



Bakalářská práce

Vliv chitosanu na antibakteriální vlastnosti nanovláken

Studijní program:

B0719A130001 Nanotechnologie

Autor práce:

Eliška Prokopcová

Vedoucí práce:

Ing. Miroslava Rysová, Ph.D.

Ústav nových technologií a aplikované
informatiky

Konzultant práce:

Ing. Mgr. Karolína Morávková

Ústav pro nanomateriály, pokročilé
technologie a inovace

Liberec 2024



Zadání bakalářské práce

Vliv chitosanu na antibakteriální vlastnosti nanovláken

<i>Jméno a příjmení:</i>	Eliška Prokopcová
<i>Osobní číslo:</i>	M21000082
<i>Studijní program:</i>	B0719A130001 Nanotechnologie
<i>Zadávající katedra:</i>	Ústav nových technologií a aplikované informatiky
<i>Akademický rok:</i>	2023/2024

Zásady pro vypracování:

1. Seznamte se s teorií zpracování a vlastností chitosanu a s možnostmi jeho využití v medicíně aplikacích.
2. Prostudujte a popište stav poznání v oblasti chitosanových a antibakteriálně účinných nanovláken.
3. Experimentálně ověřte vliv složení nanovláken na bakteriální kolonizaci nanovláken na alespoň jednom modelovém bakteriálním kmenu.
4. Ověřte vliv podílu chitosanu na antibakteriální účinnost nanovláken v přímém kontaktu.
5. Výsledky shrňte a diskutujte.

Rozsah grafických prací: dle potřeby dokumentace
Rozsah pracovní zprávy: 30 – 40 stran
Forma zpracování práce: tištěná/elektronická
Jazyk práce: čeština

Seznam odborné literatury:

- [1] Xia, Y. et al. Applications of Chitosan and its Derivatives in Skin and Soft Tissue Diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10, n. 894667. doi: 10.3389/fbioe.2022.894667
- [2] Morin-Crini, N. et al. Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. *Environmental Chemistry Letters*, 2019, 17, pp. 1667–1692. doi: 10.1007/s10311-019-00904-x
- [3] Yilmaz Atay, H. Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems. *Functional Chitosan*, 2020, 6, pp. 457–489. doi: 10.1007/978-981-15-0263-7_15
- [4] Cui, C. t al. Electrospun chitosan nanofibers for wound healing application. *Engineered Regeneration*, 2021, 2, pp. 82 – 90. doi: 10.1016/j.engreg.2021.08.001

Vedoucí práce: Ing. Miroslava Rysová, Ph.D.
Ústav nových technologií a aplikované informatiky

Konzultant práce: Ing. Mgr. Karolína Morávková
Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace

Datum zadání práce: 12. října 2023
Předpokládaný termín odevzdání: 14. května 2024

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan

L.S.

prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.
garant studijního programu

V Liberci dne 19. října 2023

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že na mou bakalářskou 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 bakalářské práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li bakalářskou 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 bakalářská 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.

Vliv chitosanu na antibakteriální vlastnosti nanovláken

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem chitosanu (CHIT) na antibakteriální vlastnosti směsných nanovláken. Teoretická část této práce poskytuje základní informace o chitosanu ale také o jeho antibakteriálních účincích a následném využití v různých oblastech. Také se zaměřuje na různé faktory, které ovlivňují výsledné vlastnosti chitosanu. Tato práce také zmiňuje základní informace o metodě elektrostatického zvlákňování. Uvádí také informace o klasifikaci bakterií na grampozitivní a gramnegativní. Chitosan je přírodní polysacharid se zajímavými vlastnostmi. Jednou z hlavních vlastností je přirozená antibakteriální aktivita způsobená přítomností primárních aminoskupin na jeho polymerním řetězci. Vzhledem k obtížné zpracovatelnosti elektrostatickým zvlákňováním v čisté podobě je výhodné chitosan mísit s vhodnými polymery. Tato práce se zabývá antibakteriálními vlastnostmi jeho směsi s hydrofobním polykaprolaktonem (PCL). Nanovlákná obsahující PCL a chitosan v různém poměru až do obsahu 30 % CHIT byla testována z hlediska inhibice bakteriálního růstu metodou Kolonie tvořící jednotku (CFU, Colony forming unit) po dvou hodinách expozice. Dále byl studován vliv složení nanovláken na bakteriální adhezi z hlediska počtu adherovaných bakterií v čase a jejich rozměru. Jako modelové bakterie byly použity grampozitivní kok Staphylococcus gallinarum a gramnegativní tyčinka Escherichia coli. Tato práce ze získaných dat přinesla poznatky o bakteriální adhezi na PCL/CHIT nanovláknách a o antibakteriálním účinku PCL/CHIT nanovláken. Směsná PCL/CHIT nanovlákná u bakteriálního kmene Staphylococcus gallinarum inhibovala růst již při podílu 5 % chitosanu o 3 řády. Při podílu 20 % chitosanu došlo k úplné inhibici S. gallinarum (o 5 řádů). U bakterie Escherichia coli k prokazatelné inhibici růstu nedošlo. Z hlediska bakteriální adheze u bakterie Staphylococcus gallinarum se snížil počet bakterií na nanovláknách při podílu 20 % chitosanu. Počet adherovaných bakterií se v čase neměnil. U bakterie E. coli narostl počet adherovaných bakterií až po 6 hodinách expozice, a to jen u vzorků s podílem 20 % a 30 % chitosanu. Velikost bakterií rostla se zvyšujícím se podílem chitosanu v nanovláknách. Byl prokázán významný vliv podílu chitosanu ve směsných PCL/CHIT nanovláknách na bakteriální odezvu.

Klíčová slova

Nanovlákná, chitosan, polykaprolakton, antibakteriální účinek, bakteriální adheze

Impact of chitosan content on antibacterial properties of nanofibers

Abstract

This bachelor thesis deals with the influence of chitosan (CHIT) on the antibacterial properties of blended nanofibers. The theoretical part of this thesis provides basic information about chitosan but also about its antibacterial effects and its subsequent use in various fields. It also focuses on the various factors that influence the resulting properties of chitosan. This thesis also mentions basic information about the electrospinning method. It provides information of the classification of bacteria into Gram-positive and Gram-negative. Chitosan is natural polysaccharide with interesting properties. One of the main properties is the natural antibacterial activity caused by the presence of primary amino groups on its polymer chain. Due to the difficulty of processing by electrospinning in pure form, it is advantageous to blend chitosan with suitable polymers. This thesis focuses on the antibacterial properties of its blend with hydrophobic polycaprolactone (PCL). Nanofibers containing PCL and chitosan in various ratios up to 30 % CHIT were tested for inhibition of bacterial growth by the Colony Forming Unit (CFU) method after two hours of exposure. Furthermore, the influence of nanofiber composition on bacterial adhesion was studied in terms of the number of bacteria adhered over time and their size. The gram-positive coccus *Staphylococcus gallinarum* and the gram-negative rod *Escherichia coli* were used as model bacteria. Based on the obtained data, this thesis provided insights into bacterial adhesion on PCL/CHIT nanofibers and the antibacterial effect of PCL/CHIT nanofibers. The blended PCL/CHIT nanofibers inhibited the growth of a bacterial strain of *Staphylococcus gallinarum* at a chitosan content of 5 % by 3 orders of magnitude. At a 20 % chitosan content, *S. gallinarum* was completely inhibited (by 5 orders of magnitude). For *Escherichia coli*, no significant growth inhibition was observed. Regarding bacterial adhesion, the number of bacteria on the nanofibers decreased at 20 % chitosan content for *Staphylococcus gallinarum*. The number of adhered bacteria did not change over time. For *E. coli*, the number of adhered bacteria increased only after 6 hours of exposure and only for samples with 20 % and 30 % chitosan content. The size of bacteria increased with increasing chitosan content in the nanofibers. The chitosan content in blended PCL/CHIT nanofibers was shown to significantly influence bacterial response.

Keywords

Nanofibers, chitosan, polycaprolactone, antibacterial activity, bacterial adhesion

Poděkování

Ráda bych zde chtěla velmi poděkovat své vedoucí bakalářské práce paní Ing. Miroslavě Rysové, Ph. D., nejprve za nabídnutí takto zajímavého tématu bakalářské práce, dále za skvělé vedení, neskutečnou podporu a načerpání mnoha nových poznatků, vědomostí a zkušeností a za celkový vřelý přístup. Mojí konzultantce Ing. Mgr. Karolíně Morávkové bych chtěla poděkovat za pomoc při práci v laboratoři, za cenné rady a mentální podporu. Chtěla bych zde poděkovat i paní Mgr. Markétě Schaabové za její trpělivost, asistenci a obrovskou pomoc při mikrobiologických experimentech. Zároveň bych jí a paní Ivě Víchové chtěla poděkovat za pomoc se SEM analýzou. Poděkování také patří finanční podpoře projektu Biologicky aktivní materiály pro aplikace ve zdravotnických prostředcích číslo FW01010214, bez kterého by tato bakalářská práce nemohla být zpracována. Za korekturu bych ráda poděkovala své tetě MUDr. Kristině Studénkové. Dále bych ráda poděkovala své rodině za obrovskou podporu při studiu. A v neposlední řadě patří velké díky mému příteli za podporu a taky za to, že to se mnou i v těch nejhorších chvílích vydržel.

Obsah

Úvod	12
Teoretická část.....	13
1 Chitosan a jeho vlastnosti	13
1.1 Výroba chitosanu.....	14
1.2 Aplikace chitosanu	15
2 Bakterie.....	18
2.1.1 Klasifikace bakterií.....	19
2.1.2 Bakteriální adheze	20
2.2 Antibakteriální účinky chitosanu	21
3 Nanovlákná.....	24
3.1 Metody výroby nanovláken.....	25
3.2 Využití nanovláken v medicíně	27
3.3 Nanovlákná s antibakteriálním účinkem	29
3.4 Chitosanová nanovlákná	36
3.4.1 Síťování	38
Experimentální část	41
4 Popis vstupních materiálů.....	41
5 Materiály a metody.....	43
5.1 Použité materiály, chemikálie, přístroje a programy	43
5.2 Hodnocení interakce s bakteriemi	44
5.2.1 Kolonie tvořící jednotku – CFU	44
5.2.2 Adheze na povrch materiálu	45
6 Výsledky a diskuse.....	47
6.1 Výsledky CFU.....	47
6.2 Výsledky adheze na povrchu materiálů	51
6.2.1 Velikosti bakterií.....	51
6.2.2 Počty adherentních bakterií	59
6.3 Celkové shrnutí výsledků a diskuse	67
Závěr	68
Použitá literatura	69
Přílohy.....	74
Příloha A: snímky ze SEM	74

Seznam obrázků

Obr. 1.1: Struktura chitosanu.	14
Obr. 1.2: Přeměna chitinu na chitosan (převzato z [7]).	14
Obr. 2.1: Základní struktura bakteriální buňky (zdroj: autor).	18
Obr. 2.2: Ilustrace bakteriální adheze na nanovláčkách (převzato s úpravami z [14])... ..	20
Obr. 3.1: Zařízení pro electrospinning (převzato s úpravami z [17]).	25
Obr. 3.2: Schéma nanospideru nové generace.	27
Obr. 3.3: Schéma zvláknovacího zařízení a varianty electrospinningu. (převzato s úpravami z [14]).	29
Obr. 3.4: Znázornění různých mechanismů působení antimikrobiálních látek obsažených v nanovláčkách na buňky bakterií.	30
Obr. 3.5: Různé metody inkorporace biocidů do elektrospunovaných nanovláken.	32
Obr. 3.6: Snímky FE-SEM	37
Obr. 3.7: Extrakce vodorozpustného jádra CHIT nanovláken [43].	38
Obr. 3.8: SEM snímek zesílených CHIT nanovláken [45].	39
Obr. 4.1: FTIR spektra nanovláken PCL/CHIT.	42
Obr. 6.1: Graf vlivu podílu chitosanu na počet narostlých kolonií.	47
Obr. 6.2: Graf vlivu podílu chitosanu na počet vyrostlých kolonií.	48
Obr. 6.3: Graf vlivu podílu chitosanu na počet narostlých kolonií.	49
Obr. 6.4: Graf vlivu podílu chitosanu na počet narostlých kolonií.	49
Obr. 6.5: Graf vlivu podílu chitosanu na počet narostlých kolonií.	50
Obr. 6.6: Přehledový graf průměrných velikostí bakterií. Kmen SG.	51
Obr. 6.7: Přehledový graf průměrných velikostí bakterií. Kmen EC.	52
Obr. 6.8: Velikost bakterií SG po inkubaci 2 hodiny.	53
Obr. 6.9: Velikost bakterií SG po inkubaci 4 hodiny.	54
Obr. 6.10: Velikost bakterií SG po inkubaci 6 hodin.	55
Obr. 6.11: Velikost bakterií EC po inkubaci 2 hodiny.	56
Obr. 6.12: Velikost bakterií EC po inkubaci 4 hodiny.	57
Obr. 6.13: Velikost bakterií EC po inkubaci 6 hodin.	58
Obr. 6.14: SEM snímky vzorků.	59
Obr. 6.15: Graf průměrného počtu bakterií SG na 1 mm ² po 2 h inkubace.	59
Obr. 6.16: SEM snímky vzorků.	60
Obr. 6.17: Graf průměrného počtu bakterií SG na 1 mm ² po 4 h inkubace.	60
Obr. 6.18: SEM snímky vzorků.	61
Obr. 6.19: Graf průměrného počtu bakterií SG na 1 mm ² po 6 h inkubace.	61
Obr. 6.20: SEM snímky vzorků.	62
Obr. 6.21: Graf průměrného počtu bakterií EC na 1 mm ² po 2 h inkubace.	62
Obr. 6.22: SEM snímky vzorků.	63
Obr. 6.23: Graf průměrného počtu bakterií EC na 1 mm ² po 4 h inkubace.	63
Obr. 6.24: SEM snímky vzorků.	64
Obr. 6.25: Graf průměrného počtu bakterií EC na 1 mm ² po 6 h inkubace.	64
Obr. 6.26: Graf porovnání průměrného počtu bakterií SG na 1 mm ² ve všech inkubačních časech.	65
Obr. 6.27: Graf porovnání průměrného počtu bakterií EC na 1 mm ² ve všech inkubačních časech.	65

Seznam tabulek

Tab. 3.1: Klíčové vlastnosti nanovláken pro antimikrobiální aplikace (převzato z [14]).	31
Tab. 3.2: Přehled elektrostaticky zvlákněných polymerů s příslušnými antibakteriálními látkami a metodou inkorporace [36]......	35
Tab. 5.1: Přehled testovaných materiálů.....	43
Tab. 5.2: Seznam použitých bakterií. Česká sbírka mikroorganismů.	43
Tab. 5.3: Seznam použitých přístrojů a programů.....	43
Tab. 5.4: Přehled zkoumaných materiálů.	44
Tab. 6.1: Počet narostlých kolonií SG po inkubaci 2 h s příslušnými materiály.....	47
Tab. 6.2: Počet narostlých kolonií EC po inkubaci 2 h s příslušnými materiály.....	48
Tab. 6.3: Počet narostlých kolonií SG po inkubaci 2 h s příslušnými materiály.....	49
Tab. 6.4: Počet narostlých kolonií EC po inkubaci 2 h s příslušnými materiály.....	50

Seznam zkratek

AgNP	Nanočástice stříbra („Ag nanoparticles“)
bakt.	bakteriální
Bl.	blank (čistá bakteriální kultura)
BSA	(„Bovine Serum Albumin“)
bujón	Trypton sójový bujón
CFU	Kolonie tvořící jednotku („Cell Forming Unit“)
DD	Stupeň deacetylace („Deacetylation degree“)
dH ₂ O	Destilovaná voda
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EC	<i>Escherichia coli</i>
FR	Fyziologický roztok
GTA	Glutaraldehyd
CHIT	Chitosan
McF	Mc Farland
NaCl	Chlorid sodný
oboh.	obohacený
PCL	Polykaprolakton
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SG	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
TSA	Trypton sójový agar („Trypton Soy Agar“)
TSB	Trypton sójový bujón („Tryptic Soy Broth“)

Úvod

V dnešní době se v oblasti biomedicínského výzkumu stále více klade důraz na hledání nových materiálů se specifickými vlastnostmi a potenciálem pro využití v medicíně. Jedním z těchto materiálů jsou nanovlákná, která díky svým unikátním vlastnostem mají širokou škálu možných aplikací jako nosiče pro dopravu léčiv, scaffoldy pro tkáňové inženýrství nebo kryty ran. Právě kryty ran využívají jejich vlastnosti jako je jejich struktura, vysoká porozita a malý rozměr pórů pro ochranu rány. U infikovaných ran mohou nanovlákná nést antibakteriálně účinné látky, které pomáhají bojovat s infekcí a při následném hojení. Vzhledem k rostoucí bakteriální rezistenci vůči řadě antibiotik je snaha o hledání alternativ umožňujících boj s infekcí, a to včetně alternativ přírodních.

Chitosan, derivát chitinu, je unikátní přírodní polysacharid se širokým spektrem aplikací, který vykazuje přirozené antibakteriální účinky a bioaktivitu a může být v těchto materiálech pro hojení ran využitelný. Antibakteriální účinky chitosanových nanovláken mohou být ovlivněny celou řadou faktorů, jako je obsah chitosanu a stupeň jeho deacetylace, metoda stabilizace nanovláken, struktura nanovláken (homogenní distribuce v celém průřezu vlákna, rozdílné složení jádro/obal). Významný vliv na výsledný antibakteriální efekt má také složení bakteriální populace.

Tato bakalářská práce si klade za cíl zkoumat vliv podílu chitosanu v nanovláknách na jejich bakteriální odezvu u dvou modelových bakterií – grampozitivní *Staphylococcus gallinarum* a gramnegativní *Escherichia coli*. Použité metody jsou blíže popsány v experimentální části této práce.

Teoretická část

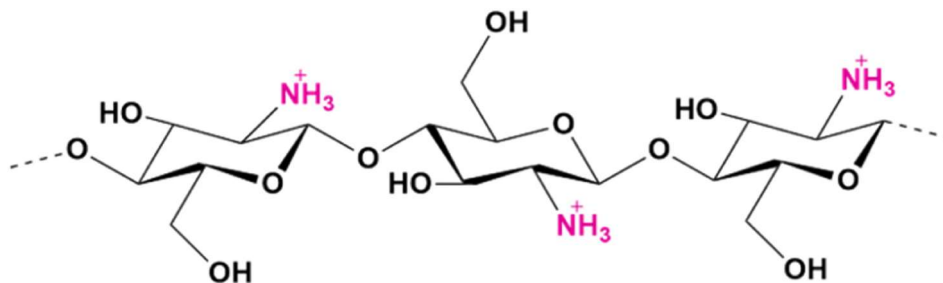
1 Chitosan a jeho vlastnosti

Chitosan (CHIT) se získává chemickou úpravou chitinu, který je po celulóze druhým nejrozšířenějším polysacharidem na Zemi, vyskytujícím se přirozeně ve schránkách korýšů [1], ale i v buněčných stěnách hub [2]. CHIT je zatím jediný známý přírodní alkalický polysacharid s kladným nábojem [3]. CHIT je lineární kationický polysacharid, který je netoxický, biokompatibilní a biologicky odbouratelný. Jeho monomerní jednotka se skládá z D-glukosaminu (deacetylovaná 2-amino-2-deoxy-D-glukopyranózová jednotka) a N-acetyl-D-glukosaminu (acetylovaná jednotka 2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranózová jednotka) prostřednictvím β -(1→4)-glykosidických vazeb [1, 4].

Na rozdíl od chitinu má CHIT lepší rozpustnost, biologickou rozlišitelnost, širokou škálu biologických, farmakologických účinků, jako jsou bakteriostatické, antioxidační, imunomodulační, protinádorové a další aktivity. CHIT je nerozpustný v běžných organických rozpouštědlech. Je rozpustný ve zředěných roztocích kyselin a jeho rozpustnost závisí na stupni deacetylace. Rozpustnost CHIT ve zředěných kyselinách spočívá v tom, že aminoskupina na jeho molekulovém řetězci se spojí s vodíkovými protony ve vodném roztoku, čímž se z něj stane kladně nabitý polyelektrolyt. Existence kationtů tedy ničí původní vodíkové vazby mezi molekulami chitosanu a způsobuje jejich rozpouštění ve vodě. Rozpustnost chitosanu je také ovlivněna jeho molekulovou hmotností. Obecně platí, že rozpustnost roste s rostoucím stupněm deacetylace a klesající molekulovou hmotností.

Chitosan má ve svém monomeru přístupné funkční skupiny, jako je primární amin (NH_2), primární i sekundární hydroxylová skupina (OH), což umožňuje jeho chemické modifikace bez narušení délky molekulárního řetězce. Chemická modifikace CHIT je účinnou technikou pro řízení interakce polymeru s dalšími složkami, jako jsou ionty kovů, organické sloučeniny či léčiva. Chemická modifikace CHIT mění jeho vybrané vlastnosti včetně antibakteriální aktivity a může se využít i pro přípravu systémů s prodlouženým uvolňováním léčiv, což je výhodné pro jeho aplikace v hojení ran a dopravě léčiv [1].

CHIT může chemicky reagovat s mnoha organickými činidly a také může být připraven do různých tvarů, například houbových materiálů, nanočástic, gelových částic a tak podobně [4].

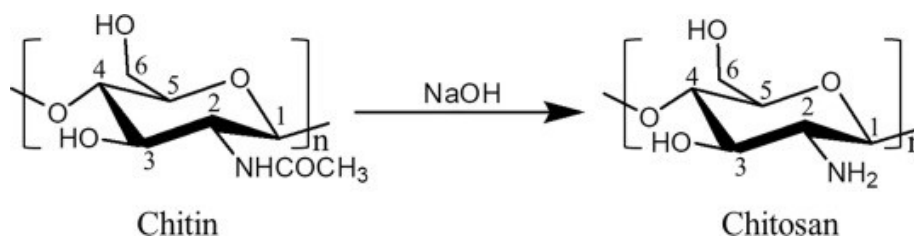


Obr. 1.1: Struktura chitosanu.

Znázorněny (růžově) jeho aktivní aminoskupiny po jejich protonaci v kyselém prostředí [5].

1.1 Výroba chitosanu

Odpadní krunýře koryšů (krabů a krevet) jsou primárním zdrojem biomasy pro průmyslovou izolaci chitinu a výrobu CHIT. Odpad z mořského průmyslu se recykluje za účelem získání biomateriálu, což vede k environmentální udržitelnosti. Skořápky koryšů se skládají z bílkovin, organických solí, chitinu a lipidů [6]. Chitin má omezené možnosti použití kvůli vysokému obsahu acetylovaných skupin, rigidní krystalové struktuře a špatné rozpustnosti ve vodných roztocích. Při částečné odstranění acetylové skupiny chitinu se zvyšuje rozpustnost ve vodě a zvyšuje se biologická rozložitelnost a biokompatibilita. Obecně lze chitin se stupněm deacetylace (DD – deacetylation degree) vyšším než 50 % označit jako chitosan.



Obr. 1.2: Přeměna chitinu na chitosan (převzato z [7]).

Nejčastěji využívanou metodou v průmyslové výrobě CHIT je metoda chemické degradace. Ta zahrnuje odvápnění a následnou alkalickou deacetylaci chemickou cestou. Suroviny, například skořápky krevet a krabů, se odvápní, deproteinizují a odbarví, aby se

získal chitin [4]. Nejprve se skořápky rozemelou a minerály, hlavně uhličitan vápenatý, se odstraní extrakcí zředěnou kyselinou chlorovodíkovou, při kterém se vysráží chlorid vápenatý. Bílkoviny se odstraní rozpouštěním zředěným roztokem hydroxidu sodného, přičemž se hydrolyzují N-acetylové skupiny v náhodně vybraných částech polymerního řetězce. K odstranění barvy může být zařazen další krok – odbarvení. Poté proběhne deacetylace 40-50% NaOH (hydroxid sodný), aby se odstranil acetyl a získal se CHIT. CHIT s různým stupněm deacetylace lze získat změnou koncentrace alkalického roztoku, reakční doby, teploty a poměru chitin/alkalický roztok. Uvedená metoda je jednoduchá, snadno proveditelná, vysoce účinná, a navíc je celý výrobní proces lehce kontrolovatelný. Chemická deacetylace se však vyznačuje velkou spotřebou energie a znečišťováním životního prostředí. Proto by ji mohla nahradit enzymatická metoda [4, 6], jako ekologičtější varianta.

Enzymatická deacetylace je metoda přeměny chitinu na CHIT pomocí chitindeacetylázy. Tato metoda nejen šetří energii, ale také chrání životní prostředí. Problémy s výběrem, šlechtěním, extrakcí a kultivací bakterií produkujících vynikající enzymy však omezují použití enzymových metod. Proto je výběr vhodných kmenů podporujících produkci vysoce životaschopné chitindeacetylázy cennější aplikací [4].

Neustálý nárůst produkce odpadů spojený s růstem celosvětové produkce potravin vyžaduje hledání využití odpadů a vedlejších produktů z potravinářského průmyslu. Produkce CHIT je v tomto ohledu ekonomicky životaschopným prostředkem a může být dále efektivně využita v nesčetných aplikacích [6].

1.2 Aplikace chitosanu

CHIT je považován za multifunkční polymer použitelný k různým účelům díky své univerzálnosti, biokompatibilitě, stravitelnosti a nízké ceně. CHIT a jeho sortiment derivátů má širokou škálu aplikací využívaných k řešení mnoha problémů v environmentálním a biomedicínském inženýrství. CHIT je díky svým zajímavým vlastnostem jedním z nejslibnějších polymerů na biologické bázi pro podávání léčiv, tkáňové inženýrství, genovou terapii a teranostiku. Rozmanité aplikace chitosanu a jeho derivátů spočívají v jeho unikátní struktuře a bioaktivitě [6].

V současné době mají CHIT a jeho deriváty praktické využití ve formě roztoků, suspenzí, částic, pryskyřic, kuliček, nanočástic a hub, gelů/hydrogelů, pěn, membrán a

filmů, vláken, mikroskopických vláken a scaffoldů v mnoha oblastech. Mezi takové oblasti řadíme medicínu a biomedicínu, farmacii, kosmetologii, hygienu a osobní péči, potravinářský průmysl a výživu, zemědělství a agrochemii, textilní a papírenský průmysl, a mnoho dalších [8].

Jeho jednotlivé aplikace zahrnují například:

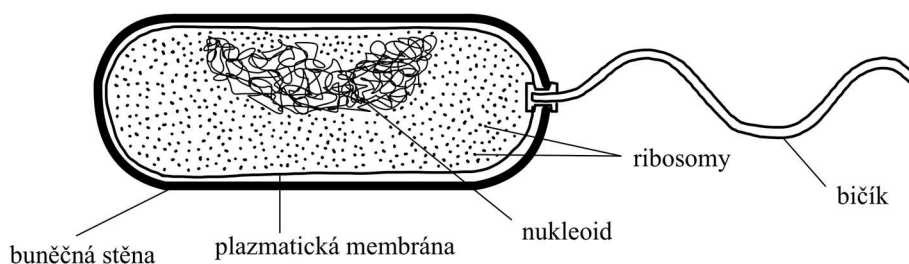
- **Potravinářský průmysl:** CHIT se používá jako nutriční složka (potravinářské přídatné látky, funkční potraviny), pro antimikrobiální nátěry ovoce a zeleniny, v anticholesterolemických dietních výrobcích a jako nutraceutika [8].
- **Chemie:** CHIT je předmětem zkoumání pro aplikaci v chromatografii, zelené chemii, katalýze, membránové technologii a elektrochemii. Byl navržen v tenkovrstvé chromatografii pro separaci nukleových kyselin a v zelené chemii pro výrobu zelených rozpouštědel. Předpokládá se, že chitosan bude hrát v těchto nových vývojových směrech velmi důležitou roli [8].
- **Biotechnologie:** Kromě toho je chitosan jako ekologicky šetrný biopolymer testován také pro aplikace v biotechnologiích pro čiření a čištění odpadní vody, sanaci, odvodňování kalů a membránovou filtraci [8].
- **Farmacie:** Chitosan a jeho deriváty lze použít jako roztoky, gely, tablety, kapsle, vlákna, filmy a houby. Lze ho použít při orálním, očním, nosním, vaginálním, bukalním, parentálním, intravezikálním a transdermálním podání a jako implantáty pro podávání léčiv v implantabilní i injekční formě. Využívají se zejména jeho mukoadhezivní vlastnosti, gelace a komplexace (např. s DNA) [8].
- **Medicína:** Aplikace chitosanu zahrnují farmaceutické formulace a podávání léčiv různého typu (antibiotika, protizánětlivé látky, vakcíny, proteiny, peptidy, růstové faktory), antimikrobiální aplikace, genovou terapii, hojení ran a popálenin, regenerativní medicínu, tkáňové inženýrství (kosti, vazy, chrupavky, šlachy, játra, regenerace nervů a kůže), aplikace pro léčbu rakoviny (terapie, diagnostická strategie), dermatologie, oftalmologie, stomatologie, biosenzory a mnoho dalších aplikací, jako je podpora imobilizovaných enzymů a veterinární medicína. Chitosan se také používá pro aplikace ve tkáňovém inženýrství jako „scaffold“ a v hojení ran jako bioaktivní kryt. Jeho antibakteriální a protiplísňové vlastnosti ve spojení s biokompatibilitou jsou zvláště zajímavé pro ošetření ran. Materiály ve formě netkaných textilií, nanovláken, kompozitů, filmů a houbiček mohou urychlit hojení ran a regeneraci kůže. Tyto materiály využívají také jeho hemostatické a mukoadhezivní vlastnosti či jeho

schopnost tvorby komplexů s různými molekulami. Chitosan je biologicky odbouratelný a enzymaticky se rozkládá na oligosacharidy, které jsou následně metabolizovány. Chitosan a jeho oligosacharidy mají také stimulační účinek na buňky. Chitosan je potenciálním antioxidantem, který je schopen vychytávat volné radikály (např. hydroxylové, DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) a superoxidové. Některé studie ukázaly, že chitosan vykazuje inhibiční účinek na nádorové buňky [9, 10]. Pro hojení ran jsou významné především jeho účinky na fibroblasty a jeho schopnost potlačení bakteriálního růstu [8].

- **Hojení ran:** Chitosanové materiály se v hojení ran využívají v různých podobách a v kombinaci s celou řadou dalších bioaktivních látek. Hojení ran zahrnuje především regeneraci poškozené měkké tkáně. Konkrétní forma krytu se volí na základě rozsahu poškození, typu a hloubky rány, krvácivosti, přítomnosti zánětu či infekce a řady dalších faktorů vč. věku, výživy a zdravotního stavu pacienta. U chitosanových hydrogelů byla prokázána podpora reepitelizace a angiogeneze tkáně. Pro podporu dalších dějů je možné chitosan kombinovat s dalšími aktivními látkami. U chitosanových hydrogelů s chloridem lithným byla prokázána schopnost snížit záněty rány, podpořit angiogenezi a urychlit regeneraci epitelu. Při léčbě infikovaných ran je využití chitosanu velice výhodné. V případě, kdy patogenní bakterie napadají kůži a podkožní tkáň, vyvolávají zánětlivý stav a znemožňují hojení, je nutné odstranění infekce i případné nekrotické tkáně. Zde je možné využít přirozené antimikrobiální účinky chitosanu a kombinovat je s jeho schopností vázat různá léčiva pro dosažení zvýšeného antibakteriálního účinku. Byla popsána například inkorporace nanočástic stříbra do chitosanových hydrogelů. Dále byla popsána schopnost kombinace chitosanu a ficinu inhibovat infekci a biofilm bakterie *Staphylococcus aureus*. U chitosanových membrán s kurkuminem byla popsána schopnost inhibovat patogenní bakterie a zároveň podporovat regeneraci vláknité pojivové tkáně. Zajímavé biologické efekty při hojení ran, jako např. antioxidační a imunomodulační účinek, byly popsány také u různých derivátů chitosanu. Například sulfát chitosanu může zlepšit funkci makrofágů tím, že indukuje polarizaci makrofágů M1 na M2, a tím podporuje hojení diabetických ran, u kterých se dysfunkce makrofágů vyskytuje [11].

2 Bakterie

Bakterie jsou jednobuněčné, prokaryotické organismy vyskytující se v půdě, vzduchu i vodě (jsou všudypřítomné). Buňka nese silnou tuhou buněčnou stěnu mimo plazmatickou membránu (kvůli tomuto znaku jsou bakterie zařazeny do rostlinné říše). Mají velkou variabilitu ve způsobu výživy, to znamená, že mohou být autotrofní a heterotrofní. Při heterotrofním způsobu výživy mohou mít parazitický saprofytický nebo symbiotický charakter. Vzhledem k jejich prokaryotické povaze jim chybí pravé jádro (postrádají jadernou membránu a nukleol), genetický materiál mají ve formě složené struktury genofor/ nukleoid/ zárodečné jádro. V bakteriální buňce je přítomna DNA i RNA (ribonukleová kyselina), kde DNA je ve formě jednoho kruhového chromozomu a v její DNA chybí základní bílkovina histon. Buněčná stěna je tvořena mukopeptidem. Bakteriím chybí mitochondrie, Golgiho aparát, plastid a endoplazmatické retikulum. Všechny potřebné enzymy k dýchání nalezneme v buněčné membráně. Vegetativní rozmnožování probíhá zpravidla binárním dělením, cystami, pučením a endosporami [12].



Obr. 2.1: Základní struktura bakteriální buňky (zdroj: autor).

Velikost bakterií se velmi liší. Jsou tak nepatrné, že je nelze pozorovat pouhým okem, ale k jejich pozorování potřebujeme mikroskop. Každá buňka měří průměrně 1,25-2 μm v průměru a 2-10 μm na délku [12]. Dalo by se očekávat, že bakteriální buňky, které jsou malé a relativně jednoduché, budou mít jednoduchý tvar a velikost, ale není tomu tak, protože mikrobiální svět nabízí značnou morfologickou rozmanitost. Dva nejběžnější tvary jsou však koky a tyčinky. Koky jsou zhruba kulovité buňky [13] většinou s průměrem 0,5-1,25 μm a nemají bičíky [12], mohou existovat jednotlivě, nebo mohou být sdruženy v charakteristických uspořádáních, která mohou být užitečná při jejich identifikaci. Mohou vznikat dlouhé řetězce koků, a to, když se buňky po opakované

dělení slepí v jedné rovině. Příslušníci rodu *Staphylococcus* se dělí v náhodných rovinách a vytvářejí nepravidelné, hroznovité shluky. Tyčinky, někdy nazývané bacily, se značně liší poměrem délky a šířky [13], mají v průměru 0,5-1,2 μm na šířku a v průměru 3-7 μm na délku a mohou, ale nemusí mít bičík [12]. Tvar konce tyčinky se u jednotlivých druhů často liší a může být plochý, zaoblený, ve tvaru fotbalového míče nebo rozdvojený. Ačkoli se mnoho tyčinek vyskytuje jednotlivě, některé zůstávají po rozdělení pohromadě a tvoří páry, nebo řetězce [13].

2.1.1 Klasifikace bakterií

Poté, co Christian Gram v roce 1884 vyvinul Gramovo barvení, se brzy ukázalo, že většinu bakterií lze rozdělit do dvou hlavních skupin na základě jejich reakce na Gramovo barvení. Grampozitivní bakterie se barví fialově, zatímco gramnegativní bakterie byly růžové nebo červené. Skutečný strukturální rozdíl mezi těmito dvěma skupinami se ukázal až s příchodem transmisního elektronového mikroskopu (TEM).

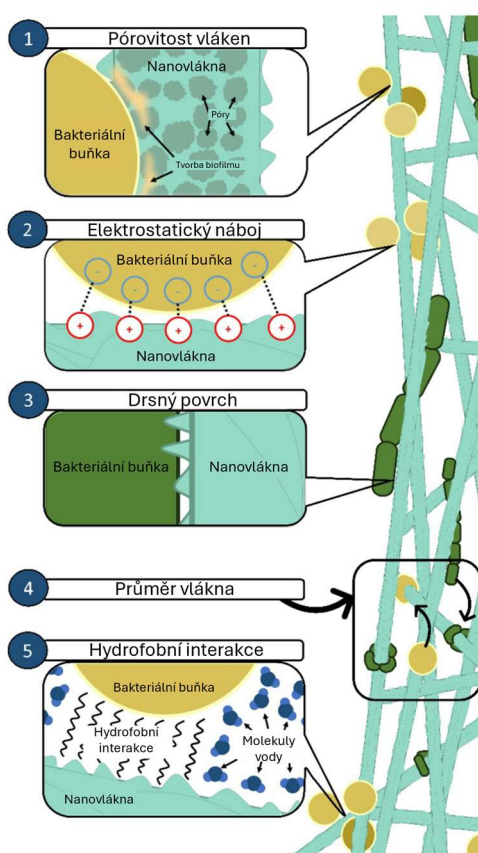
Buněčná stěna typických grampozitivních bakterií se skládá z jedné homogenní vrstvy peptidoglykanu (mureinu) o tloušťce 20-80 nm, která leží mimo plazmatickou membránu. Naproti tomu buněčné stěny typických gramnegativních bakterií mají dvě odlišné vrstvy: 2-7 nm silnou vrstvu peptidoglykanu pokrytou 7-8 nm silnou vnější membránou. Jedním z důležitých znaků, který lze pozorovat u typických gramnegativních bakterií, je prostor mezi plazmatickou membránou a vnější membránou. U typických grampozitivních bakterií se také někdy vyskytuje mezi plazmatickou membránou a buněčnou stěnou. Tento prostor se nazývá periplazmatický prostor a látka, která tento prostor zaujímá, se nazývá periplazma.

Mechanismus barvení podle Grama spočívá v rozdílech v buněčné stěně mezi typickými grampozitivními a typickými gramnegativními bakteriemi. Pokud je buněčná stěna odstraněna, typické grampozitivní bakterie se barví gramnegativně. Při barvení Grama se bakterie nejprve obarví krystalovou violetí, barvivem s kladným nábojem, které je přitahováno čistým záporným nábojem bakteriální buňky. Poté se ošetří jódem, mořidlem, které interaguje s krystalovou violetí, vytváří nerozpustný komplex, a tím podporuje zadržení barviva. Když se pak bakterie v kroku odbarvení ošetří ethanolem, póry tlustého peptidoglykanu, který se nachází v buněčných stěnách typických grampozitivních bakterií, se zřejmě zmenší, což způsobí, že peptidoglykan funguje jako propustná bariéra, která brání ztrátě krystalové violeti. Komplex barviva a jódu se tedy

během kroku odbarvování zachová a bakterie zůstávají fialové i po přidání druhého barviva. Naproti tomu peptidoglykan v typických gramnegativních buněčných stěnách je velmi tenký, není tak silně zesíťovaný a má větší póry. Ošetření alkoholem může také z vnější membrány získat dostatek lipidů, které dále zvýší pórovitost buněčné stěny. Z těchto důvodů alkohol snadněji odstraňuje komplex krystalové violeti (fialové) a jódu a odbarvuje buňky. Protibarvivo safranin, rovněž barvivo s čistým záporným nábojem, snadno obarví odbarvené buňky tak, že se jeví červené nebo růžové [13].

2.1.2 Bakteriální adheze

Bakteriální (bakt.) adheze a interakce s povrchem je zásadní pro kontrolu biofilmu a je ovlivněna chemickým složením a strukturou povrchu (hustota kladného náboje, drsnost, topografie a smáčivost). Většina povrchů bakt. buněk je záporně nabitá a díky elektrostatické síle je vysoce přitahuje kladně nabitý povrch. Naopak negativně nabitý povrch materiálu může bakterie odpuzovat. Roli zde však hraje celá řada dalších proměnných včetně složení kultivačního média, jeho pH či přítomnosti proteinů, které povrch mohou obalovat [14].



Obr. 2.2: Ilustrace bakteriální adheze na nanovláčkách (převzato s úpravami z [14]).

2.2 Antibakteriální účinky chitosanu

U CHIT je znám jeho inhibiční účinek na bakterie. Ačkoli přesný mechanismus antibakteriální aktivity není dosud zcela objasněn, existuje řada teorií popisujících princip jeho účinku. Nejrozšířenější spočívá v jeho vazbě na záporně nabitou buněčnou stěnu bakterií, což způsobí narušení buňky, a tím změnu propustnosti membrány. Tento i další mechanismy jeho účinku jsou spojovány s aminoskupinou na jeho molekulárním řetězci. Polykationická struktura chitosanu je předpokladem antibakteriální aktivity vzhledem k tomu, že pH prostředí je nižší než pK_a chitosanu, hraje v antibakteriální aktivitě primární roli elektrostatická interakce mezi polykationtovou strukturou a převážně aniontovými složkami povrchu mikroorganismů (jako jsou gramnegativní lipopolysacharid a povrchové proteiny buněk).

Aminoskupina ve struktuře chitosanu může být přeměněna na protonovanou aminoskupinu, která propůjčuje chitosanu polykationtové vlastnosti. Buněčné stěny grampozitivních bakterií se skládají převážně z kyseliny teichoové, která je záporně nabitá a může reagovat s chitosanem prostřednictvím elektrostatických interakcí, což vede k destrukci bakteriální buněčné stěny, ztrátě buněčné funkce, a nakonec k buněčné smrti. Protonované aminoskupiny v chitosanu interagují s anionty lipopolysacharidů přítomných na vnější membráně gramnegativních bakterií, což vede k bakteriostatickému účinku. Kromě toho může chitosan procházet membránami bakteriálních buněk a narušovat transkripci a translaci genetického materiálu, čímž ovlivňuje normální buněčnou funkci, způsobí inhibici replikace DNA a následně buněčnou smrt [11].

Dalším možným mechanismem je, že CHIT působí jako chelatační činidlo, které se selektivně váže na stopové prvky kovů, čímž zapříčiňuje tvorbu toxinů a inhibici mikrobiálního růstu [11].

Chitosan vykazuje silnější antibakteriální vlastnosti proti grampozitivním bakteriím než proti gramnegativním bakteriím [4].

Faktory ovlivňující antibakteriální vlastnosti

Rozdíly v baktericidní účinnosti chitosanu jsou způsobeny různými faktory. Mezi takové faktory řadíme koncentraci CHIT, molekulovou hmotnost, hustotu kladného náboje, hydrofilní a hydrofobní charakteristiku, chelatační schopnost, pH, iontovou sílu, fyzický stav, teplotu a čas a mikrobiální faktory [2]. Hustota kladného náboje stejně jako

iontová síla a další jsou přímo závislé na stupni deacetylce, a tedy počtu a stavu aminoskupin na řetězci chitosanu. Kromě počtu aminoskupin navazujících na C-2 na řetězci je pro elektrostatické interakce důležitá míra protonace těchto skupin. Když se zvýší hustota kladného náboje chitosanu, zvýší se následně i antibakteriální účinnost [2].

Faktory, které ovlivňují antibakteriální účinnost CHIT jsou definovány níže.

- **Koncentrace chitosanu:** Při nižších koncentracích se CHIT váže na negativně nabitý povrch buňky, narušuje buněčnou membránu a způsobuje smrt buňky tím, že vyvolává únik intracelulárních složek. Zatímco při vyšších koncentracích může protonovaný chitosan pokrýt povrch buňky a zabránit úniku intracelulárních složek. Kromě toho se kladně nabitě bakteriální buňky navzájem odpuzují a zabraňují agregaci [2].
- **Molekulová hmotnost:** Četné studie baktericidní aktivity chitosanu přinesly nejednoznačné výsledky, pokud jde o korelaci mezi antibakteriální aktivitou a molekulovou hmotností chitosanu. Některé studie uvádějí, že zvyšování molekulové hmotnosti chitosanu vede ke snižování jeho aktivity vůči *E. coli*, zatímco v jiných studiích vykazoval chitosan s vysokou molekulovou hmotností větší aktivitu než chitosan s nízkou molekulovou hmotností [2].
- **Hustota kladného náboje:** Význam polykationtové struktury v antimikrobiální aktivitě potvrzuje obrovské množství literatury. Vyšší hustota kladného náboje vede k silnému elektrostatickému působení CHIT [2]. Čím vyšší je stupeň deacetylce chitosanu, tím vyšší je počet aminoskupin dostupných pro protonaci a tím je silnější jeho antibakteriální aktivita [7]. Jedna studie uvádí, že CHIT s vyšším stupněm deacetylce je schopen i inhibice růstu patogenní bakterie *Staphylococcus aureus*, která způsobuje významné komplikace u kontaminovaných ran [2].
- **Chelatační schopnost:** Chitosan má vysokou chelatační kapacitu pro různé kovové ionty v kyselých podmínkách a je široce používán k odstraňování nebo regeneraci kovových iontů v různých průmyslových odvětvích. Ionty kovů, které se spojují s molekulami buněčné stěny mikroorganismu, mají zásadní význam pro stabilitu buněčné stěny. Chelatace takových kovových iontů zprostředkovaná chitosanem byla často uváděna jako možný způsob antimikrobiálního účinku. Chelatace hraje roli nejen v kyselém stavu, ale je také schopna spojovat dvojmocné ionty kovů v neutrálním stavu. Kromě toho se prostřednictvím chelatační schopnosti připravuje komplex chitosanu s kovy, který vykazuje silnou antimikrobiální aktivitu [2].

- **pH:** Antimikrobiální aktivita chitosanu je závislá na pH. Chitosan je totiž rozpustný v kyselém prostředí a jeho molekula se při pH nižším než pKa (6,3-6,5) stává polykationtní. Uvádí se, že chitosan vykazuje antibakteriální aktivitu pouze v kyselém prostředí, což se neprokázalo jako zcela správné – CHIT rozhodně vykazuje silnější inhibiční účinek při nižším pH, přičemž inhibiční aktivita slábne se zvyšujícím se pH. Nicméně při neutrálním pH neztrácí CHIT svou antibakteriální účinnost zcela, jak se někdy mylně uvádí. O antimikrobiální aktivitě chitosanu v alkalických podmínkách je však známo jen málo [2].
- **Fyzický stav (forma/struktura):** Antimikrobiální aktivita chitosanu může být ovlivněna také formou, strukturou a mírou hydratace. Všechny tyto parametry mohou ovlivnit dostupnost molekul chitosanu, a tím i rychlost jejich interakce s buněčnou stěnou či molekulami. CHIT dobře dostupný na povrchu materiálu v protonované formě má roztahující vliv na antibakteriální účinek. Z hlediska dostupnosti jsou pro antibakteriální účinnost výhodnější hydratované formy (např. hydrogely) či mikro a nanomateriály (mikrosféry, nanočástice, nanovlákná). Významným parametrem je zde ale také případná míra síťování, které vede ke stabilizaci struktury, však může antibakteriální účinek snižovat [2].
- **Teplota, čas a stabilita:** Antibakteriální účinnost chitosanu je přímo ovlivněna dobou expozice a také vnějšími podmínkami, jako je teplota. Vliv na vlastnosti materiálů mají také podmínky skladování. Během skladování se mohou měnit specifické vlastnosti chitosanu. Může docházet k jeho degradaci, a tím ke změně molekulové hmotnosti i viskozity u hydrogelových forem. Skladování může snižovat antibakteriální aktivitu chitosanu [2].
- **Bakteriální faktory:** Přestože má chitosan široké spektrum antimikrobiální aktivity, vykazuje různou inhibiční účinnost vůči různým bakteriím v závislosti na jejich typu. Významný rozdíl byl zaznamenán mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi. Různorodost jeho účinku u grampozitivních a gramnegativních bakterií je dána rozdílnými vlastnostmi buněčného povrchu a složení buněčné stěny, jak již bylo popsáno v 2.1.1 [2].

3 Nanovlákna

Nanovlákna jsou nejčastěji definována jako vlákna s průměrem nižším než 100 nm. Někdy jsou tímto termínem označována také vlákna s průměrem pod 1000 nm, pro která by bylo vhodnější označení „submikronová vlákna“ [15]. Vlastnosti nanovláken a možné způsoby jejich výroby jsou popsány níže.

Vlastnosti nanovláken: Nanovlákna jsou jedinečná řadou vlastností vč. fyzikálních, chemických, mechanických a elektrických, které jim umožňují využití v různých oblastech.

Mezi fyzikální vlastnosti řadíme vysokou pórovitost, kontrolovatelné póry, malou velikost pórů, vícerozměrnou strukturu a vysoký poměr povrchu k objemu. Zmíněná vysoká pórovitost a kontrolovatelné póry poskytují výhodu při použití těchto vláken v obvazech na rány. Díky existenci malých pórů je umožněna výměna plynů mezi ránou a okolím, a navíc malá velikost pórů zabraňuje pronikání bakterií do rány. Díky vysokému poměru povrchu nanovláken k jejich objemu a vysoké stabilitě se často používají jako filtry pro čištění vody a vzduchu. Nanovlákna jsou schopna odstraňovat z vody znečišťující látky, jako jsou těžké kovy, organické látky a bakterie, ale jsou také schopna odstraňovat ze vzduchu částice přenášené vzduchem, jako je pyl a prach, což z nich dělá ideální kandidáty pro příslušné filtry vody a vzduchu.

Mezi chemické vlastnosti patří biodegradabilita, biokompatibilita a netoxičita. Tyto vlastnosti jsou však silně závislé na konkrétním materiálovém složení. Využitelnost nanovláken v medicíně a hojení ran je tedy závislá nejen na jejich struktuře, ale zejména na jejich složení. To jim může propůjčovat bioaktivní charakter a přímo podporovat biologické děje v ráně.

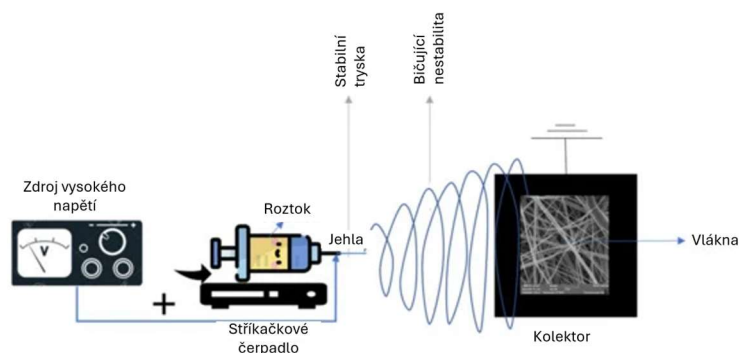
Mezi mechanické vlastnosti řadíme flexibilitu, elasticitu, přizpůsobivost (self-adjustment) a u některých i samoopravnost (self-repairing) [15]. Jejich flexibilita a elasticita umožňuje přizpůsobení tvarovým nerovnostem povrchu. Této vlastnosti se využívá v různých oblastech průmyslu a výhodná je také v hojení ran, kdy nanovlákna mohou dobře kopírovat nerovnosti rány.

Mezi elektrické vlastnosti patří jejich schopnost reakce na podněty z okolí, a zejména vodivost. Pro dosažení těchto vlastností, které umožňují jejich využití třeba v oblasti sensoriky, se však často vyžadují další modifikace.

Nanovlákná poskytují jedinečné strukturní vlastnosti, ale mají také omezení. Mezi ta patří např. nízká mechanická pevnost, či omezená reprodukovatelnost s možností průmyslové výroby. Všechny tyto parametry jsou závislé na konkrétním složení a technologii výroby [16].

3.1 Metody výroby nanovláken

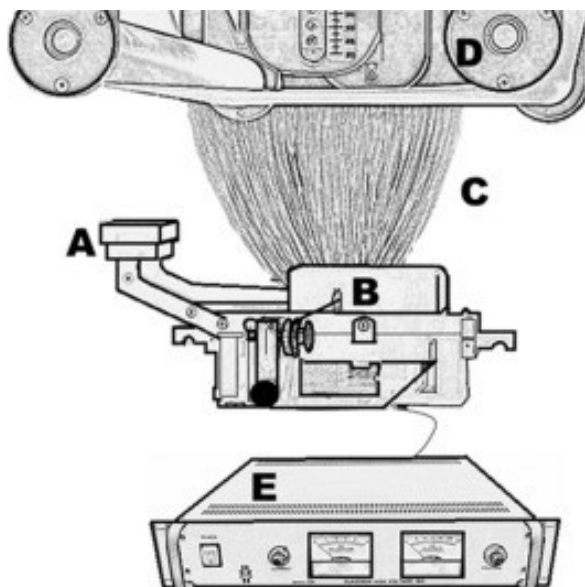
Způsobů, kterými lze vyrobit nanovlákná, je hned několik. Při rozdělení do základních skupin na základě mechanismu formování vláken se jedná o technologie využívající k tvorbě nanovláken elektrickou sílu, mechanickou sílu a hydrodynamickou sílu. Tyto skupiny se dále dělí dle specifik výroby a spadají do nich například výroba jednotlivých orientovaných submikronových vláken metodou dloužení (drawing), odstředivého zvlákňování, samoorganizace či fázové separace [12, 15]. V praxi se nejčastěji využívají a vyvíjejí technologie na bázi elektrické síly – nejčastěji elektrostatické zvlákňování (electrospinning). Nejpoužívanějším způsobem výroby je elektrostatické zvlákňování stejnosměrným proudem (DC). Zvlákňování stejnosměrným elektrickým proudem se dále dělí na elektrické zvlákňování jehlové (z kapilár) a bezjehlové. Elektrické zvlákňování spočívá na principu, že rozdíl elektrických potenciálů mezi elektrodou a kolektorem ovlivňuje hladinu zvlákňované kapaliny, nejčastěji mluvíme o polymerním roztoku. Musí vybudit takzvanou nadkritickou hodnotu intenzity elektrického pole E , která lokálně způsobí zvýšenou hodnotu elektrického tlaku nad hodnotu kapilárního tlaku (u kapilární elektrody). Kapilární tlak je důsledkem povrchového napětí a křivosti kapalinového tělesa. Tímto dochází k hydrodynamické nestabilitě, která se projeví v podobě polymerních trysek, z nichž se po odpaření rozpouštědla vytvoří submikronová vlákna nebo nanovlákná [12].



Obr. 3.1: Zařízení pro electrospinning (převzato s úpravami z [17]).

Bezjehlové stejnosměrné elektrické zvlákňování (needleless electrospinning) je jedna z metod elektrostatického zvlákňování za použití zvlákňovacích elektrod, které neuzavírají zvlákňovanou kapalinu v kapiláře. Někdy se tyto metody označují jako metody zvlákňování z volné hladiny polymerního roztoku. Objevují se zde statické a dynamické zvlákňovací elektrody, kde dynamické zvlákňovací elektrody při zvlákňování vykonávají pohyb, nejčastěji se jedná o rotační pohyb či přímočarý posuvný pohyb (zařízení Nanospider TM) [15].

Mezi různými technikami uváděnými v literatuře je systém electrospinningu z volné hladiny jednou z nejvyužívanějších technologií pro kontinuální a masovou výrobu nanovlákných vrstev. Technologie Nanospider byla poprvé vyvinuta panem profesorem Jirsákem a kolegy v roce 2004 a poté byla komercializována a zdokonalena společností Elmarco. Původní princip zařízení Nanospider byl založen na rotující elektrodě ponořené do polymerní lázně. Povrch rotující elektrody byl pokryt tenkou vrstvou polymerního roztoku a vystavením silnému potenciálu docházelo na celém povrchu válcové elektrody k formování Taylorových kuželů a polymerních trysek. Největší rozdíl mezi první (zvlákňování z odvalující se elektrody) a novou generací Nanospideru (drátový electrospinning) je v typu elektrody a podávající jednotky. V technologii nové generace je pro podávání roztoku použita statická drátěná elektroda a pohyblivá jednotka s polymerním roztokem (nanášecí hlava). Efektivní elektrostatické pole na tenkém drátu je vyšší než na povrchu válečku, což může ovlivnit proces zvlákňování u různých polymerních roztoků. Uzavřený systém nanášecí hlavy zamezuje odparu rozpouštědla a umožňuje udržet viskozitu roztoku v průběhu času stabilní. Zařízení Nanospider pomocí drátové elektrody zabraňuje nežádoucím změnám polymerního roztoku při dlouhodobém používání. Výhodou použití zařízení Nanospider s drátovou elektrodou je snadná tvorba nanovláken na tenkém drátu. Míra produktivity je velmi vysoká; vlákna jsou tenká (80-700 nm) a mají užší distribuci průměrů (menší směrodatnou odchylku) [18].



Obr. 3.2: Schéma nanospideru nové generace.

(A) Nádrž na roztok přivádějící roztok směrem k drátu, (B) drátová elektroda, (C) plocha pro spřádání, (D) odběrný válec připojený k podkladovému materiálu a (E) zdroj vysokého napětí (převzato z [19]).

3.2 Využití nanovláken v medicíně

V oblasti medicíny mají nanovlákná celou řadu možných využití – ta zahrnují pokročilé prostředky osobní ochrany (roušky), membrány pro kapalinovou separaci, membrány pro filtraci plynů (např. interiérové antibakteriální filtry pro nemocniční prostory), nanovláknenné kryty ran i systémy pro dopravu léčiv. Hledají se různé účinnější a kontrolovanější nosiče léků např. pro protinádorovou terapii. V současné době je pozornost věnována také možnému využití nanovláken jako scaffoldů pro tkáňové inženýrství různým typům tkání. Zde se využívá předpokladu podobnosti nanovláknenných struktur a mezibuněčné hmoty (ECM). Nanovláknenné tkáňové scaffoldy jsou považovány za velmi nadějně řešení, které by mohlo pomáhat zdraví a kvalitě života mnoha pacientů po celém světě. Díky jejich uspořádané porézní vláknité struktuře a podobnosti nanovláken s přirozenými biologickými tkáněmi mohou z mnoha důvodů vytvořit jedinečnou třídu materiálů. Povrchová plocha a povrchová energie nanovláken jsou ve srovnání s jinými materiály mnohem vyšší, což umožňuje lepší adhezi buněk, interakce s proteiny a léčivy. Nanovlákná tedy představují velice zajímavý materiál, který může svou architekturou stimulovat děje na mikroskopické úrovni, zatímco na makroskopické úrovni poskytují mechanickou pevnost a fyziologickou přijatelnost [20].

Polymery vhodné pro přípravu nanovláknenných materiálů v medicíně

Příprava nano- a mikrovláknenných materiálů může vycházet z různých polymerů (syntetických i přírodních), ale také jejich kombinací. Při volbě materiálu se vždy vychází z požadavků na finální produkt z hlediska vlastností, jako doba biokompatibilita, biodegradabilita, doba degradace, hydrofilita/hydrofobita povrchu, interakce s dalšími molekulami a mechanické vlastnosti. Významné je také, aby nevyvolávaly ani nežádoucí imunologické reakce.

Z přírodních polymerů můžeme například uvést kolagen, želatinu, hedvábí (silk fibroin), chitosan, škrob, kyselinu hyaluronovou nebo celulózu. U přírodních polymerů se objevují i jejich nevýhody, jako například rychlá degradace, což pro nás znamená vyšší riziko přetížené tkáně nebo limitace mechanických vlastností a také jejich omezenost v dostupnosti a variabilitě složení. Zmíněnou variabilitou myslíme variabilitu zdrojů, a tím pádem i variabilitu výsledných produktů.

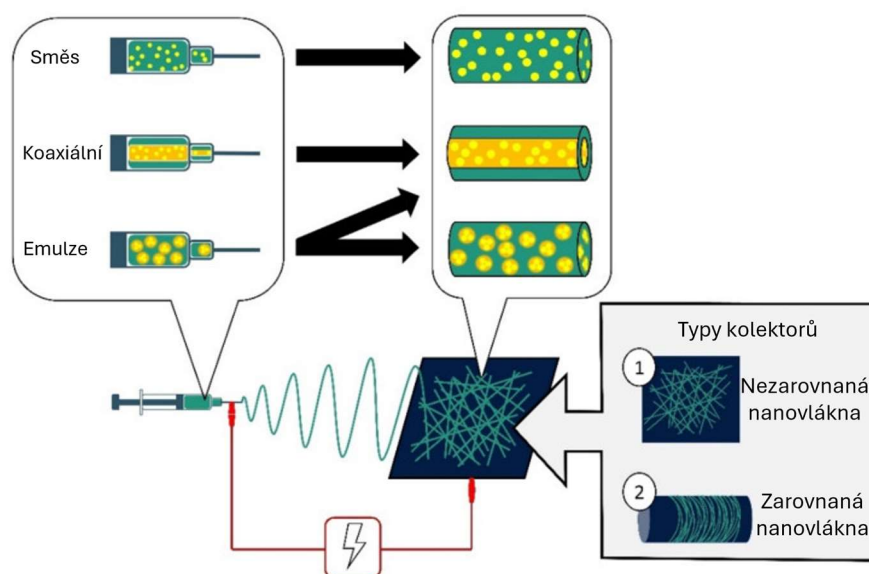
Při požadavku na zvýšenou stabilitu ve vodném prostředí a vyšší pevnost se obracíme na syntetické polymery, u kterých můžeme lépe zajistit identickou chemickou strukturu a s tím je spojena i stabilita vlastností výsledných materiálů. V tomto sektoru polymerů si můžeme vybrat z několika následujících nebiodegradabilních a pomalu degradujících polymerů. Radíme sem polyuretany (PU), poly (dimethyl siloxan) (PDMS), poly (ethylen tereftalát) (PET), poly (methyl methakrylát) (PMMA), polyamidy (PA) nebo třeba polystyren (PS).

Ze syntetických polymerů se zkoumají také ty s kratší dobou degradace. Zkoumá se jejich použití, například pro konstrukci scaffoldů pro tkáňové inženýrství. Zde se předpokládá, že po implantaci je jejich funkce dočasná a struktura scaffoldu by měla být postupně zcela nahrazena novou tkání. Rychlost degradace polymeru by proto měla odpovídat rychlosti obnovy poškozené tkáně. Tyto scaffoldy mohou současně sloužit jako nosiče bioaktivních látek (drug delivery systém), které se uvolňují v průběhu degradace. Pro tyto aplikace se nejčastěji používají alifatické polyestery schválené Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v USA (Food and Drug Administration of the United States of America, FDA). Mezi takové schválené alifatické polyestery patří polykaprolakton (PCL), kyselina polymléčná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA) a jejich kopolymery PLGA (kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové) a PLCL (kopolymer kyseliny mléčné a kaprolaktonu). Degradace zmíněných alifatických polyesterů probíhá

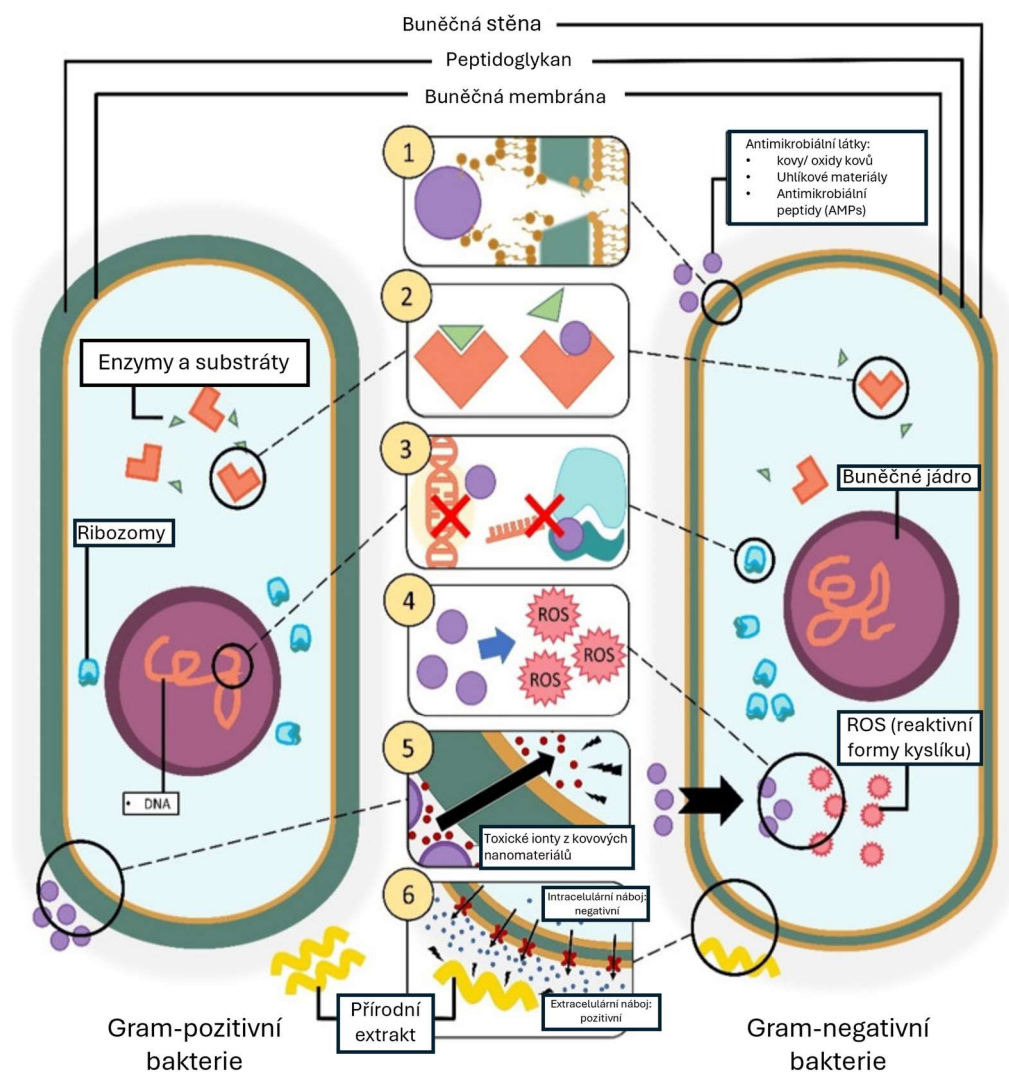
hydrolyticky, to znamená štěpením esterové vazby (RCOOR') za přítomnosti vody. Během této degradace nevznikají žádné toxické produkty. Všechny uvedené přírodní i syntetické polymery byly úspěšně zpracovány metodou elektrostatického zvlákňování do podoby nanovláken anebo vláken submikronových. Rychlost degradace je kromě chemického složení nejzásadněji ovlivněna délkou molekulárních řetězců, ale také formou scaffoldu. Vzhledem k vysoké porozitě a velkému specifickému povrchu dochází zpracováním do nanovláknenné podoby ke zkrácení doby degradace [15].

3.3 Nanovláknna s antibakteriálním účinkem

V posledních desetiletích se v důsledku rostoucí rezistence bakterií vůči antibiotikům stal celosvětovou hrozbou výskyt multirezistentních (MDR) bakterií neboli „superbakterií“. Z toho důvodu jsou hledány nové materiály se zvýšenou antibakteriální účinností, které by mohly být využívány v oblasti filtrace, osobní hygieny i medicíny, např. pro krytí ran. Nanovláknna mohou bojovat proti bakteriím díky membránovému efektu danému jejich strukturou. Elektrostaticky zvlákněná nanovláknna vykazují jedinečné fyzikálně-chemické vlastnosti, které je možné doplnit o antibakteriální účinek vhodnou úpravou bez narušení jejich struktury a ztráty porozity. Antibakteriálního účinku nanovláken je možné dosáhnout dvěma hlavními způsoby – úpravou povrchu, anebo hmoty vláken. Nejčastěji se využívá inkorporace antibakteriálně aktivních látek přímo do hmoty nanovláken, jak ukazuje schéma viz. Obr. 3.3.



Obr. 3.3: Schéma zvlákňovacího zařízení a varianty electrospinningu. (převzato s úpravami z [14]).



Obr. 3.4: Znázornění různých mechanismů působení antimikrobiálních látek obsažených v nanovláčkách na buňky bakterií.

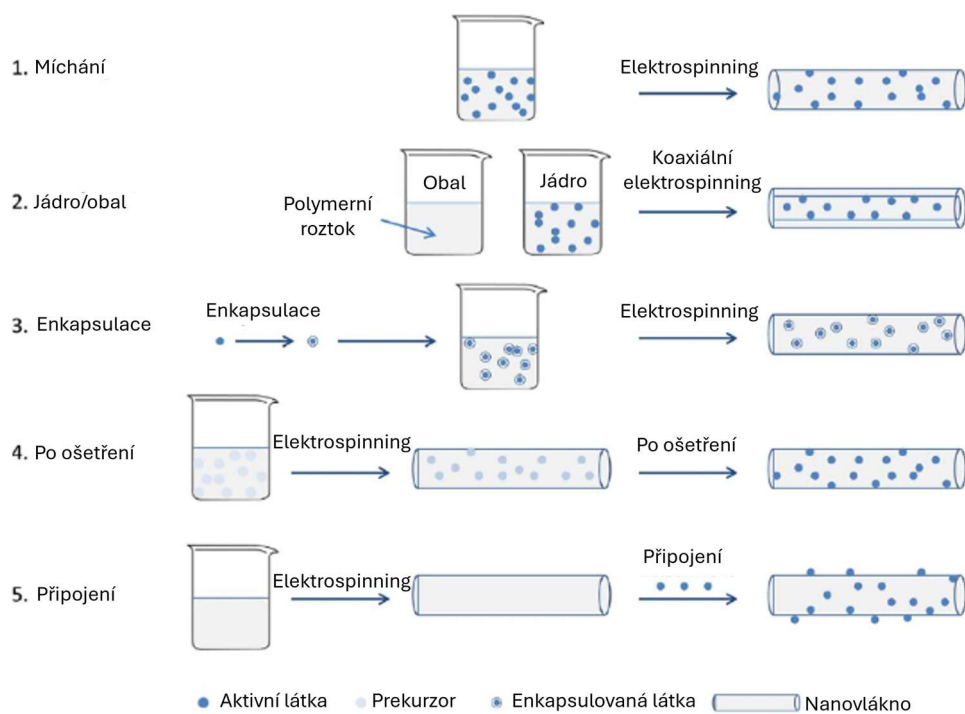
Prostřednictvím: 1) narušení buněčné membrány/buněčné stěny; 2) inhibice buněčných metabolických drah; 3) inhibice DNA a genové exprese; 4) vyvolání buněčného stresu; 5) toxikace nanomateriály na bázi kovů; 6) hyperpolarizace buněk. (převzato s úpravami z [14]).

Povrch nanovláken lze modifikovat a funkčně využít jako konformní povrchovou vrstvu pro zajištění řízené interakce s mikroorganismy. Povlakování povrchu nanovláken antibakteriálními substráty může dále zlepšit topografii nanovláken, a podpořit tak specifické interakce mezi bakteriemi a nanovláčky. Tímto způsobem mohou být upravována nanovláčka z přírodních i syntetických polymerů. Tab. 3.1 shrnuje základní vlastnosti nanovláčkových materiálů pro antimikrobiální aplikace [14].

Tab. 3.1: Klíčové vlastnosti nanovláken pro antimikrobiální aplikace (převzato z [14]).

Vlastnosti	Účinky	Odkazy
Nano velikost	Nanovlákná s velikostí pod 1000 nm, jsou podobná velikosti bakterií, a mohou tak zlepšit jejich zachycení a inhibici.	[21–25]
Poměr plochy k objemu	Nanovlákná s menším průměrem poskytují větší poměr povrchu k objemu pro účinnou inkorporaci antimikrobiálních terapeutických látek.	[26–29]
Vysoká pórovitost a malé póry	Vysoká pórovitost umožňuje vyšší dostupnost léčiva nebo antimikrobiálních látek do nanovláken, zvyšuje záchyt bakterií na povrchu nanovláken.	[30–32]
Propojené póry	Podporují výměnu kyslíku a živin, zajišťují strukturální stabilitu, podporují proliferaci buněk a zajišťují trvalé uvolňování antimikrobiálních látek.	[31, 33–35]

Při výrobě antibakteriálních nanovláken se nejčastěji používá strategie zabudování antibakteriálních látek do vláken. Metoda zvlákňování potom určuje uložení aktivní látky do polymerního roztoku před electrospinningem, lze dosáhnout homogenní distribuce v celé hmotě vlákna. Využití koaxiálního elektrostatického zvlákňování vede k tvorbě struktury „jádro/obal“ a k omezení účinné látky v jedné z těchto částí vlákna. Další možností je zapouzdření (enkapsulace) účinné látky do nanočástic před jejich rozptýlením ve zvlákňovacím roztoku. Antibakteriálního účinku je možné dosáhnout také následnou úpravou vlákna po electrospinningu za účelem přeměny prekurzoru na jeho aktivní formu nebo navázáním účinné látky na povrch vlákna.



Obr. 3.5: Různé metody inkorporace biocidů do elektrospunovaných nanovláken. 1. míchání/dispergace účinné látky v roztoku polymeru před electrospinningem; 2. uzavření aktivní (účinné) látky v jádru vlákna pomocí koaxiálního electrospinningu; 3. zapouzdření/adsorpce aktivní látky v nanostrukturách před disperzí v roztoku electrospinningu; 4. přeměna prekurzoru na aktivní látku v nanovláknka po electrospinningu; 5. připojení aktivní látky na nanovláknka po electrospinningu. (převzato s úpravami z [36]).

Do nanovláken mohou být jako antibakteriální složka inkorporovány různé typy látek. Takovými látkami jsou například:

- **Antibiotika:** Obecně se polymer rozpustí v organickém rozpouštědle, jako je DMF, chloroform, methanol nebo hexafluoroisopropanol. Antibiotikum se nejprve rozpustí ve stejném nebo jiném rozpouštědle a za stálého míchání se pomalu přidává do roztoku polymeru, aby vznikl homogenní roztok před electrospinningem. Touto metodou lze přizpůsobit velký rozsah množství antibiotika, které má být vloženo do nanovláken, a to úpravou počáteční koncentrace léčiva v roztoku pro electrospinning. Koncentrace použitých antibiotik se značně liší. Zahrnutí antibiotik do roztoku polymeru může mít vliv na zvláknitelnost polymeru a na jeho vlastnosti, jako morfologie nanovláken v důsledku změn viskozity, povrchového napětí a vodivosti roztoku. Pro dosažení antibakteriální aktivity při zachování vlastností nanovláknenné membrány může být použito dvouproudové electrospinningové uspořádání, které umožňuje

současnou výrobu dvou různých druhů nanovláken na stejné membráně [37]. Tuto metodu použil například v [38, 39] a další. Výsledná kompozitní membrána vykazovala vysokou elasticitu, pevnost v tahu a schopnost udržet steh, ale výrazně sníženou smrštitelnost. Přestože přimíchání antibiotik do polymerního roztoku před electrospinningem je jednoduchá a univerzální metoda, jak do prakticky jakýchkoli polymerních nanovláken nahrát velké množství léčiv, je zřejmá i její nevýhoda. Antibiotika totiž mají v nanovlákněch tendenci se ve vodném roztoku vyluhovat, což je jev, který byl označen jako skokové uvolnění léčiva. Tento jev by pravděpodobně snížil účinnost nanomembrán proti bakteriím, jakmile by uvolnitelné množství dosáhlo pod kritickou úroveň. K zajištění prodlouženého uvolňování bylo použito několik strategií. Jedním ze způsobů je použití technologie koaxiálního electrospinningu, kdy vnější roztok obsahuje polymer a vnitřní roztok antibiotikum. Polymer tvoří plášť (nebo obal), který zapouzdřuje antibiotickou složku (jádro) v nanovlákněch. Přístupy k dosažení prodlouženého uvolňování jsou adsorpce nebo enkapsulace léčiva v nanostruktuře před jeho rozptýlením v roztoku polymeru [36]. Oběma metodami byla zvlákněna např. antibiotika tetracyklin a amoxicilin. Příklady dalších úspěšně zvlákněných antibiotik jsou uvedeny v Tab. 3.2.

- **Antiseptika:** Jedná se o látky širokospektrálně účinné proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, které však mají nízkou toxicitu pro člověka. Většina těchto antiseptik byla použita na běžná vlákna a textilie pro antibakteriální úpravu. Stejně jako v případě antibiotik se tyto biocidní látky s malými molekulami obvykle resuspendují v polymerních roztocích před electrospinningem. Jednoduché míchání, stejně jako u antibiotik, téměř vždy vede k nárazovému uvolňování účinných látek z nanovláken ve vodných roztocích. Některé z těchto látek však mají ve své struktuře funkční skupiny, které mohou být využity k navázání na povrch vlákna a zpomalit tak proces uvolňování [36]. Příkladem úspěšně zvlákněného antiseptika je chlorhexidin.
- **Nanočástice stříbra (AgNP):** Stříbro (ionty a částice) je již dlouho známo jako účinná antibakteriální látka a používá se v lékařství a při konzervaci potravin. Použití AgNP jako antibakteriální látky vzbudilo zvláštní zájem, protože nanočástice samy o sobě mohou mít antibakteriální aktivitu a jejich velký povrch usnadňuje uvolňování iontů kovu. AgNP lze do nanovláken vnést v různých fázích, tj. 1) přimícháním (blending) předem syntetizovaných AgNP do

polymerního roztoku před electrospinningem, 2) syntézou de novo AgNP v polymerním roztoku v prekurzoru a 3) syntézou AgNP *in situ* v nanovlákně po electrospinningu. Nejjednodušší a nejčastěji používanou metodou výroby nanovláken s obsahem AgNP je úplné rozptýlení předem připravených AgNP v roztoku polymeru před electrospinningem. Upřednostňují se koloidní roztoky AgNP. Přidání předem připravených AgNP do polymerního roztoku před electrospinningem je sice jednoduchý způsob výroby antibakteriálních nanovláken, ale tato metoda vyžaduje předchozí přípravu nanočástic a může být problémem úplné rozptýlení AgNP v polymerním roztoku. Mnoho studií proto uvádí jednostupňovou přípravu roztoku AgNP/polymer, přičemž jako prekurzor se používá AgNO₃ (dusičnan stříbrný) a jako redukční činidlo pro syntézu AgNP rozpouštědlo. Při této syntéze v roztoku vzniká rovnoměrná disperze AgNP, částečně díky stabilizačnímu účinku. Nakonec je možné syntetizovat AgNP *in situ* při následných úpravách nanovláken z AgNO₃, které byly přidány do roztoku pro electrospinning. Nejběžnější následnou úpravou je zahřívání nanovláken. Stříbro může být také nanoseno na předem připravená nanovlákná, a to buď za použití AgNP, nebo AgNO₃ jako prekurzoru [36]. Příklady nanovláken s AgNP jsou uvedeny v Tab. 3.2.

- **Nanočástice oxidů kovů:** Nanočástice oxidu zinečnatého (ZnO) a oxidu titaničitého (TiO₂) vykazují kromě dobře známé fotokatalytické aktivity a absorpce UV záření také vynikající antibakteriální aktivitu po nebo během UV záření. Ve srovnání s AgNP je však hlavním omezením oxidů kovů to, že k dosažení antibakteriální aktivity potřebují UV ošetření, což je podmínka, která může být při použití nanovláken (např. jako biomateriál nebo filtrační médium) obtížně splnitelná. Stejně jako v případě AgNP lze i tyto nanočástice oxidů kovů zavést do nanovláken několika přístupy. Zaprvé, předsyntetizované nanočástice ZnO nebo TiO₂ lze přidat do roztoku polymeru před electrospinningem. Zadruhé, nanočástice oxidů kovů lze syntetizovat v roztoku polymeru z prekurzorů. Zatřetí byl popsán hybridní proces dvojího electrospinningu a elektrosprejování k výrobě nanovláken zdobených nanočásticemi [36].
- **Chitosan (CHIT):** Chitosan je deacetylovaný derivát chitinu, podle rozsáhlých prací inhibuje růst mikrobů. Tato antibakteriální schopnost spolu s jeho netoxičností, biologickou odbouratelností a biokompatibilitou usnadňuje nové využití CHIT v medicíně. Přirozená antibakteriální vlastnost CHIT umožňuje

vyrábět antibakteriální nanovlákná bez použití biocidů. Kvůli své polykationtové povaze v roztocích však CHIT nelze snadno zpracovat do nanovláken pomocí electrospinningu. Čistá CHIT nanovlákná navíc bývají málo pevná a náchylná k bobtnání v roztoku, pokud nejsou stabilizována např. zesíťováním glutaraldehydem (GTA). K překonání těchto problémů byl CHIT smíchán s různými jinými látkami, aby vznikla silnější antibakteriální kompozitní nanovlákná. CHIT nebo jeho deriváty se často používají v kombinaci s AgNP k dalšímu zvýšení antibakteriální aktivity v kompozitních nanovláknách s jiným polymerem. Vzhledem k nízké rozpustnosti CHIT ve vodných roztocích a organických rozpouštědlech se obvykle rozpouští v silné organické kyselině, přičemž nejčastěji se používá kyselina trifluoroctová, mravenčí a octová.

Tab. 3.2: Přehled elektrostaticky zvlákněných polymerů s příslušnými antibakteriálními látkami a metodou inkorporace [36].

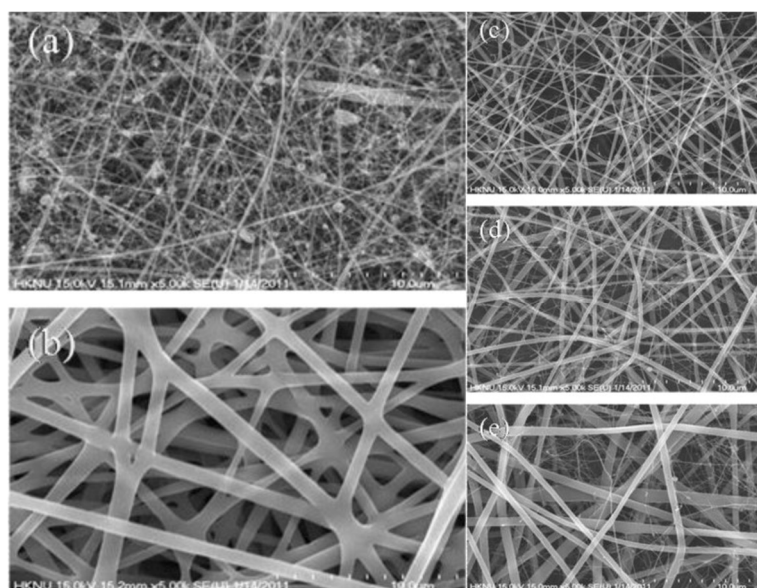
Zvlákněvaný polymer	Antibakteriální látky	Metoda inkorporace
	Antibiotika	
PLA, PEVA, PLA/PCL, PEUU/PLGA	Tetracyklin	Míchání
PLGA	Cefoxitin	Míchání
PLA	Mupirocin	Míchání
coPLA, coPLA/PEG, PU	Ciprofloxacin	Míchání
PLAGA	Cefazolin	Míchání
PLGA	Amoxicilin	Míchání
PLA, PLA/Colagen, PCL	Gentamicin	Jádro/obal
PLLACL	Tetracyklin	Jádro/obal
PMMA/nylon	Ampicilin	Jádro/obal
PLGA	Amoxicilin	Adsorpce/enkapsulace na nanostrukturách
	Neantibiotika	
PCL/PLA	Triclosan	Míchání
PLA	Triclosan	Komplexy s β g-CD
CA	Chlorhexidin	Míchání
PAN, PLA, PLA/PEG	QACs	Míchání
CA/PEU	PHMB	Míchání
PAN	PHMB	Kovalentní imobilizace
PAN	N-Halamin	Míchání
PEO/CHIT	K5N8Q	Míchání
PDLLA, PEO	Antibakteriální peptidy	Míchání

	AgNP	
PVDF, PVA/PU, Nylon 6, PVP, PLGA, PBS	AgNP	Disperze nanočástic
Nylon 6, PAN, PLLCL, PCL, PVA	AgNP	Syntéza v polymerním roztoku
PLA, PCL, PAN, PVA, PEO	AgNP	Syntéza <i>in situ</i>
PLA/CHIT	AgNP	Syntéza <i>in situ</i>
PEO/CHIT	AgNP	Syntéza <i>in situ</i>
PVA/CHIT	AgNP	Syntéza <i>in situ</i>
PVA/CHIT	AgNP	Disperze nanočástic
PEO/CHIT	AgNP	Disperze nanočástic
	Nanočástice oxidů kovů	
PU, PVA, Silk Fibroin	ZnO, TiO ₂	Disperze
PU	TiO ₂	Syntéza <i>in situ</i>
Nylon 6	ZnO	Elektrosprejování na povrch
PMMA	ZnO /TiO ₂	Syntéza v roztoku
	CHIT	
PLA, PVA	Deriváty CHIT	Míchání
PET, PCL, PEO	CHIT	Míchání
PLA	CHIT	Jádro/obal

3.4 Chitosanová nanovláknna

Zpracování čistého CHIT elektrostatickým zvlákněním je velmi omezeno především jeho polykationickou povahou v roztoku, rigidní chemickou strukturou a specifickými intra- a inter- molekulárními interakcemi, které vytvářejí silné intramolekulární vodíkové vazby a méně řetězce CHIT během electrospinningu. Jedním z hlavních přístupů k elektrospínovatelnosti CHIT je míchání CHIT s polymery, které usnadňuje jeho zpracování. Polymer s vynikajícími vlastnostmi pro směsování s chitosanem je zejména polyethylenoxid (PEO), který je rozpustný ve vodě. Použity však mohou být i jiné (hydrofilní i hydrofobní) polymery. Jejich podíl a charakter určuje výsledné vlastnosti nanovláken [3]. Pomocí *in situ* syntézy byla úspěšně zvlákněna elektrospinningem kompozitní nanovláknna o složení CHIT/sericin/PVA (polyvinylalkohol). U těchto nanovláken nebyl zaznamenán žádný antibakteriální účinek vůči *E. coli* vlivem reakce chitosanu s proteinem sericin [40].

Koaxiální electrospinning poskytuje alternativní způsob přípravy nanovláken na bázi CHIT. Při této technice se chitosan a jiný polymerní roztok zvláknují přes spinneret složený ze dvou koaxiálních kapilár, aby se získala nanovláknna na bázi CHIT se strukturou jádro-obal. Nguyen a kolegům se povedlo úspěšně připravit kompozitní vlákna PLA (kyselina polymléčná)/CHIT pomocí koaxiálního electrospinningu (viz Obr. 3.6). Tato nanovláknna byla schopná inhibovat růst *E. coli* pouze po dobu 12 hodin [41]. Směs polymerního aniontu alginátu a polymerního kationtu CHIT vytváří díky iontovému zesíťování mezi řetězci spontánní iontový komplex, který lze použít k získání nanovláken s koaxiální (jádro-plášť) strukturou. U těchto nanovláken nebyla testována antibakteriální účinnost, ale lze předpokládat, že vzhledem k využití aminoskupin při vzniku komplexu tato nanovláknna nemají antibakteriální účinek [42]. Pomocí koaxiálního electrospinningu byla připravena PEO (polyethylenoxid)/CHIT nanovláknna s jádrovou strukturou. Obr. 3.7 ukazuje zachování chitosanového obalu po extrakci PEO jádra ve vodném prostředí. Tato nanovláknna s průměrem 150 – 190 nm mají zajímavý potenciál pro uvolňování léčiv [43].

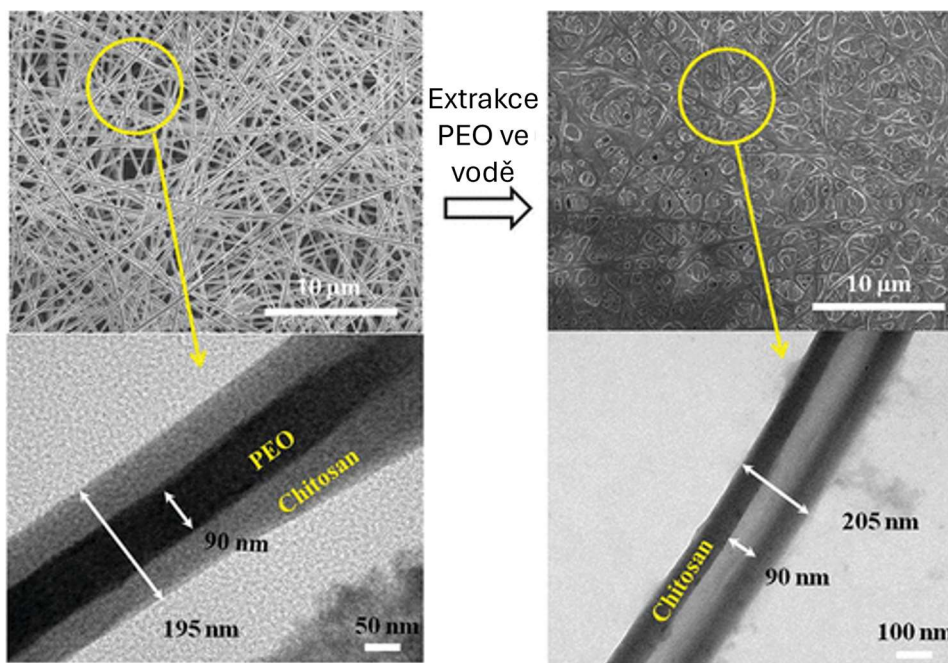


Obr. 3.6: Snímky FE-SEM

a) zvlákněných CHIT nanovláken; b) zvlákněných PLA nanovláken; c), d), e) koaxiálně zvlákněných kompozitních CHIT/PLA nanovláken při různém dávkování roztoku [41].

Kromě běžné 2D (plošné) struktury mohou nanovláknenné membrány na bázi CHIT mít trojrozměrnou (3D) porézní strukturu a tím účinně napodobovat přirozenou extracelulární matici, což přitahuje rozsáhlou pozornost v aplikacích hojení ran. Původní nanovláknenné membrány na bázi CHIT bez jakéhokoli dalšího zpracování však vykazovaly i některé horší vlastnosti, mimo jiné špatnou stabilitu za mokra a nízkými

mechanickými vlastnostmi ve vodném roztoku, což negativně ovlivňuje jejich použití jako inženýrských scaffoldů a pro kožní tkáňové inženýrství. Z tohoto důvodu se využívá stabilizace nanovláken síťováním [3].

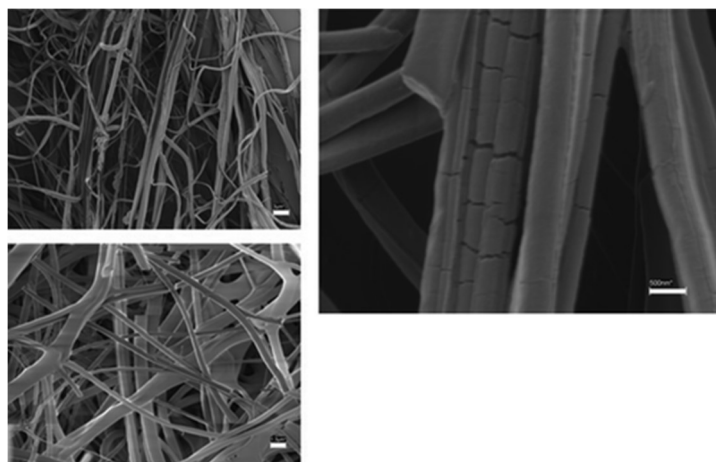


Obr. 3.7: Extrakce vodorozpuštného jádra CHIT nanovláken [43].

3.4.1 Síťování

Zesíťování je důležitým procesem pro zlepšení odolnosti proti vlhkosti a stability elektrospunovaných nanovláken na bázi chitosanu. Při výrobě chitosanových nanovláken se používají různé síťovací prostředky a techniky síťování. Chemické síťování je jednou z běžných metod modifikace CHIT nanovláčkových membrán. Chemické síťovače propojují molekuly, zvyšují stabilitu za mokra a stabilitu mechanických vlastností. Chemické síťování může vést ke snížené dostupnosti funkčních skupin v chitosanových zesíťovaných vláknitých membránách a potenciálnímu zvýšení cytotoxicity v důsledku možné toxicity způsobené chemickými látkami a nekontrolovatelným množstvím síťovacích látek. Vývoj účinných obvazů na rány s velkou biokompatibilitou (elektrospunovaná vláknitá membrána z chitosanu se zvýšenou vlhkostní stabilitou i biokompatibilitou) představuje jeden z nejzajímavějších materiálů pro podávání léčiv při hojení ran [3].

Chemicky zesíťovaná chitosanová nanovláknna lze vytvořit chemickými reakcemi mezi funkčními skupinami CHIT řetězce síťovadly. Aminovou skupinu CHIT je možné zesíťovat různými síťovadly, včetně glutaraldehydu, epichlorhydrinu a genipinu atd. Bylo prokázáno, že glutaraldehyd zesíťuje CHIT za vzniku Schiffovy báze. Ačkoli glutaraldehyd významně zlepšil stabilitu nanovláken na bázi CHIT za mokra, několik zpráv naznačuje, že materiály zesíťené glutaraldehydem jsou cytotoxické i při nízkých koncentracích glutaraldehydu. Ten se může během degradace vláken vyplavovat do lidského těla, což má za následek nižší buněčnou aktivitu. K překonání omezení cytotoxicity spojené s glutaraldehydem byl jako biokompatibilní síťovač pro elektrospunovaná CHIT vlákna použit genipin [3]. Sarham a kolegové vyrobili kompozitní nanovláknenné membrány CHIT/med/PVA a následně srovnávali chemické síťování pomocí par glutaraldehydu (GTA) a fyzikální síťování zahříváním a zmrazováním/rozmrazováním. Membrány vykazovaly antibakteriální účinnost již při podílu 5 % chitosanu. Síťování GTA vedlo k prokázanému poklesu viability fibroblastů [44]. Ve studii [45] zvlákňovali různé druhy CHIT a zesíťovali je s využitím par GTA (viz Obr. 3.8). Ačkoli v současné době není známo, do jaké míry GTA proniká do CHIT vláken, je zřejmé, že zesíťování mělo za následek zvýšení křehkosti a změnu barvy [45].



Obr. 3.8: SEM snímek zesíťovaných CHIT nanovláken [45].

Existující protonované aminoskupiny chitosanu mohou vytvářet iontové interakce s některými záporně nabitými molekulami a anionty. Například k síťování CHIT nanovláken se běžně používaly některé malé aniontové molekuly, včetně tripolyfosforečnanu sodného (TPP), kyseliny trísíselné (TA) a glycerolfosforečnanu (GP). Konkrétně TPP je netoxická a bezbarvá anorganická sloučenina široce používaná jako

iontové síťovadlo, která vytváří stabilní iontové komplexy s chitosanem, což je proces nazývaný ionotropní gelace. TA je typ taninu, přírodní žluté polyfenolické sloučeniny, která je hojně zastoupena v rostlinách, zejména v zeleném čaji. Ve srovnání s chemickými síťovadly mají iontová síťovadla výhodu menší toxicity a menšího znečištění životního prostředí [3].

Fyzikálně zesíťovaných CHIT nanovláken nebo hydrogelových vláken bylo dosaženo především pomocí fyzikálních sil, jako jsou vodíkové vazby, polární vazby, elektrostatické interakce a také Van der Waalsovy síly mezi molekulárními řetězci. Buněčná architektura a nanovláknenná struktura v matricích z nanovláken SiO₂/chitosanu byly výhodné pro adhezi a roztažení lidských mezenchymálních kmenových buněk. Tyto výsledky výzkumu naznačily, že fyzikálně zesíťované vláknité materiály s chitosanem mají velkou biokompatibilitu. Na druhou stranu, podobně jako u jiných fyzikálně zesíťovaných matric, bylo obtížné přesně kontrolovat velikost pórů, chemickou funkcionalizaci a degradační chování fyzikálně zesíťovaných materiálů [46], což mohlo vést k velkým rozdílům ve vlastnostech materiálů *in vivo* i *in vitro* [3].

Experimentální část

Cílem experimentální části této práce bylo ověřit vliv podílu chitosanu ve směsných nanovlákních PCL/CHIT na interakce s modelovými bakteriemi *Staphylococcus gallinarum* (SG) a *Escherichia coli* (EC). Tato nanovláknina díky kombinaci CHIT s hydrofobním polymerem PCL nevyžadovala žádný proces síťování pro zachování jejich stability ve vodném prostředí, což může představovat výhodu pro aplikaci v hojení infikovaných ran.

Nejprve byly optimalizovány některé laboratorní metody využití v této práci tak, aby byla zajištěna spolehlivost získaných výsledků. Výsledky z jednotlivých optimalizačních experimentů nejsou v této práci, vzhledem k jejich značnému rozsahu, uvedeny.

Následně byly provedeny hlavní studie, jejich cílem bylo ověřit vliv podílu chitosanu na schopnost tvorby kolonií u bakterií po krátké expozici a dále na schopnost bakterií adherovat na povrch nanovláken.

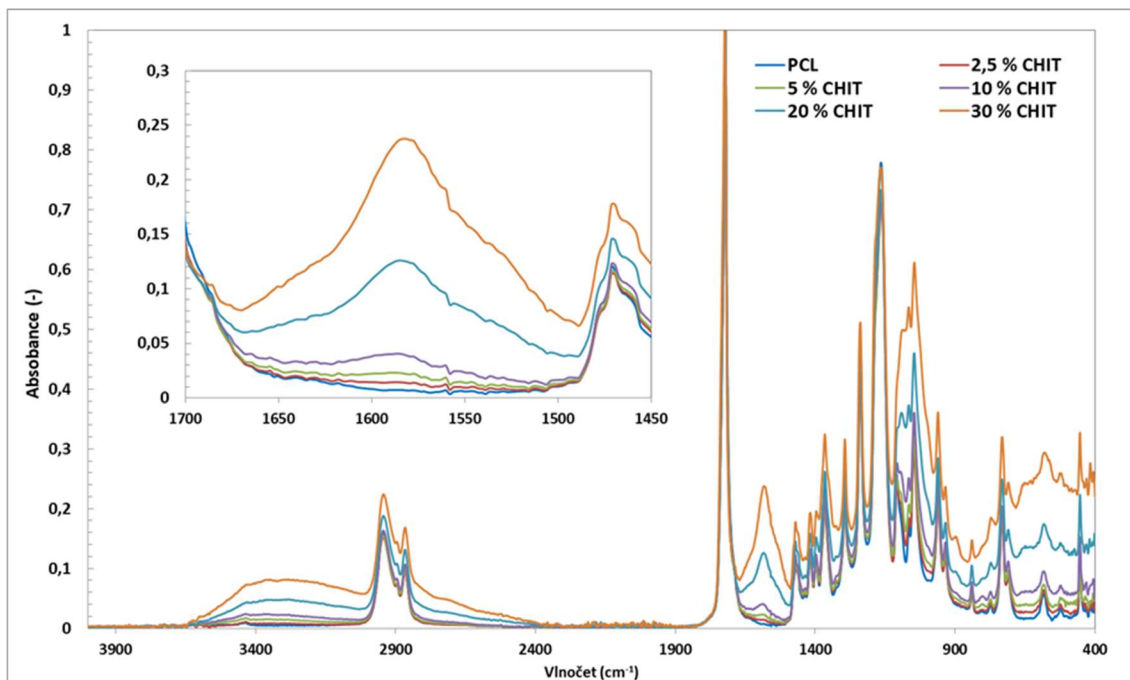
4 Popis vstupních materiálů

Příprava testovaných nanovláken nebyla součástí této práce. Nanovláknenné materiály byly připraveny bezjehlovým zvlákněním na zařízení NanospiderTM z drátové elektrody (schéma viz obrázky níže). Série nanovláken obsahovala čistá nanovláknina z polykaprolaktonu (PCL). Ta jsou dále označována také jako nanovláknina CHIT 0 % a byla používána jako kontrola bez příměsi chitosanu. Směsi PCL a chitosanu byly připraveny s podílem CHIT ve finálním hmotnostním podílu 2,5 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 % ze sušiny.

Vstupní charakterizace zahrnovala ověření nanovláknenné struktury elektronovou mikroskopií (SEM) a dále důkaz přítomnosti chitosanu ve směsi infračervenou spektroskopií (FTIR). SEM analýza prokázala nanovláknennou morfologii u všech vzorků.

Přítomnost chitosanu v nanovlákních PCL/CHIT a jeho rozdílný podíl byl prokázán FTIR analýzou. Naměřená spektra jsou na Obr. 4.1. Rozdíl spekter byl zaznamenán zejména u vrcholů na vlnočtu 3400 cm^{-1} a 1590 cm^{-1} . Oba tyto vrcholy přímo odrážejí přítomnost molekul chitosanu ve směsných nanovlákních. Vrchol kolem 3400

cm^{-1} souvisí s vibracemi $-\text{OH}$ skupin. Vrchol kolem 1590 cm^{-1} souvisí s vibracemi aminoskupiny $-\text{NH}_2$. Jak je patrné, největší počet aminoskupin v nanovlákněch byl zaznamenán u nanovláken 30 % CHIT. I z tohoto důvodu lze u tohoto zorku předpokládat nejvyšší antibakteriální účinnost.



Obr. 4.1: FTIR spektra nanovláken PCL/CHIT.

5 Materiály a metody

5.1 Použité materiály, chemikálie, přístroje a programy

Seznam nanovlákných vzorků zkoumaných v této práci je uveden v Tab. 3.1. U materiálů byla udržována podobná plošná hmotnost okolo 10 g/m².

Tab. 5.1: Přehled testovaných materiálů.

Směs číslo	1	2	3	4	5	6
Podíl CHIT	0 %	2,5 %	5 %	10 %	20 %	30 %
Podíl PCL	100 %	97,5 %	95 %	90 %	80 %	70 %

Výčet použitých chemikálií: ethanol (p.a., Penta Chemicals), glutaraldehyd (GTA, 4 %, Sigma-Aldrich), Trypton sójový bujón (TSB, Thermo Fischer Scientific), Trypton sójový agar (TSA, Thermo Fischer Scientific), destilovaná voda (dH₂O), chlorid sodný (NaCl, p.a., Penta Chemicals), hovězí sérový albumin (BSA, ≥ 96 %, Sigma-Aldrich).

Tab. 5.2: Seznam použitých bakterií. Česká sbírka mikroorganismů.

	Jméno	Podkmen	Číslo šarže	Forma dodání
SG	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	3572	2209202328767	GD (gelový disk)
EC	<i>Escherichia coli</i>	7929	2610202328849	GD (gelový disk)

Tab. 5.3: Seznam použitých přístrojů a programů.

Přístroje a programy		Firma
Skenovací elektronový mikroskop	VEGA 3	TESCAN
Fluorescenční mikroskop	AXIO Imager.M2	ZEISS
Rotátor	Rotator SB3	Stuart
Naprašovačka	Q150R ES PLUS	Quorum
Počítačka kolonií	CC-200	Cole-Parmer [®]
Vortex	BenchMixer [™] V2	Benchmark Scientific
McFarland	Turbidimetr	Hannah Instrument
Centrifuga	Z 36 HK	HERMLE Labortechnik GmbH
Software pro analýzu snímků	ImageJ	Fiji Contributors
Software pro tvorbu histogramů	MATLAB	MathWorks
Software pro tvorbu grafů, tabulek a zpracování celé práce	Microsoft Office	Microsoft Corporation
Překladač	DeepL	DeepL SE

5.2 Hodnocení interakce s bakteriemi

5.2.1 Kolonie tvořící jednotku – CFU

CFU představuje českou zkratku pro anglický pojem „colony forming unit“, což v překladu znamená kolonie tvořící jednotku. Jedná se o kvantitativní mikrobiologický test. Jak již bylo zmíněno, zkoumané materiály jsou směsí PCL a CHIT, které byly vyraženy o průměru 1 cm. Každý materiál byl testován v duplikátu (viz tabulka níže).

Tab. 5.4: Přehled zkoumaných materiálů.

Vzorek číslo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Podíl CHIT	0 %		2,5 %		5 %		10 %		20 %		30 %	

Po několika optimalizačních experimentech jsme stihly otestovat antibakteriální účinky na dvou bakteriálních kmenech (*S. gallinarum* a *E. coli*). Popis použitého postupu je uveden níže.

Experiment 1

a) *Staphylococcus gallinarum* (SG)

- 1) Den před experimentem byl oživen kmen SG vložení tablety do Trypton sójového bujónu (TSB) v lahvičce.
- 2) V den experimentu byl připraven obohacený (oboh.) fyziologický roztok (FR) s podílem 0,15 % hovězího sérového albuminu (BSA). Roztok byl sterilizován filtračně (porozita 0,2 μm).
- 3) Lahvička s bujónem a oživenými bakteriemi byla nejprve protřepána pomocí vortexu. Její obsah byl následně naředěn na koncentraci bakterií 7×10^7 na ml. Byl změřen zákal bakteriální suspenze $\text{McF} = 1,3$ ($\text{McF} = \text{McFarland}$).
- 4) Bakteriální suspenze byla naředěna na finální koncentraci 10^3 bakterií na ml. Do 5ml mikrozkušavek Eppendorf bylo vloženo vždy jedno kolečko materiálu (průměr 1 cm) a přidány 4 ml bakt. suspenze o koncentraci 10^3 . Expozice probíhala 2 hodiny při teplotě 37 °C na rotátoru (40 ot./min). V průběhu expozice byl připraven slepý vzorek Blank 0, jednalo se o čistou bakteriální suspenzi o koncentraci 10^3 bez jakéhokoli ovlivnění. Ten byl

očkovan (1 ml) na Trypton sójový agar (TSA) v čase T_0 a následně v čase T_{120} (2 hodiny), aby byl vidět přirozený vývoj bakteriální populace bez ovlivnění nanovláknů.

Pro usnadnění počítání kolonií bylo provedeno ředění 4krát, a to bylo vyočkováno v dubletu.

- 5) Po 2hodinové inkubaci nanovláknenných vzorků byly mikroskopické vyjmuty z termostatu z rotátoru, protřepány pomocí vortexu a bakt. suspenze byla očkována vylitím 1 ml na TSA v Petriho misce. Následně bylo provedeno ředění 4krát a toto bylo vyočkováno v dubletu na TSA stejným způsobem.
- 6) Vyočkované vzorky byly vloženy do termostatu (37 °C) s třepáním, aby se suspenze vsákla, poté byly misky otočeny dnem vzhůru a byly inkubovány bez třepání do druhého dne.
- 7) Druhý den byly počítány vyrostlé kolonie, pořízena fotodokumentace a následně vyhodnocovány výsledky.

b) *Escherichia coli* (EC)

Experiment s bakterií *E. coli* byl proveden stejným postupem. Lišila se pouze vstupní koncentrací bakterií, která byla 10^8 (McF = 1,1). Dále se lišilo složení FR. Ten byl pro EC neobohacený, tedy neobsahoval žádné BSA. Den před experimentem byl oživen kmen EC vložení korálku do TSB v lahvičce.

Experiment 2

Z důvodů silné antibakteriální účinnosti byl v případě bakterie SG u vybraných vzorků experiment opakován s vyšší koncentrací bakteriální suspenze (10^5), aby byla nalezena hranice antibakteriálního účinku v závislosti na podílu chitosanu. Kromě vyšší koncentrace bakterií byl postup zcela shodný s Experimentem 1. Doba expozice byla zachována na 2 hodinách.

5.2.2 Adheze na povrch materiálu

Byl studován vliv podílu chitosanu na bakteriální adhezi na povrch nanovláken. Použity byly oba modelové bakteriální kmeny (SG, EC). Sledován byl také vliv doby expozice – a to 2, 4 a 6 hodin. Vzhledem k silným interakcím fluorescenčních barviv s nanovláknů nebylo možné hodnotit počet adherovaných bakterií pomocí fluorescenční

mikroskopie. Z tohoto důvodu byla využita mikroskopie elektronová (SEM). Hodnocen byl nejen počet adherovaných bakterií na jednotku plochy, ale také jejich rozměr.

Příprava vzorků a hodnocení

Vzorky pro bakteriální adhezi byly připravovány zároveň s experimentem CFU viz 5.2.1. Byla použita vstupní koncentrace bakt. suspenze – tedy 7×10^7 bakterií na ml. Pro sady vzorků (inkubace 2, 4 a 6 hodin) byla suspenze nejprve stočena na centrifuze (5 minut, 9000 rpm) a následně byly resuspendovány ve fyziologickém roztoku (obohaceném pro bakt. kmen SG), aby byly odstraněny zbytky TSB, které by mohly interagovat s chitosanem. Byly použity výřezy nanovláken o průměru 12 mm. Inkubace probíhala ve 24jamkové kultivační destičce při zatížení skleněnými válečky. Po zatížení válečky se na materiály pipetovalo 500 μ l bakt. suspenze a byly ponechány 2 hodiny v termostatu při teplotě 37 °C k inkubaci (staticky).

Po inkubaci byly odejmuty skleněné válečky, následně probíhala série oplachů fyziologickým roztokem (FR) u všech vzorků stejně (SG i EC). Poté byly bakterie na vzorcích fixovány 500 μ l 4% glutaraldehydu (GTA) po dobu 10 minut. Poté byly materiály opět opláchnuty ve FR a byla provedena dehydratace v dehydratační řadě roztoků ethanolu (30%, 50%, 70%, 80%, 90% a 100%). Vždy 500 μ l na vzorek po dobu pěti minut. Poté materiály byly na sušení přesunuty na rovnou a čistou plochu. Následně byla na části každého vzorku provedena SEM analýza. Vzorky byly naprášeny vrstvou platiny (2 nm) a snímány při zvětšení 0,5kx až 25kx. Počet bakterií na plochu byl hodnocen u zvětšení 5kx a 10kx vždy na dvou pozicích v Softwaru ImageJ ve čtyřech opakováních. Velikost bakterií byla měřena při zvětšení 10kx na dvou pozicích také softwarem ImageJ. U počtu bakterií byla vyhodnocena distribuce velikostí a zpracována do histogramu četností (absolutní) pro každý vzorek. K tomu byl použit software MATLAB (R2023a).

6 Výsledky a diskuse

6.1 Výsledky CFU

Experiment 1

Přehled dosažených výsledků v Experimentu 1 u *S. gallinarum* je uveden v tabulce níže a graficky zpracován na Obr. 6.1. Výsledky dosažené u *E. coli* jsou uvedeny v tabulce Tab. 6.2 a graficky na Obr. 6.2. Společná diskuse pro Experiment 1 a 2 je uveden na straně 50.

Tab. 6.1: Počet narostlých kolonií SG po inkubaci 2 h s příslušnými materiály.

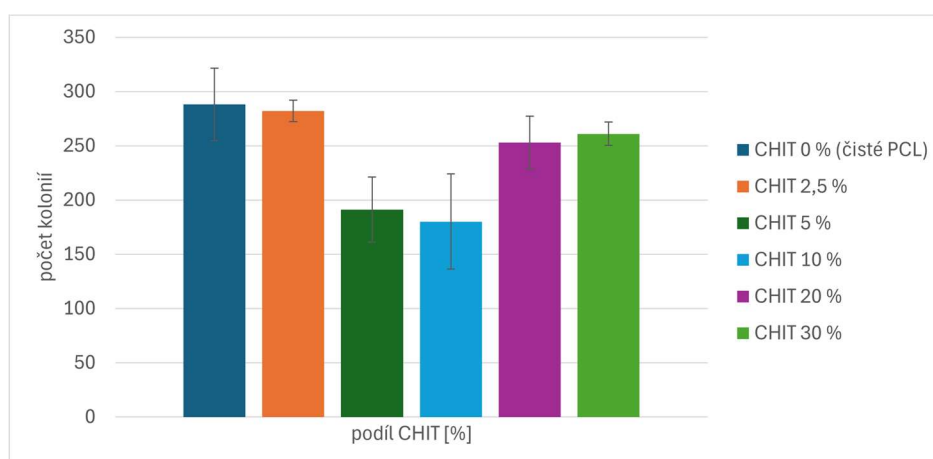
Vzorek číslo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Bl. 0 (T ₀)	Bl. 0 (T ₁₂₀)
Podíl CHIT	0 %		2,5 %		5 %		10 %		20 %		30 %		čistá bakteriální kultura	
10 ³	482	455	483	522	4	9	6	1	0	0	0	0	508	580
10 ³ ředěno 4krát	128	108	129	159	1	3	2	0	0	0	0	0	145	146
	133	116	139	129	1	0	1	0	0	0	0	0	169	131
Průměr 10 ³ ředěno 4krát	121		139		1,25		0,75		0		0		157	139



Obr. 6.1: Graf vlivu podílu chitosanu na počet narostlých kolonií. Kmen SG, koncentrace 10³, 4krát ředěno (vpravo detailní pohled pro vzorky CHIT 5, 10, 20 a 30 %).

Tab. 6.2: Počet narostlých kolonií EC po inkubaci 2 h s příslušnými materiály.

Vzorek číslo	Podíl CHIT	10 ³	10 ³ ředěno 4krát		Průměr 10 ³ ředěno 4krát
1	0 %	1060	304	310	288
2		908	238	298	
3	2,5 %	980	269	284	282
4		1020	283	293	
5	5 %	692	191	149	191
6		808	214	211	
7	10 %	486	144	142	180
8		728	230	203	
9	20 %	812	252	221	253
10		656	280	258	
11	30 %	888	271	246	261
12		864	262	266	
Bl. 0 (T₀)	čistá bakt. kultura	1053	300	273	287
Bl. 0 (T₁₂₀)		1120	303	283	293



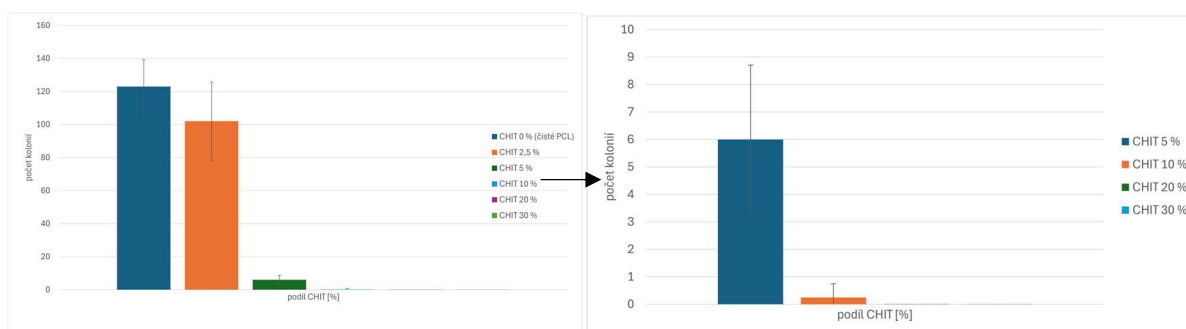
Obr. 6.2: Graf vlivu podílu chitosanu na počet vyrostlých kolonií. Bakteriální kmen EC, koncentrace 10³, 4krát ředěno.

Experiment 2

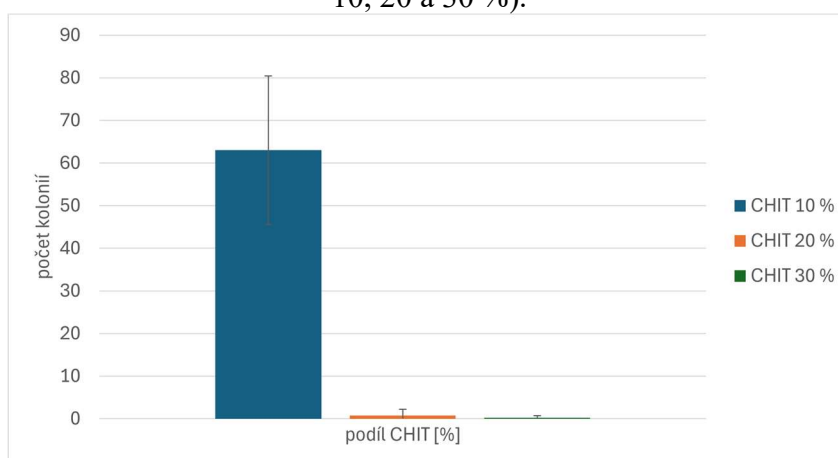
Z důvodu nedostatečné informace o redukční aktivitě CHIT u materiálů s vyšším podílem CHIT na bakt. kmenu SG byl proveden experiment s vyšší koncentrací bakterií v suspenzi. Dosažené výsledky jsou v Tab. 6.3 a graficky na Obr. 6.3, opakována byla celá série 10³ a pro koncentraci 10⁵ byly vybrány vzorky (CHIT 5, 10, 20 a 30 %), pro které je výsledek graficky zachycen na Obr. 6.4. Na bakt. kmenu EC byl proveden stejná série experimentu jako v Experimentu 1 a pro tento experiment jsou uvedeny výsledky v Tab. 6.4 a graficky znázorněny na Obr. 6.5.

Tab. 6.3: Počet narostlých kolonií SG po inkubaci 2 h s příslušnými materiály.

Vzorek číslo	Podíl CHIT	10 ⁵		10 ³		10 ³ 4krát ředěno		Průměr
1	0 %	X	500	X	121	147	123	
2			482		112	113		
3	2,5 %	X	466	X	112	67	102	
4			502		108	120		
5	5 %	X	25	X	5	4	6	
6			42		10	5		
7	10 %	53	79	X				63
8		77	44					
9		X	0	1	0	0	0,25	
10			1	0	1	0		
11	20 %	0	0	X				0,75
12		0	3					
13		X	0	0	0	0	0	
14			0	0	0	0		
15	30 %	0	0	X				0,25
16		1	0					
17		X	0	0	0	0	0	
18			0	0	0	0		



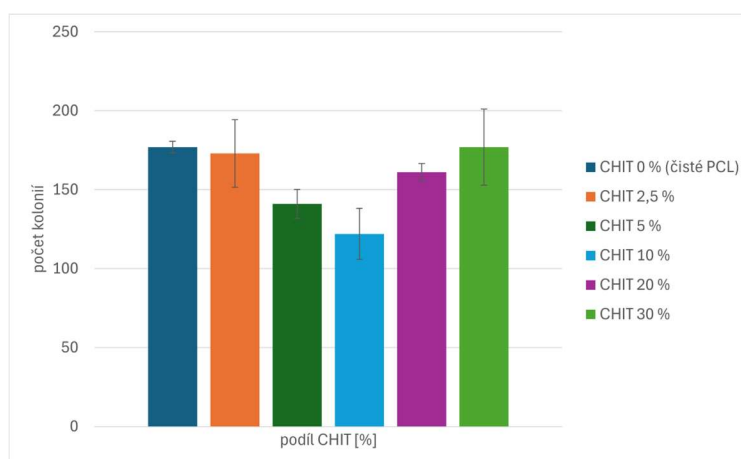
Obr. 6.3: Graf vlivu podílu chitosanu na počet narostlých kolonií. Kmen SG, koncentrace 10³, 4krát ředěno (vpravo detailní pohled pro vzorky CHIT 5, 10, 20 a 30 %).



Obr. 6.4: Graf vlivu podílu chitosanu na počet narostlých kolonií. Kmen SG, koncentrace 10⁵.

Tab. 6.4: Počet narostlých kolonií EC po inkubaci 2 h s příslušnými materiály.

Vzorek číslo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Podíl CHIT	0 %		2,5 %		5 %		10 %		20 %		30 %	
10 ³	698	708	556	1020	564	476	508	464	604	644	684	696
10 ³ ředěno 4krát	181	172	152	283	147	131	134	111	162	153	205	183
Průměr 10 ³ ředěno 4krát	177		173		141		122		161		177	



Obr. 6.5: Graf vlivu podílu chitosanu na počet narostlých kolonií. Kmen EC, koncentrace 10³, 4krát ředěno.

Diskuse výsledků

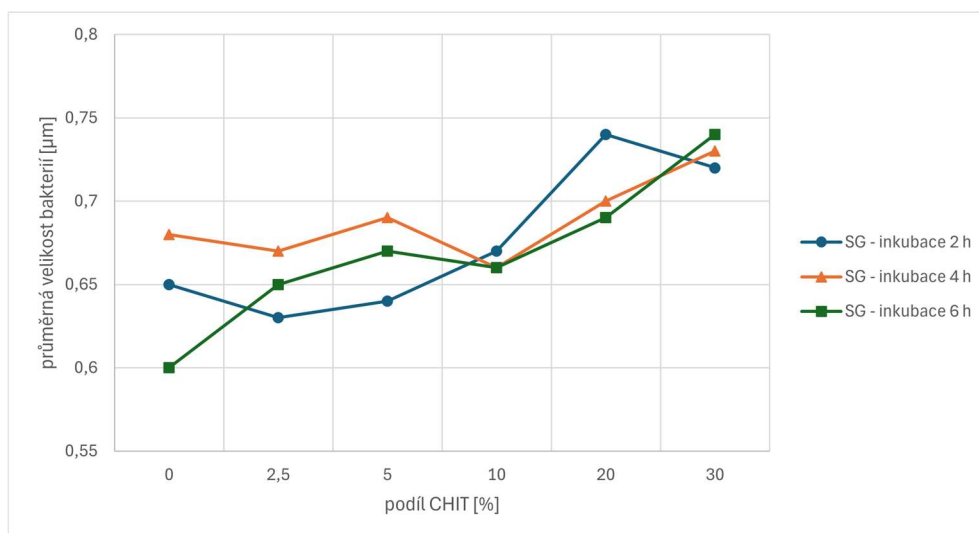
Metodou CFU byl prokázán antibakteriální efekt nanovláken PCL/CHIT pouze u bakteriálního kmene SG. Jak je vidět z grafu na Obr. 6.1, koncentrace CHIT nanovlákních 20 % a vyšší vedla k úplné eliminaci růstu bakterií SG a nebyly po 2 hodinách expozice formovány žádné kolonie. Již podíl 5 % CHIT vedl k významnému snížení počtu kolonií a objevovaly se pouze jednotky. Ve srovnání s kontrolou PCL nanovlákní, kdy při ředění 4krát narostlo 121 ± 11 kolonií. V případě 2,5 % CHIT v nanovlákních potom narostlo 139 ± 14 kolonií.

Na rozdíl od bakterií SG na bakterie EC neměl podíl CHIT významný vliv a nedošlo k eliminaci růstu bakteriálních kolonií. Jak je vidět z výsledků zobrazených na Obr. 6.2, u vzorků s podílem CHIT 5 % a 10 % došlo k poklesu počtu kolonií na 191 a 180, tedy zhruba o 25 %, tento pokles nebyl zaznamenán u nanovláken s podílem nad CHIT 20 %. Nanovlákní s podílem CHIT 2,5 % měla srovnatelné množství kolonií jako PCL.

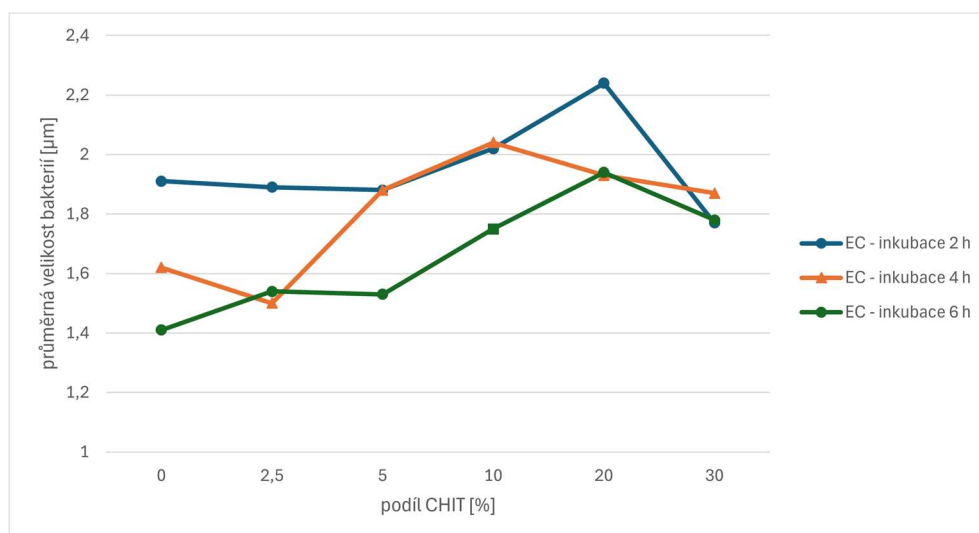
6.2 Výsledky adheze na povrchu materiálů

6.2.1 Velikosti bakterií

Pro účely vyhodnocení adheze bakterií na nanovláčkách byly použity snímky o zvětšení 5kx a 10kx (u obou těchto zvětšení byly vzorky snímány na dvou místech). Konkrétně pro měření velikostí bakterií byly použity snímky se zvětšením 10kx. U každého vzorku byla hodnocena distribuce velikostí bakterií a sestaven histogram četností (absolutní). Níže jsou uvedeny ilustrační snímky a zbylé snímky budou uvedeny viz příloha. U bakterií EC byla měřena jejich délka a u bakterií SG byl měřen jejich průměr v jednom směru.



Obr. 6.6: Přehledový graf průměrných velikostí bakterií. Kmen SG.



Obr. 6.7: Přehledový graf průměrných velikostí bakterií. Kmen EC.

Diskuse výsledků

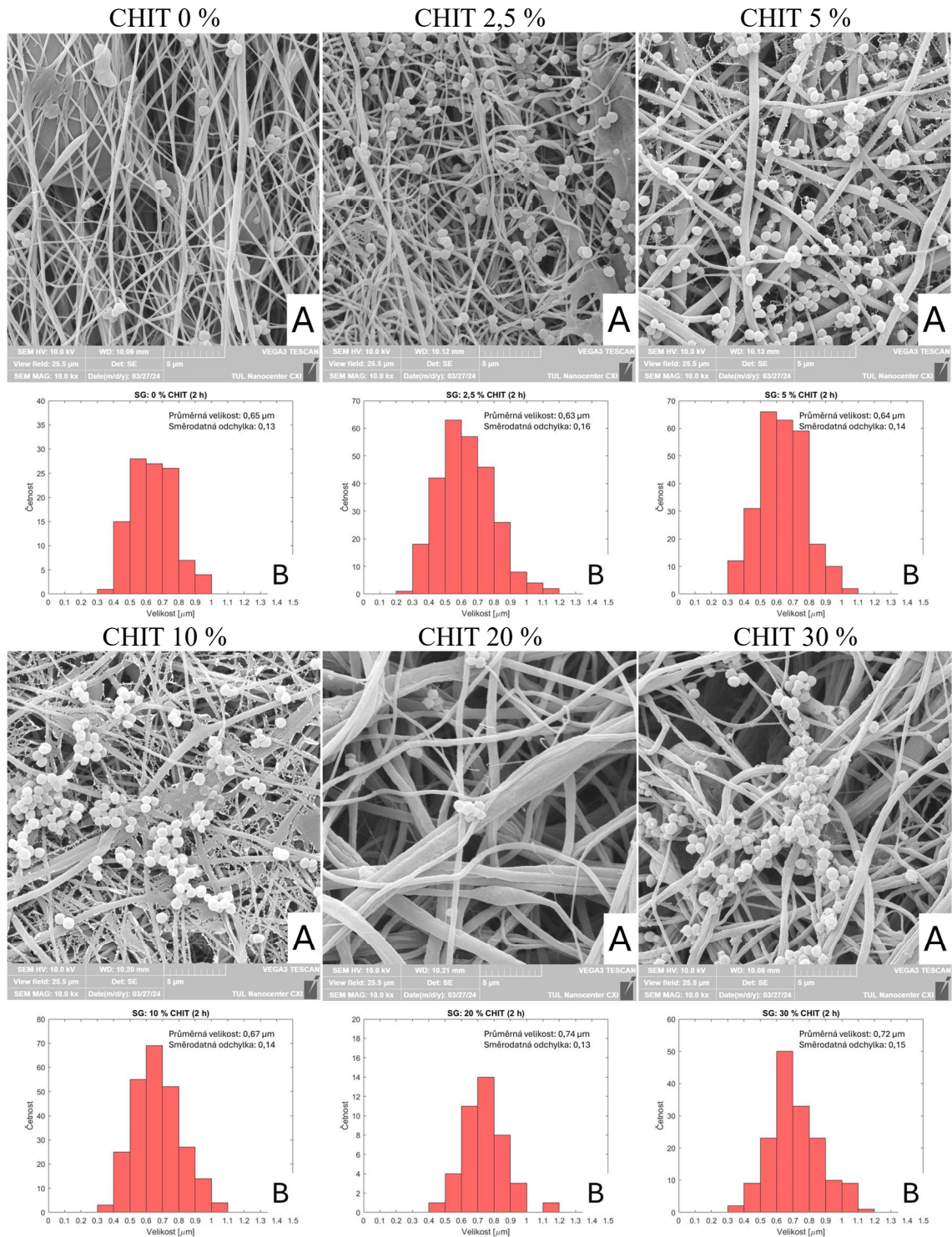
Grafické zobrazení souhrnných výsledků průměrné velikosti bakterií na nanovlákněných vzorcích jsou na Obr. 6.6 a Obr. 6.7.

Snímky z elektronové mikroskopie (SEM) a histogramy četností pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny na následujících obrázcích: Obr. 6.8, Obr. 6.9, Obr. 6.10, Obr. 6.11, Obr. 6.12, Obr. 6.13.

U SG je vidět podobný trend ve všech časech expozice. Rostoucí rozměr s podílem CHIT v nanovlákněch mírně roste pro všechny koncentrace CHIT. Největší rozdíl byl zaznamenán u expozice 6 hodin, kde průměrná velikost SG na PCL nanovlákněch byla 0,6 μm a u vzorku s podílem CHIT 30 % byla průměrná velikost 0,74 μm.

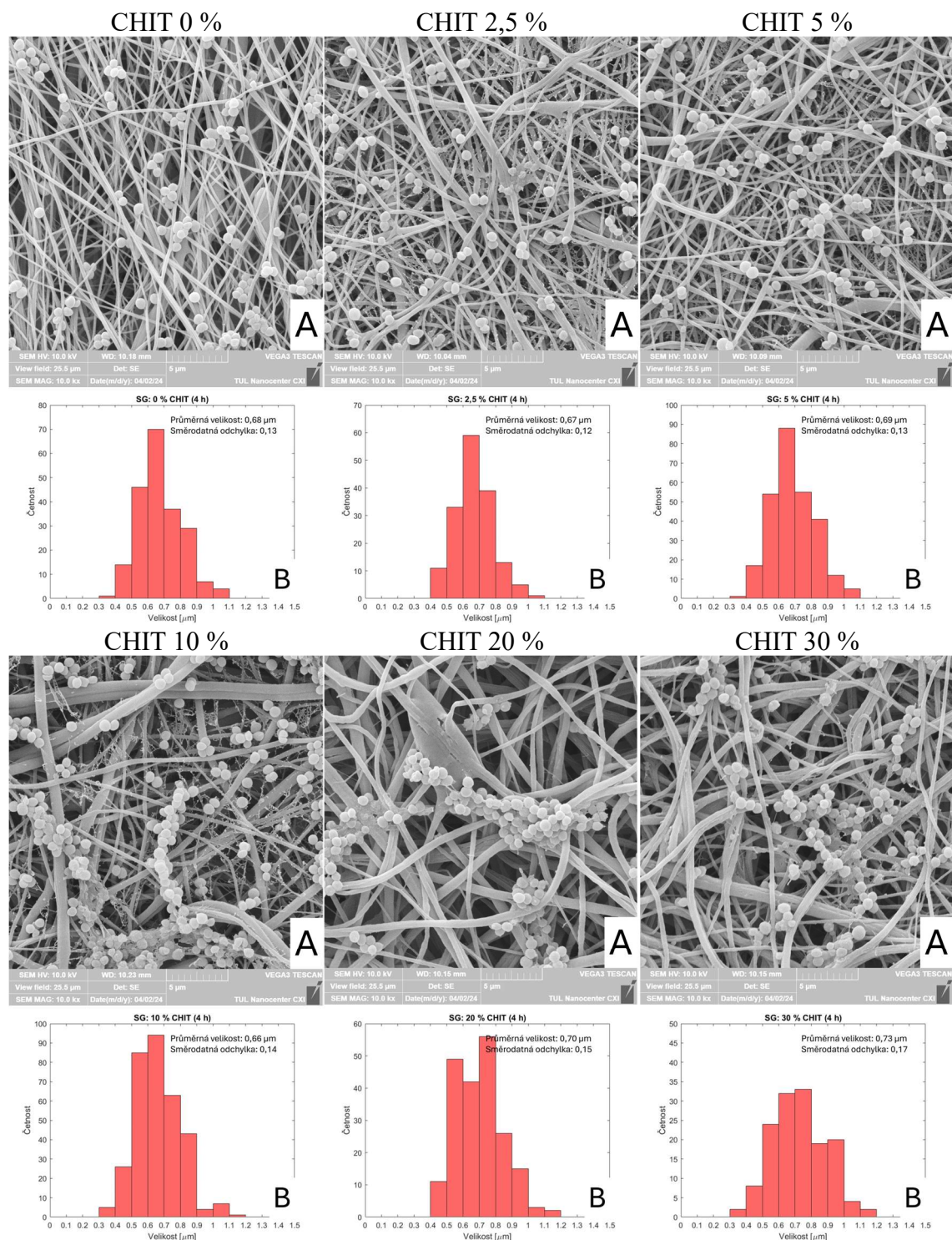
U EC byl podobný rostoucí trend pouze do koncentrace chitosanu 20 %. Tam byla zaznamenána délka bakterií EC 1,94 μm oproti hodnotě 1,41 μm u PCL nanovlákně. U vzorků s podílem CHIT 30 % nastalo skokové zmenšení průměrné velikosti bakterií na hodnotu 1,78 μm. Velikost bakterií může být ovlivněna různými faktory, které souvisejí se syntézou buněčné stěny, fází buněčného cyklu a jsou také ovlivněny látkami okolního prostředí a stresem [47]. Dosažené výsledky jasně ukazují souvislost mezi velikostí bakterií a podílem chitosanu v nanovlákněch. Nebyly však provedeny žádné další testy, které by vysvětlily mechanismus tohoto účinku. Lze předpokládat, že výsledky souvisí se stresem z narušení bakteriální stěny.

SG – doba inkubace bakteriální suspenze na nanovláčkách byla 2 hodiny:



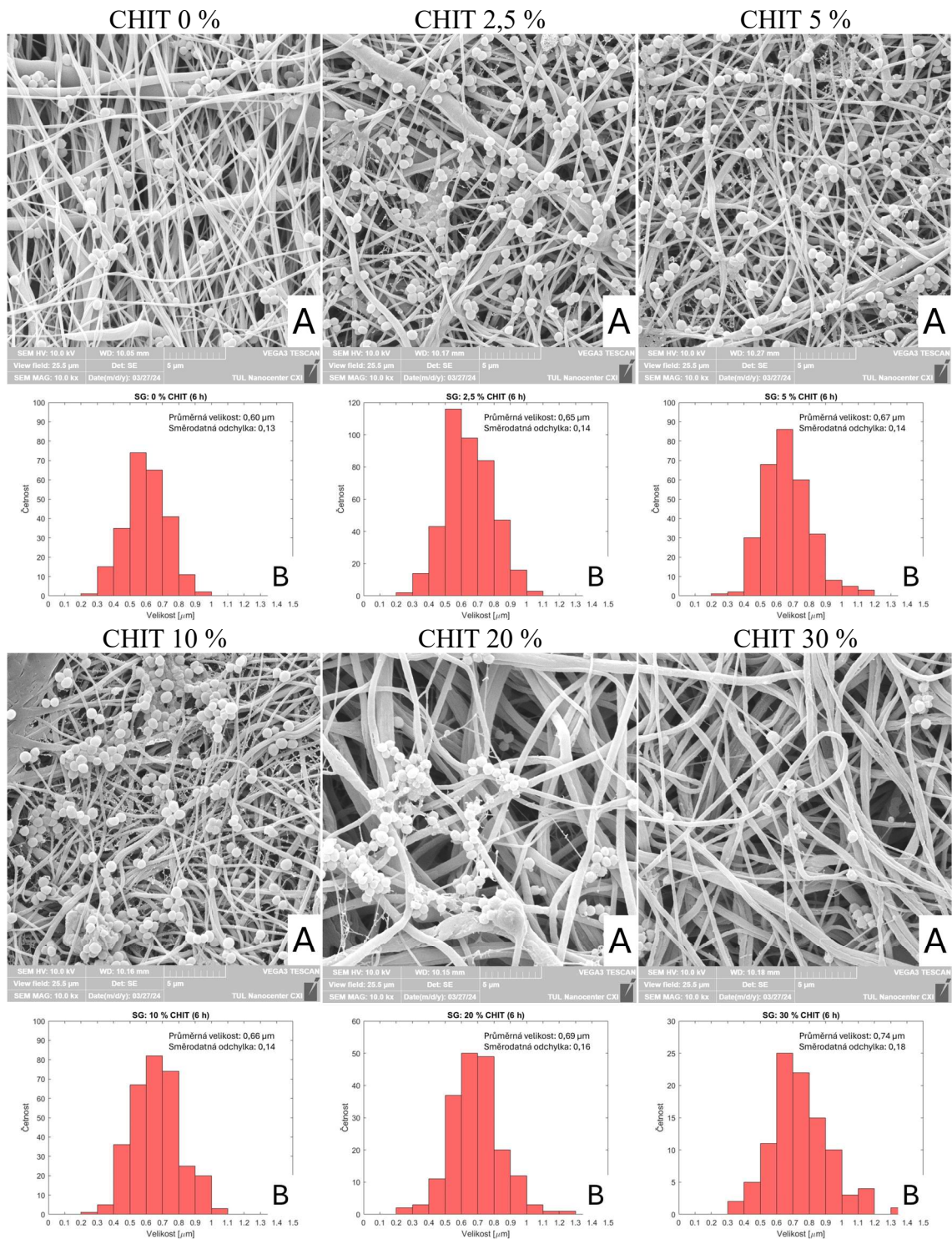
Obr. 6.8: Velikost bakterií SG po inkubaci 2 hodiny.
A – SEM snímek vzorku, B – histogram distribuce velikosti bakterií (absolutní četnost).

SG – doba inkubace bakteriální suspenze na nanovláčkách byla 4 hodiny:



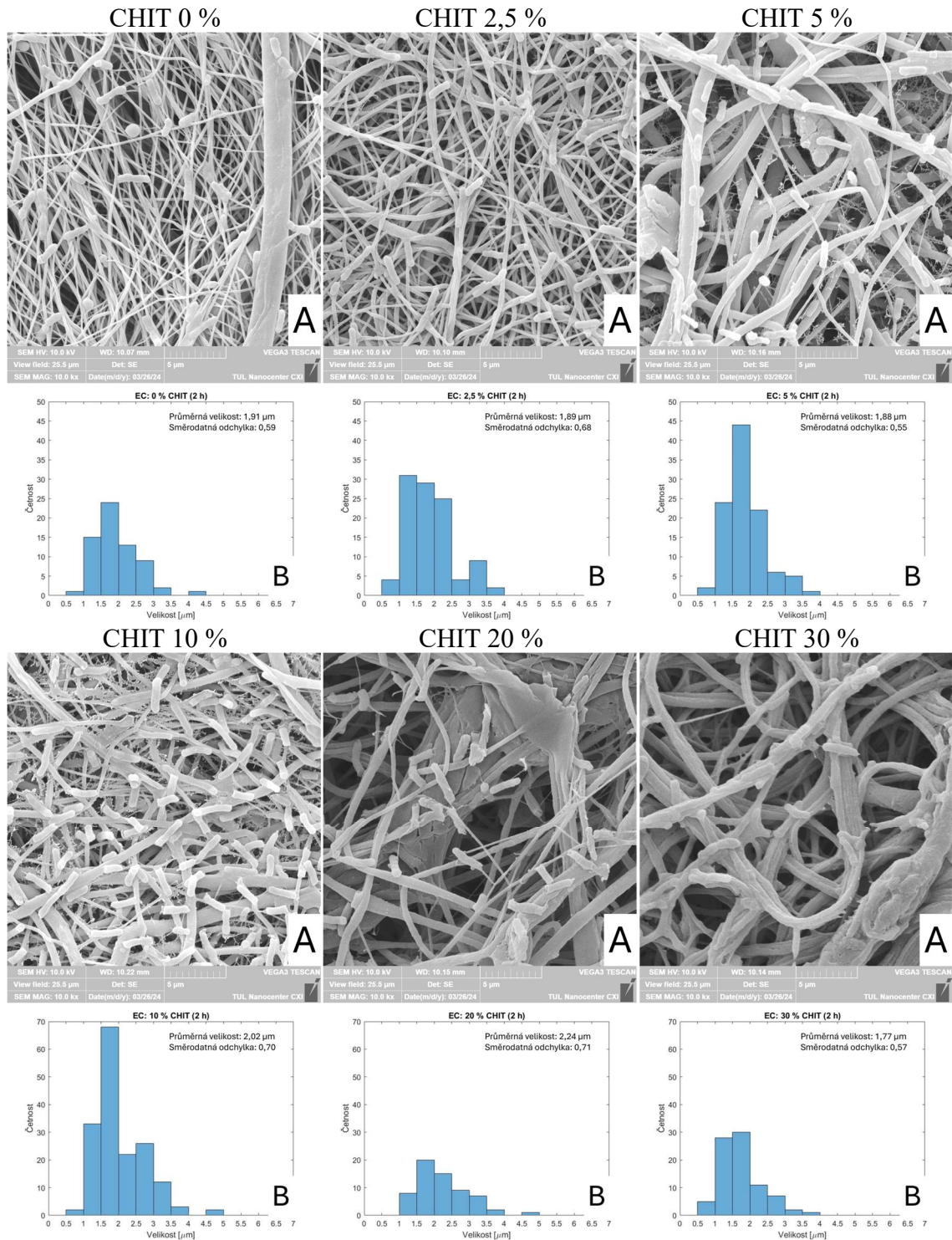
Obr. 6.9: Velikost bakterií SG po inkubaci 4 hodiny.
A – SEM snímek vzorku, B – histogram distribuce velikosti bakterií (absolutní četnost).

SG – doba inkubace bakteriální suspenze na nanovláčkách byla 6 hodin:



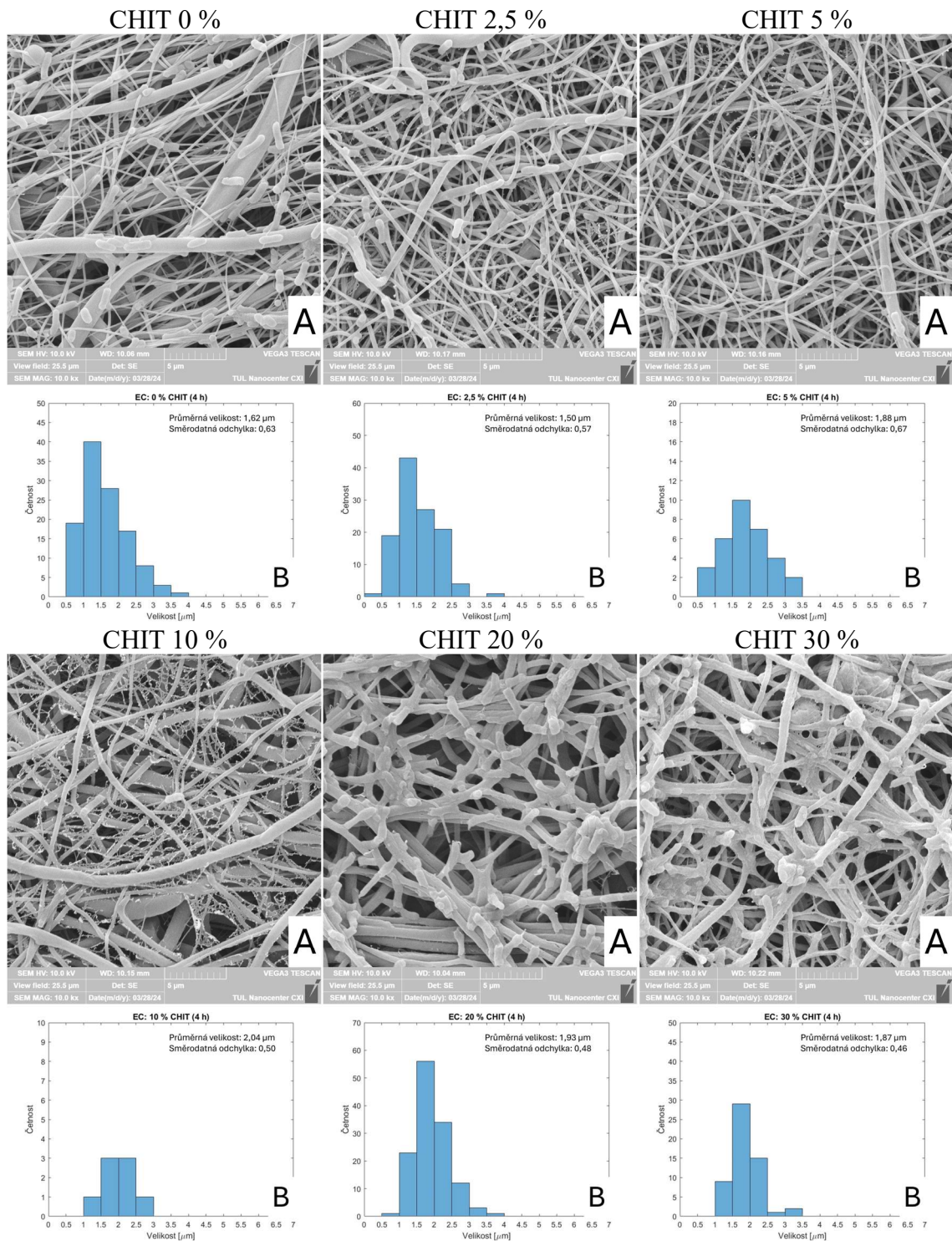
Obr. 6.10: Velikost bakterií SG po inkubaci 6 hodin.
A – SEM snímek vzorku, B – histogram distribuce velikosti bakterií (absolutní četnost).

EC – doba inkubace bakteriální suspenze na nanovláčkách byla 2 hodiny:



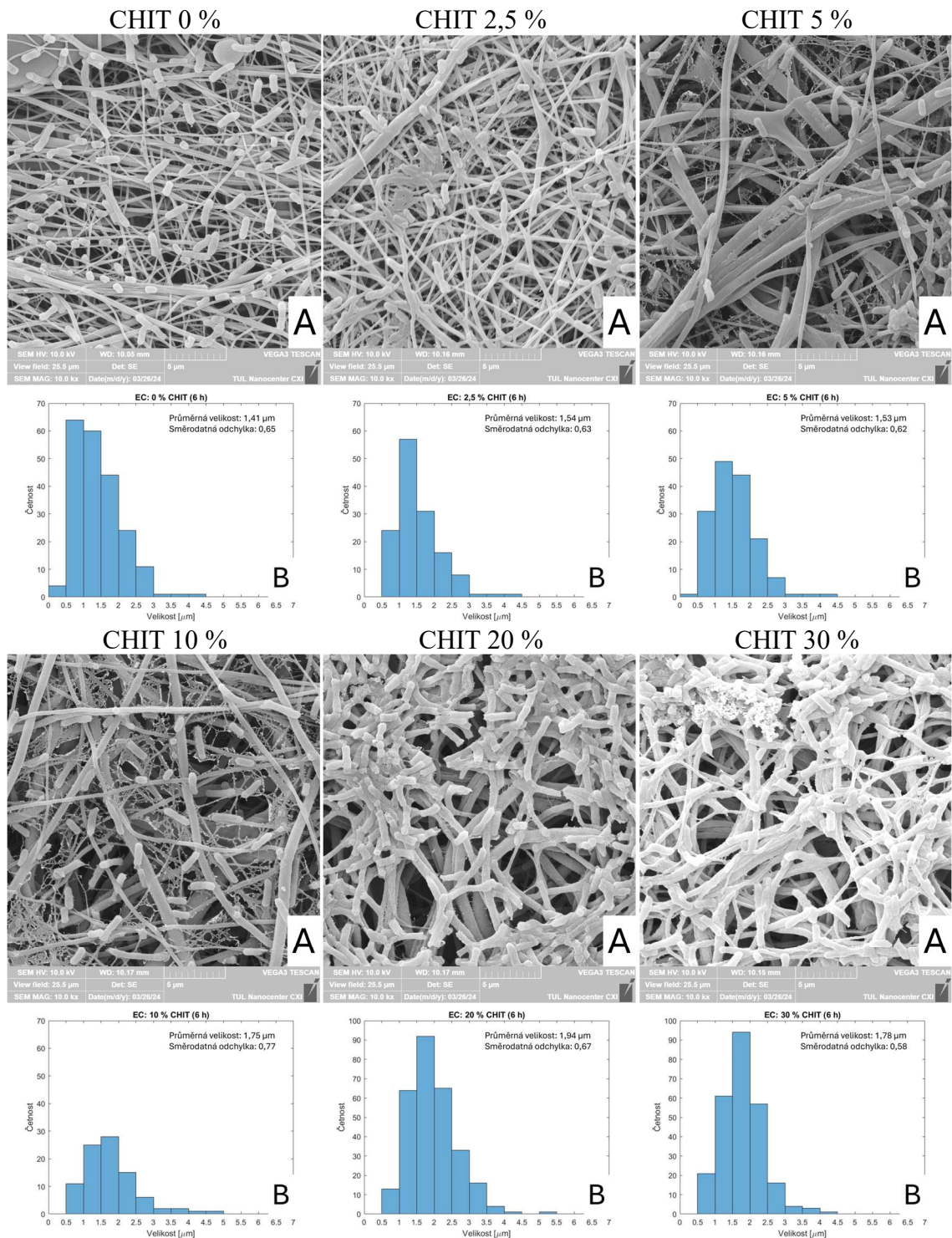
Obr. 6.11: Velikost bakterií EC po inkubaci 2 hodiny.
A – SEM snímek vzorku, B – histogram distribuce velikosti bakterií (absolutní četnost).

EC – doba inkubace bakteriální suspenze na nanovláčkách byla 4 hodiny:



Obr. 6.12: Velikost bakterií EC po inkubaci 4 hodiny.
A – SEM snímek vzorku, B – histogram distribuce velikosti bakterií (absolutní četnost).

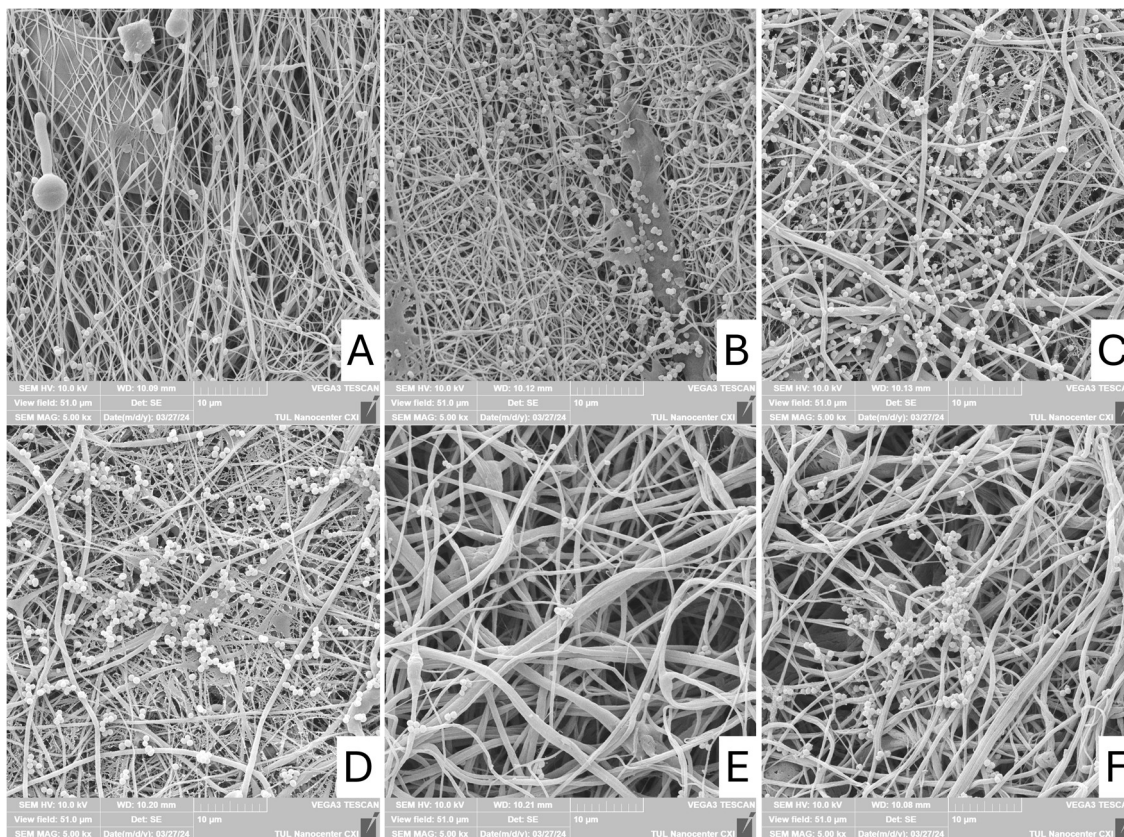
EC – doba inkubace bakteriální suspenze na nanovláčkách byla 6 hodin:



Obr. 6.13: Velikost bakterií EC po inkubaci 6 hodin.
A – SEM snímek vzorku, B – histogram distribuce velikosti bakterií (absolutní četnost).

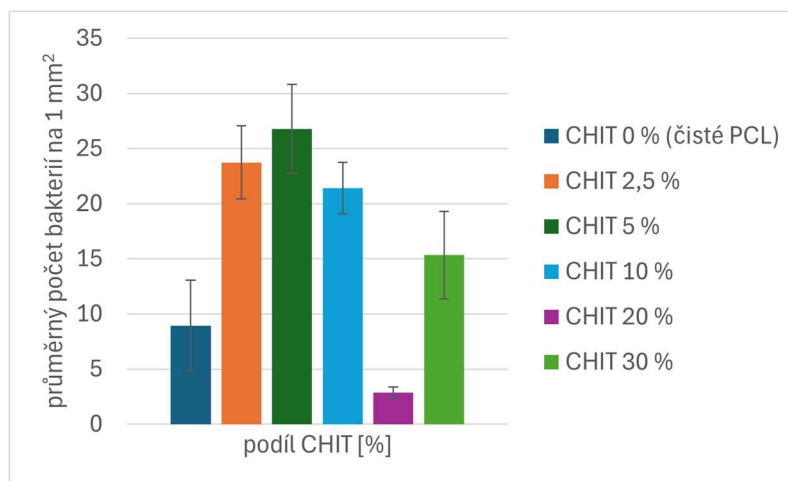
6.2.2 Počty adherovaných bakterií

Pro účely vyhodnocení počtu bakterií na plochu byly použity snímky se zvětšením 5kx a 10kx (vzorky byly snímány na dvou místech). Souhrnný graf průměrných počtů je na Obr. 6.26 a Obr. 6.27. Uvedeny níže jsou SEM snímky se zvětšením 5kx a zbylé snímky, které byly zahrnuty do výsledků, jsou v 6.2.1 a v přílohách.

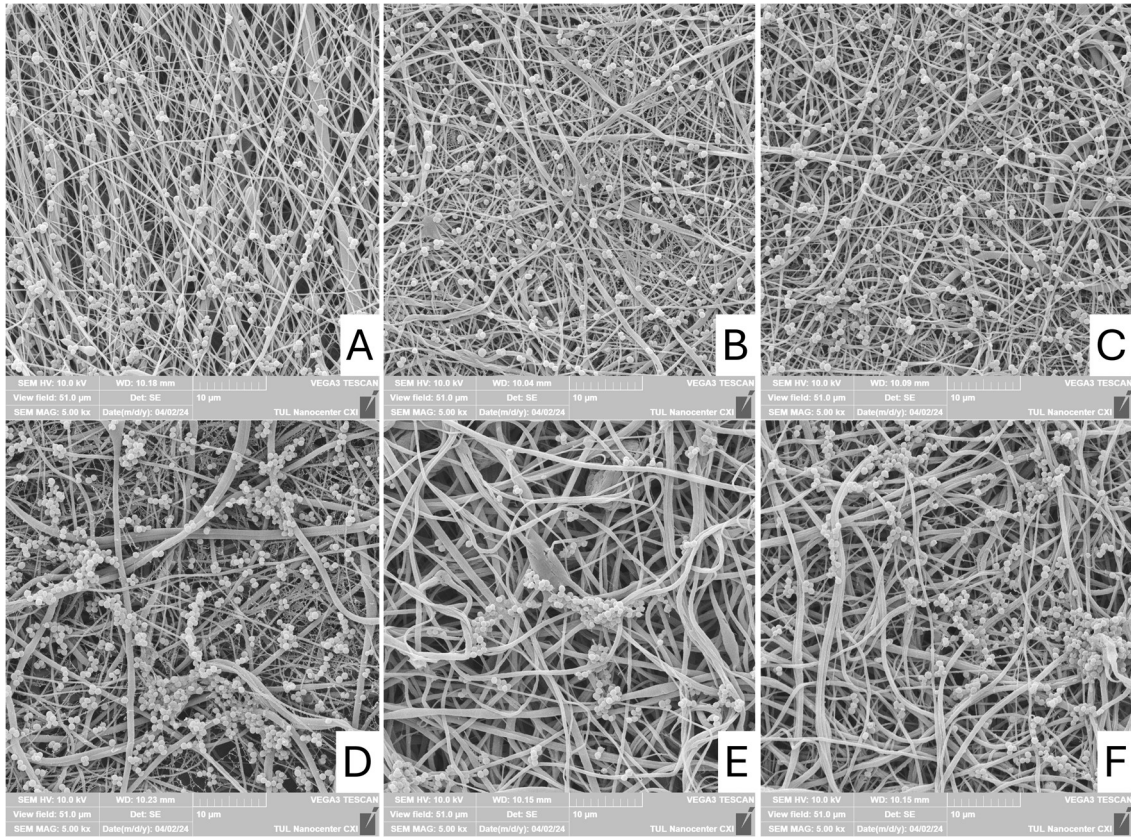


Obr. 6.14: SEM snímky vzorků.

SG – doba inkubace 2 h, A – CHIT 0 %, B – CHIT 2,5 %, C – CHIT 5 %, D – CHIT 10 %, E – CHIT 20 %, F – CHIT 30 %.

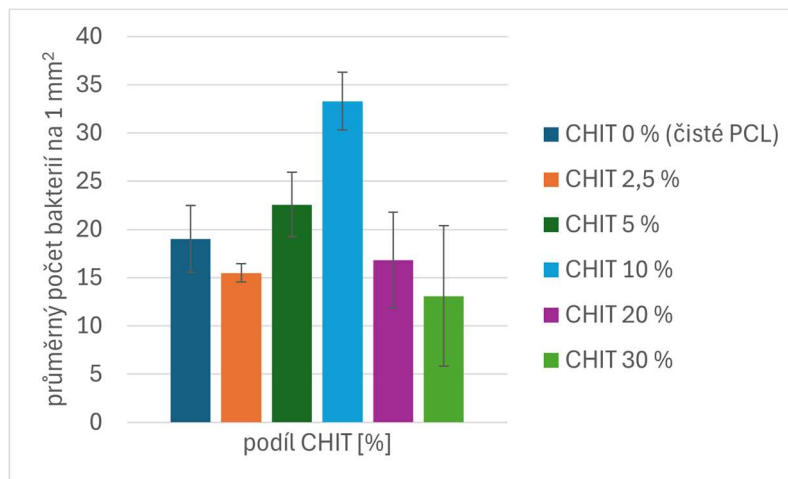


Obr. 6.15: Graf průměrného počtu bakterií SG na 1 mm² po 2 h inkubace.

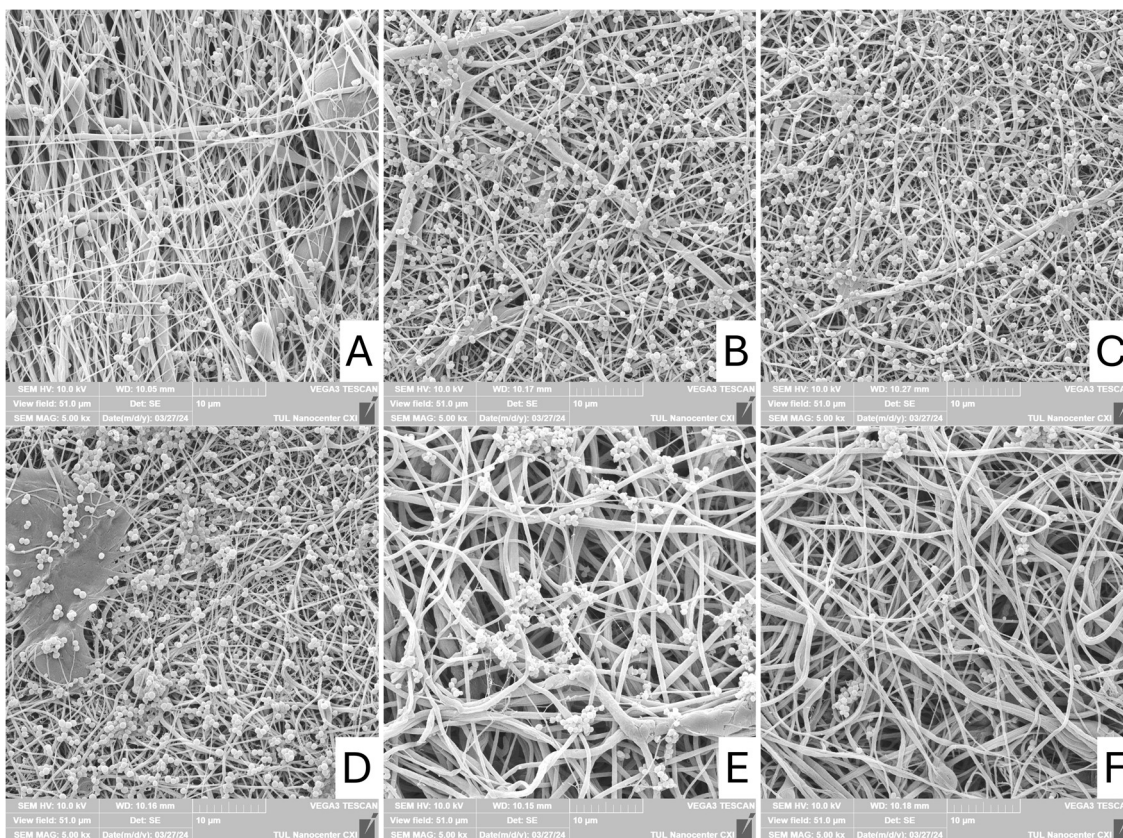


Obr. 6.16: SEM snímky vzorků.

SG – doba inkubace 4 h. A – CHIT 0 %, B – CHIT 2,5 %, C – CHIT 5 %, D – CHIT 10 %, E – CHIT 20 %, F – CHIT 30 %.

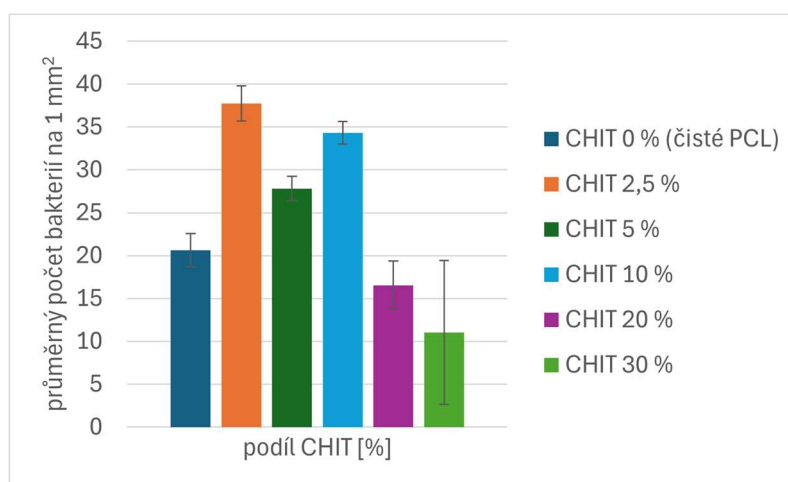


Obr. 6.17: Graf průměrného počtu bakterií SG na 1 mm² po 4 h inkubace.

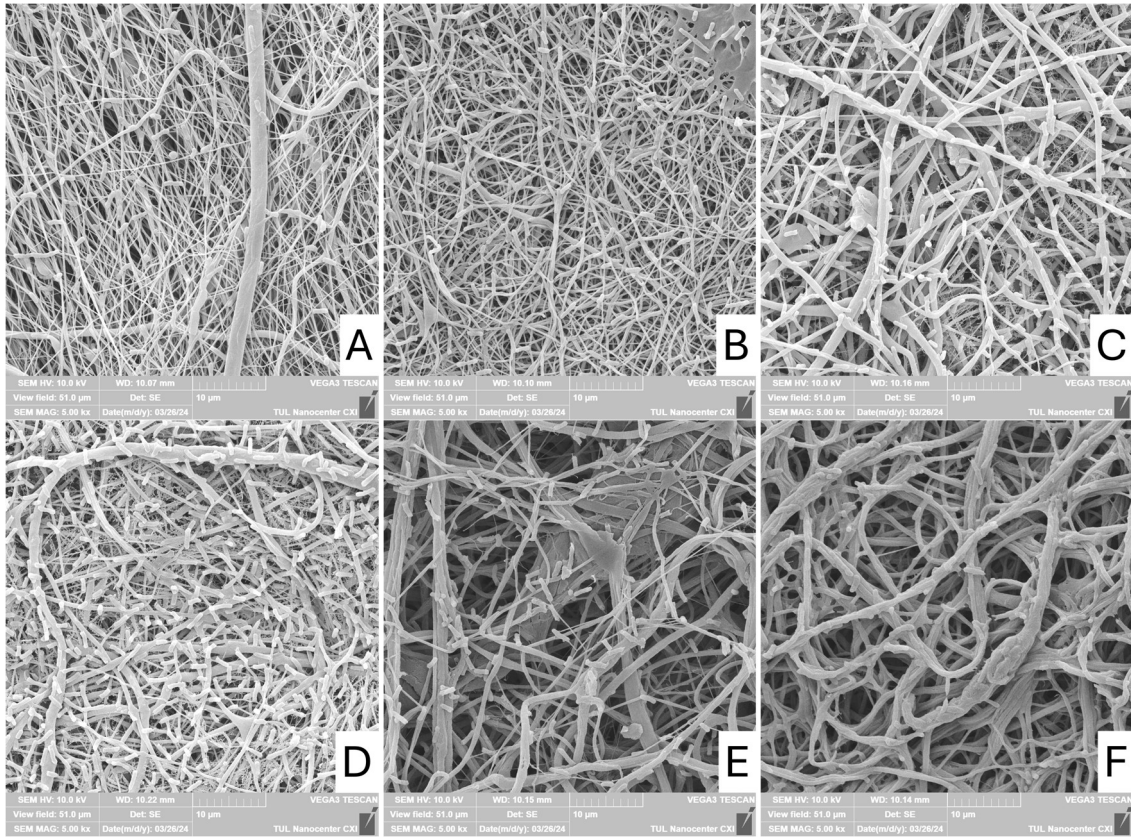


Obr. 6.18: SEM snímky vzorků.

SG – doba inkubace 6 h. A – CHIT 0 %, B – CHIT 2,5 %, C – CHIT 5 %, D – CHIT 10 %, E – CHIT 20 %, F – CHIT 30 %.

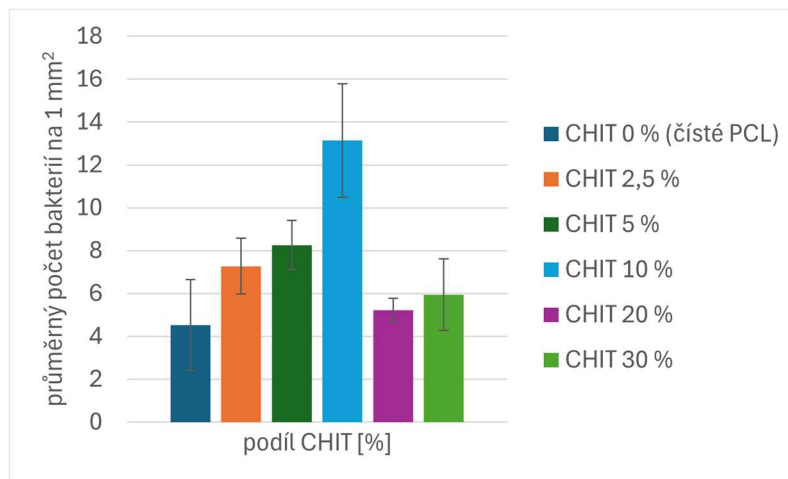


Obr. 6.19: Graf průměrného počtu bakterií SG na 1 mm² po 6 h inkubace.

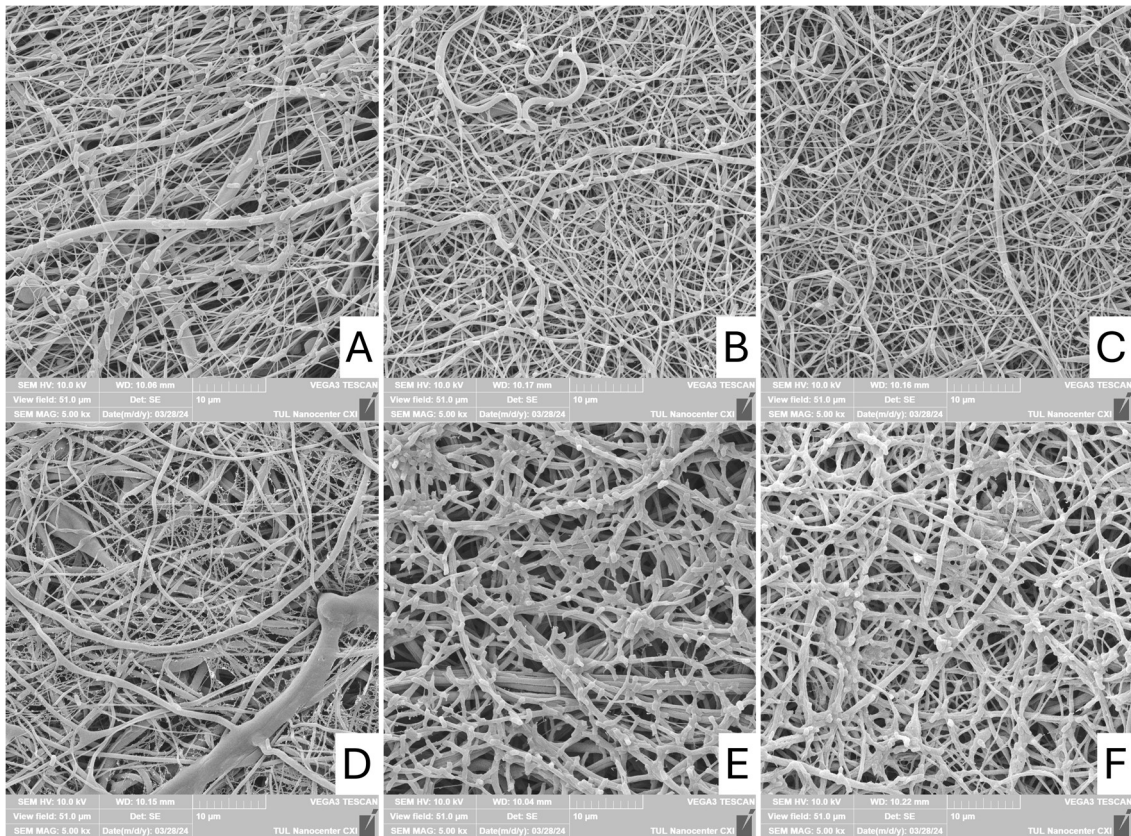


Obr. 6.20: SEM snímky vzorků.

EC – doba inkubace 2 h. A – CHIT 0 %, B – CHIT 2,5 %, C – CHIT 5 %, D – CHIT 10 %, E – CHIT 20 %, F – CHIT 30 %.

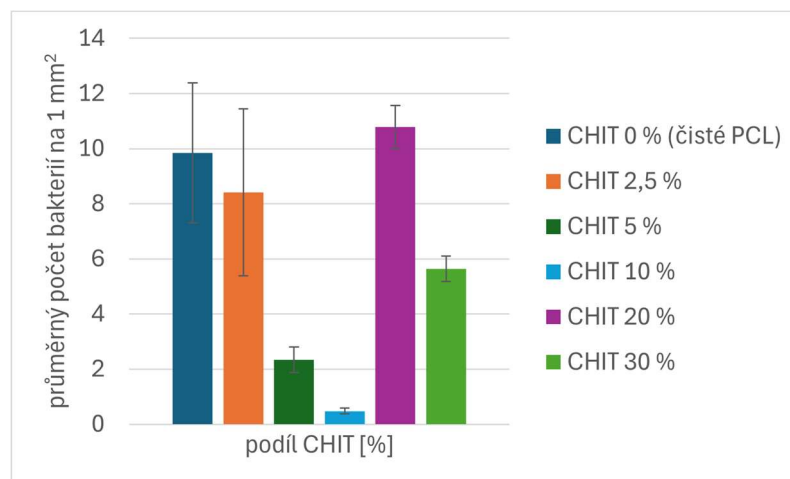


Obr. 6.21: Graf průměrného počtu bakterií EC na 1 mm² po 2 h inkubace.

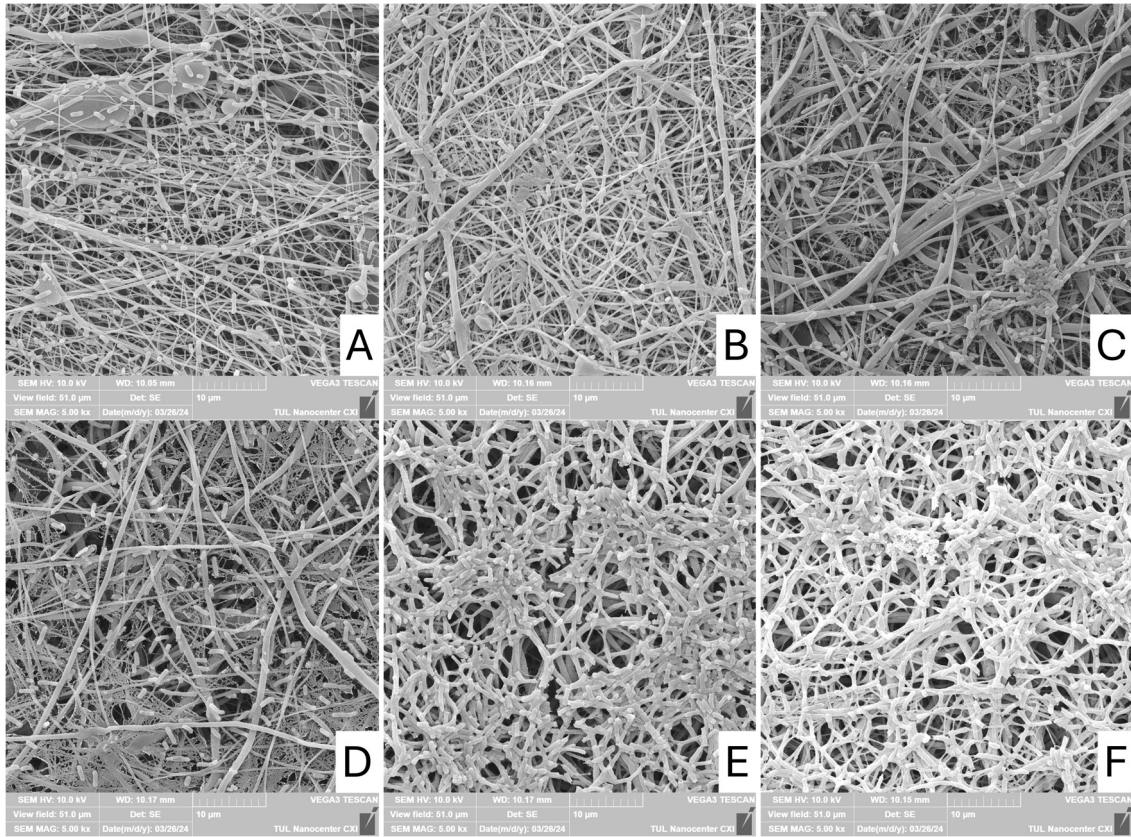


Obr. 6.22: SEM snímky vzorků.

EC – doba inkubace 4 h. A – CHIT 0 %, B – CHIT 2,5 %, C – CHIT 5 %, D – CHIT 10 %, E – CHIT 20 %, F – CHIT 30 %.

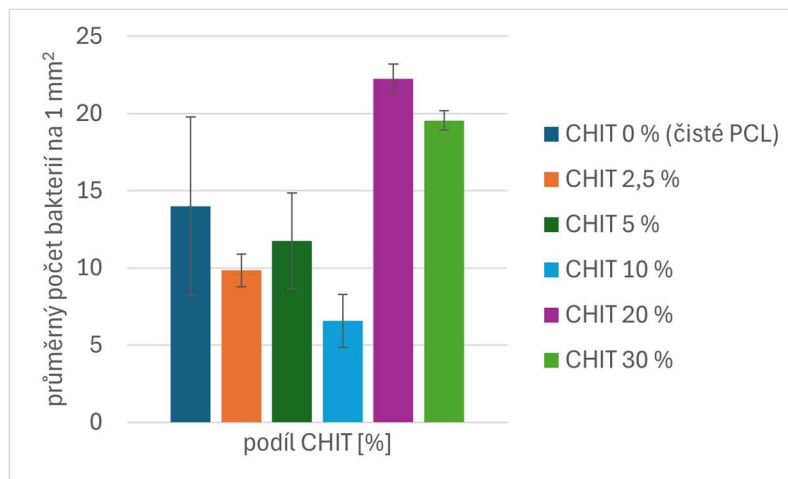


Obr. 6.23: Graf průměrného počtu bakterií EC na 1 mm² po 4 h inkubace.

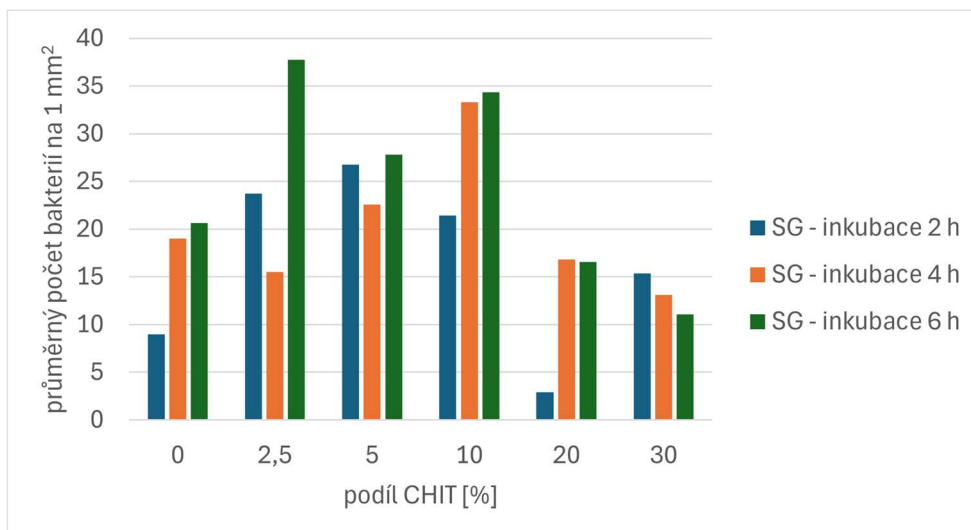


Obr. 6.24: SEM snímky vzorků.

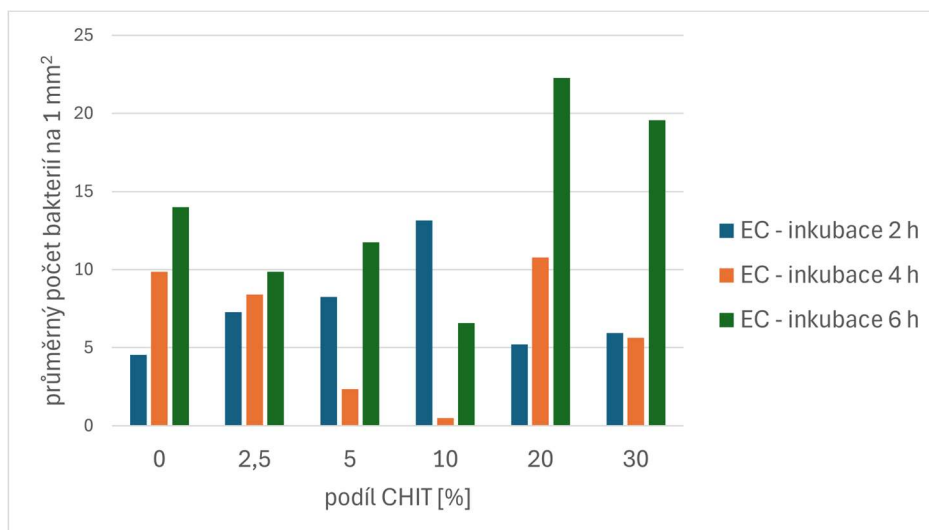
EC – doba inkubace 6 h. A – CHIT 0 %, B – CHIT 2,5 %, C – CHIT 5 %, D – CHIT 10 %, E – CHIT 20 %, F – CHIT 30 %.



Obr. 6.25: Graf průměrného počtu bakterií EC na 1 mm² po 6 h inkubace.



Obr. 6.26: Graf porovnání průměrného počtu bakterií SG na 1 mm² ve všech inkubačních časech.



Obr. 6.27: Graf porovnání průměrného počtu bakterií EC na 1 mm² ve všech inkubačních časech.

Diskuse výsledků

Grafická zobrazení souhrnných výsledků průměrného počtu bakterií na plochu na nanovlákných vzorcích jsou na Obr. 6.26 a Obr. 6.27.

Snímky z elektronové mikroskopie (SEM) a grafy (umístěny pod snímky) pro konkrétní sérii vzorků jsou na: Obr. 6.14, Obr. 6.16, Obr. 6.18, Obr. 6.20, Obr. 6.22, Obr. 6.24.

U bakterie SG byl ve všech časových bodech zaznamenán rostoucí trend počtu adherovaných bakterií až do koncentrace 10 % chitosanu, následně u vyšších koncentrací počet klesal. Počet adherovaných bakterií se významně nelišil u jednotlivých vzorků v různých časových bodech, protože lze předpokládat, že dle výsledků CFU byl bakteriální růst inhibován. Výjimku tvoří vzorek 2,5 % chitosanu u kterého došlo po 6 hodinách k významnému nárůstu adherovaných bakterií, tento vzorek neprokázal inhibici bakterie SG ani u metody CFU. Viabilita adherovaných bakterií bohužel nemohla být prokázána pomocí fluorescenčního barvení živých a mrtvých buněk, které by prokázalo, zda adherované bakterie jsou viabilní.

U bakterie EC nebyl pozorován žádný trend. U vzorků s 20 % a 30 % chitosanu po 6 hodinách expozice došlo k významnému nárůstu adherovaných bakterií. Dá se předpokládat, že je to způsobeno rostoucím počtem bakterií v suspenzi, protože ani metoda CFU neprokázala antibakteriální účinek chitosanu vůči bakterii *E. coli*. Do výsledků také mohla vstoupit přítomnost proteinů v médiu. Z tohoto důvodu jsme suspenzi stočily před zahájením experimentu, aby neobsahovala zbytky TSB. Vzhledem k minimálnímu účinku chitosanu na EC lze předpokládat nejen nárůst počtu bakterií v suspenzi po 6 hodinách, ale také přítomnost metabolických produktů, které mohly interagovat s povrchem nanovláken. Lze předpokládat, že tato interakce by vzrůstala s rostoucím nábojem, a tedy i podílem chitosanu v nanovlákněch. Takto je možné vysvětlit nárůst počtu bakterií EC na povrchu nanovláken s podílem 20 % CHIT a vyšším po 6 hodinách expozice. Je to však domněnka, kterou by bylo vhodné potvrdit další analýzou.

6.3 Celkové shrnutí výsledků a diskuse

Dosažené výsledky částečně potvrdily data dostupná v literatuře (např. [4]). Byl prokázán významný vliv typu bakterie s ohledem na složení buněčné stěny. Jako citlivější na přítomnost chitosanu se prokázal být *S. gallinarum* (SG). Jedná se grampozitivního koka, u kterého došlo k významnému snížení počtu formovaných kolonií již po 2 hodinách expozice u nanovláken s obsahem 5 % chitosanu a vyšším. Podíl chitosanu 20 % ve směsných nanovlákních PCL/CHIT byl dostatečný pro snížení počtu bakterií SG o 5 řádů (hodnoceno metodou CFU). U gramnegativní bakterie *E. coli* (EC) žádné redukční účinky nebyly pozorovány. Použité modelové bakterie se liší složením bakteriální stěny, což významně ovlivnilo jejich reakci na podíl chitosanu v nanovlákních. Díky dosaženým výsledkům byly potvrzeny výsledky studie [45], která udávala krajní mez, kdy se začal projevovat antibakteriální účinek vůči SG již u podílu 5 % chitosanu. Tento poznatek má význam z hlediska zpracovatelnosti nanovláken a jejich případné ceny.

Bakteriální adheze na nanovlákná se také lišila dle typu bakterií. U bakterie SG klesal počet adherovaných bakterií od vzorků s podílem 20 % CHIT a k nárůstu nedocházelo ani po 6 hodinách inkubace. Toto podporuje výsledky metody CFU a předpoklad, že u bakterie SG v přítomnosti více než 5 % CHIT nedochází k dělení. U EC nebyl stejně jako u metody CFU pozorován významný vliv podílu chitosanu na antibakteriální účinek nanovláken. Byl zaznamenán rozdíl ve velikostech adherovaných bakterií u obou kmenů v závislosti na podílu chitosanu. U bakterie SG se průměrná velikost adherovaných bakterií s podílem chitosanu zvyšovala. Stejný trend byl pozorován u bakterie EC až do koncentrace 20 % chitosanu. Ve všech časových bodech došlo ke zmenšení velikosti EC při podílu 30 % chitosanu v nanovlákních.

Je také důležité zmínit, že každá metoda použitá v této práci vyžadovala optimalizaci, aby poskytla měřitelné výsledky. Tak je možné vysvětlit i rozdílné výsledky metody CFU a bakteriální adheze. Pro bakteriální adhezi byla použita vstupní koncentrace bakteriální suspenze 7×10^7 (SG) a 10^8 (EC), která je mnohonásobně vyšší než koncentrace u CFU (10^3 – 10^5). Při použití nižších koncentrací bakterií nedocházelo k bakteriální adhezi u EC. Žádná metoda nemohla být použita jako univerzální, protože by nebyla vyhovující pro všechny provedené analýzy. Jednotlivé metody se přizpůsobovaly daným potřebám a možnostem.

Závěr

Tato bakalářská práce se zabývala vlivem podílu CHIT na antibakteriálních účincích nanovláken. Tento vliv byl pozorován na dvou modelových bakteriálních kmenech. Teoretická část práce shrnuje problematiku chitosanových nanovláken, antibakteriálních účinků CHIT nanovláken, ale také na rozdíl ve stavbě grampozitivních a gramnegativních bakterií.

Cílem praktické (experimentální) části bylo ověřit vliv podílu chitosanu ve směsných nanovlákních PCL/CHIT na jejich antibakteriální účinky několika metodami. Součástí experimentální části bylo i hledání optimálních metod testování. Původně zamýšlenou metodou hodnocení viability adherovaných bakterií pomocí fluorescenčního barvení LIVE/DEAD nebylo možné vzhledem vysoké sorpci barviv nanovláknů. Z tohoto důvodu byla využita analýza elektronovou mikroskopií (SEM). Ta sice neumožnila hodnocení viability bakterií, ale bylo možné hodnotit jejich rozměr.

Prováděny byly testy inhibice růstu metodou CFU, dále hodnocení bakteriální adheze a velikosti adherovaných bakterií. Byly pozorovány rozdílné odezvy bakterií na PCL/CHIT nanovlákních v důsledku rozdílného složení. Jako další významný parametr se ukázal typ bakterie. U grampozitivního koku *Staphylococcus gallinarum* byla pozorována výrazná citlivost na přítomnosti již malých dávek chitosanu (5 %). Tento výsledek potvrzuje některá již publikovaná data. Citlivost u gramnegativní tyčinky *Escherichia coli* nebyla potvrzena ani u dávky 30 % CHIT v nanovlákních. Nezbytný obsah chitosanu pro dosažení antibakteriální aktivity má význam z několika důvodů a je nutné ho dále zkoumat i na jiných bakteriálních kmenech, aby tyto poznatky byly ověřeny.

Tato bakalářská práce nabízí spoustu možností pro další výzkum. Takovýmto podnětem je například prozkoumání antibakteriálního účinku na dalších grampozitivních a gramnegativních bakteriích, aby byl potvrzen či vyvrácen vliv typu bakteriální stěny na antibakteriální účinek chitosanu. Může být také zkoumán vliv stáří nanovláken s obsahem CHIT na jejich antibakteriální účinky. Pro tuto práci byly připraveny čerstvé nanovlákněné vrstvy a je otázkou, zda dochází vlivem času k chemickým reakcím, které by ovlivňovaly antibakteriální účinky.

Použitá literatura

- [1] NEGM, Nabel A., Hassan H. H. HEFNI, Ali A. A. ABD-ELAAL, Emad A. BADR a Maram T. H. ABOU KANA. Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **152**, 681–702. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.196
- [2] YILMAZ ATAY, Hüsnügül. Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems. *Functional Chitosan* [online]. 2020, 457–489. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-15-0263-7_15
- [3] CUI, Congjing, Shibin SUN, Shaohua WU, Shaojuan CHEN, Jianwei MA a Fang ZHOU. Electrospun chitosan nanofibers for wound healing application. *Engineered Regeneration* [online]. 2021, **2**, 82–90. ISSN 2666-1381. Dostupné z: doi:10.1016/j.engreg.2021.08.001
- [4] WANG, Wenjie, Changhu XUE a Xiangzhao MAO. Chitosan: Structural modification, biological activity and application. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **164**, 4532–4546. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.09.042
- [5] GUARNIERI, Anna, Micaela TRIUNFO, Carmen SCIEUZO, Dolores IANNICIELLO, Elena TAFI, Thomas HAHN, Susanne ZIBEK, Rosanna SALVIA, Angela DE BONIS a Patrizia FALABELLA. Antimicrobial properties of chitosan from different developmental stages of the bioconverter insect *Hermetia illucens*. *Scientific Reports* [online]. 2022, **12**(1), 8084. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-022-12150-3
- [6] BAKSHI, Prasanna S., D. SELVAKUMAR, K. KADIRVELU a N. S. KUMAR. Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **150**, 1072–1083. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113
- [7] LI, Jianhui a Shaoling ZHUANG. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. *European Polymer Journal* [online]. 2020, **138**, 109984. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2020.109984
- [8] MORIN-CRINI, Nadia, Eric LICHTFOUSE, Giangiacomo TORRI a Grégorio CRINI. Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. *Environmental Chemistry Letters* [online]. 2019, **17**(4), 1667–1692. ISSN 1610-3661. Dostupné z: doi:10.1007/s10311-019-00904-x
- [9] XU, Yuanqing, Z WANG, Z. QIN, Sumei YAN a Binlin SHI. Effects of chitosan addition on growth performance, diarrhoea, anti-oxidative function and serum immune parameters of weaned piglets. *South African Journal of Animal Science* [online]. 2018, **48**, 142–150. Dostupné z: doi:10.4314/sajas.v48i1.16
- [10] HUANG, Haohai, Dan LIAO, Ying ZOU a Honggang CHI. The effects of chitosan supplementation on body weight and body composition: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical Reviews in Food Science and*

Nutrition [online]. 2020, **60**(11), 1815–1825. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2019.1602822

[11] XIA, Yidan, Dongxu WANG, Da LIU, Jiayang SU, Ye JIN, Duo WANG, Beibei HAN, Ziping JIANG a Bin LIU. Applications of Chitosan and its Derivatives in Skin and Soft Tissue Diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2022, **10**, 894667. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2022.894667

[12] TRIVEDI, P. C., Sonali PANDEY a Seema BHADAURIA. *Text Book of Microbiology*. B.m.: Pointer Publishers, 2010. ISBN 978-81-7910-306-7.

[13] WILLEY, Joanne M., Linda M. SHERWOOD a Christopher J. WOOLVERTON. *Prescott's Microbiology*. B.m.: McGraw-Hill Education, 2019. ISBN 978-1-260-57002-1.

[14] HAMDAN, Nazirah, Alisa YAMIN, Shafida Abd HAMID, Wan Khartini Wan Abdul KHODIR a Vincenzo GUARINO. Functionalized Antimicrobial Nanofibers: Design Criteria and Recent Advances. *Journal of Functional Biomaterials* [online]. 2021, **12**(4), 59. ISSN 2079-4983. Dostupné z: doi:10.3390/jfb12040059

[15] DAVID LUKÁŠ a KOL. *Nanovlákná - Teorie, technologie a použití*. první. Praha: Academia, nedatováno. ISBN 978-80-200-3400-7.

[16] CHAMANEHPOUR, Elham, Sandeep THOUTI, Horst-Günter RUBAHN, Alireza DOLATSHAHI-PIROUZ a Yogendra MISHRA. Smart Nanofibers: Synthesis, Properties, and Scopes in Future Advanced Technologies. *Advanced Materials Technologies* [online]. 2023, **9**. Dostupné z: doi:10.1002/admt.202301392

[17] GUL, Aysegul, Izabela GALLUS, Akshat TEGGINAMATH, Jiri MARYSKA a Fatma YALCINKAYA. Electrospun Antibacterial Nanomaterials for Wound Dressings Applications. *Membranes* [online]. 2021, **11**(12), 908. ISSN 2077-0375. Dostupné z: doi:10.3390/membranes11120908

[18] YALCINKAYA, Fatma. Preparation of various nanofiber layers using wire electrospinning system. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2019, **12**(8), 5162–5172. ISSN 1878-5352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2016.12.012

[19] *1-s2.0-S1878535216302490-gr1.jpg (267×265)* [online]. [vid. 2024-03-26]. Dostupné z: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1878535216302490-gr1.jpg>

[20] GHAJARIEH, A., S. HABIBI a A. TALEBIAN. Biomedical Applications of Nanofibers. *Russian Journal of Applied Chemistry* [online]. 2021, **94**(7), 847–872. ISSN 1070-4272. Dostupné z: doi:10.1134/S1070427221070016

[21] ABRIGO, Martina, Peter KINGSHOTT a Sally L. MCARTHUR. Electrospun polystyrene fiber diameter influencing bacterial attachment, proliferation, and growth. *ACS applied materials & interfaces* [online]. 2015, **7**(14), 7644–7652. ISSN 1944-8252. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.5b00453

[22] HEIDARI, Mina, Hajir BAHRAMI a Marziyeh RANJBAR-MOHAMMADI. Fabrication, optimization and characterization of electrospun poly(caprolactone)/gelatin/graphene nanofibrous mats. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* [online]. 2017, **78**, 218–229. ISSN 1873-0191. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.04.095

- [23] HEIDARI, Mina, S. Hajir BAHRAMI, M. RANJBAR-MOHAMMADI a P. B. MILAN. Smart electrospun nanofibers containing PCL/gelatin/graphene oxide for application in nerve tissue engineering. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* [online]. 2019, **103**, 109768. ISSN 1873-0191. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2019.109768
- [24] JALAJA, K., V. S. SREEHARI, P. R. Anil KUMAR a R. James NIRMALA. Graphene oxide decorated electrospun gelatin nanofibers: Fabrication, properties and applications. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* [online]. 2016, **64**, 11–19. ISSN 1873-0191. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2016.03.036
- [25] GUARINO, Vincenzo, Iriczalli CRUZ-MAYA, Rosaria ALTOBELLI, W. K. ABDUL KHODIR, Luigi AMBROSIO, Marco A. ALVAREZ PÈREZ a Argelia Almaguer FLORES. Electrospun polycaprolactone nanofibres decorated by drug loaded chitosan nano-reservoirs for antibacterial treatments. *Nanotechnology* [online]. 2017, **28**(50), 505103. ISSN 1361-6528. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6528/aa9542
- [26] RAVIKUMAR, Rramaswamy, Mani GANESH, Udumansha UBAIDULLA, Eun YOUNG CHOI a Hyun TAE JANG. Preparation, characterization, and in vitro diffusion study of nonwoven electrospun nanofiber of curcumin-loaded cellulose acetate phthalate polymer. *Saudi pharmaceutical journal: SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society* [online]. 2017, **25**(6), 921–926. ISSN 1319-0164. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsps.2017.02.004
- [27] BHATTARAI, Rajan Sharma, Rinda Devi BACHU, Sai H. S. BODDU a Sarit BHADURI. Biomedical Applications of Electrospun Nanofibers: Drug and Nanoparticle Delivery. *Pharmaceutics* [online]. 2018, **11**(1), 5. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics11010005
- [28] LIN, Lin, Yulei GU a Haiying CUI. Moringa oil/chitosan nanoparticles embedded gelatin nanofibers for food packaging against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on cheese. *Food Packaging and Shelf Life* [online]. 2019, **19**, 86–93. ISSN 2214-2894. Dostupné z: doi:10.1016/j.fpsl.2018.12.005
- [29] BOSE, Rajendran, Yoshie ARAI, Jongchan AHN, Hansoo PARK a Soo-Hong LEE. Influence of cationic lipid concentration on properties of lipid–polymer hybrid nanospheres for gene delivery. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2015, **2015:10**, 5367—5382. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S87120
- [30] PERSANO, Luana, Andrea CAMPOSEO, Cagri TEKMEEN a Dario PISIGNANO. Industrial Upscaling of Electrospinning and Applications of Polymer Nanofibers: A Review. *Macromolecular Materials and Engineering* [online]. 2013, **298**(5), 504–520. ISSN 1439-2054. Dostupné z: doi:10.1002/mame.201200290
- [31] KIM, Dong-Ha, Ji-Soo JANG, Won-Tae KOO, Seon-Jin CHOI, Sang-Joon KIM a Il-Doo KIM. Hierarchically interconnected porosity control of catalyst-loaded WO₃ nanofiber scaffold: Superior acetone sensing layers for exhaled breath analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2018, **259**, 616–625. ISSN 0925-4005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2017.12.051
- [32] FENG, Guoping, Yifan CHENG, Shu-Yi WANG, Diana A. BORCA-TASCIUC, Randy W. WOROBO a Carmen I. MORARU. Bacterial attachment and biofilm formation on surfaces are reduced by small-diameter nanoscale pores: how small is small

enough? *NPJ biofilms and microbiomes* [online]. 2015, **1**, 15022. ISSN 2055-5008. Dostupné z: doi:10.1038/npjbiofilms.2015.22

[33] CHEN, Shixuan, Alec MCCARTHY, Johnson V. JOHN, Yajuan SU a Jingwei XIE. Converting 2D Nanofiber Membranes to 3D Hierarchical Assemblies with Structural and Compositional Gradients Regulates Cell Behavior. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)* [online]. 2020, **32**(43), e2003754. ISSN 1521-4095. Dostupné z: doi:10.1002/adma.202003754

[34] DOS SANTOS, Danilo M., Daniel S. CORREA, Eliton S. MEDEIROS, Juliano E. OLIVEIRA a Luiz H. C. MATTOSO. Advances in Functional Polymer Nanofibers: From Spinning Fabrication Techniques to Recent Biomedical Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2020, **12**(41), 45673–45701. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.0c12410

[35] UNNITHAN, Afeesh R., Nasser A. M. BARAKAT, P. B. TIRUPATHI PICHIAH, Gopalsamy GNANASEKARAN, R. NIRMALA, Youn-Soo CHA, Che-Hun JUNG, Mohamed EL-NEWEHY a Hak Yong KIM. Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun polyurethane–dextran nanofiber mats containing ciprofloxacin HCl. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2012, **90**(4), 1786–1793. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2012.07.071

[36] GAO, Yuan, Yen TRUONG, Yonggang ZHU a Ilias KYRATZIS. Electrospun Antibacterial Nanofibers: Production, Activity, and In Vivo Applications. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2014, **131**. Dostupné z: doi:10.1002/app.40797

[37] HONG, Yi, Kazuro FUJIMOTO, Ryotaro HASHIZUME, Jianjun GUAN, John J. STANKUS, Kimimasa TOBITA a William R. WAGNER. Generating Elastic, Biodegradable Polyurethane/Poly(lactide-co-glycolide) Fibrous Sheets with Controlled Antibiotic Release via Two-Stream Electrospinning. *Biomacromolecules* [online]. 2008, **9**(4), 1200–1207. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm701201w

[38] KENAWY, El-Refaie, John M. LAYMAN, Jessica R. WATKINS, Gary L. BOWLIN, Jamil A. MATTHEWS, David G. SIMPSON a Gary E. WNEK. Electrospinning of poly(ethylene-co-vinyl alcohol) fibers. *Biomaterials* [online]. 2003, **24**(6), 907–913. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(02)00422-2

[39] KIM, Kwangsok, Yen K. LUU, Charles CHANG, Dufei FANG, Benjamin S. HSIAO, Benjamin CHU a Michael HADJIARGYROU. Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *Journal of Controlled Release* [online]. 2004, **98**(1), 47–56. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2004.04.009

[40] HADIPOUR-GOUDARZI, Elmira, Majid MONTAZER, Masoud LATIFI a Ali Akbar Ghare AGHAJI. Electrospinning of chitosan/sericin/PVA nanofibers incorporated with in situ synthesis of nano silver. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2014, **113**, 231–239. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2014.06.082

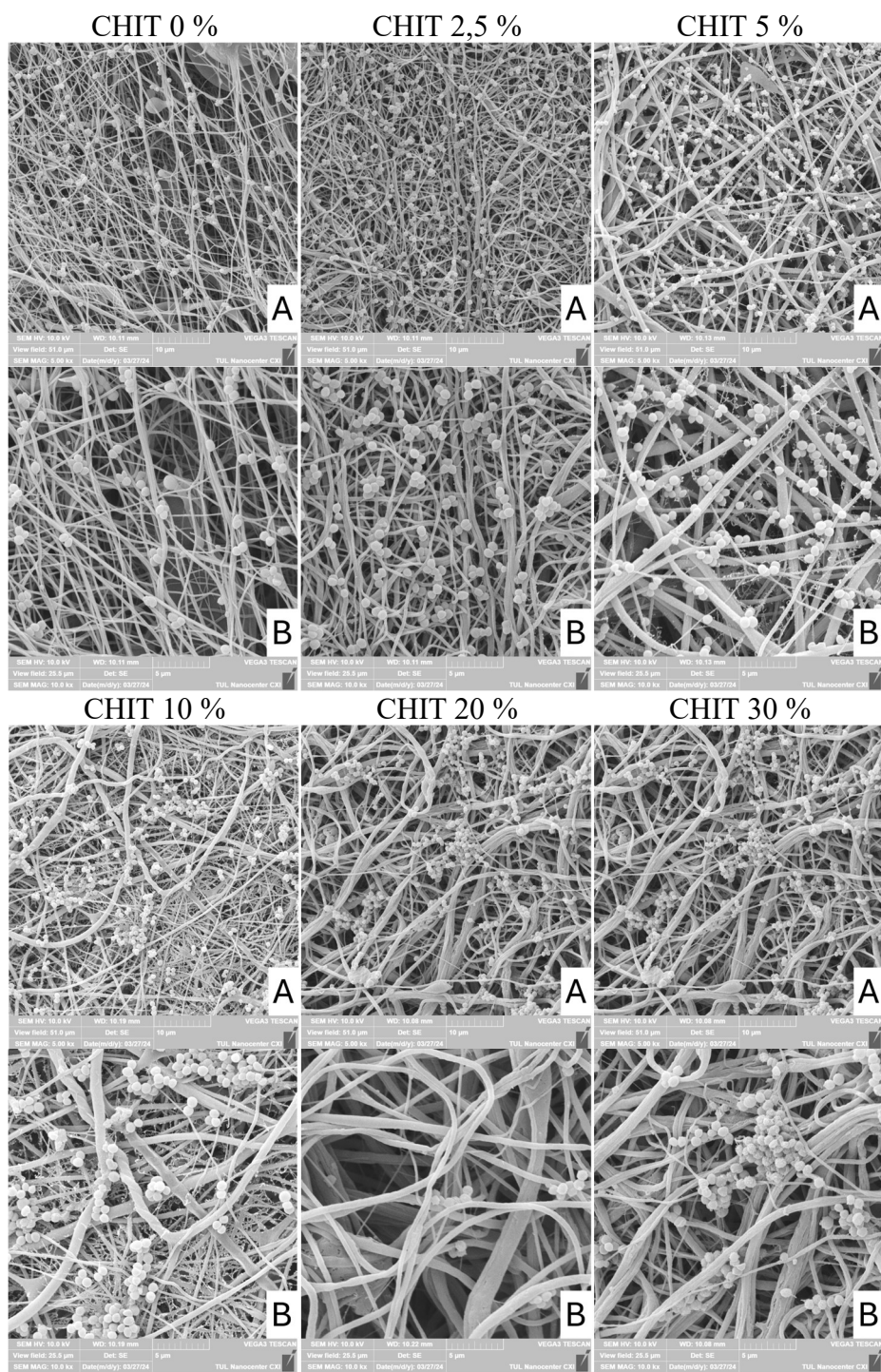
[41] NGUYEN, Thuy Thi Thu, Ok Hee CHUNG a Jun Seo PARK. Coaxial electrospun poly(lactic acid)/chitosan (core/shell) composite nanofibers and their antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, **86**(4), 1799–1806. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2011.07.014

- [42] NISTA, Silvia Vaz Guerra, Jefferson BETTINI a Lucia Helena Innocentini MEI. Coaxial nanofibers of chitosan–alginate–PEO polycomplex obtained by electrospinning. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2015, **127**, 222–228. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2015.03.063
- [43] PAKRAVAN, Mehdi, Marie-Claude HEUZEY a Abdellah AJJI. Core–Shell Structured PEO-Chitosan Nanofibers by Coaxial Electrospinning. *Biomacromolecules* [online]. 2012, **13**(2), 412–421. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm201444v
- [44] SARHAN, Wessam A. a Hassan M. E. AZZAZY. High concentration honey chitosan electrospun nanofibers: Biocompatibility and antibacterial effects. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2015, **122**, 135–143. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2014.12.051
- [45] SCHIFFMAN, Jessica D. a Caroline L. SCHAUER. Cross-Linking Chitosan Nanofibers. *Biomacromolecules* [online]. 2007, **8**(2), 594–601. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm060804s
- [46] BHATTARAI, Narayan, Jonathan GUNN a Miqin ZHANG. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2010, **62**(1), Chitosan-Based Formulations of Drugs, Imaging Agents and Biotherapeutics, 83–99. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2009.07.019
- [47] CESAR, Spencer a Kerwyn Casey HUANG. Thinking big: the tunability of bacterial cell size. *FEMS microbiology reviews* [online]. 2017, **41**(5), 672–678. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1093/femsre/fux026

Přílohy

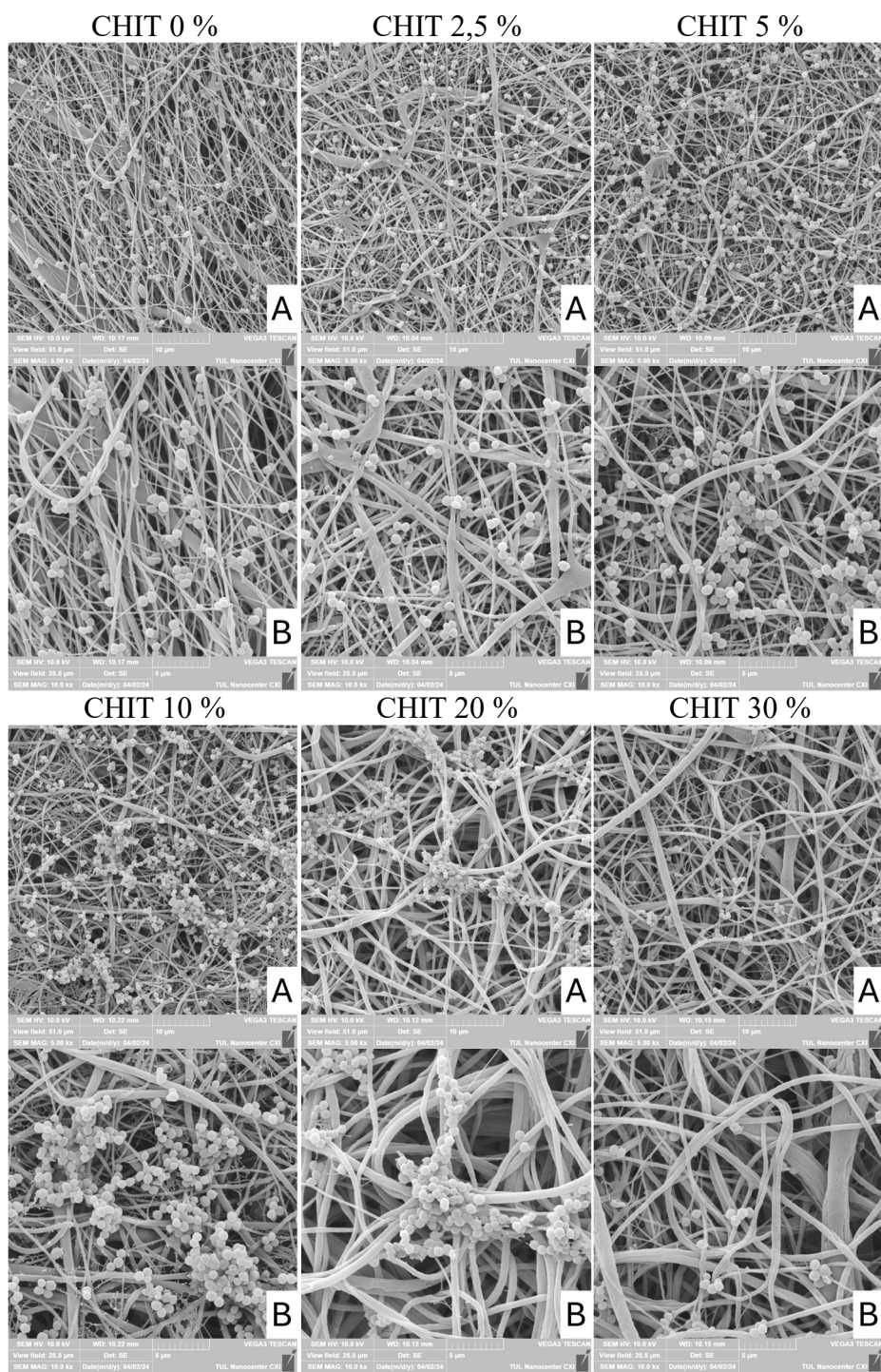
Příloha A: snímky ze SEM

Doplňující snímky k analýze adheze (počty a velikosti bakterií)

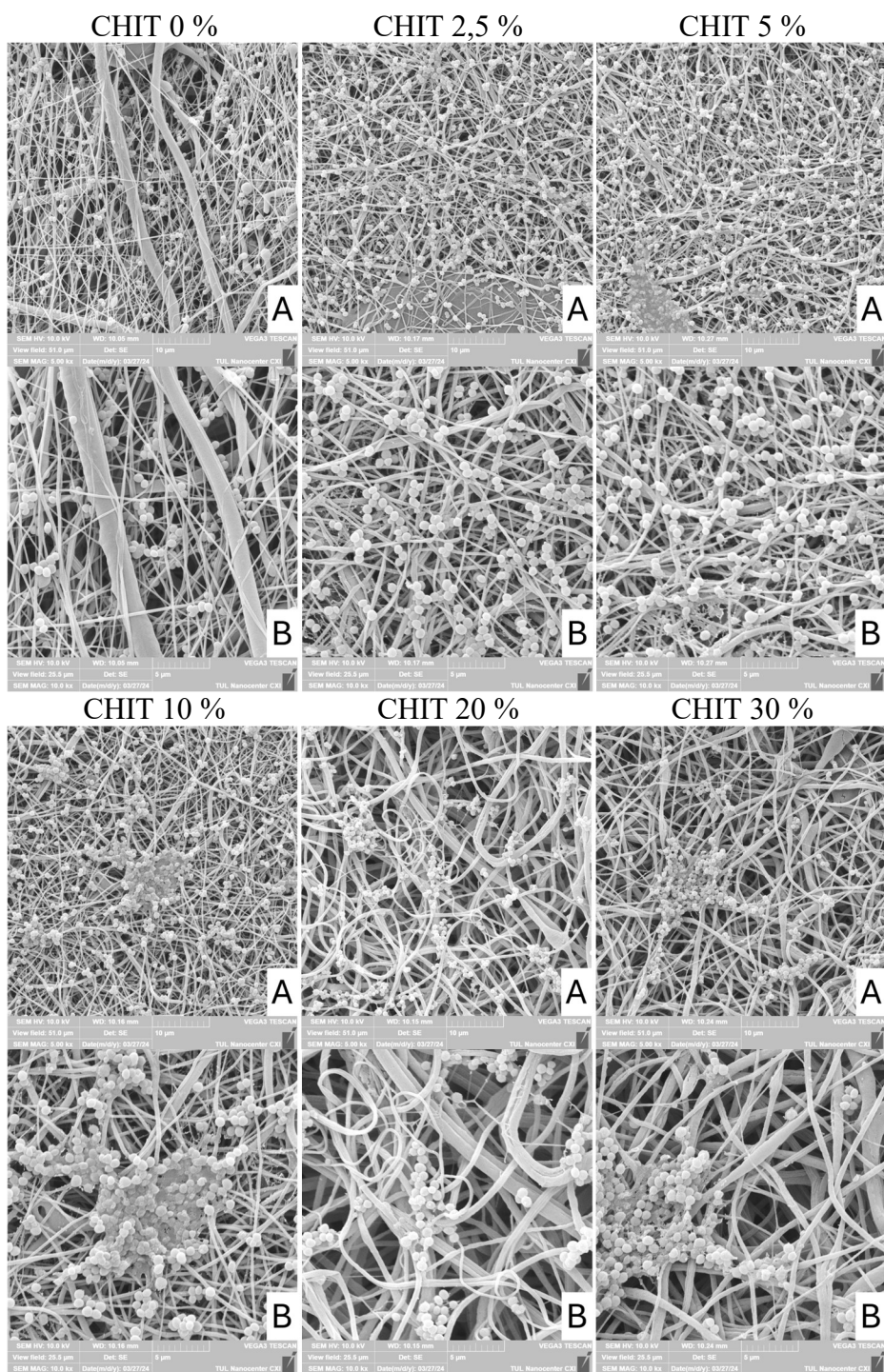


Obrázek A 1: SEM snímky vzorků.

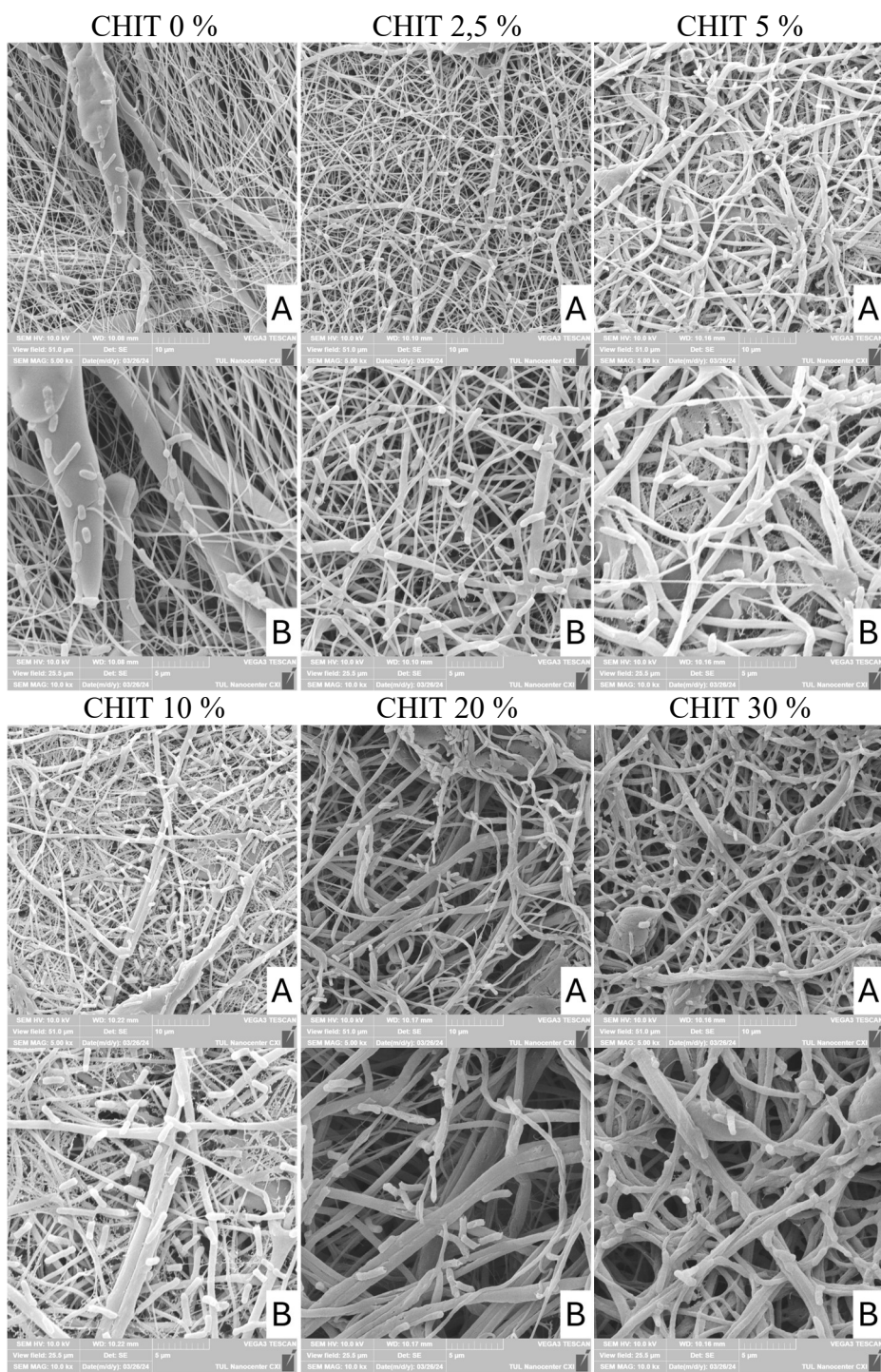
SG – doba inkubace 2 h. A – SEM snímek se zvětšením 5kx na druhé pozici, B – SEM snímek se zvětšením 10kx na druhé pozici.



Obrázek A 2: SEM snímky vzorků.
 SG – doba inkubace 4 h. A – SEM snímek se zvětšením 5kx na druhé pozici, B – SEM snímek se zvětšením 10kx na druhé pozici.

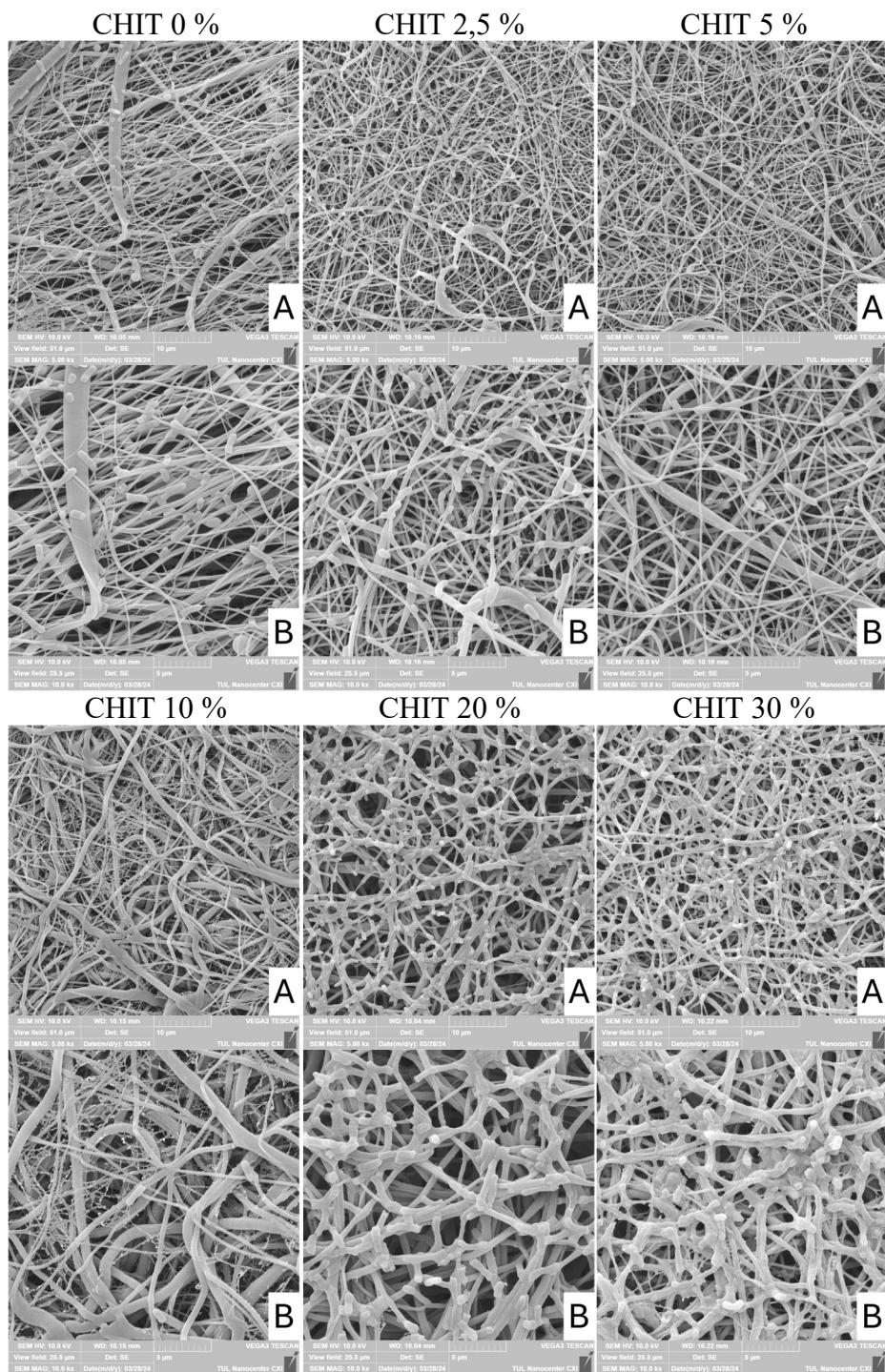


Obrázek A 3: SEM snímky vzorků.
 SG – doba inkubace 6 h. A – SEM snímek se zvětšením 5kx na druhé pozici, B – SEM snímek se zvětšením 10kx na druhé pozici.



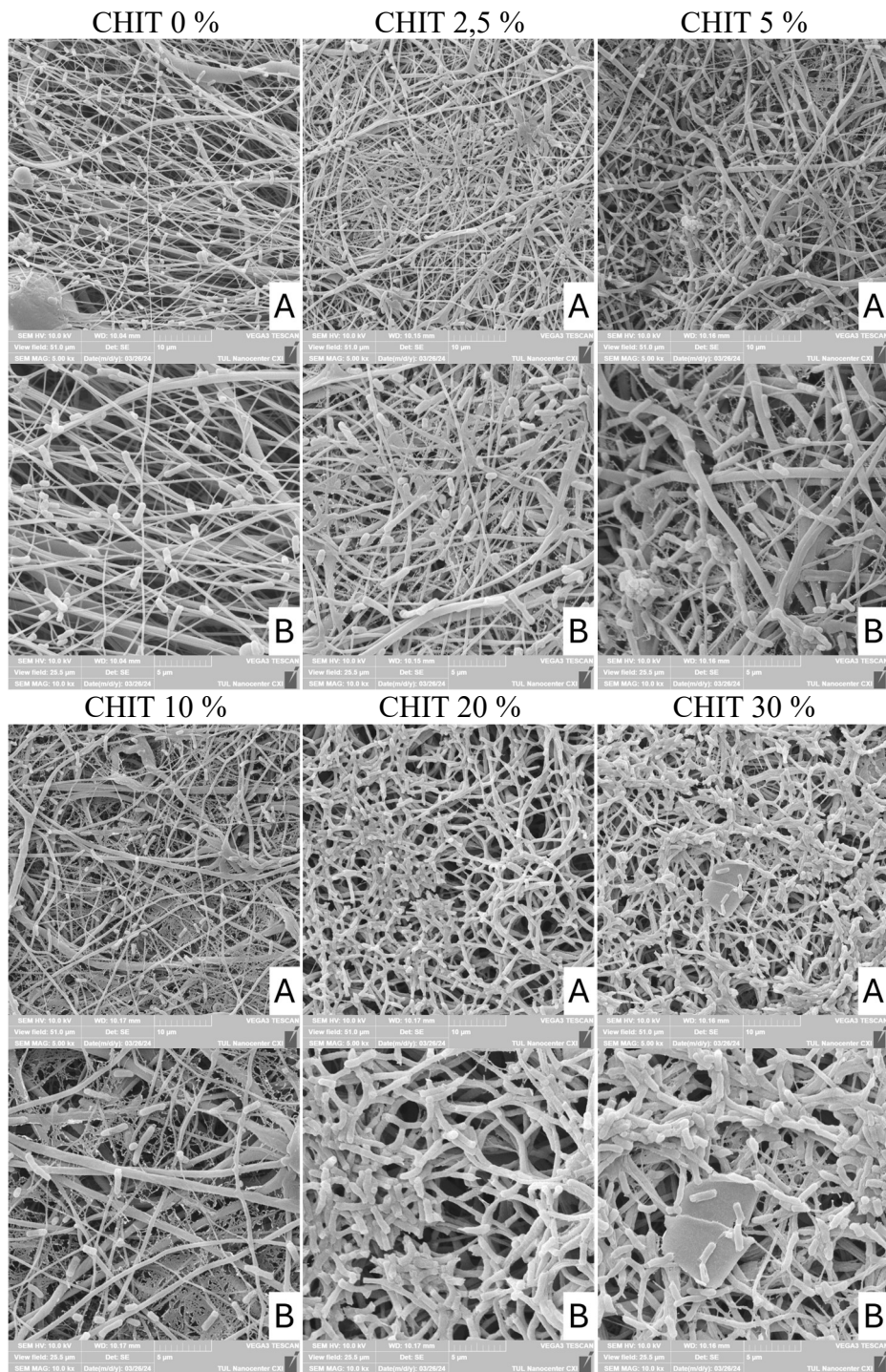
Obrázek A 4: SEM snímky vzorků.

EC – doba inkubace 2 h. A – SEM snímek se zvětšením 5kx na druhé pozici, B – SEM snímek se zvětšením 10kx na druhé pozici.



Obrázek A 5: SEM snímky vzorků.

EC – doba inkubace 4 h. A – SEM snímek se zvětšením 5kx na druhé pozici, B – SEM snímek se zvětšením 10kx na druhé pozici.



Obrázek A 6: SEM snímky vzorků.

EC – doba inkubace 6 h. A – SEM snímek se zvětšením 5kx na druhé pozici, B – SEM snímek se zvětšením 10kx na druhé pozici.