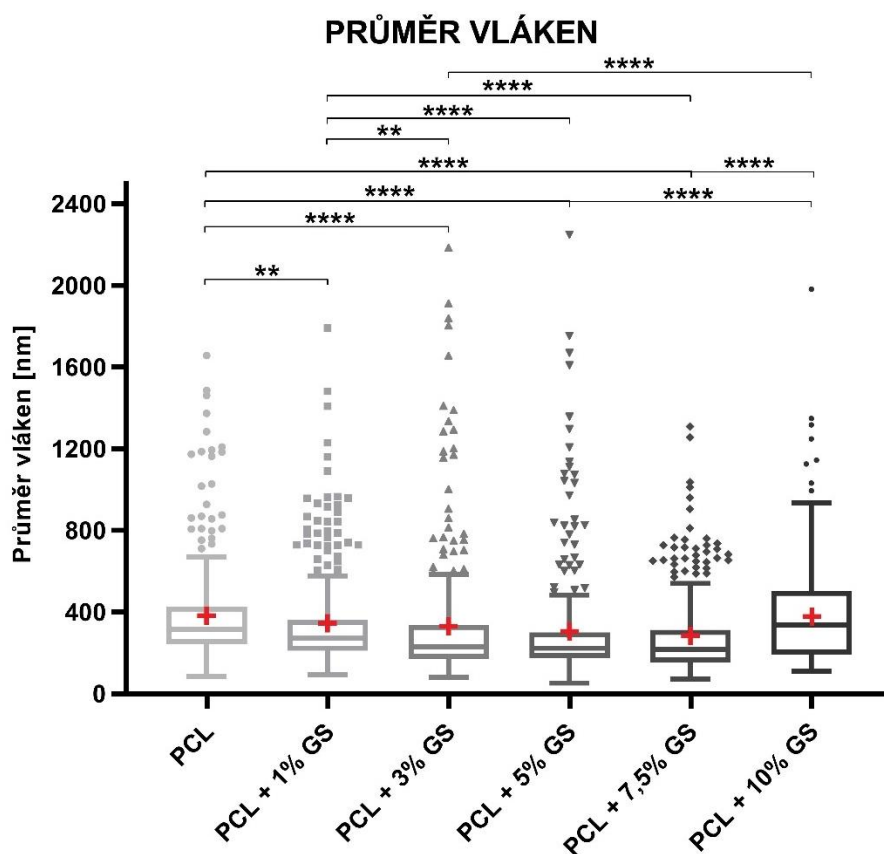
Obrázek 21: Snímky z SEM sterilních vrstev, zvětšení 3000x

7.2.2. Průměr vláken

Na SEM snímcích o zvětšení 5000x byly měřeny průměry vláken. Od každého materiálu bylo provedeno 300 měření. Průměrné průměry vláken a směrodatné odchylky jsou v Tabulce 4. Data jsou graficky znázorněna na Obrázku 22. Největší průměry vláken má materiál bez antibiotika PCL, průměrná hodnota ($382,92 \pm 239,86$) nm. Průměry vláken, u materiálů s antibiotikem se zvyšující se koncentrací, se snižují až do materiálu PCL + 10% GS. Tento materiál má větší průměry vláken, ($379,89 \pm 238,20$) nm, než ostatní materiály s antibiotikem, právě kvůli velkému množství defektů. Rozdíly mezi jednotlivými materiály jsou statisticky významné.

Tabulka 4: Průměry vláken a směrodatné odchylky

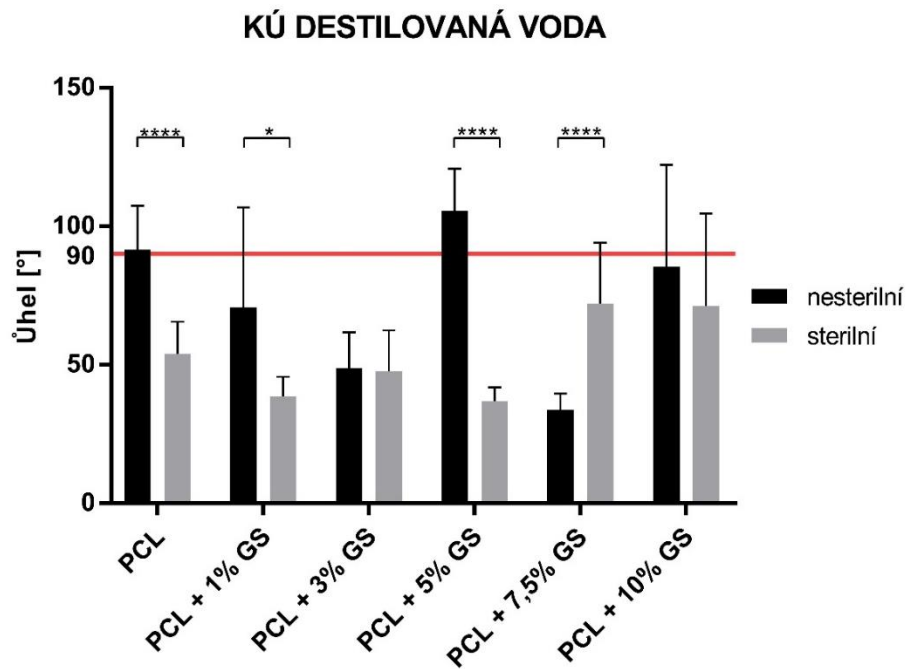
Materiál	Průměr \pm SD [nm]
PCL	$382,92 \pm 239,86$
PCL + 1% GS	$348,59 \pm 240,76$
PCL + 3% GS	$326,65 \pm 307,13$
PCL + 5% GS	$305,06 \pm 275,97$
PCL + 7,5% GS	$282,40 \pm 200,47$
PCL + 10% GS	$379,89 \pm 238,20$



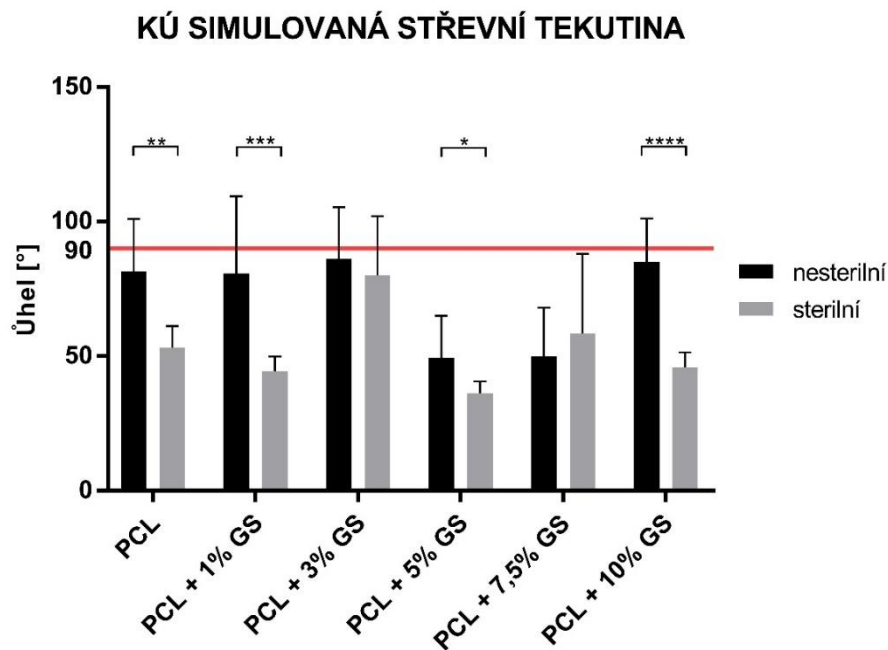
Obrázek 22: Krabicový graf průměrů vláken nesterilních materiálů, + značí průměrnou hodnotu, Tukey; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; ANOVA Kruskal-Wallis; $n=300$

7.2.3. Smáčivost vrstev

Velikost kontaktního úhlu určuje smáčivost vyrobených nanovlákných vrstev. Pokud je kontaktní úhel menší než 90° , je vrstva testovanou tekutinou smáčena. Avšak pokud je úhel větší než 90° , je vrstva nesmáčivá, v případě vody hydrofobní. Testované tekutiny byly destilovaná voda a simulovaná střevní tekutina. Simulovaná střevní tekutina byla připravena podle receptu v kapitole 6.7. Pro každý materiál s každou tekutinou bylo provedeno 10 měření. Byla také sledována změna smáčivosti po sterilizaci materiálů. Obrázky 23 a 24 zobrazují grafy kontaktních úhlů pro jednotlivé materiály, nesterilní i sterilní. Většina materiálů se jevila jako smáčivá destilovanou vodou a simulovanou střevní tekutinou. Pouze u nesterilních materiálů PCL a PCL + 5% GS při měření s destilovanou vodou byl kontaktní úhel větší než 90° a to konkrétně pro PCL ($91,6 \pm 15,9^\circ$) a pro PCL + 5% GS ($105,6 \pm 15,2^\circ$). Simulovanou střevní tekutinou byly smáčeny všechny materiály. Byly sledovány rozdíly mezi nesterilními a sterilními materiály a u většiny materiálů je rozdíl je statisticky významný. Vysoké směrodatné odchylky mohou být dány nízkým počtem měření nebo také použitou metodou měření.



Obrázek 23: Graf hodnot kontaktního úhlu vody, pro nesterilní a sterilní materiály; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; parametrický t-test; $n = 10$



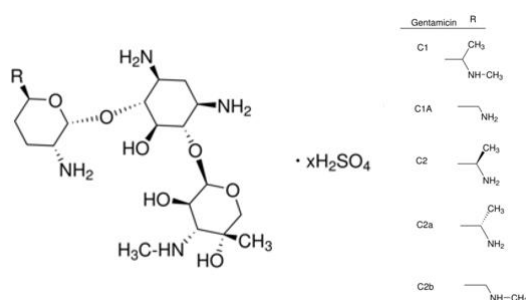
Obrázek 24: Graf hodnot kontaktního úhlu simulované střevní tekutiny, pro nesterilní a sterilní materiály; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; parametrický t-test, neparametrický t-test (Mann-Whitney test); $n = 10$

7.3. Testování obsahu a účinku antibiotika ve vrstvách

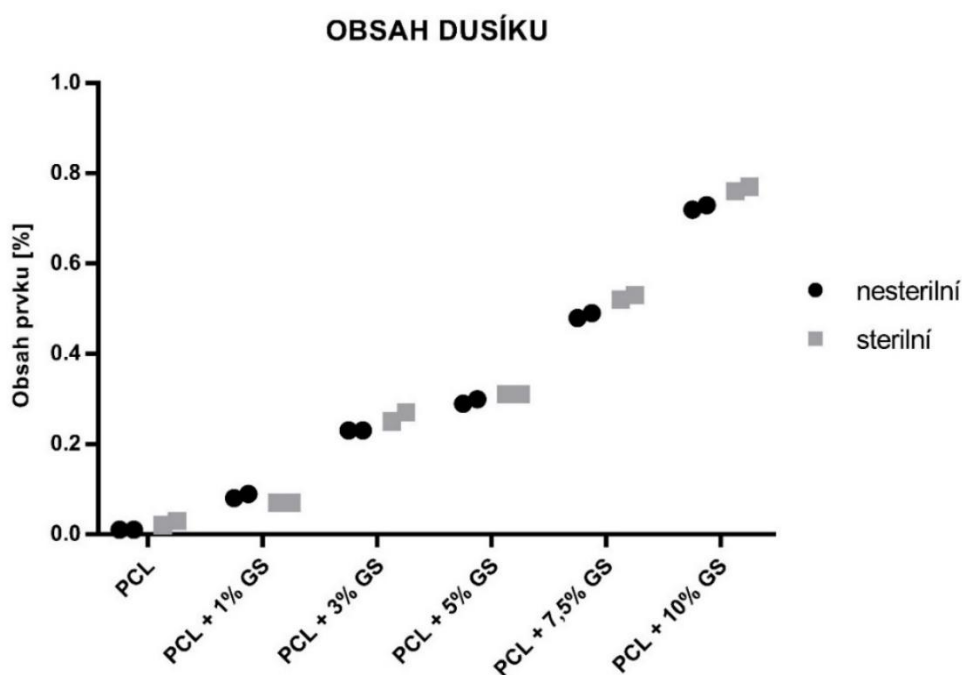
Bylo testováno, zdali je antibiotikum Gentamicin Sulfát přítomný v nanovlákněných vrstvách, jak vrstvy absorbují tekutiny, jestli nejsou cytotoxické, jaká je jejich cytokompatibilita a jestli mají vrstvy antibakteriální účinky.

7.3.1. Chemické složení nanovláčkových vrstev s antibiotikem

Pro určení chemického složení byla provedena elementární analýza. Touto analýzou je možné kvantitativně vyhodnotit obsah prvků ve vzorku. Bylo sledováno množství prvků dusíku a síry, jelikož Gentamicin Sulfát (Obrázek 25) inkorporovaný v nanovláčkové PCL vrstvě obsahuje aminové skupiny ($-NH_2$) a sulfáty, které vznikají odtržením vodíků z kyseliny sírové. Graf na Obrázku 26 zobrazuje naměřený hmotnostní procentuální obsah dusíku. Je zde vidět rostoucí trend, kdy s vyšší koncentrací antibiotika v materiálu roste naměřený obsah dusíku. Tento trend je potvrzen i u měření obsahu síry na grafu na Obrázku 27, avšak u materiálu sterilní PCL se jedno měření vychyluje. To může být způsobeno například vlhkostí vzorku či zbytkem rozpouštědla, což ovlivňuje měření. Nicméně ostatní měření i u nesterilních vzorků vykazují nulový obsah síry. Naměřené hodnoty jsou vyneseny v Tabulce 5 a 6.



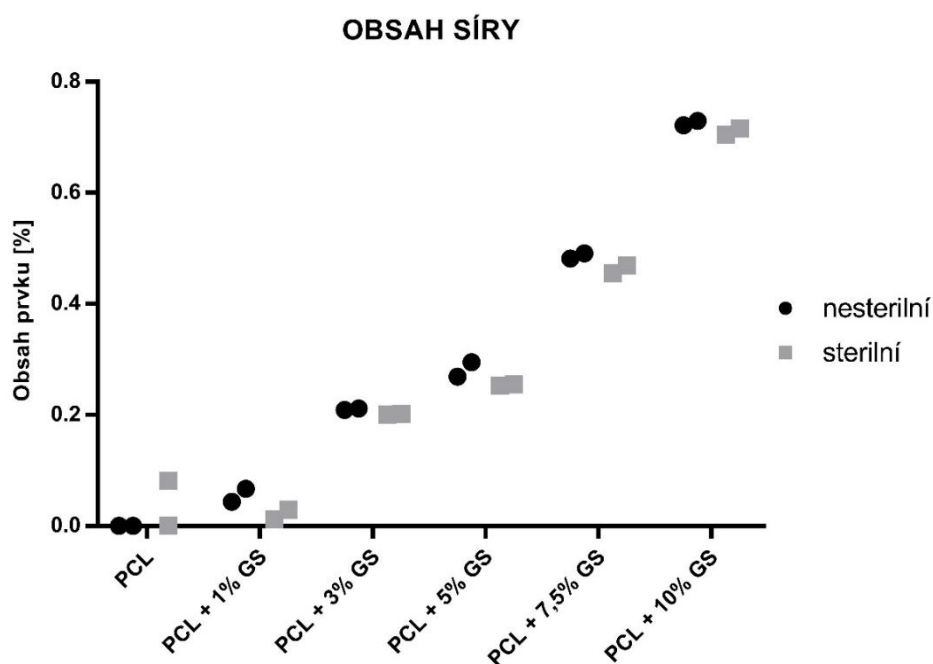
Obrázek 25: Struktura Gentamicinu sulfátu (Převzato ze Sigma Aldrich)



Obrázek 26: Graf obsahu dusíku v nanovláčkových vrstvách s antibiotikem, pro nesterilní i sterilní materiály, 2 měření z různých míst

Tabulka 5: Výsledky elementární analýzy – obsah dusíku v nesterilních i sterilních materiálech

Obsah dusíku	Nesterilní materiály [%]		Sterilní materiály [%]	
PCL	0,01	0,01	0,03	0,02
PCL + 1% GS	0,08	0,09	0,07	0,07
PCL + 3% GS	0,23	0,23	0,27	0,25
PCL + 5% GS	0,29	0,30	0,31	0,31
PCL + 7,5% GS	0,49	0,48	0,52	0,53
PCL + 10% GS	0,73	0,72	0,76	0,77



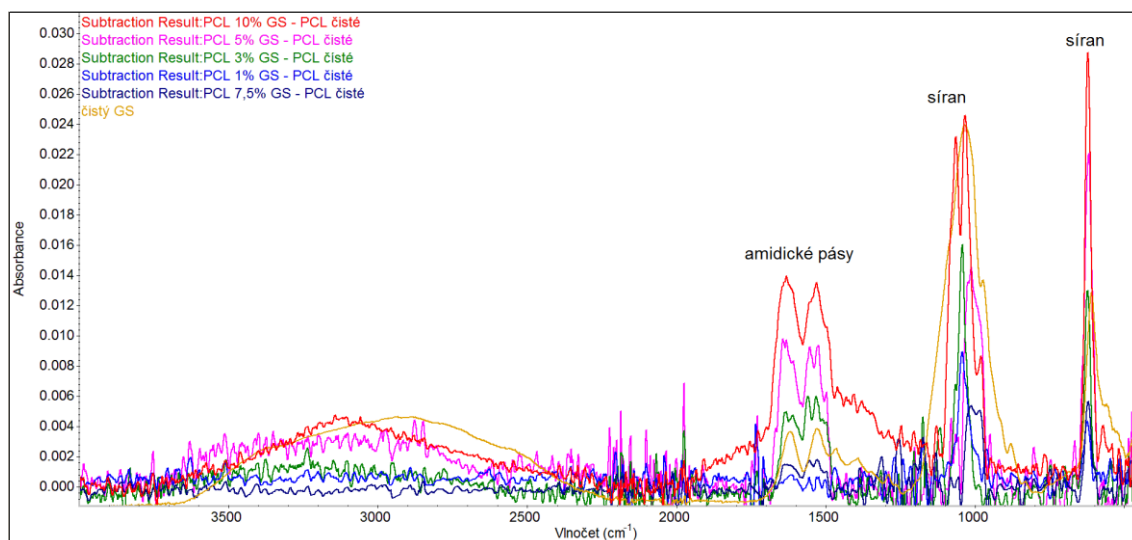
Obrázek 27: Graf obsahu síry v nanovlákněných vrstvách s antibiotikem, pro nesterilní i sterilní materiály, 2 měření z různých míst

Tabulka 6: Výsledky elementární analýzy – obsah síry v nesterilních i sterilních materiálech

Obsah síry	Nesterilní materiály [%]		Sterilní materiály [%]	
PCL	0	0	0,08	0
PCL + 1% GS	0,05	0,07	0,03	0,01
PCL + 3% GS	0,21	0,21	0,20	0,20
PCL + 5% GS	0,27	0,30	0,26	0,25
PCL + 7,5% GS	0,48	0,49	0,46	0,47
PCL + 10% GS	0,72	0,73	0,70	0,72

Další analýzou, kterou je možné vyhodnotit chemické sloužení je infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací. FTIR analýza je kvalitativní analýza a na rozdíl od elementární analýzy, kde se hodnotí obsah prvků, FTIR analýza vyhodnocuje, jaké molekuly se na základě absorbance vlnění nachází ve vzorku.

Bylo měřeno čisté antibiotikum GS a všechny materiály s obsahem GS. Na Obrázku 28 je absorbanční rozdílové spektrum z FTIR měření nesterilních materiálů. Píky jsou u vlnočtu cca 1600 cm^{-1} což odpovídá amidickým pásům, a to odpovídá vibračním vazeb mezi -CO a mezi -NH₂, které jsou také obsaženy v molekule antibiotika GS (viz Obrázek 25). Pík u vlnočtu cca 1000 cm^{-1} odpovídá síranům (sulfátům), tedy vibračním vazby S=O.

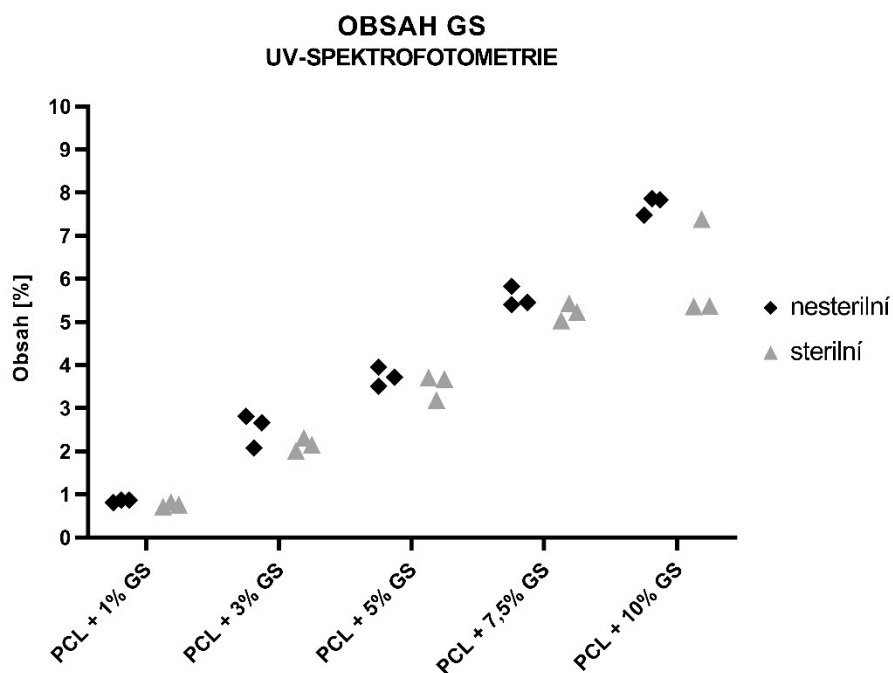


Obrázek 28: Absorbanční rozdílová spektra FTIR pro nesterilní materiály, ze kterých byla odečtena spektra PCL

7.3.2. Obsah antibiotika v nanovlákněných vrstvách

Pro potvrzení obsahu antibiotika GS byla provedena kvantifikace pomocí UV-spektrofotometrie a vysoko-účinné kapalinové chromatografie panem prof. RNDr. Daliborem Šatínským, Ph.D. z Farmaceutické fakulty Karlovy Univerzity v Hradci Králové.

Na Obrázku 29 je graf s výsledky z měření na UV-spektrofotometru, kdy byl měřen obsah antibiotika GS ve vrstvách pomocí měření intenzity zbarvení fialového komplexu gentamicin-ninhydrin. Byly měřeny nesterilní i sterilní vzorky z různých míst. Graf ukazuje, že naměřený obsah antibiotika GS se zvyšuje s vyššími koncentracemi GS ve vrstvách. Podařilo se inkorporovat antibiotikum do nanovlákněných vrstev, avšak naměřený obsah je nižší než připravená koncentrace antibiotika do polymerních roztoků. U materiálu PCL + 10% GS jsou u sterilních materiálů, některé hodnoty nižší, to může být dáno nerovnoměrnou distribucí GS v nanovlákněné vrstvě, právě kvůli vysoké koncentraci, která zapříčinila, že se polymerní roztok hůře a pomalu zvlákňoval. Materiál PCL bez antibiotika nebyl měřen. Hodnoty jsou zobrazeny v Tabulce 7.

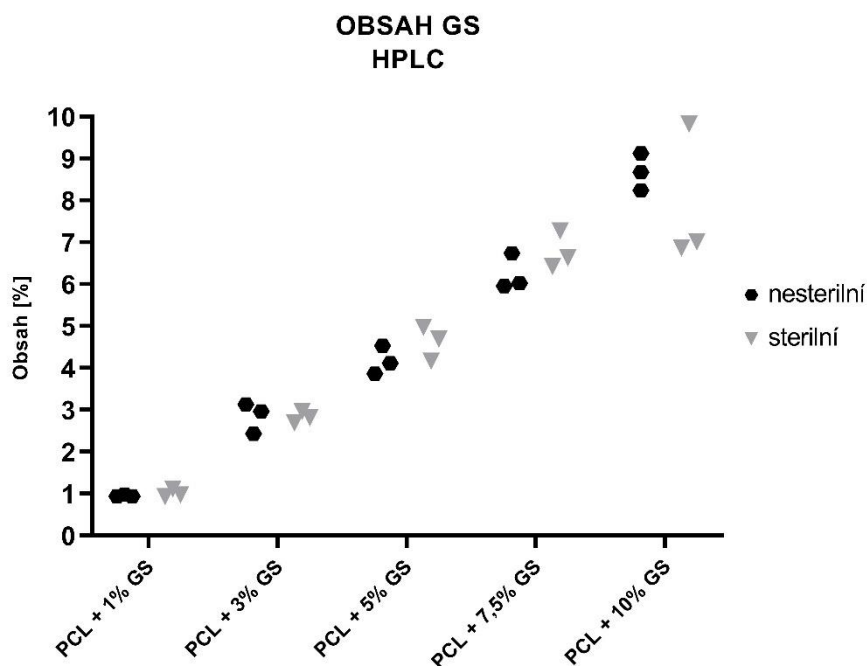


Obrázek 29: Graf měření komplexu gentamicin-ninhydrin na UV-spektrofotometru, což odpovídá procentuálnímu obsahu GS ve vrstvách, 3 měření z různých míst

Tabulka 7: Hodnoty naměřené UV – spektrofotometrií

Materiál	Nesterilní materiály [%]			Sterilní materiály [%]		
PCL + 1% GS	0,81	0,87	0,87	0,82	0,71	0,76
PCL + 3% GS	2,08	2,66	2,81	2,01	2,15	2,31
PCL + 5% GS	3,95	3,51	3,72	3,71	3,19	3,68
PCL + 7,5% GS	5,83	5,45	5,40	5,43	5,23	5,04
PCL + 10% GS	7,84	7,48	7,68	7,39	5,37	5,36

Obrázek 30 zobrazuje graf naměřených hodnot z vysoko-účinné kapalinové chromatografie. Byly měřeny nesterilní i sterilní vzorky z různých míst. Výsledky korespondují s výsledky z UV-spektrofotometrie, je zde opět potvrzeno, že se antibiotikum podařilo inkorporovat do nanovlákných vrstev. Stejně jako u UV-spektrofotometrie, pro sterilní materiál PCL + 10% GS byly naměřeny některé hodnoty nižší, což opět může být dáno nerovnoměrnou distribucí antibiotika ve vrstvách. Konkrétní hodnoty jsou poznamenány v Tabulce 8.



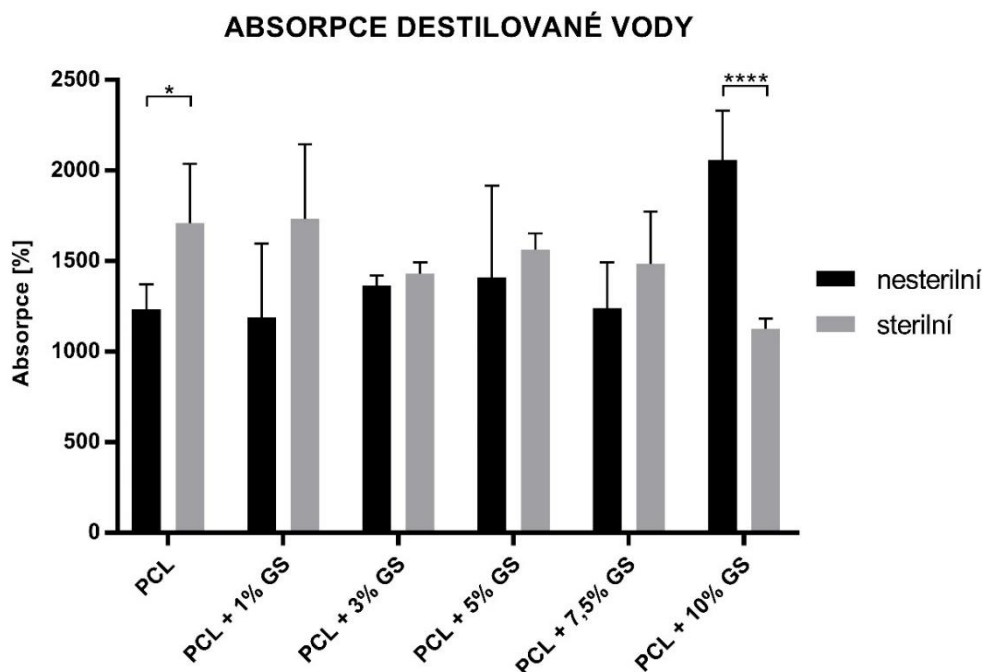
Obrázek 30: Graf měření komplexu gentamicin-ninhydrin na HPLC, což odpovídá procentuálnímu obsahu GS ve vrstvách, 3 měření z různých míst

Tabulka 8: Hodnoty naměřené pomocí HPLC

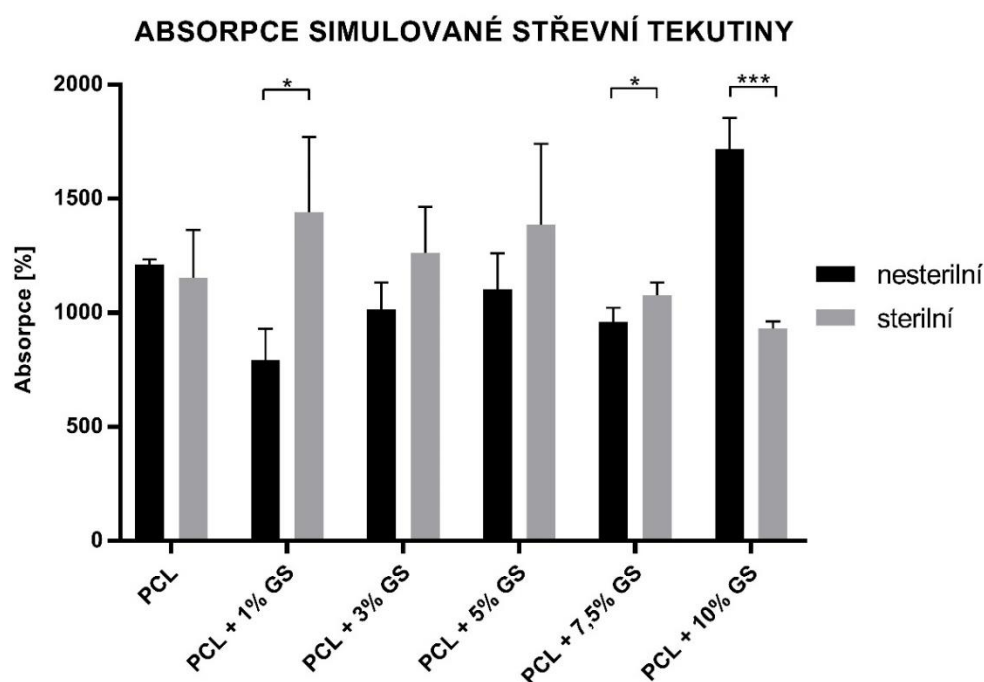
Materiál	Nesterilní materiály [%]			Sterilní materiály [%]		
PCL + 1% GS	0,94	0,98	0,94	1,11	0,93	0,97
PCL + 3% GS	2,43	2,96	3,13	2,69	2,81	2,96
PCL + 5% GS	4,53	3,86	4,11	4,97	4,16	4,69
PCL + 7,5% GS	6,74	6,02	5,95	7,27	6,63	6,42
PCL + 10% GS	9,12	8,24	3,67	9,82	7,01	6,86

7.3.3. Absorpce tekutin a změna hmotnosti vlivem absorpce

Chování materiálů v kontaktu s tekutinou bylo také testováno metodou absorpce. Absorpce byla testována s destilovanou vodou a simulovanou střevní tekutinou. Hodnota absorpce byla vypočítána podle rovnice (1) v kapitole 6.12. Výsledky experimentu jsou graficky zobrazeny na Obrázcích 31 a 32. Největší hodnotu absorpce vody i simulované střevní tekutiny má materiál nesterilní PCL + 10% GS. To může být způsobeno největším obsahem antibiotika GS ve vláknech, které je ve vodě rozpustné. Avšak hodnoty absorpce sterilních materiálů PCL + 10% GS toto nepotvrzují, absorpce je nižší. U ostatních materiálů jsou hodnoty absorpce u sterilních materiálů vyšší než u nesterilních. Data mají také velké směrodatné odchylky. To je dáno metodikou experimentu, kdy mohlo dojít k rozdílnému vysušení vzorků před vážením.



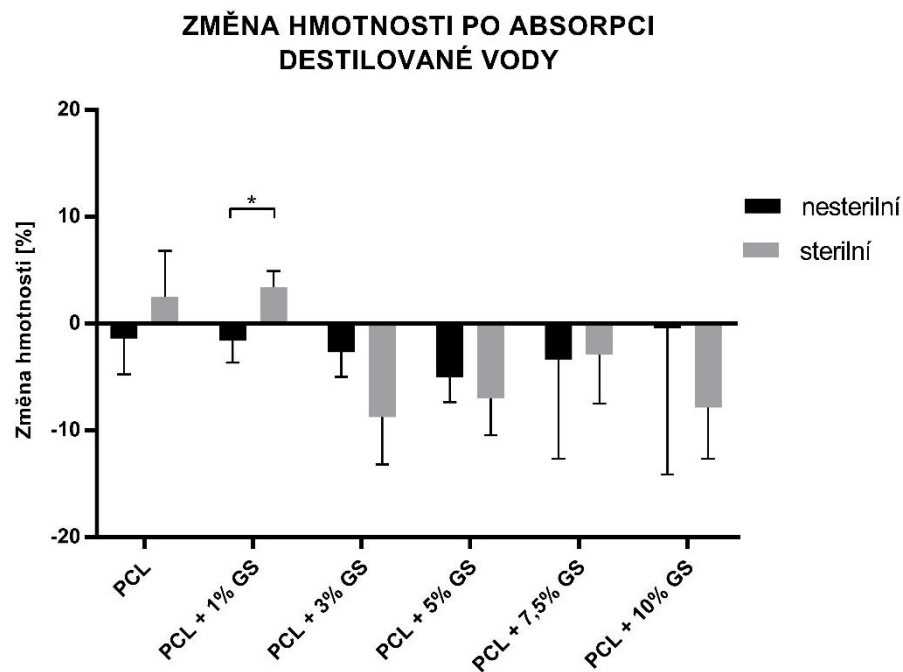
Obrázek 31: Graf průměrné hodnoty absorpce destilované vody pro nesterilní a sterilní materiály; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; parametrický *t*-test, neparametrický *t*-test (Mann-Whitney test); $n=5$



Obrázek 32: Graf průměrné hodnoty absorpce simulované střevní tekutiny pro nesterilní a sterilní materiály; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; parametrický *t*-test, neparametrický *t*-test (Mann-Whitney test); $n=5$

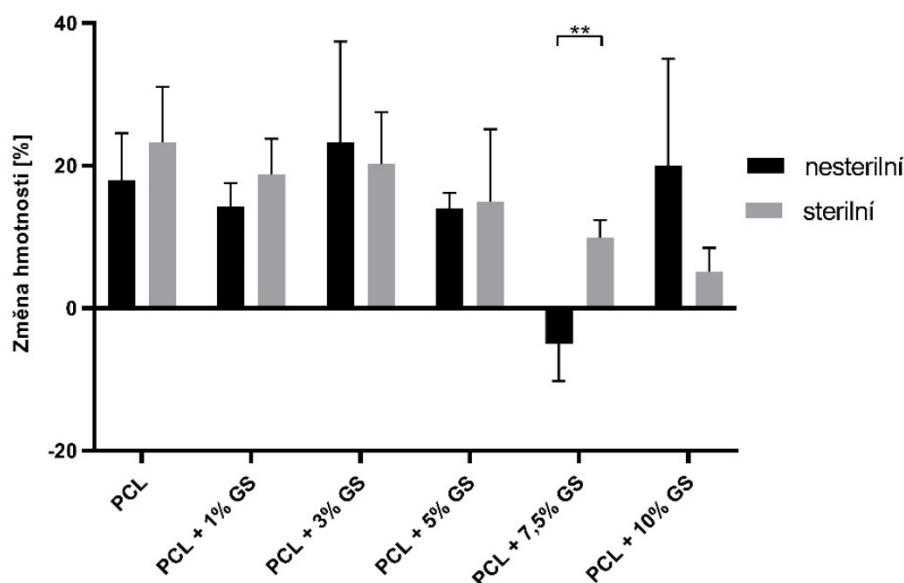
Během absorpce byla také sledována změna hmotnosti vzorků po absorpci podle rovnice (2) v kapitole 6.12. Na Obrázku 33 je graficky zobrazena změna hmotnosti materiálů po absorpci destilované vody a na Obrázku 34 je graf změny hmotnosti po absorpci

simulované střevní tekutiny. V porovnání změny hmotnosti po absorpci vody a simulované střevní tekutiny je vidět, že materiály, které absorbovaly vodu mají procentuální změnu hmotnosti zápornou. Došlo tedy k úbytku materiálu a snížení hmotnosti. Antibiotikum GS je ve vodě rozpustné, tudíž ve vodném prostředí se antibiotikum uvolnilo a rozpustilo. Materiály, které byly zality simulovanou střevní tekutinou mají ve většině případů kladnou procentuální změnu hmotnosti. Došlo ke zvýšení hmotnosti po absorpci. Materiály při kontaktu se simulovanou střevní tekutinou nabobtnaly, což ukazuje schopnost tohoto materiálu absorbovat případný únik obsahu střev při aplikaci tohoto materiálu na střevní anastomózu. Hodnoty některých materiálů jsou odchýlené od trendů, to může být dáno metodikou, kdy nebylo zcela možné vysušit před vážením všechny vzorky stejně.



Obrázek 33: Graf změny hmotnosti vzorků po absorpci destilované vody pro nesterilní a sterilní materiály; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; parametrický t -test; $n=5$

ZMĚNA HMOTNOSTI PO ABSORPCI SIMULOVANÉ STŘEVNÍ TEKUTINY



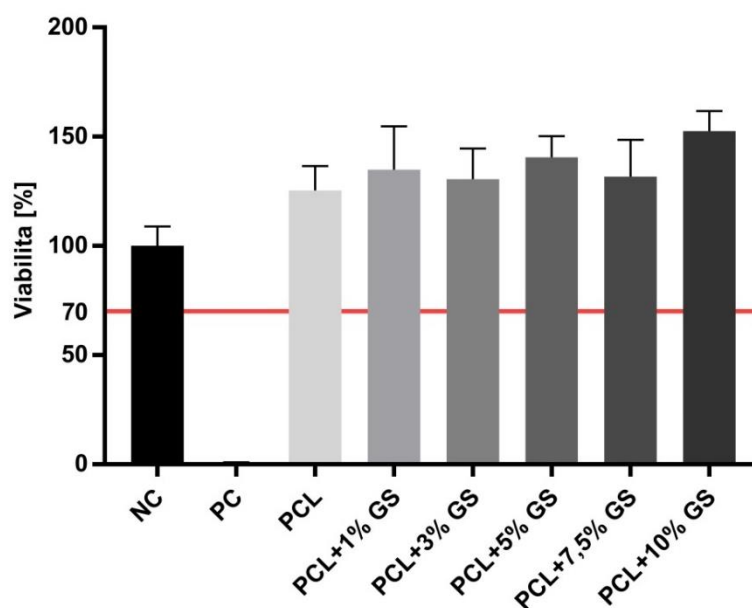
Obrázek 34: Graf změny hmotnosti vzorků po absorpci simulované střevní tekutiny, nesterilní a sterilní materiály; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; parametrický t -test; $n=5$

7.3.4. Cytotoxicita extraktů materiálů

Bylo testováno, jestli jsou extraktů materiálů cytotoxické. Extrakty byly přidány k buněčné linii 3T3 myší fibroblasty a inkubovány po dobu 24 hodin. Následně byla hodnocena viabilita pomocí metabolického kolorimetrického testu MTT. Viabilita neboli životaschopnost buněk byla hodnocena v procentech. Podle normy ČSN EN ISO 10993-5 je hraniční hodnota viability 70 %, nižší procentuální viabilita značí cytotoxicitu.

Otázkou bylo, jestli některá koncentrace antibiotika může být cytotoxická pro buňky. Na Obrázku 35 je graf procentuální viability pro jednotlivé extrakty materiálů. Hraniční hodnotu cytotoxicity značí v grafu červená čára. Hodnoty materiálů byly posuzovány podle negativní kontroly (NC), což byly pouze buňky v médiu DMEM a značí tak 100% viabilitu. Pozitivní kontrolou (PC) byly buňky v roztoku média a Tritonu-X, který je pro buňky cytotoxický. Z grafu je vidět, že všechny materiály s antibiotiky i bez, nejsou cytotoxické.

CYTOTOXICITA EXTRAKTŮ MATERIÁLŮ



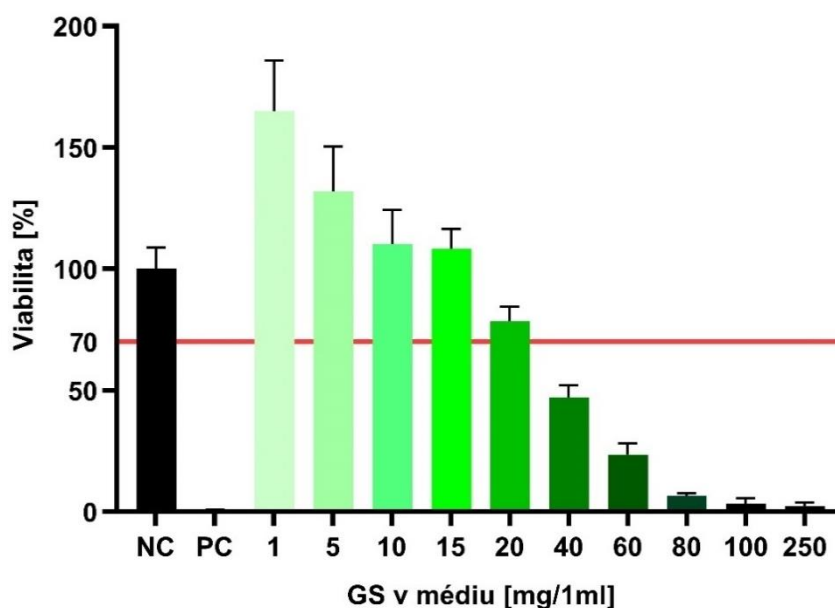
Obrázek 35: Graf buněčné viability buněčné linie 3T3 myších fibroblastů, extrakty inkubovány 24 hodin, NC – negativní kontrola (buňky pouze v médiu DMEM, normální konfluence buněk), PC – pozitivní kontrola (buňky usmrcené Tritonem-X)

7.3.5. Cytotoxicita Gentamicinu sulfátu v médiu

Byla sledována i samotná cytotoxicita antibiotika GS. Byly připraveny koncentrace GS 1; 5; 10; 15; 20; 40; 60; 80; 100 a 250 mg GS v 1 ml média DMEM a 24 hodin inkubovány společně s buněčnou linií 3T3 myší fibroblasty.

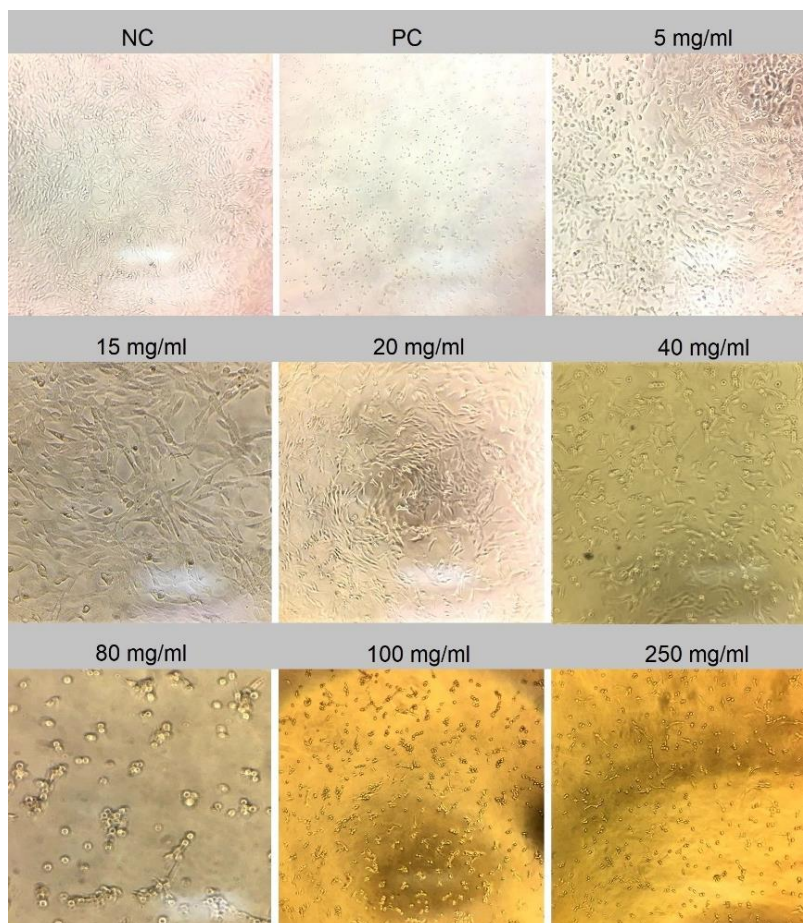
Na Obrázku 36 je graf buněčné viability pro jednotlivé koncentrace GS v 1 ml média DMEM. Červená čára značí hranici cytotoxicity 70 %. Negativní kontrola (NC) jsou buňky pouze v médiu, pozitivní kontrola (PC) jsou buňky usmrcené Tritonem-X. Zvolené koncentrace GS pro tento experiment vychází z koncentrace GS, která byla přidána do polymerních roztoků. Pro přípravu polymerního roztoku pro materiál PCL + 1% GS, bylo přidáno 160 mg GS do 100 ml roztoku. Vychází tedy, že v 1ml roztoku je 1,6 mg GS. Pro nejvyšší koncentraci tedy 10 % GS, vychází 16 mg v 1 ml roztoku. Obě tyto koncentrace čistého antibiotika GS v médiu, nevyšly jako cytotoxické. Tedy bylo ověřeno, že i nejvyšší koncentrace GS v materiálu není cytotoxická a tyto výsledky se shodují s výsledky z předešlé kapitoly, kde žádný z extraktů materiálů nevyšel jako cytotoxický. Buňky po inkubaci v koncentraci 20 mg/1 ml měly viabilitu ($78,37 \pm 6,03$) % a tato koncentrace ještě není cytotoxická. Koncentrace 40 mg GS v 1 ml média a vyšší koncentrace mají viabilitu nižší než 70 % a jsou již cytotoxické.

CYTOTOXICITA GS V MÉDIU



Obrázek 36: Graf viability buněčné linie 3T3 myších fibroblastů, extrakty inkubovány 24 hodin, NC – negativní kontrola (buňky pouze v médiu DMEM, normální konfluence buněk), PC – pozitivní kontrola (buňky usmrcené Tritonem-X)

Buňky inkubované s GS v médiu byly sledovány vizuálně pomocí mikroskopu po 24 hodinách inkubace. Fotografie buněk v kultivační destičce jsou na Obrázku 37. Je zde vidět, že pro koncentraci GS 5; 15 a 20 mg/ml média mají buňky typický tvar pro 3T3 myší fibroblasty – buňky jsou roztáhlé s nepravidelnými výběžky. Koncentrace 40 mg GS v 1 ml média je již cytotoxická, některé buňky již změnilly tvar a nejsou roztáhlé. Na fotografiích koncentrací 80, 100 a 250 mg GS v 1 ml média je většina buněk již usmrcená, buňky mají zakulacený tvar a nejsou roztáhlé.



Obrázek 37: Fotografie buněk inkubovaných 24 hodin v GS v ml o koncentracích GS: 5; 15; 20; 40; 80; 100 a 250 mg v 1 ml média, NC – negativní kontrola (buňky pouze v médiu DMEM, normální konfluenci buněk), PC – pozitivní kontrola (buňky usmrčené Tritonem-X), optický mikroskop, zvětšení 100x

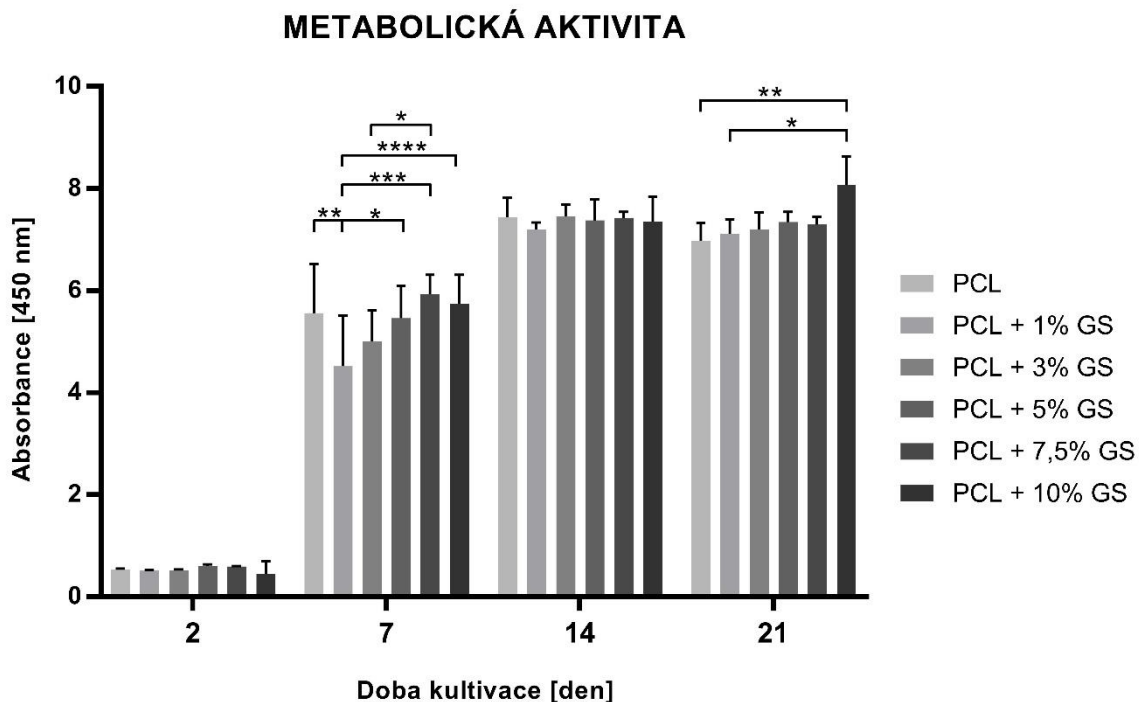
7.3.6. *In vitro* test buněčné adheze a proliferace

Po dobu 21 dní byly materiály testovány *in vitro*. Na materiály byla nasazena buněčná linie 3T3 myši fibroblasty a byla sledována buněčná adheze a proliferace. Druhý, sedmý, čtrnáctý a dvacátý první den se hodnotila metabolická aktivita buněk, počet buněk na materiálech a buňky byly také sledovány mikroskopii – fluorescenční a skenovací elektronovou.

Na Obrázku 38 je graf metabolické aktivity hodnocen pomocí metabolického testu CCK-8. Absorbance odpovídá metabolické aktivitě neboli viabilitě. Druhý testovací den byla absorbance velmi malá, ale během 7 dní se metabolická aktivita buněk výrazně zvýšila. Po 14 dnech a 21 dnech došlo k nárůstu absorbance, avšak u všech materiálů, kromě PCL + 10% GS, byla absorbance 21. den lehce nižší než 14. den. To může být dáno tím, že po 21 dnech kultivace byly materiály zcela celé porostlé, což ilustruje Obrázek 39, kde jsou snímky z fluorescenčního mikroskopu. Buňky tak po delší době

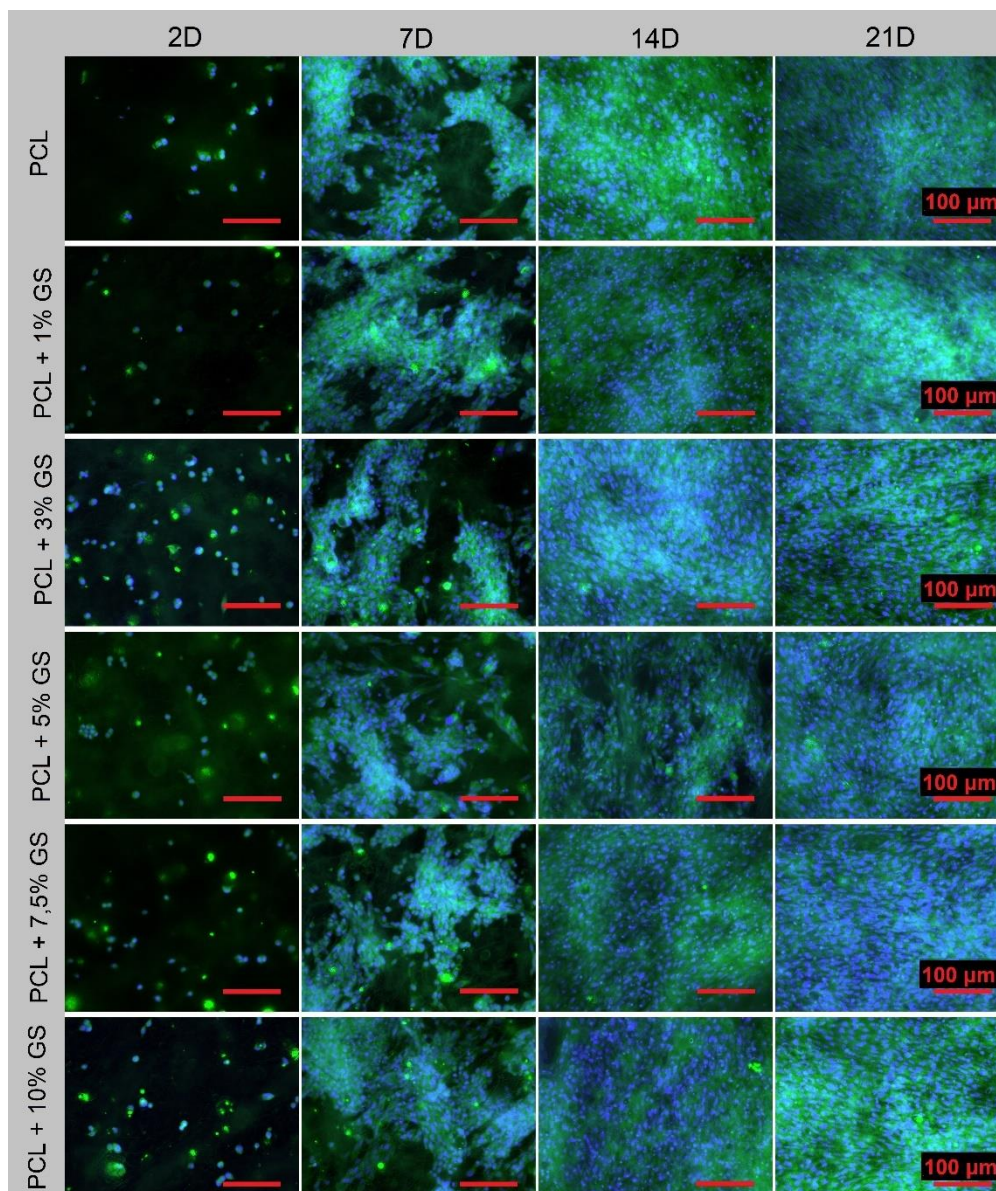
kultivace neměly prostor a ani výživu z média, které se při velkém počtu buněk rychleji spotřebovává. Významné statistické rozdíly jsou mezi jednotlivými materiály 7. a 21. den.

Kultivační médium DMEM obsahuje 1% směs antibiotik kvůli případným patogenům, které se mohou při kultivaci vyskytnout v kultuře. Větší koncentrace antibiotika uvolněného z vrstev by tak mohlo dodatečně likvidovat případné patogeny, které během delší doby kultivace směs antibiotik z média nezvládla zlikvidovat.



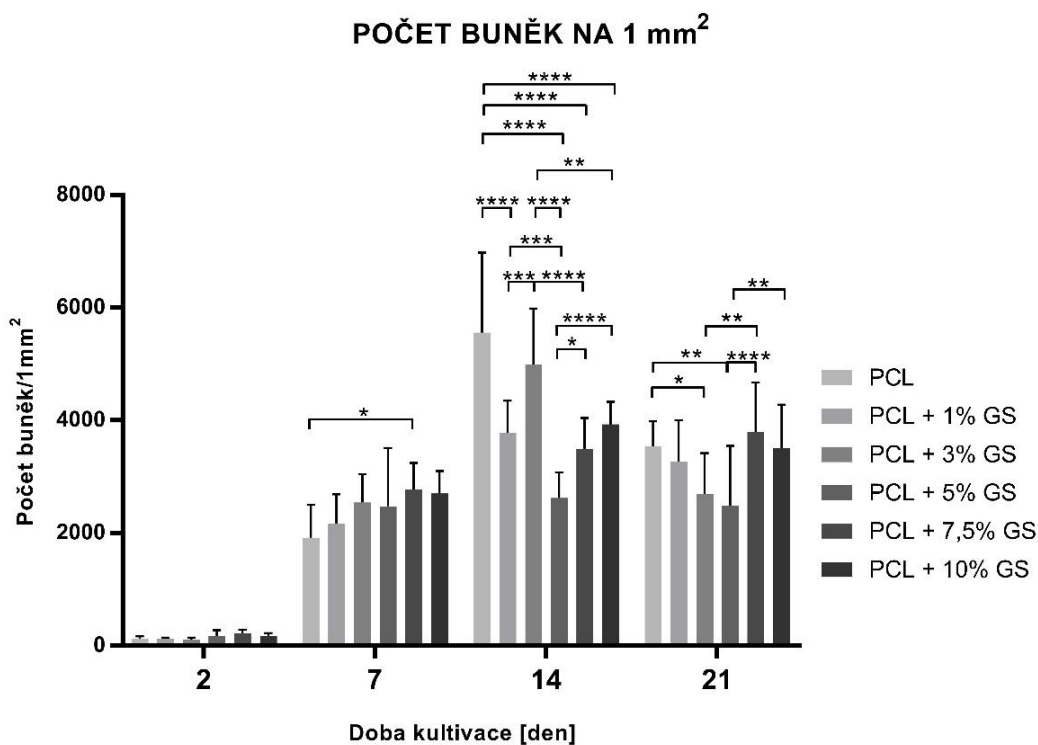
Obrázek 38: Graf metabolické aktivity buněčné linie 3T3 myších fibroblastů na nanovlákněných materiálech, 2.; 7.; 14. a 21. den testování; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; ANOVA. Bonferroni; $n = 5$

Na Obrázku 39 jsou snímky z fluorescenční mikroskopie, po 2; 7; 14 a 21 dnech kultivace pro každý materiál. Jádra buněk jsou obarvena modře a zeleně je obarvený buněčný cytoskelet. Druhý den je materiál buňkami velmi málo porostlý, sedmý den jsou materiály buňkami porostlé více, čtrnáctý a dvacátý první den jsou materiály již porostlé konfluentní vrstvou buněk. Toto pozorování tedy koresponduje s výsledky z metabolického testu na Obrázku 38, kdy více buněk značí větší metabolickou aktivitu.



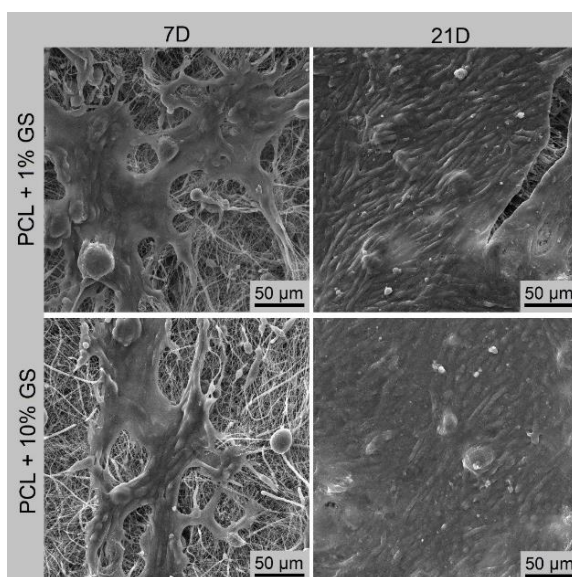
Obrázek 39: Snímky z fluorescenčního mikroskopu obarvených buněk na testovaných materiálech, buněčná jádra obarvená modře (DAPI), cytoskelet buněk obarven zeleně (Phalloidin-FICT); měřítko 100 μm

Pomocí programu MatLab byl vyhodnocen počet buněk na 1 mm^2 plochy materiálu. Výsledky jsou zobrazeny graficky na Obrázku 40. Sedmý, čtrnáctý a dvacátý první den testování jsou mezi materiály významné statistické rozdíly. U některých materiálů je dvacátý první den pokles počtu buněk. To souhlasí s výsledky z metabolického testu na Obrázku 38, kdy po 21 dnech kultivace bylo buněk mnoho, byly přerostlé, neměly místo a ani médium s živinami, proto došlo k lehkému úbytku počtu buněk.



Obrázek 40: Počet buněk 3T3 myších fibroblastů na 1 mm² plochy materiálu 2.; 7.; 14. a 21. den testování; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; ANOVA. Bonferroni; $n = 10$

Materiály byly také snímány pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Byly vybrány snímky materiálů PCL + 1% GS a PCL + 10% GS ze 7. a 21. dne testování (Obrázek 41). Sedmý den jsou pod necelistvou vrstvou buněk vidět nanovláknna, nicméně dvacátý první den jsou vrstvy zcela porostlé celistvou konfluentní vrstvou buněk.



Obrázek 41: Snímky z elektronového mikroskopu, materiály PCL + 1% GS a PCL + 10% GS po 7 a 21 dnech in vitro testování, měřítko 50 μm

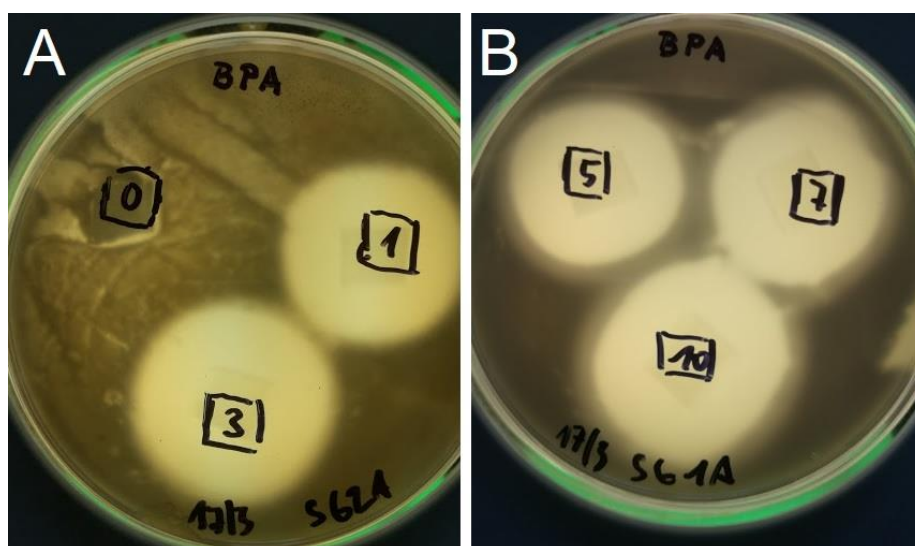
7.3.7. Antibakteriální testy

7.3.7.1. Difúzní test

1. Prvotní experiment

Před samotným experimentem byl proveden prvotní experiment, kdy byly připraveny vzorky o rozměru 10 × 10 mm a vloženy do agarů s buněčnou suspenzí. Testovaly se obě bakteriální kultury *Escherichia Coli* a *Staphylococcus gallinarum*. Byly sledovány inhibiční zóny, které se tvořily okolo vzorků. Inhibiční neboli také halo zóny se tvoří, když se bakterie snaží vyhnout působení antibiotika. Bakterie tak v místě a blízkém okolí materiálu neproliferují.

Na Obrázku 42 A a B jsou fotografie Petriho misek s agarem a vloženým materiálem. Testovaná bakteriální kultura byla *Staphylococcus gallinarum*. Materiály jsou označeny následovně na Obrázku 42 A: 0: PCL, 1: PCL + 1% GS, 3: PCL + 3% GS, na Obrázku 42 B: 5: PCL + 5% GS, 7: PCL + 7,5% GS, 10: PCL + 10% GS. Bakteriální kolonie *Staphylococcus gallinarum* vzniklé na agaru mají hnědošedou barvu, tedy bílá místa značí halo zóny. Materiál PCL bez antibiotika, který je Obrázku 42 A označen 0, sloužil jako kontrola. Je zde vidět, že u toho materiálu nedošlo ke vzniku žádné halo zóny, jelikož neobsahoval antibiotikum. Bakterie přes něj přerůstaly. U ostatních materiálů jsou halo zóny značně viditelné. V Tabulce 9 jsou poznamenané velikosti halo zón pro všechny materiály a obě bakteriální kultury.



Obrázek 42: Fotografie Petriho misek s Braid Parker agarem a inokulum bakterie *Staphylococcus gallinarum*, do kterých byly vloženy materiály rozměru 10 × 10 mm na 24 hodin a poté sledovány halo zóny; 0: PCL čistý, 1: PCL + 1% GS, 3: PCL + 3% GS, 5: PCL + 5% GS, 7: PCL + 7,5% GS, 10: PCL + 10% GS

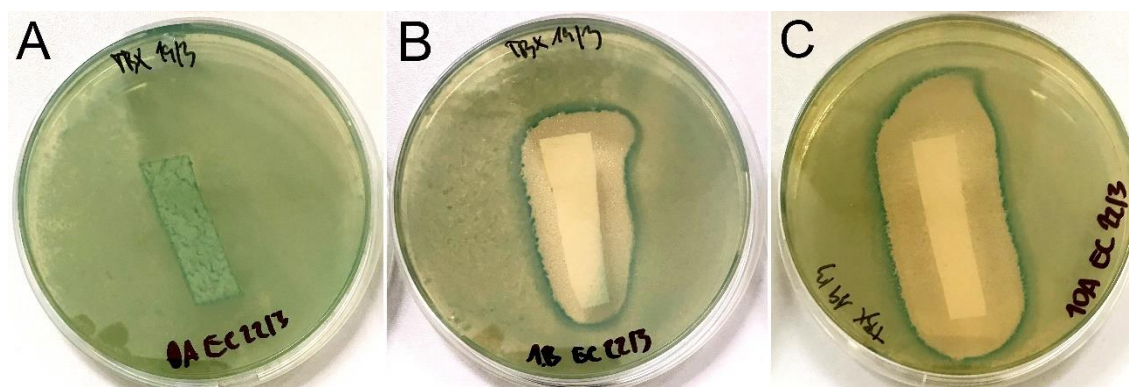
Tabulka 9: Průměrná velikost inhibičních zón, průměr ± SD

Bakteriální kultura	Průměrná velikost inhibiční zóny [mm] n=2	
	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
PCL	0 ± 0	0 ± 0
PCL + 1% GS	8,5 ± 0	8,9 ± 1,2
PCL + 3% GS	9,8 ± 0,4	9,4 ± 0,9
PCL + 5% GS	10,3 ± 0,4	9,2 ± 0,2
PCL + 7,5% GS	11 ± 0	9,5 ± 0
PCL + 10% GS	11,5 ± 0	11,3 ± 0,4

2. Difúzní Experiment

Pro potvrzení antibakteriální účinnosti nanovláknenných vrstev byl proveden rozsáhlejší experiment, kdy byl testován větší vzorek materiálů a byl vždy samostatně v Petriho misce. Velikost materiálu byla 10 × 40 mm. Byly testovány obě bakteriální kultury *Escherichia Coli* a *Staphylococcus gallinarum*.

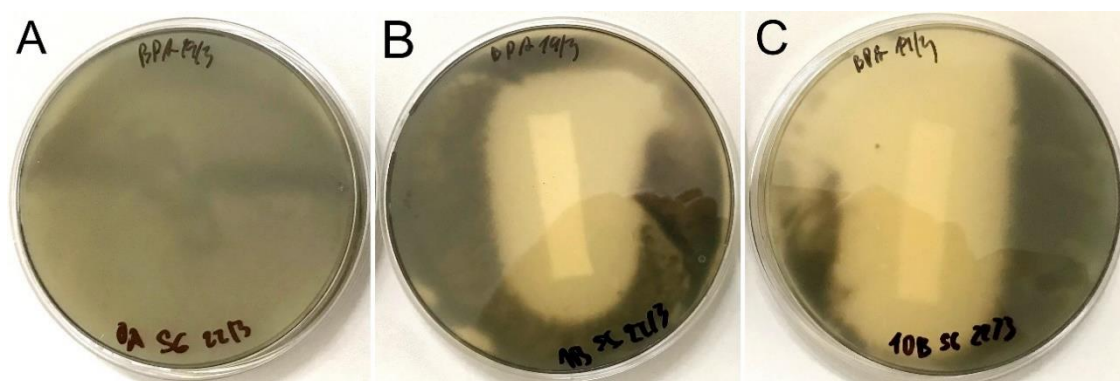
Na Obrázku 43 A, B, C jsou fotografie Petriho misek s bakteriální kulturou *Escherichia Coli* a vloženými materiály. Na Obrázku 43 A je PCL bez antibiotika, B: PCL + 1% GS, C: PCL + 10% GS. U materiálu PCL bez antibiotika se nevytvořily žádné halo zóny a bakterie přes materiál přerůstaly. U ostatních materiálů na Obrázku 43 B: PCL + 1% GS a C: PCL + 10% GS se vytvořily halo zóny, avšak u materiálu s vyšší koncentrací antibiotika PCL + 10% GS je halo zóna větší v porovnání s PCL + 1% GS. Odpovídají tomu i hodnoty v Tabulce 10.



Obrázek 43: Fotografie Petriho misek s Nutrient agar a inokulum bakterie *Escherichia Coli*, do kterých byly vloženy materiály rozměru 10 × 40 mm na 24 hodin a poté sledovány halo zóny;
A: PCL, B: PCL + 1% GS, C: PCL + 10% GS

Obrázek 44 A, B, C zobrazuje fotografie Petriho misek s bakteriální kulturou *Staphylococcus gallinarum*. Zde došlo pravděpodobně ke slítí inokula během manipulace a agar v misce nebyl rovnoměrně pokryt. Proto pak některé inhibiční zóny nebylo možné

naměřit a nebyly zcela jasné. Na Obrázku 44 B je materiál PCL +1% GS a C je materiál PCL +10% GS. Zde jsou halo zóny částečně viditelné a v porovnání s materiálem PCL bez antibiotika (Obrázek 44 A), kde nedošlo k vytvoření halo zóny, mají všechny materiály s antibiotikem antibakteriální účinky. Fotografie všech materiálů jsou vloženy v příloze.



Obrázek 44: Fotografie Petriho misek s Braid Parker agarem a inokulum bakterie *Staphylococcus gallinarum*, do kterých byly vloženy materiály rozměru 10 × 40 mm na 24 hodin a poté sledovány halo zóny; A: PCL, B: PCL + 1% GS, C: PCL + 10% GS

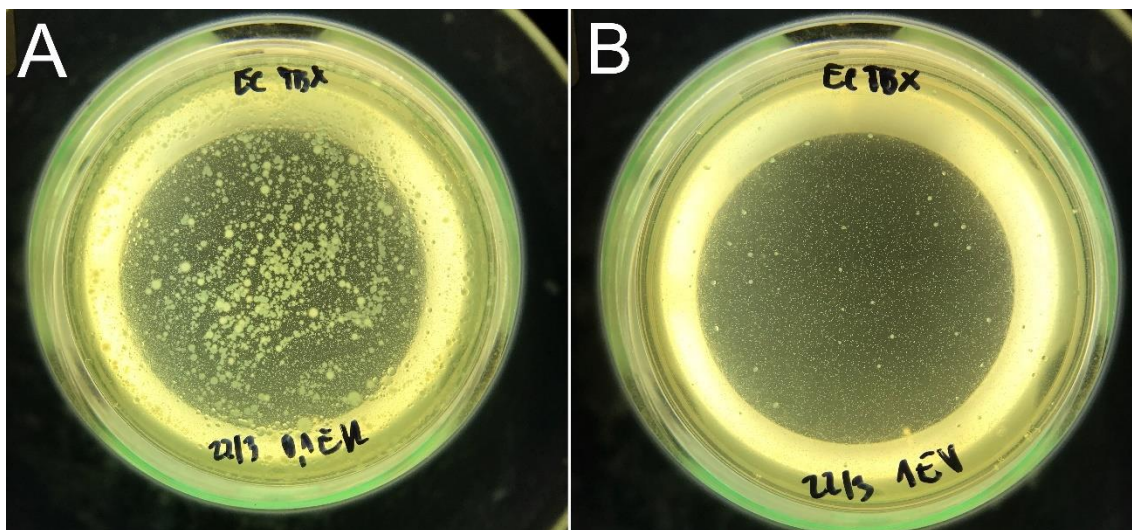
Tabulka 10: Průměrná velikost inhibičních zón, průměr ± SD

Bakteriální kultura	Průměrná velikost inhibiční zóny [mm]	
	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
PCL	0 ± 0	0 ± 0
PCL + 1% GS	6,4 ± 0,5	12,3 ± 0,5
PCL + 3% GS	7,6 ± 0,05	rozlité - neměřitelné
PCL + 5% GS	7,9 ± 0,7	rozlité - neměřitelné
PCL + 7,5% GS	8,7 ± 0,8	13,0 ± 0,9
PCL + 10% GS	10,0 ± 0,6	15,5 ± 0,5

7.3.7.2. Antibakteriální účinky extraktů

Pro potvrzení antibakteriálních účinků materiálu, byl proveden experiment, kdy byly hodnoceny účinky extraktů materiálu. Extrakty materiálu PCL + 5% GS louhované 4,5 hodiny v inokulu o různých koncentracích KTJ/ml byly napipetovány do Petriho misek a zality agarem. Stejně tak bylo napipetováno i samotné inokulum bez louhovaných extraktů. Po 24 hodinách inkubace bylo zjištěno, že u misek, kde bylo přidáno inokulum s extrakty materiálu vznikalo méně nových bakteriálních kolonií a byly velmi malé. Bakterie neproliferovaly tak jako v miskách, kde bylo inokulum bez extraktů. Vyhodnocení probíhalo vizuálně. Na Obrázku 45 A je čisté inokulum bez extraktů a na Obrázku 45 B je inokulum, ve kterém byly louhovány extrakty, o koncentraci

$3 \cdot 10^8$; KTJ/ml zamíchané v agaru. Je zde vidět, že na Obrázku 45 A došlo k nárůstu bakteriálních kolonií a je jich tam podstatně více než na Obrázku 45 B. To potvrzuje antibakteriální účinky extraktů materiálů.



Obrázek 45: Extrakty materiálů louhová v inokulum a zalité agarem: A – inokulum bez extraktů materiálu B - inokulum s extraktem materiálu PCL + 5% GS zalité agarem a inkubované 24 hodin při 37°C, koncentrace $3 \cdot 10^8$; KTJ/ml

8. Diskuse výsledků

V experimentální části byly vyvíjeny nanovlákněné vrstvy z poly- ϵ -kaprolakton (PCL), ve kterých bylo inkorporováno antibiotikum Gentamicin sulfát (GS).

Již několik publikací popsal inkorporaci různých antibiotik do nanovlákněných materiálů při elektrostatickém zvlákňování (*Gao et al. 2014; Sirc et al. 2012*). Inkorporace antibiotika GS do nanovlákněných vrstev z PCL byla popsána v publikacích *Ceylan et al. (2017)*, *Coimbra et al. (2019)*, *Pisani et al. (2019)*, *Khodir et al. (2019)*. Tyto publikace jsou popsány v kapitole 2.3. a byly částečně inspirací pro sestavení experimentální části.

8.1. Výběr polymeru a antibiotika

Pro výrobu nanovlákněných vrstev byl zvolen polymer PCL, jelikož je velmi často používaný jak v tkáňovém inženýrství, tak pro řízené uvolňování, tak i v jiných aplikacích. Je biodegradabilní, biokompatibilní, má dlouhou dobu degradace, má dobré mechanické vlastnosti a jeho hlavní výhodou pro je, že je již schválen federací pro kontrolu léčiv (FDA). (*Krchová et al. 2014; Kweon et al. 2003; Woodruff a Hutmacher 2010*)

PCL byl také zvolen, jelikož veškeré *in vivo* testy na prasatech byly provedeny právě s nanovlákněnými vrstvami z tohoto polymeru. Publikace *Rosendorf et al. (2020)*, *Rosendorf et al. (2021a)*, *Rosendorf et al. (2021b)* uvádějí, že nanovlákněné materiály z PCL se jeví jako biokompatibilní, bez imunitních odezev u zvířat a *in vivo* experimenty měly nulovou mortalitu. Tyto publikace dále uvádějí, že velkým problémem při hojení střevních anastomóz je přítomnost bakterií. Bylo tak vybráno vhodné antibiotikum pro inkorporaci do nanovlákněných materiálů.

Bylo vybráno antibiotikum Gentamicin sulfát. Toto antibiotikum právě působí na bakterie, které produkují enzym kolagenázu, která má za následek štěpení kolagenu v nově vznikající tkáni. Takovou bakterií je například *Pseudomonas aeruginosa*, která je představena v teoretické části v kapitole 4.1. (*Bednář et al. 1996; Shogan et al. 2015*). Antibiotikum uvolňující se z nanovlákněných vrstev na střevní anastomóze má tedy zabránovat vznikající infekci, zánětu a degradaci nově vzniklé a hojící se tkáně v místě střevní anastomózy. Antibiotikum GS bylo vybráno na základě konzultace

s prof. Ing. Jaroslavem Hrabákem, Ph.D. a prof. MUDr. Václavem Liškou, Ph.D. z Biomedicínského centra v Plzni.

8.2. Výroba nanovláknenných vrstev s inkorporovaným antibiotikem

Bylo vyrobeno šest vrstev. Pět vrstev obsahovalo různé koncentrace antibiotika GS a jedna vrstva byla pouze čisté PCL. V některých již zmíněných publikacích se pracovalo s koncentracemi 1; 3; či 10 hm. % GS (*Coimbra et al. 2019; Khodir et al. 2019; Pisani et al. 2019*), jiné publikace zvolily více koncentrací. Například *Ceylan et al. (2017)* uvádí koncentrace 2,5; 5 a 10 hm. % GS ve vrstvách. Pro tuto diplomovou práci byla tedy zvolena škála koncentrací GS 1; 3; 5; 7,5 a 10 hm. % ze sušiny polymeru.

Podle parametrů a průběhu zvlákňování se jevila koncentrace GS 10 % jako limitní, jelikož zvlákňování bylo pomalé a vrstvy byly defektní. Vyšší koncentrace GS v polymerním roztoku by se ještě obtížněji zvlákňovaly. Při hodnocení cytotoxicity bylo zjištěno, že množství antibiotika GS, které bylo přidáno do polymerního roztoku o koncentraci 10 % GS, ještě nebylo cytotoxické. Vyšší koncentrace antibiotika by již mohly být cytotoxické. Tudíž vyšší koncentrace antibiotika pro zvlákňování připraveny nebyly. Koncentrace GS byla počítána ze sušiny PCL a předpokládalo se, že přibližně takové koncentrace budou inkorporovány v nanovlákněch. Polymerní roztoky s antibiotikem byly zvlákňovány na bezjehlovém zařízení Nanospider™, což je rozdíl oproti již zmíněným publikacím, kde se zvlákňovalo z jehel. Využitím Nanospideru™ se také usnadňuje případný převod na průmyslovou výrobu výsledného materiálu, jelikož toto zařízení se běžně v průmyslu využívá.

Na základě snímků ze skenovacího elektronového mikroskopu, inkorporace antibiotika do nanovláknenných vrstev nijak více mikroskopicky neovlivnila morfologii vrstev. Většina materiálů měla průměrný průměr vláken v rozmezí 280 nm až 380 nm. Největší průměr vláken měl materiál PCL bez antibiotika ($382,92 \pm 239,86$) nm a naopak nejmenší měl materiál PCL + 7,5% GS ($282,40 \pm 200,47$) nm. Průměry jsou podobné jako u materiálů, které byly již testované *in vivo* ve studii *Rosendorf et al. (2021b)*, kde nanovláknenné vrstvy z PCL měly průměr vláken (385 ± 239) nm. V této studii měly testované vrstvy plošnou hmotnost 10 g/m^2 . Z *in vivo* testů bylo zjištěno, že vrstvy těchto plošných hmotností mají lepší vliv na hojení tkáně a rychleji resorbují. Proto byla výroba

vrstev v této diplomové práci optimalizována tak, aby vyrobené vrstvy měly tutéž plošnou hmotnost.

Byla hodnocena také smáčivost vrstev, která se hodnotila pomocí měření kontaktního úhlu metodou přisedlé kapky. Předpokladem bylo, že materiály s vyšší koncentrací antibiotika budou smáčet více, jelikož antibiotikum GS je rozpustné ve vodě. Přestože většina materiálů byla smáčivá vodou i simulovanou střevní tekutinou, tento předpoklad nebyl zcela potvrzen, hodnoty nedržely žádný trend v závislosti na koncentraci GS ve vrstvách. To může být způsobeno nerovnoměrným rozložením antibiotika GS ve vrstvách či použitou metodou, kterou velmi ovlivňuje lidský faktor. Materiály nesterilní PCL a nesterilní PCL + 5% GS se jevily jako nesmáčivé, jelikož pro ně byl naměřen kontaktní úhel větší než 90° , konkrétně pro PCL ($91,6 \pm 15,9^\circ$) a PCL + 5% GS ($105,6 \pm 15,2^\circ$), avšak po sterilizaci tyto materiály byly smáčeny testovanými tekutinami.

8.3. Testování obsahu a účinku antibiotika v nanovlákných vrstvách

Elementární analýzou bylo naměřeno, že se zvyšující koncentrací antibiotika v nanovlákných vrstvách se také zvyšuje obsah dusíku a síry. Oba tyto prvky jsou ve struktuře antibiotika GS. Byla také provedena infračervená mikroskopie (FTIR), kde byly naměřeny vibrace vazeb mezi molekulami, které jsou charakteristické pro antibiotikum GS.

Tyto výsledky však dokazují přítomnost prvků a molekul, které obsahuje antibiotikum GS. Pro vyhodnocení, zdali je ve vrstvách antibiotikum ve správně formě byla použita UV-spektrofotometrie a vysoko-účinná kapalinová chromatografie, kde byl měřen barevný komplex gentamicin-ninhydrin. Výsledky z UV-spektrofotometrie potvrzují rostoucí trend naměřeného obsahu GS se zvyšující se koncentrací GS ve vrstvách. Kvantifikace GS pomocí UV-spektrofotometrie při měření komplexu gentamicin-ninhydrin byla provedena i v jiných publikacích: *Ismail et al. (2016)* a *Pisani et al. (2019)*. Výsledky ze chromatografie také potvrzují vyšší obsah GS se zvyšující se koncentrací GS ve vrstvách. Antibiotikum se tedy podařilo inkorporovat do nanovlákných vrstev. Ve spolupráci s prof. RNDr. Daliborem Šatínským, Ph.D. byla metodika kvantifikace GS během práce optimalizována oproti současné literatuře. Byla použita taková vlnová délka (570 nm), při které se neabsorbovalo činidlo, ale jen komplex gentamicin-ninhydrin, kdy ninhydrin reaguje s primárními a sekundárními

aminoskupinami ve struktuře Gentamicinu sulfátu a vzniká tak fialově zabarvený komplex.

Metoda absorpce tekutin byla provedena na základě publikace *Choi et al. (2011)*. Vyhodnocovala se procentuální absorpce tekutin a změna hmotnosti materiálů podle rovnic (1) a (2) v kapitole 6.12. Absorpce sterilních i nesterilních materiálů se pohybovala v rozmezí 700 až 1700 %, u materiálu PCL + 10% GS až 2000 %. Materiály byly tedy během 24 hodin schopné absorbovat velké množství tekutin – destilované vody či simulované střevní tekutiny. Společně s absorpcí se hodnotila změna hmotnosti. Většina materiálů zalitých destilovanou vodou vykazovala ztrátu hmotnosti, jelikož antibiotikum GS je rozpustné ve vodě, tudíž došlo ke snížení hmotností vlivem rozpuštění a uvolnění antibiotika do vodného prostředí. Po absorpci simulované střevní tekutiny došlo k nárůstu hmotnosti. Tento trend nedrží nesterilní materiál PCL + 7,5% GS, zde došlo ke snížení hmotnosti. Odchýlení od trendu mohlo být způsobeno metodikou, kdy není možné zajistit stejné vysušení všech vzorků před vážením. Nárůst hmotnosti značí, že materiály jsou schopné absorbovat simulovanou střevní tekutinu a k vysušení dochází velmi pomalu. To by mohlo být pozitivní při aplikaci materiálu, kdy případný únik obsahu střev by mohl být materiálem zachycen a absorbován.

Polymerní nanovlákná z PCL byly již testovány *in vitro* na cytotoxicitu v některých publikacích (*Khodir et al. 2019; Klíčová et al. 2020*) a vycházejí jako necytotoxické a cytocompatibilní. Avšak bylo nutné otestovat cytotoxicitu a cytocompatibilitu materiálů s antibiotikem. Bylo nutné ověřit, zdali zvolené koncentrace antibiotika GS nejsou již cytotoxické. Byly testovány extrakty materiálů i samotné antibiotikum. Všechny materiály se jeví jako necytotoxické, naopak buněčná viabilita materiálů je větší než u buněk kultivovaných pouze v médiu (negativní kontrola). Koncentrace antibiotika GS v médiu, zvolené na základě množství, které bylo přidáváno do polymerních roztoků, byly také testovány na cytotoxicitu. Koncentrace 20 mg/1 ml byla ještě lehce nad hranicí cytotoxicity, avšak koncentrace 40 mg/1 ml byla cytotoxická pro testovanou buněčnou linii 3T3 myši fibroblasty.

Po dobu 21 dní byla sledována interakce buněk s materiály, což koresponduje s dobou pozorování zvířat u *in vivo* testů v již zmíněných publikacích (*Rosendorf et al. 2020; Rosendorf et al. 2021a; Rosendorf et al. 2021b*). Všechny materiály se jeví jako cytocompatibilní. Největší metabolická aktivita a největší počet buněk byl zaznamenán

14. den kultivace. Avšak 21. den došlo u většiny materiálů k lehkému poklesu metabolické aktivity buněk, a i počtu buněk, jelikož buněk bylo mnoho, již vytvořily na materiálu konfluentní vrstvu a neměly dostatek živin z média pro další proliferaci.

8.4. Antibakteriální účinky nanovlákných vrstev s antibiotikem

Uvolňování antibiotik či jiných aktivních látek z různých polymerních struktur jako jsou nanovlákná je obecně velmi složité. Musí se zahrnout vlastnosti materiálu: stupeň krystalinity, pórovitost, doba degradace, molekulová hmotnost, ohebnost řetězců; vlastnosti inkorporované látky: její hydrofobicita/hydrofilita, rozpustnost a použité množství; vnější prostředí: teplota, pH; vlastnosti celé polymerní struktury (nosiče): velikost, tvar, měrný povrch; a další parametry jako rychlost absorpce vody či osmolalita (Fredenberg *et al.* 2011). Obrázek 12 v kapitole 2.2. ilustruje komplexnost procesů a mechanismů uvolňování. Rychlost uvolnění aktivní látky závisí na struktuře nosiče (Kajdič *et al.* 2019).

Antibakteriálními testy bylo potvrzeno, že vytvořené nanovlákné vrstvy mají antibakteriální účinky na grampozitivní i gramnegativní bakterie. K uvolnění antibiotika došlo ve velmi krátkém čase (24 hodin) a halo zóny byly větší s vyšší koncentrací antibiotika ve vrstvách. Materiál bez antibiotika antibakteriální účinky neměl a bakterie přes něj přerůstaly. Také extrakty materiálů, louhované 4,5 hodiny vykazovaly antibakteriální účinky. Všechny vrstvy obsahující antibiotikum byly toxické pro testované bakteriální kultury, přestože nebyly cytotoxické pro testovanou buněčnou linii.

Sledování uvolňování GS v čase v této práci nebylo provedeno. Většina dříve zmíněných publikací (Coimbra *et al.* 2019; Khodir *et al.* 2019; Pisani *et al.* 2019) uvádí rychlé počáteční uvolnění. Některé publikace uvádí, že až 80% antibiotika GS bylo uvolněno během prvních 24 hodin. Což souhlasí s výsledky z antibakteriálních testů, kde se antibakteriální účinky projeví již po 24 hodinách. Pro prodloužení uvolňování nebo zajištění konstantního uvolňování literatura doporučuje zvolit jinou strukturu nanovláken či nanovlákného scaffoldu. Lze využít koaxiálního zvlákňování pro tvorbu vláken jádro/plášť, kde plášť zpomalí uvolňování, vrstvení nanovlákných vrstev na sebe (sendvičová struktura), využití emulzního zvlákňování či uzavření látky do lipozomu (Gao *et al.* 2014; Kuang *et al.* 2018; Kajdič *et al.* 2019).

8.5. Vliv sterilizace na nanovláknenné vrstvy s antibiotikem

Většina experimentů byla provedena na nesterilních materiálech a sterilních materiálech, které byly sterilizovány ethylenoxidem. Existují i další metody sterilizace zdravotnických výrobků například sterilizace párou, gama záření, ozonové záření či sterilizace nízkoteplotní plazmou (*Mendes et al. 2007*). Sterilizace ethylenoxidem byla zvolena kvůli nižší teplotě sterilizace (37 °C). Polymer PCL má nízkou teplotu tání (okolo 60 °C), při vyšších teplotách sterilizace by došlo k tání či degradaci polymeru. Proto se sterilizace ethylenoxidem jeví jako jediná vhodná metoda pro sterilizaci nanovláknenných materiálů z PCL.

Problematice sterilizace ethylenoxidem nanovláknenných materiálů z PCL se věnují publikace *Horáková et al. (2017)* a *Horáková et al. (2020)*. Tyto publikace uvádějí, žádné nebo nevýrazné změny v morfologii, v chemickém složení, rychlosti degradace či mechanických vlastnostech sterilizovaných materiálů. Avšak uvádějí pomalejší buněčnou proliferaci po sterilizaci ethyleneoxidem. Sterilizované materiály ale nebyly cytotoxické.

Publikace *Friess a Schlapp (2006)* uvádí, že po sterilizaci Gentamicinu sulfátu ethylen oxidem, došlo k malým změnám ve struktuře molekuly, což potvrdila nukleární magnetická rezonanční spektroskopie. Avšak změny ve struktuře nebyly zásadní, jelikož i po sterilizaci mělo antibiotikum antibakteriální účinky. V novější studii *Dhal a Mishra (2020)* nebyl zjištěn žádný podstatný rozdíl v měřených vlastnostech mezi nesterilními a sterilními fóliemi z PLGA/pullulanu s inkorporovaným GS, folie měly i po sterilizaci antibakteriální účinky.

Sterilizace nijak neovlivnila makroskopicky či mikroskopicky morfologii nanovláknenných materiálů, jak materiálů bez antibiotika, tak i materiálů s antibiotikem. Velikost kontaktního úhlů se po sterilizaci u některých materiálů zmenšila, u některých naopak zvětšila bez závislosti na použité tekutině. Po sterilizaci se stále většina materiálů jevila jako smáčivá.

Podle výsledků z elementární analýzy se chemické složení významně nezměnilo vlivem sterilizace. Výsledky z UV-spektrofotometrie a vysoko-účinné kapalinové chromatografie také potvrzují žádné změny vlivem sterilizace, až na materiál PCL + 10%

GS, kde po sterilizaci některé hodnoty nedrží rostoucí trend. To ale opět může být dáno nerovnoměrnou distribucí GS ve vrstvách.

Absorpce destilované vody a simulované střevní tekutiny sterilních materiálů nedrží žádný trend. Absorpce u některých materiálů se po sterilizaci zvýšila a u některých snížila, výsledky nedržely žádnou závislost. U některých materiálů byl rozdíl mezi nesterilními a sterilními materiály statisticky významný. Změna hmotnosti sterilních materiálů se lišila od nesterilních jen v případě materiálů PCL a PCL + 1% GS po absorpci vody, kdy se změna hmotnosti po sterilizaci zvýšila. V případě simulované střevní tekutiny byl statisticky významný rozdíl pouze mezi nesterilním a sterilním materiálem PCL + 7,5% GS.

Veškeré buněčné testy *in vitro* byly prováděny pouze na sterilních materiálech, zde tedy nelze vliv sterilizace pozorovat. Vzorky pro antibakteriální testy byly také sterilizované, vliv také nelze pozorovat. Avšak antibakteriálními testy bylo potvrzeno, že vyrobené nanovlákné materiály mají antibakteriální účinky, což znamená, že antibiotikum je účinné i po sterilizaci. Sterilizace tedy nemá vliv na účinnost antibiotika ve vrstvách.

Jako jinou alternativu lze také nanovlákné materiály z PCL s inkorporovaným antibiotikem GS sterilizovat gama zářením. Studie *Horáková et al. (2020)* doporučuje sterilizaci gama zářením pro PCL nanovlákná, jelikož zlepšuje buněčnou proliferaci. Gama záření, jako vhodnou sterilizaci Gentamicin sulfátu, uvádí publikace *Mullins et al. (2016)*.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo inkorporovat antibiotikum do nanovláknenných materiálů. Primární aplikací vytvořených nanovláknenných materiálů jsou střevní anastomózy, které vznikají v důsledku chirurgického odstranění poškozené části střeva. Nanovláknenný materiál s antibiotikem by měl zpevnit střevní spoj, zlepšit hojení tkáně a zabránit pooperačním komplikacím, které způsobují bakterie. Bakterie ve střevech produkují extracelulární enzymy, které štěpí nově vzniklou a hojící se tkáň. To vede ke zhoršenému hojení a dalším komplikacím.

V teoretické části této diplomové práce je rešerše literatury na danou problematiku, které bylo nutné porozumět pro vypracování experimentální části. V experimentální části je vyvíjen nanovláknenný materiál z poly- ϵ -kaprolaktonu, ve kterém je inkorporované antibiotikum. Zvolené antibiotikum bylo Gentamicin Sulfát, jelikož toto antibiotikum působí na bakterie, které se vyskytují ve střevech a produkují extracelulární enzymy.

Polymerní roztoky s antibiotikem byly zvlákněny na zařízení NanospiderTM. Bylo zjištěno, že koncentrace 10 % GS je limitní koncentrace pro zvláknování. Zvláknování bylo pomalé a vrstvy, v porovnání s ostatními koncentracemi, více defektní. Na zařízení NanospiderTM se zvláknuje ve větší produkci a vrstvy jsou více homogenní ve srovnání se jehlovým zvláknováním, kdy například může dojít k ucpání jehel. Nelze však předpokládat, že vrstvy budou dokonale homogenní. Jelikož antibiotikum nemuselo být zcela homogenně rozptýlené v polymerní roztoku, přestože před zvláknováním byly roztoky promíchány pomocí ultrazvukové sonotrody. Ve výsledných nanovláknenných vrstvách může být tak antibiotikum inkorporováno nerovnoměrně. Tato teorie by vysvětlovala některé výsledky pro materiály s vyšší koncentrací antibiotika GS (PCL + 7,5% GS a PCL + 10% GS), které se v některých analýzách nedržely trendů nebo se vychylovaly. Tím, že byly nanovláknenné vrstvy vyrobeny na průmyslovém zařízení a následně otestovány, dochází k usnadnění případného převedení výsledného materiálu do průmyslu a velkovýroby.

Ověření chemického složení a obsahu GS potvrdilo, že došlo ke zvláknění antibiotika společně s polymerním roztokem, že ve vrstvách antibiotikum je inkorporované a že je zde ve správné formě. Materiály absorbují vodu i simulovanou střevní tekutinu a po kontaktu se simulovanou střevní tekutinou materiály navyšují svoji hmotnost. Žádný

z materiálů není cytotoxický. Byla nalezena hraniční koncentrace cytotoxicity antibiotika GS v médiu (40 mg/1 ml) vůči buněčné linii 3T3 myší fibroblasty. Materiály testované *in vitro* vykazovaly po dvacet jedna dní vysokou metabolickou aktivitu a po dvou týdnech byly materiály zcela porostlé buňkami.

Antibakteriální testy potvrdily antibakteriální účinky vrstev v porovnání s vrstvou PCL, kde nebyla žádná koncentrace antibiotika, vrstva byla zcela zarostlá bakteriemi. Extrakty materiálu PCL + 5% GS také potvrzují antibakteriální účinky. Podle všech výsledků sterilizace ethylenoxidem výrazně neovlivnila účinnost antibiotika GS ve vrstvách.

Z výsledků testování nelze přímo určit, který materiál neboli kterou koncentraci antibiotika lze považovat za nejvhodnější. Materiál PCL + 10% GS se nejhůře zvlákňoval a pro materiál PCL + 7,5% GS se některé výsledky odchylovaly od ostatních dat a trendů. To ale může být dáno právě nerovnoměrnou distribucí antibiotik ve vrstvách. Materiály by v blízké době měly být testovány *in vivo* na zvířecích modelech. Právě z těchto testů by mohlo být zjištěno, která či které koncentrace antibiotika by mohly být vhodné. Vytvořené materiály mají antibakteriální účinky a zároveň jsou cytokompatibilní s buňkami, které na nich rostou a proliferují. Tato kombinace je vhodná právě při řešení problémů spojených se střevními anastomózami, kdy přítomné bakterie degradují hojící se tkáň. Tyto vlastnosti vyrobených materiálů jsou tedy požadované pro budoucí aplikaci a plánované *in vivo* testy by mohly tyto vlastnosti materiálů potvrdit.

Pro další experimenty by bylo zajímavé vyhodnotit uvolňování antibiotika GS v čase, například z *in vitro* prostředí, pomocí UV-spektrofotometrie či chromatografie, jelikož se tyto metody jeví jako vhodné pro kvantifikaci antibiotika GS. Pokud by například *in vivo* experimenty odhalily vysokou koncentraci antibiotika ihned po aplikování materiálu nebo by byl požadavek na udržení stejné koncentrace antibiotika po delší časový horizont, bylo by vhodné zkusit změnit metodu inkorporace.

Literatura

ADÁMKOVÁ, V. 2016. *Antibiotika v chirurgických oborech*, Praha: Mladá fronta. ISBN 978-80-204-3940-6

ALAVI, M., KARIMI, N., SAFAEI, M., Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. **7**(1). 3-9. DOI: 10.15171/apb.2017.002

ALBERTS, B., přeložili KOTYK, A., BOUZEK, B., HOZÁK, P., 1998. *Základy Buněčné Biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem, ČR: Espero, 630 s., ISBN 80-902906-0-4.

ARYA, D. P., 2007. *Aminoglycoside antibiotics: from chemical biology to drug discovery*. USA, Hoboken, New Jersey: Wiley. 319 s. ISBN: 978-0-471-74302-6

ASADIAN, M., CHAN, K. V., NOROUZI, M., GRANDE, S., COOLS, P., MORENT, R., GEYTER, N. D., 2020. Fabrication and Plasma Modification of Nanofibrous Tissue Engineering Scaffolds. *Nanomaterials*. **10**(1). 63 s. DOI: 10.3390/nano10010119

ASHGHARI, F., SAMIEI, M., ADIBKIA, K., AKBARZADEH, A., DAVARAN, S., 2017. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. **45**(2). 185-192. ISSN: 2169-1401. DOI: 10.3109/21691401.2016.1146731

AZIMI, B., NOURPANAH, P., RABIEE, M., ARBAB, S., 2014. Poly (ϵ -caprolactone) Fiber: An Overview. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*. **9**(3). 17 s. DOI: 10.1177/155892501400900309

BACAKOVA, L., FILOVA, E., PARIZEK, M., RUML, T., SVORCIK, V., 2011. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*. **29**(6), 739–767. ISSN 0734-9750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.004

BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*, Praha: Marvil. ISBN: 8594031505280

BENEŠ, J., 2018. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada Publishing. 598 s. ISBN: 978-80-271-0636-3.

BLAŽEJ, S, J PARAL a M KAŠKA, 2015. Vývoj konstrukcí střevních anastomóz a současný stav jejich možností. *Rozhledy v chirurgii*. **94**(8). 316-321.

BOLAND, E. D., COLEMAN, B. D., BARNES, C. P., SIMPSON, D. G., WNEK, G. E., BOWLIN, G. L., 2005. Electrospinning polydioxanone for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*. **1**(1). 115-123. ISSN: 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2004.09.003

CARMELO, A., VERBET-NERDIN, C., ROSSI, R. M., POPA, A.-M., 2013. Fragrance encapsulation in polymeric matrices by emulsion electrospinning. *European Polymer Journal*. **49**. 3806-3813. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2013.08.028

CEYLAN, M., YANG, S.-Y., ASMATULU, R., 2017. Effects of gentamicin-loaded PCL nanofibers on growth of Gram positive and Gram negative bacteria. *IJAMBR*. **5**(5). 40-51. ISSN: 2053-1818. DOI: 10.33500/ijambr.2017.05.005

CHAN, S. Y., CHAN, B. Q. Y., LIU, Z., PARIKH, B. H., ZHANG, K., LIN, Q., SU, X., KAI, D., CHOO, W. S., YOUNG, D. J., LOH, X. J., 2017. Electrospun Pectin-Polyhydroxybutyrate Nanofibers for Retinal Tissue Engineering. *ACS Omega*. **2**(12). 8959-8968. ISSN: 2470-1343. DOI: 10.1021/acsomega.7b01604

CHAWLA, K., 2018. *Biomaterials for Tissue Engineering: Methods and Protocols*. USA, New York: Springer. ISBN: 978-1-4939-7741-3

CHOI, E. J., SON, B., HWANG, T. S., HWANG, E.-H., 2011. Increase of degradation and water uptake rate using electrospun star-shaped poly(D,L-lactide) nanofiber. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **17**(4), 691–695. ISSN 1226-086X. DOI: 10.1016/j.jiec.2010.10.024

CHOU, S.-F., CARSON, D., WOODROW, K. A., 2015. Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers. *Journal of Controlled Release*. **220**. Part B. 584-591. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.09.008

COIMBRA, P., FREITAS, J. P., GONÇALVES, T., GIL, M. H., FIGUEIREDO, M., 2019. Preparation of Gentamicin Sulfate Eluting Fiber Mats by Emulsion and by Suspension Electrospinning. *Material Science & Engineering C*. **94** (1). s. 86-93. DOI: 10.1016/j.msec.2018.09.019

CORNEJO BRAVO, J. M., VILLARREAL GÓMEZ, L. J., SERRANO MEDINA, A., 2016. Electrospinning for Drug Delivery Systems: Drug Incorporation Techniques. In: HAIDER, S., HAIDER, A., *Electrospinning - Material, Techniques, and Biomedical Applications*. ISBN: 978-953-51-2821-2 978-953-51-2822-9. DOI: 10.5772/65939

ČIHÁK, R., GRIM, M., FEJFAR, O., 2013. *Anatomie 2*. 3.vydání. Praha: Grada. ISBN: 978-80-247-4788-0.

DAHLIN, R. L., KASPER, F. K., MIKOS, A. G., 2011. Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. **17**(5). 349 – 364. ISSN 1937-3368. DOI: 10.1089/ten.teb.2011.0238

DHAL, C., MISHRA, R., 2020. In vitro and in vivo evaluation of gentamicin sulphate-loaded PLGA nanoparticle-based film for the treatment of surgical site infection. *Drug Delivery and Translational Research*. **10**(4). 1032-1043. ISSN: 2190-393X. DOI: 10.1007/s13346-020-00730-7

DOPPALAPUDI, S., JAIN, A., KHAN, W., DOMB, A. J., 2014. Biodegradable polymers-an overview. *Polymers for Advanced Technologies*. **25**(5). 427-435. DOI: 10.1002/pat.3305

ELMARCO, Technologie Nanospider™. elmarco.cz. [online]. [cit. 5.3.2021]. Dostupné z: <https://www.elmarco.cz/ns-technologie>

ERBEN, J., PILAROVA, K., SANETRNIK, F., CHVOJKA, J., JENCOVA, V., BLAZKOVA, L., HAVLICEK, J., NOVAK, O., MIKES, P., PROSECKA, E., LUKAS, S., KUZELOVA KOSTAKOVA, E., (2015). The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering. *Materials Letters* 143, 172-176. ISSN: 0167577X. DOI: 10.1016/j.matlet.2014.12.100

FAKIROV, S., 2015. *Biodegradable Polyesters*. Germany, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 368 s. ISBN: 978-3-527-65698-1

FREDENBERG, S., WAHLGREN, M., RESLOW, M., AXELSSON, A., 2011. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems - A review. *International Journal of Pharmaceutics*. **415**(1-2). 34-52. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.05.049

FRIESS, W., SCHLAPP, M., 2006. Sterilization of gentamicin containing collagen/PLGA microparticle composites. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **63**(2). 176-187. ISSN: 09396411. DOI: 10.1016/j.ejpb.2005.11.007

GAO, Y., BACH TRUONG, Y., ZHU, Y., LOUIS KYRATZIS, I., 2014. Electrospun antibacterial nanofibers: Production, activity, and in vivo applications. *Journal of Applied Polymer Science*. **131**(18). ISSN 00218995, DOI: 10.1002/app.40797

GHAFOOR, B., ALEEM, A., ALI, M. N., MIR, M. 2018. Review of the fabrication techniques and applications of polymeric electrospun nanofibers for drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 48. 82-87. DOI: 10.1016/j.jddst.2018.09.005

GONZALEZ, A., CAFASSO, J., What is Anastomosis? Healthline. [online] [cit. 20.2.2021] Dostupné z: <https://www.healthline.com/health/anastomosis>

Van GOOR, H., 2007. Consequences and complications of peritoneal adhesions. *Colorectal Disease*. **9**(2). 25-34. ISSN: 1463-1318. DOI: 10.1111/j.1463-1318.2007.01358.x

GOULDER, F., 2012. Bowel anastomoses: The theory, the practice and the evidence base. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*. **4**(9). 208 s. ISSN: 1948-9366. DOI: 10.4240/wjgs.v4.i9.208

GUNATILLAKE, P. A., ADHIKARI, R., 2003. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials*. 5. 1-16. ISSN:1473-2262. DOI: 10.22203/eCM.v005a01

GUO, B., MA, P.X., 2014. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Science China Chemistry*. **57**(4). 490–500. ISSN: 1674-7291. DOI: 10.1007/s11426-014-5086-y

GUYTON, K. L., LEVINE, Z. C., LOWRY, A. C., LAMBERT, L., GRIBOVSKAJA-RUPP, I., HYMAN, N., ZABORINA, O., ALVERDY, J., 2019. Identification of Collagenolytic Bacteria in Human Samples: Screening Methods and Clinical Implications for Resolving and Preventing Anastomotic Leaks and Wound Complications. *Diseases of the Colon & Rectum*. **62**(8). 972-979. ISSN: 0012-3706. DOI: 10.1097/DCR.0000000000001417

HAGHI, A. K., 2012. *Electrospinning of Nanofibers in Textiles*. Canada: Toronto, Apple Academic Press. 132 s. ISBN 978-1-926895-04-8

HAŠEK, J., 2012. Nové léčivé látky v magistraliter receptuře XVIII – gentamicin-sulfát. *Farmaceutická technologie, Praktické lékařství*. ČR, Doksy: Lékárna u Matky Boží. **8**(3). 130-133.

HORÁKOVÁ, J., MIKEŠ, P., ŠAMAN, A., JENČOVÁ, V., KLÁPŠŤOVÁ, A., ŠVARCOVÁ, T., ACKERMANN, M., NOVOTNÝ, V., SUCHÝ, T., LUKÁŠ, D., 2017. The effect of ethylene oxide sterilization on electrospun vascular grafts made from biodegradable polyesters. *Materials Science and Engineering: C*. **92**(1). 132-142. DOI: 10.1016/j.msec.2018.06.041

HORÁKOVÁ, J., KLÍČOVÁ, M., ERBEN, J., KLÁPŠŤOVÁ, A., NOVOTNÝ, V., BĚHÁLEK, L., CHVOJKA, J., 2020. Impact of Various Sterilization and Disinfection Techniques on Electrospun Poly- ϵ -caprolactone. *ACS Omega*. **5**(15). 8885-8892. DOI: 10.1021/acsomega.0c00503.

HRIB, J., SIRC, J., HOBZOVA, R., HAMPEJSOVA, Z., BOSAKOVA, Z., MUNZAROVA M., MICHALEK, J., 2015. Nanofibers for drug delivery – incorporation and release of model molecules, influence of molecular weight and polymer structure. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 6. 1939-1945. DOI: 10.3762/bjnano.6.198

HUGHES, S. M., HABIB, M. A., RAHMAN, M. M., ASMATULU, R., 2020. PCL Nanofibers Incorporated with Natural and Synthetic Calcium Hydroxyapatite Particles for Tooth Regeneration. Conference ICCE-28, 19.-25. července. Praha, ČR.

HYMAN, N., MANCHESTER, T. L., OSLER, T., BURNS, B., CATALDO, P. A., Anastomotic Leaks After Intestinal Anastomosis: It's Later Than You Think. *Annals of Surgery*. **245**(2). 254-258. ISSN: 0003-4932. DOI: 10.1097/01.sla.0000225083.27182.85

ISMAIL, A., F., H., MOHAMED, F., ROSLI, L. M. M., SHAFRI, M. A. M., HARIS, M. S., ADINA, A. B., 2016. Spectrophotometric Determination of Gentamicin Loaded PLGA Microparticles and Method Validation via Ninhydrin-Gentamicin Complex as a Rapid Quantification Approach. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. **6**(1). 007-014. DOI: 10.7324/JAPS.2016.600102

JANMOHAMMADI M., NOURBAKHS M. S., 2019. Electrospun polycaprolactone scaffolds for tissue engineering: a review, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, **68**(9). 527-539, DOI: 10.1080/00914037.2018.1466139

JAWOREK, A., SOBCZYK, A. T. 2008. Electro spraying route to nanotechnology: An overview. *Journal of Electrostatics*. **66**(3-4). 197-219. ISSN: 03043886. DOI: 10.1016/j.elstat.2007.10.001

KAJDIČ, S., PLANINŠEK, O., GAŠPERLIN, M., KOCBEK, P., 2019. Electrospun nanofibers for customized drug-delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 51. 672-681. DOI: 10.1016/j.jddst.2019.03.038

KHODIR, W. K. W. A., RAZAK, A. H. A., NG, M. H., GUARINO, V., SUSANTI, D., 2018. 9(2). Encapsulation and Characterization of Gentamicin Sulfate in the Collagen Added Electrospun Nanofibers for Skin Regeneration. *Journal of Functional Biomaterials*. **9**(2). 9 s. ISSN: 2079-4983. DOI: 10.3390/jfb9020036

KIM, K., LUU, Y. K., CHANG, K., FANG, D., HSIAO, B. S., CHU, B., HADJIARGYROU, M., 2004. Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *Journal of Controlled Release*. **98**(1). 10 s. DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.04.009

KINGHAM, P. T., PACHTER, L. H., 2009. Colonic Anastomotic Leak: Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *Journal of the American College of Surgeons*. **208**(2). 269-278. ISSN: 10727515. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2008.10.015

KLÍČOVÁ, M., 2018. *Vývoj dvouvrstvých vlákných tkáňových nosičů s odlišnou smáčivostí povrchu pro zpevnění střevních anastomóz: Development of double-layered fibrous scaffolds with various surface wettability for intestinal anastomosis strengthening*. Diplomová práce. Liberec: Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce: Jana Horáková.

KLÍČOVÁ, M., KLÁPŠŤOVÁ, A., CHVOJKA, J., KOPŘIVOVÁ, B., JENČOVÁ, V., HORÁKOVÁ, J., 2020. Novel double-layered planar scaffold combining electrospun PCL fibers and PVA hydrogels with high shape integrity and water stability. *Materials Letters*. 263. DOI: 10.1016/j.matlet.2019.127281

KLOSE, D., SIEPMANN, F., ELKHARRAZ, K., SIEPMANN, J., 2008. PLGA-based drug delivery systems: Importance of the type of drug and device geometry. *International Journal of Pharmaceutics*. 354(1-2). DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.10.030

KRCHOVÁ, S., DZAN, L., LUKÁŠ, D., MIKEŠ, P., JENČOVÁ, V., HORÁKOVÁ, J., STRNADOVÁ, K., 2014. Nanovlákná v hojení ran. Nanofibers for the wound healing. *Česká dermatovenorologie*. 4. 234 – 240. [online] [cit. 18.4.2021]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/274248115_Nanofibers_for_the_wound_healing_Nanovlakna_v_hojeni_koznich_ran

KROISOVÁ, D. 2009. *Biodegradovatelné polymery - úvod do problematiky*. Liberec: Technická univerzita v Liberci. ISBN 978-80-7372-468-9.

KUANG, G., ZHANG, Z., LIU, S., ZHOU, D., LU, X., JING, X., HUANG, Y., 2018. Biphasic drug release from electrospun polyblend nanofibers for optimized local cancer treatment. *Biomaterials Science*. 6. 324-331. DOI: 10.1039/c7bm01018d

KWEON, H., YOO, M. K., PARK, I. K., KIM, T. H., LEE, H. C., LEE, H.-S., OH, J.-S., AKAIKE, T., CHO, C.-S., 2003. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials*. 24(5). 801-808. ISSN: 01429612. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00370-8

LANZA, R., LANGER, R., VACANTI, J. P., ATALA, A., 2020. *Principles of Tissue Engineering*. Fifth edition. UK: Elsevier. 1635 s. ISBN 978-0-12-818422-6

LI, Z., WANG, C., 2013. *One-Dimensional Nanostructures. Electrospinning Technique and Unique Nanofibers*. New York: Springer. 141 s. ISBN 978-3-642-36427-3

LIU, X., HOLZWARATH, J. M., MA, P. X., 2012. Functionalized synthetic biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Macromol Biosci*. 12(7). DOI: 10.1002/mabi.201100466.

LUKÁŠ D., SARKAR, A., MARTINOVÁ, L., VODSEĎÁLKOVÁ, K., CHALOUPEK, J., POKORNÝ, P., MIKEŠ, P., CHVOJKA, J., KOMÁREK, M., 2009. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). *Textile Progress*. 41(2). 59-140. ISSN 754-2278. DOI: 10.1080/00405160902904641

MA, Z., KOTAKI, M., INAI, R., RAMAKRISHNA, S., 2005. Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds. *Tissue Engineering*. **11**(1-2). 101-109. ISSN: 1557-8690. DOI: 10.1089/ten.2005.11.101

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., STAHL, D. A., CLARK, D. P., 2012. *Brock biology of microorganisms*. thirteenth edition., USA, San Francisco: Benjamin Cummings. 1043 s. ISBN 978-0-321-64963-8

MENDES, G., C. C., BRANDAO, T. R. S., SILVA, C. L. M., 2007. Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review. *American Journal of Infection Control*. **35**(9). 574-581. ISSN: 01966553. DOI: 10.1016/j.ajic.2006.10.014

MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR, 2017. *Český lékopis 2017: Tištěná verze (1.-4. díl)*. B.m.: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-271-0500-7.

MULLINS, N. D., DEADMAN, B. J., MOYNIHAN, H. A., MCCARTHY, F. O., LAWRENCE, S. E., THOMPSON, J., MAGUIRE, A. R., 2016. The impact of storage conditions upon gentamicin coated antimicrobial implants. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. **6**(6). 374-381. ISSN: 20951779. DOI: 10.1016/j.jpha.2016.05.002

MURRELL, Z., STAMOS, M., 2006. Reoperation for Anastomotic Failure. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. **16**(4). 213-216. ISSN: 1530-9681. DOI: 10.1055/s-2006-956442

NAYAK, R., PADHYE, R., KYRATZIS, I. L., TRUONG, Y. B., ARNOLD, L., 2011. Recent advances in nanofibre fabrication techniques. *Textile Research Journal*. **82**(2). 129-147. ISSN: 0040-5175, 1746-7748. DOI: 10.1177/0040517511424524

NGUYEN, D. N., CLASEN, C., Van den MOOTER, G., 2016. Pharmaceutical Applications of Electrospraying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **105**(9). 2601-2620. DOI: 10.1016/j.xphs.2016.04.024

OULEHLOVÁ, Z., 2020. *Vývoj planárních nanovlákných vrstev pro nové aplikace v gastrointestinální chirurgii: Development of planar nanofibrous layers for novel applications in gastrointestinal surgery*. Diplomová práce. Liberec: Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce: Markéta Klíčová

PATEL, H. BONDE, M., SRINIVASAN, G., 2011. Biodegradable Polymer Scaffold for Tissue Engineering. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*. **25**(1). 20-29. DOI: 10.4028/www.scientific.net/kem.288-289.59

PELIPENKO, J., KRIST, J., JANKOVIĆ, B., BAUMGARTNER, S., KOCBEK, P., 2013. The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics*. **465**(1). 125-134. ISSN: 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.07.078

- PETRÍK, S., 2011. Industrial Production Technology for Nanofibers. In: LIN, T., *Nanofibers - Production, Properties and Functional Applications*. ISBN: 978-953-307-420-7
- PHAM, Q. P., SHARMA, U., MIKOS, A. G., 2006. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Engineering*. **12**(5). DOI: 10.1089/ten.2006.12.1197
- PILLAI, O., PANCHAGNULA, R., 2001. Polymers in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*. **5**(4). 447-451. DOI: 10.1016/s1367-5931(00)00227-1
- PILLAY, V., DOTT, C., CHOONARA, Y. E., TYAGI, C., TOMAR, L., KUMAR, P., TOIT, L. C., NDESENDO, V. M. K., 2013. A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications. *Journal of Nanomaterials*. Vol. 2013. DOI: 10.1155/2013/789289
- POOLE, K., 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*. **2**(65). ISSN: 1664-302X. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00065
- PRABU, G. T. V., DHURAI, B., 2020. A Novel Profiled Multi-Pin Electrospinning System for Nanofiber Production and Encapsulation of Nanoparticles into Nanofibers. *Scientific Reports*. **10**. 4302. DOI: 10.1038/s41598-020-60752-6
- PROKOPOVÁ, I., 2004. *Makromolekulární chemie*. Praha: Vydavatelství VŠCHT v Praze. 2. vydání. ISBN 80-7080-554-4.
- RAMAKRISHNA, S., FUJIHARA, K., TEO, W., LIM T., MA, Z., 2005. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. Singapore: World Scientific. 382 s. ISBN 981-256-415-2
- RAMAN, C., BERKLAND, C., KIM, K., PACK, D. P., 2005. Modeling small-molecule release from PLG microspheres: effects of polymer degradation and nonuniform drug distribution. *Journal of Control Release*. **103**(1). DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.11.012
- RAMOS, P., PILAWA, B., KRZTOŃ, A., LISZKA, B., 2012. Free Radicals in the Thermally Sterilized Aminoglycoside Antibiotics. *Pharmaceutica Analytica Acta*. **3**(9). 13 s. ISSN: 2153-2435. DOI: 10.4172/2153-2435.1000193
- RATNER, B. D., 2004. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. *Biomaterials science*. Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press. 2nd ed. 851 s. ISBN: 978-0-12-582463-7

RAVICHANDRAN, R., SUNDARRAJAN, S., VENUGOPAL, J. R., MUKHERJEE, S., RAMAKRISHNA, S., 2012. Advances in Polymeric Systems for Tissue Engineering and Biomedical Applications. *Macromolecular Bioscience*. **12** (3), 286-311. ISSN 16165187. DOI: 10.1002/mabi.201100325

ROSENDORF, J., HORÁKOVÁ, J., KLÍČOVÁ, M., PÁLEK, R., ČERVENKOVÁ, L., KURAL, T., HOŠEK, P., KRÍŽ, T., TEGL, V., MOULISOVÁ, V., TONAR, Z., TŘEŠKA, V., V., LUKÁŠ, D., LIŠKA, V., 2020. Experimental fortification of intestinal anastomoses with nanofibrous materials in a large animal model. *Scientific Reports B.m.: Nature Publishing Group*, **10**(1), 1–12. ISSN 2045-2322. DOI:10.1038/s41598-020-58113-4

ROSENDORF, J., KLÍČOVÁ, M., ČERVENKOVÁ, L., HORÁKOVÁ, J., KLÁPŠŤOVÁ, A., HOŠEK, P., PÁLEK, R., ŠEVČÍK, J., POLÁK, R., TŘEŠKA, V., CHVOJKA, J., LIŠKA, V., 2021a. Reinforcement of Colonic Anastomosis with Improved Ultrafine Nanofibrous Patch: Experiment on Pig. *Biomedicines*. **9**(2). 102. DOI: 10.3390/biomedicines9020102

ROSENDORF, J., KLÍČOVÁ, M., ČERVENKOVÁ, L., PÁLEK, R., HORÁKOVÁ, J., KLÁPŠŤOVÁ, A., HOŠEK, P., MOULISOVÁ, V., BEDNÁŘ, L., TEGL, V., BRZOŇ, O., TONAR, Z., TŘEŠKA, V., LUKÁŠ, D., LIŠKA, V., 2021b. Double-layered Nanofibrous Patch for Prevention of Anastomotic Leakage and Peritoneal Adhesions, Experimental Study. *In Vivo*. **35**(2) 731-741. DOI: 10.21873/invivo.12314

THAKKAR, S., MISRA, M., 2017. Electrospun polymeric nanofibers: New horizons in drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **107**. 148-167. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.07.001

SEKTHISELVAN, P., MADHUMATHI, R., 2019. Optimization on Microbial Production of Polyhydroxybutyrate (PHB): A Review. *IJRAR*. **6**(1). 243-251. ISSN: 2348-1269. Dostupné z: http://ijrar.com/upload_issue/ijrar_issue_20542765.pdf

SCHINDLER, J., 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů 2.*, doplněné a přepracované vydání., Praha: Grada. 248 s. ISBN 978-80-247-4771-2

SETHURAMAN, S., KRISHNAN, U. M., SUBRAMANIAN, A., 2017. *Biomaterials and Nanotechnology for Tissue Engineering*. USA: CRC Press, Taylor & Francis Group. 352 s. ISBN 978-1-4987-4373-0

SHASTRI, V., 2003. Non-Degradable Biocompatible Polymers in Medicine: Past, Present and Future. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. **4** (5). s. 331-337. ISSN 13892010. DOI: 10.2174/1389201033489694

SHEIN, M., ROGERS, P. N., LEPPÄNIEMI, A., ROSIN, D., EFRON, J. E., 2016. *Shein's Common Sense Emergency Abdominal surgery*. 4. vydání. UK: ftn Publishing Ltd. ISBN 978-1-910079-14-0

SHOGAN, B. D., BELOGORTSEVA, N., LUONG, P. M., ZABORIN, A., LAX, S., BETHEL, C., WARD, M., MULDOON, J. P., SINGER, M., AN, G., UMANSKIY, K., KONDA, V., SHAKHSHEER, B., LUO, J., KLABBERS, R., HANCOCK, L. E., GILBERT, J., ZABORINA, O., ALVERDY, J. C., 2015. Collagen degradation and MMP9 activation by *Enterococcus faecalis* contribute to intestinal anastomotic leak. *Science Translational Medicine*. 7(256). 13 s. ISSN: 1946-6242. DOI: 10.1126/scitranslmed.3010658

SIRC, J., KUBINOVA, S., HOBZOVA, R., STRANSKA, D., KOZLIK, P., BOSAKOVA, Z., MAREKOVA, D., HOLAN, V., SYKOVA, E., MICHALEK, J., 2012. Controlled gentamicin release from multi-layered electrospun nanofibrous structures of various thicknesses. *International Journal of Nanomedicine*. 7. 5315-5325. ISSN: 1178-2013. DOI: 10.2147/IJN.S35781

SON, Y. J., KIM, W. J., YOO, H. S., 2014. Therapeutic applications of electrospun nanofibers for drug delivery systems. *Archives of Pharmacal Research*. 37(1). 69-78. ISSN: 1976-3786. DOI: 10.1007/s12272-013-0284-2

SUZUKI S., IKADA, Y., 2010. Adhesion of Cells and Tissues to Bioabsorbable Polymeric Materials: Scaffolds, Surgical Tissue Adhesives and Antiadhesive Materials. *Journal of Adhesion Science and Technology*. 24(13-14), s. 2059-2077. ISSN: 1568-5616. DOI: 10.1163/016942410X507920

TEIXEIRA, M. A., AMORIM, M. T. P., FELGUEIRAS, H. P., 2020. Poly(Vinyl Alcohol)-Based Nanofibrous Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Polymers*. 12(1) 7, DOI: 10.3390/polym12010007

THAKKAR, S., MISRA, M., 2017. Electrospun polymeric nanofibers: New horizons in drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 107. 148-167. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.07.001

VALO, H., PELTONEN, L., VEHVILÄINEN, S., KARJALAINEN, M., KOSTIAINEN, R., LAAKSONEN, T., HIRVONEN, J., 2009. Electro spray Encapsulation of Hydrophilic and Hydrophobic Drugs in Poly(L-lactic acid) Nanoparticles. *Small*. 5(15). 1791-1798. DOI: 10.1002/smll.200801907

De VRIEZE, S., Van CAMP, T., NELVIG, A., HANGSTRÖM, B., WESTBROEK, P., De CLERCK, K., 2009. The effect of temperature and humidity on electrospinning. *Journal of Materials Science*. 44(5). 1357-1362. ISSN: 1573-4803. DOI: 10.1007/s10853-008-3010-6

WALSH, CH., WENCEWICZ, T., 2016. *Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities*. USA, Washington DC: ASM Press. ISBN 978-1-68367-089-6

WILLIAMS, G. R., RAIMI – ABRAHAM, B. T., LUO, C. J., 2018. *Nanofibers in Drug Delivery*. UK, London: UCL Press. 212 s. ISBN 978- 1- 78735- 022- 9. DOI: <https://doi.org/10.14324/111.9781787350182>

WOLFOVÁ, L., VOJTOVÁ, L., JUREČKOVÁ, L., KOHOUTOVÁ L., 2015. *Úvod do tkáňového inženýrství*. Brno, ČR: MediaBros s.r.o. ISBN 978-80-260-9720-4

WOODRUFF, M. A., HUTMACHER, D. W., (2010). The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*. **35**(10), 1217-1256. ISSN: 00796700. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002

YOON, J., YANG, H.-S., LEE, B.-S., YU, W.-R., 2018. Recent Progress in Coaxial Electrospinning: New Parameters, Various Structures, and Wide Applications. *Advanced Materials*. **30**. DOI: 0.1002/adma.201704765

YU, M., DONG, R. H., YAN, X. YU, G. F., YOU, M. H., NING, X., LONG, Y. Z., 2017. Recent Advances in Needleless Electrospinning of Ultrathin Fibers: From Academia to Industrial Production. *Macromolecular Materials and Engineering*. China. **302**(7). 19 s. ISSN 14387492. DOI: 10.1002/mame.201700002

XU, CH., INAI, R., KOTAKI, M., RAMAKRISHNA, S., 2004. Electrospun Nanofiber Fabrication as Synthetic Extracellular Matrix and Its Potential for Vascular Tissue Engineering. *Tissue Engineering*. **10**(7/8). DOI: 10.1089/ten.2004.10.1160

XUE, M., JACKSON, CH. J., 2015. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Advances in Wound Care*. **4**(3). s. 119-136. ISSN 2162-1918. DOI: 10.1089/wound.2013.0485

YU, M., DONG, R. H., YAN, X. YU, G. F., YOU, M. H., NING, X., LONG, Y. Z., 2017. Recent Advances in Needleless Electrospinning of Ultrathin Fibers: From Academia to Industrial Production. *Macromolecular Materials and Engineering*. China. **302**(7). 19 s. ISSN 14387492. DOI: 10.1002/mame.201700002

Seznam obrázků

<i>Obrázek 1: Schéma principu tkáňového inženýrství (Převzato ze Asadian et al. 2020).</i>	15
<i>Obrázek 2: Schéma buněčné membrány a extracelulární matrix která obsahuje vláknenné proteiny (kolagenová, elastinová a fibrinová vlákna), proteoglykany a adhezni bílkoviny (Převzato z Xue et al. 2013)</i>	16
<i>Obrázek 3: Syntéza PCL (Převzato z Azimi et al. 2014)</i>	19
<i>Obrázek 4: Stabilní a nestabilní oblast při elektrostatickém zvlákňování (Li et al. 2013)</i>	21
<i>Obrázek 5: Schéma zařízení bezjehlového elektrostatického zvlákňování – zařízení NanospiderTM kde: 1 – zvlákňovací elektroda (struna), 2 – zásobník na polymerní roztok, 3 – vytrysknutá nanovlákna, 4 – nanovláknenné vrstva na podkladové textilii, 5 – uzemněná elektroda (struna) (Převzato od Klíčová et al. 2020)</i>	21
<i>Obrázek 6: Schéma možné inkorporace aktivních látek do nanovlákna (řez nanovláknem) (Převzato z Williams et al 2018)</i>	26
<i>Obrázek 7: Schéma metod inkorporace aktivních látek do nanovláken (Převzato od Gao et al. 2014)</i>	27
<i>Obrázek 8: Schéma rozdílu mezi suspenzí a emulzí (Převzato z Coimbra et al. 2019)</i>	28
<i>Obrázek 9: Schématický obrázek řezem lipozomu (Převzato z Avali et al. 2017)</i>	29
<i>Obrázek 10: Schéma zvlákňovací aparatury pro koaxiální elektrostatické zvlákňování (Převzato z Gao et al. 2014)</i>	30
<i>Obrázek 11: Schématicky zobrazeny mechanismy uvolňování látek z polymerní matrice: A – Difúze póry zaplněnými vodou, B – Difúze látek před polymerní matricí, C – Osmóza, D – Eroze (degradace) (Převzato z Fredenberg et al. 2011)</i>	31
<i>Obrázek 12: Komplexní schéma vlastností, dějů a vzájemných interakcí mezi materiálem, aktivní látkou a prostředím při uvolňování vedoucí k mechanismům uvolňování (Převzato z Fredenberg et al. 2011)</i>	33
<i>Obrázek 13: Možné kinetické způsoby uvolňování a) okamžité uvolňování, b) prodloužené konstantní uvolňování, c) dvojfázové uvolňování, d) stimulem aktivované uvolňování (Převzato z Kajdič et al. 2019)</i>	34
<i>Obrázek 14: Struktura Gentamicinu sulfátu (Převzato ze Sigma Aldrich)</i>	39
<i>Obrázek 15: Schéma prokaryotické buňky (Převzato z Madigan et al. 2012)</i>	41
<i>Obrázek 16: Schéma stěn grampozitivních a gramnegativních bakterií (Převzato z Madigan et al. 2012)</i>	41
<i>Obrázek 17: a) chirurgicky vytvořená střevní anastomóza na tenkém střevu, b) nanovláknenné materiál umístěný na střevní anastomózu (Převzato z Rosendorf et al. 2020)</i>	44
<i>Obrázek 18: Schéma experimentální části této diplomové práce</i>	48
<i>Obrázek 19: Připravené polymerní roztoky s rozptýleným antibiotikem GS: A – PCL bez antibiotika, B – PCL + 1% GS, C – PCL + 5% GS, D – PCL + 10% GS vše v CHEKO 8/1/1.</i>	60
<i>Obrázek 20: Snímky SEM nesterilních vrstev, zvětšení 3000x</i>	62

Obrázek 21: Snímky SEM sterilních vrstev, zvětšení 3000x.....	63
Obrázek 22: Krabicový graf průměrů vláken nesterilních materiálů, + značí průměrnou hodnotu, Tukey; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; ANOVA Kruskal-Wallis; $n=300$	64
Obrázek 23: Graf hodnot kontaktního úhlu vody, pro nesterilní a sterilní materiály; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; parametrický t-test; $n=10$	65
Obrázek 24: Graf hodnot kontaktního úhlu simulované střevní tekutiny, pro nesterilní a sterilní materiály; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; parametrický t-test, neparametrický t-test (Mann-Whitney test); $n=10$	65
Obrázek 25: Struktura Gentamicinu sulfátu (Převzato ze Sigma Aldrich).....	66
Obrázek 26: Graf obsahu dusíku v nanovlákněných vrstvách s antibiotikem, pro nesterilní i sterilní materiály, prvková analýza.....	66
Obrázek 27: Graf obsahu síry v nanovlákněných vrstvách s antibiotikem, pro nesterilní i sterilní materiály, prvková analýza.....	67
Obrázek 28: Absorbanční rozdílová spektra FTIR pro jednotlivé nesterilní materiály a čistý GS.....	68
Obrázek 29: Graf měření komplexu gentamicin-ninhydrin na UV-spektrofotometru, což odpovídá procentuálnímu obsahu GS ve vrstvách, 3 měření z různých míst materiálů.....	69
Obrázek 30: Graf měření komplexu gentamicin-ninhydrin na HPLC, což odpovídá procentuálnímu obsahu GS ve vrstvách, 3 měření z různých míst vzorku.....	70
Obrázek 31: Graf absorpce destilované vody pro nesterilní a sterilní materiály; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; parametrický t-test, neparametrický t-test (Mann-Whitney test); $n=5$	71
Obrázek 32: Graf absorpce simulované střevní tekutiny pro pro nesterilní a sterilní materiály; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; parametrický t-test, neparametrický t-test (Mann-Whitney test); $n=5$	71
Obrázek 33: Graf změny hmotnosti vzorků po absorpci destilované vody pro nesterilní a sterilní materiály; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; parametrický t-test; $n=5$	72
Obrázek 34: Graf změny hmotnosti vzorků po absorpci simulované střevní tekutiny pro nesterilní a sterilní materiály; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; parametrický t-test; $n=5$	73
Obrázek 35: Graf buněčné viability buněčné linie 3T3 myších fibroblastů, extrakty inkubovány 24 hodin, NC – negativní kontrola (buňky pouze v médiu DMEM, normální konfluence buněk), PC – pozitivní kontrola (buňky usmrcené Tritonem-X).....	74
Obrázek 36: Graf viability buněčné linie 3T3 myších fibroblastů, extrakty inkubovány 24 hodin, NC – negativní kontrola (buňky pouze v médiu DMEM, normální konfluence buněk), PC – pozitivní kontrola (buňky usmrcené Tritonem-X).....	75
Obrázek 37: Fotografie buněk inkubovaných 24 hodin v GS v médiu o různých koncentracích, optický mikroskop, zvětšení 100x, (buňky pouze v médiu DMEM, normální konfluence buněk), PC – pozitivní kontrola (buňky usmrcené Tritonem-X).....	76

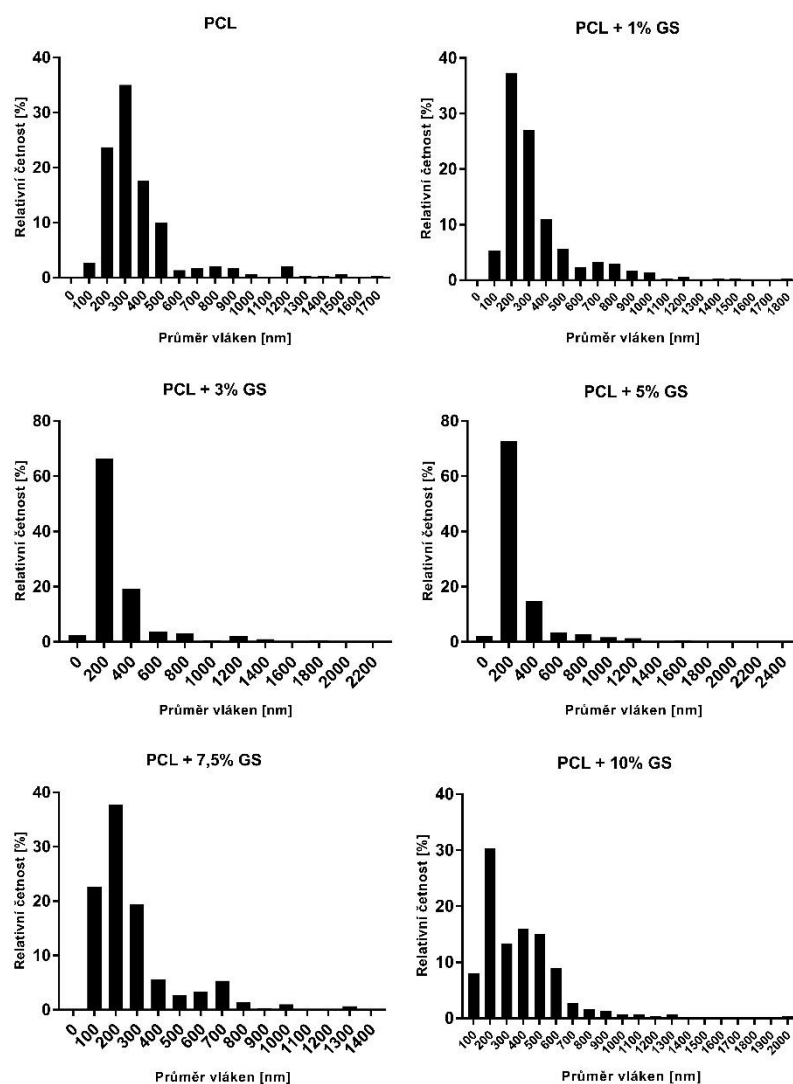
Obrázek 38: Graf metabolické aktivity buněčné linie 3T3 myších fibroblastů na nanovláčkových materiálech, 2.; 7.; 14. a 21. den testování; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; ANOVA. Bonferroni; $n = 5$	77
Obrázek 39: Snímky z fluorescenčního mikroskopu obarvených buněk na testovaných materiálech, buněčná jádra obarvená modře (DAPI), cytoskelet buněk obarven zeleně (Phalloidin-FICT); měřítko 100 μm	78
Obrázek 40: Počet buněk 3T3 myších fibroblastů na 1 mm ² plochy materiálu 2.; 7.; 14. a 21. den testování; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; ANOVA. Bonferroni; $n = 10$	79
Obrázek 41: Snímky z elektronového mikroskopu, materiály PCL + 1% GS a PCL + 10% GS po 7 a 21 dnech in vitro testování, měřítko 50 μm	79
Obrázek 42: Fotografie Petriho misek s Braid Parker agarem a inokulum bakterie <i>Staphylococcus gallinarum</i> , do kterých byly vloženy materiály rozměru 10 × 10 mm na 24 hodin a poté sledovány halo zóny; 0: PCL čistý, 1: PCL + 1% GS, 3: PCL + 3% GS, 5: PCL + 5% GS, 7: PCL + 7,5% GS, 10: PCL + 10% GS.....	80
Obrázek 43: Fotografie Petriho misek s Nutrient agarem a inokulum bakterie <i>Escherichia Coli</i> , do kterých byly vloženy materiály rozměru 10 × 40 mm na 24 hodin a poté sledovány halo zóny; A: PCL, B: PCL + 1% GS, C: PCL + 10% GS	81
Obrázek 44: Fotografie Petriho misek s Braid Parker agarem a inokulum bakterie <i>Staphylococcus gallinarum</i> , do kterých byly vloženy materiály rozměru 10 × 40 mm na 24 hodin a poté sledovány halo zóny; A: PCL, B: PCL + 1% GS, C: PCL + 10% GS.....	82
Obrázek 45: Extrakty materiálů louhová v inokulum a zalité agarem: A – inokulum bez extraktů materiálu B - inokulum s extraktem materiálu PCL + 5% GS zalité agarem a inkubované 24 hodin při 37°C, koncentrace $3 \cdot 10^8$; KTJ/ml.....	83

Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled biodegradabilních polymerů (Boland et al. 2005; Chan et al. 2017; Doppalapudi et al. 2014; Fakirov 2015; Gunatillake a Adhikari 2003; Kroisová 2009; Prokopová 2007; Ratner 2004; Sekthiselvan a Madhumathi 2019; Teixeira et al. 2019).....	18
Tabulka 2: Parametry zvláknění pro jednotlivé roztoky	61
Tabulka 3: Přehled zvlákněných roztoků a název výsledných vrstev dále v práci	61
Tabulka 4: Průměry vláken a směrodatné odchylky	63
Tabulka 5: Výsledky prvkové analýzy – obsah dusíku v nesterilních i sterilních materiálech....	67
Tabulka 6: Výsledky prvkové analýzy – obsah síry v nesterilních i sterilních materiálech.....	67
Tabulka 7: Hodnoty naměřené na UV – spektrometru	69
Tabulka 8: Hodnoty naměřené na HPLC.....	70
Tabulka 9: Průměrné velikost inhibičních zón, průměr \pm SD.....	81
Tabulka 10: Průměrné velikost inhibičních zón, průměr \pm SD.....	82

Přílohy

Příloha A: Doplnění kapitoly 7.2.2. Průměr vláken – histogramy průměrů vláken



Obrázek P1: Histogramy průměrů vláken pro všechny materiály

Příloha B: Doplnění kapitoly 7.2.3. – Smáčivost vrstev

Tabulka P1: Průměrné hodnoty \pm SD kontaktního úhlu pro nesterilní a sterilní materiály, pro vodu a simulovanou střevní tekutinu

KONTAKTNÍ ÚHEL [°]	DESTILOVANÁ VODA		SIMULOVANÁ STŘEVNÍ TEKUTINA	
	NESTERILNÍ	STERILNÍ	NESTERILNÍ	STERILNÍ
PCL	91,6 \pm 15,9	54,1 \pm 11,5	81,4 \pm 19,7	55,2 \pm 8,0
PCL + 1% GS	70,9 \pm 35,9	38,6 \pm 7,1	80,8 \pm 28,7	44,6 \pm 5,3
PCL + 3% GS	48,8 \pm 13,1	47,8 \pm 14,7	86,3 \pm 19,2	80,2 \pm 51,9
PCL + 5% GS	105,6 \pm 15,2	36,9 \pm 5,0	49,5 \pm 15,5	36,2 \pm 4,5
PCL + 7,5% GS	33,7 \pm 6,0	72,0 \pm 22,0	50,1 \pm 17,9	58,6 \pm 29,5
PCL + 10% GS	85,6 \pm 36,6	71,2 \pm 33,6	85,1 \pm 16,1	45,9 \pm 5,6

Příloha C: Doplnění kapitoly 7.3.3. – Absorpce tekutin

Tabulka P2: Průměrné hodnoty změny absorpce vody a simulované střevní tekutiny, pro jednotlivé materiály, sterilní i nesterilní

ABSORPCE [%]	DESTILOVANÁ VODA		SIMULOVANÁ STŘEVNÍ TEKUTINA	
	NESTERILNÍ	STERILNÍ	NESTERILNÍ	STERILNÍ
PCL	1232,46 ± 138,97	1709,47 ± 326,12	1211,09 ± 23,25	1153,41 ± 210,00
PCL + 1% GS	1189,94 ± 406,42	1732,48 ± 412,22	794,09 ± 137,23	1442,48 ± 327,76
PCL + 3% GS	1366,60 ± 52,69	1430,57 ± 62,77	1014,11 ± 118,27	1264,51 ± 200,07
PCL + 5% GS	1410,13 ± 506,18	1564,29 ± 88,43	1104,62 ± 156,88	1386,32 ± 354,39
PCL + 7,5% GS	1240,75 ± 252,67	1484,37 ± 290,27	1036,60 ± 63,19	1077,85 ± 54,19
PCL + 10% GS	2058,49 ± 270,78	1126,55 ± 55,90	1719,43 ± 134,53	932,96 ± 29,79

Tabulka P3: Průměrné hodnoty změny hmotnosti po absorpci vody a simulované střevní tekutiny, pro jednotlivé materiály, sterilní i nesterilní

ZMĚNA HMOTNOSTI [%]	DESTILOVANÁ VODA		SIMULOVANÁ STŘEVNÍ TEKUTINA	
	NESTERILNÍ	STERILNÍ	NESTERILNÍ	STERILNÍ
PCL	-1,369 ± 3,391	2,468 ± 4,352	17,970 ± 6,610	23,279 ± 7,807
PCL + 1% GS	-1,609 ± 2,041	3,423 ± 1,482	14,260 ± 3,296	18,778 ± 4,988
PCL + 3% GS	-2,668 ± 2,312	-8,765 ± 4,408	23,287 ± 14,119	20,232 ± 7,298
PCL + 5% GS	-5,055 ± 2,279	-7,020 ± 3,433	14,013 ± 2,153	14,946 ± 10,157
PCL + 7,5% GS	-3,346 ± 9,319	-2,908 ± 4,573	-8,115 ± 7,510	9,871 ± 2,522
PCL + 10% GS	7,653 ± 21,622	-7,845 ± 4,809	19,971 ± 15,025	5,105 ± 3,360

Příloha D: Doplnění kapitoly 7.3.4. Cytotoxicita extraktů materiálů a kapitoly 7.3.5. – Cytotoxicita GS v médiu

Tabulka P4: Viabilita buněk po kultivaci s extrakty materiálů a GS v médiu, MTT test cytotoxicity

CYTOTOXICITA EXTRAKTŮ MATERIÁLŮ	VIABILITA [%]	CYTOTOXICITA GS V MÉDIU [MG/1ML]	VIABILITA [%]
NC	100 ± 8,91	NC	100 ± 8,91
PC	0,67 ± 0,30	PC	0,67 ± 0,30
PCL	125,36 ± 11,15	1	165,12 ± 20,86
PCL + 1% GS	134,89 ± 19,80	5	131,85 ± 18,48
PCL + 3% GS	130,61 ± 14,05	10	110,17 ± 14,21
PCL + 5% GS	140,65 ± 9,62	15	108,30 ± 8,04
PCL + 7,5% GS	131,75 ± 16,86	20	78,34 ± 6,03
PCL + 10% GS	152,57 ± 9,15	40	47,03 ± 5,06
-	-	60	23,62 ± 4,56
-	-	80	6,65 ± 0,97
-	-	100	3,28 ± 2,35
-	-	250	2,22 ± 1,60

Příloha E: Doplnění kapitoly 7.3.6. - *In vitro* testování buněčné adheze a proliferace

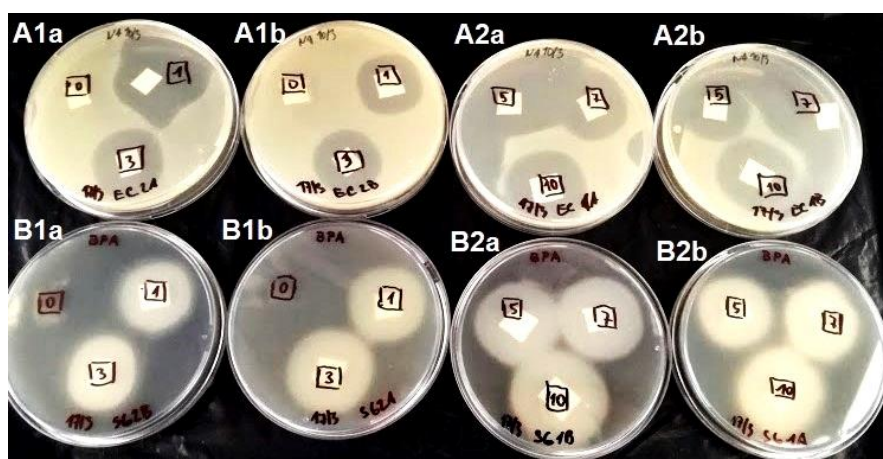
Tabulka P5: Hodnoty absorbance pro jednotlivé materiály 2.; 7.; 14. a 21. den *in vitro* testu, CCK-8 test

METABOLICKÁ AKTIVITA	ABSORBANCE [450 nm]			
MATERIÁL/DEN	2D	7D	14D	21D
PCL	0,535 ± 0,019	5,560 ± 0,967	7,441 ± 0,375	6,983 ± 0,347
PCL + 1% GS	0,525 ± 0,007	4,519 ± 0,991	7,207 ± 0,133	7,125 ± 0,275
PCL + 3% GS	0,524 ± 0,014	5,005 ± 0,607	7,451 ± 0,233	7,206 ± 0,331
PCL + 5% GS	0,606 ± 0,032	5,459 ± 0,635	7,380 ± 0,406	7,342 ± 0,203
PCL + 7,5% GS	0,592 ± 0,015	5,932 ± 0,382	7,431 ± 0,114	7,292 ± 0,157
PCL + 10% GS	0,444 ± 0,248	5,747 ± 0,565	7,350 ± 0,494	8,073 ± 0,559

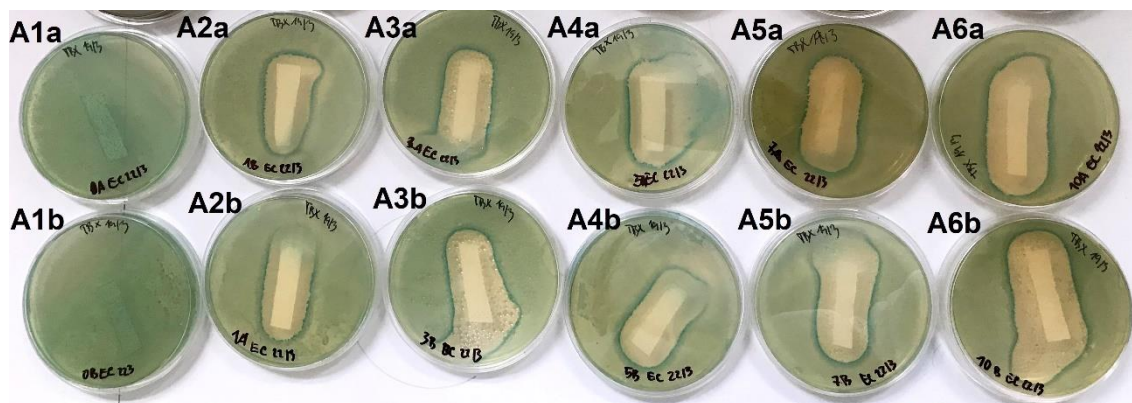
Tabulka P6: Počet buněk na 1 mm² plochy materiálu, pomocí programu MatLab

POČET BUNĚK	POČET BUNĚK NA 1 mm ²			
MATERIÁL/DEN	2D	7D	14D	21D
PCL	127,04 ± 42,04	1916,22 ± 590,34	5558,39 ± 1419,54	3534,18 ± 448,95
PCL + 1% GS	124,75 ± 20,67	2172,20 ± 517,30	3785,97 ± 565,30	3270,58 ± 730,61
PCL + 3% GS	107,23 ± 35,30	2544,74 ± 497,80	4989,68 ± 994,82	2698,44 ± 719,73
PCL + 5% GS	178,46 ± 97,94	2479,60 ± 1027,89	2623,97 ± 451,47	2492,55 ± 1059,88
PCL + 7,5% GS	213,70 ± 69,79	2767,96 ± 476,85	3492,28 ± 549,72	3796,25 ± 873,23
PCL + 10% GS	171,41 ± 50,85	2701,30 ± 403,61	3931,86 ± 398,46	3502,75 ± 773,04

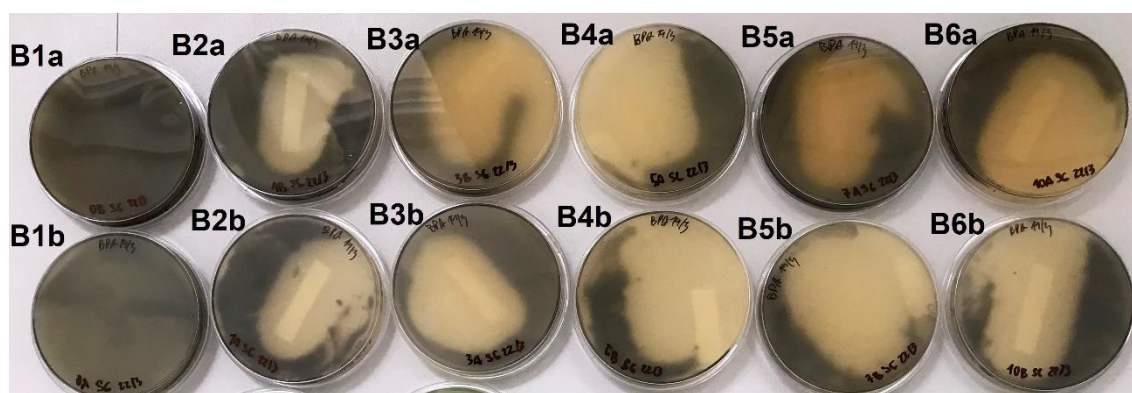
Příloha E: Doplnění kapitoly 7.3.7. Antibakteriální testy – Fotografie Petriho misek po 24 hodinách inkubace



Obrázek P2: Prvotní experiment: Petriho misky po inkubaci materiálů s bakteriálními kmeny *Escherichia Coli* (A) a *Staphylococcus gallinarum* (B); destičky 1 – materiály 0: PCL, 1: PCL + 1% GS, 3: PCL + 3% GS, 5: PCL + 5% GS, destičky 2 - materiály 7: PCL + 7,5% GS, 10: PCL + 10% GS, a - první opakování, b - druhé opakování vzorků



Obrázek P3: Difúzní experiment: Petriho misky po inkubaci materiálů s bakteriálními kmeny *Escherichia Coli* (A) - 1: PCL, 2: PCL + 1% GS, 3: PCL + 3% GS, 4: PCL + 5% GS, 5: PCL + 7,5% GS, 6: PCL + 10% GS, a – první opakování, b – druhé opakování



Obrázek P4: Difúzní experiment: Petriho misky po inkubaci materiálů s bakteriálními kmeny *Staphylococcus gallinarum* (B) - 1: PCL, 2: PCL + 1% GS, 3: PCL + 3% GS, 4: PCL + 5% GS, 5: PCL + 7,5% GS, 6: PCL + 10% GS, a – první opakování, b – druhé opakování