

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie

Povrchová úprava titanu nanočásticemi stříbra pomocí chemické redukce

Diplomová práce

Autor:	Bc. Tomáš Škurek
Studijní obor:	Materiálová chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

Olomouc 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že tuto diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Aleše Panáčka, Ph.D. Veškeré zdroje, které byly při psaní této práce použity, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Touto cestou děkuji vedoucímu práce doc. RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D. za odborné rady, cenné připomínky a konzultace. Dále bych rád poděkoval Ing. Petře Bazgerové z RCPTM za snímky vzorků, pořízené pomocí skenovacího elektronového mikroskopu, Mgr. Renatě Večeřové z Ústavu mikrobiologie LF UP za provedení testů antibakteriální aktivity a Mgr. Petru Suchomelovi za rady k sonochemické redukci.

Bibliografické údaje:

Jméno a příjmení autora	Bc. Tomáš Škurek
Název práce	Povrchová úprava titanu nanočásticemi stříbra pomocí chemické redukce
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce	Doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	<p>Tato diplomová práce se v teoretické části věnuje popisu koloidních soustav, přípravě nanočástic stříbra a jejich následné aplikaci na povrch titanové slitiny. Dále popisuje problematiku pooperačních komplikací při implantování titanových kloubních náhrad a její možná řešení. Předmětem experimentální části je příprava nanočástic stříbra a jejich aplikace na titanové disky pomocí metody přímé redukce, sonochemické redukce a metody layer by layer. Vrstvy nanočástic stříbra byly následně charakterizovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu a atomové absorpční spektrometrie, a byla zkoumána jejich antibakteriální aktivita.</p>
Klíčová slova	nanočástice stříbra, titanová slitina, chemická redukce, kloubní náhrady
Počet stran	82
Jazyk	čeština

Bibliographical identification:

Author's name and surname	Bc. Tomáš Škurek
Title	Surface modification of titanium by silver nanoparticles using chemical reduction
Type of thesis	Master
Department	Department of Physical Chemistry
Supervisor	Doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
Year of presentation	2016
Abstract	In the theoretical part, this MA thesis focuses on colloidal systems, preparation of nanoparticles and their application to titanium alloys. Furthermore, it describes common complications after total joint replacement surgery and identifies possible solutions. The experimental part includes preparation of silver nanoparticles and their application to titanium discs using direct reduction, sonochemical reduction and the layer-by-layer method. The nanoparticles were characterized using scanning electron microscopy and atomic absorption spectrometry, and their antibacterial activity was examined.
Keywords	silver nanoparticles, titanium alloy, chemical reduction, joint replacement
Number of pages	82
Language	Czech

Obsah:

Úvod

Teoretická část

1. Koloidní soustavy	10
1.1. Metody přípravy koloidních soustav	11
1.2. Fyzikálně-chemické vlastnosti koloidních soustav	12
2. Nanomateriály a nanotechnologie	18
2.1. Historie nanomateriálů	18
2.2. Vlastnosti nanomateriálů	21
3. Nanočástice stříbra	23
3.1. Příprava nanočástic stříbra	23
3.1.1. Metody top-down	23
3.1.2. Metody bottom-up	24
3.2. Metody a způsoby přípravy vrstev nanočástic stříbra	26
3.3. Antibakteriální účinky nanočástic stříbra	27
3.4. Využití nanočástic stříbra v povrchové antibakteriální úpravě	31
4. Kloubní náhrady	34
4.1. Stavba kloubů	34
4.2. Artróza kloubů	34
4.3. Kloubní náhrady	35
4.4. Pooperační komplikace	37
5. Titan a jeho využití	39
5.1. Sloučeniny titanu a jejich využití	40
5.2. Biokompatibilita titanu	41
5.3. Titanové slitiny upravené nanočásticemi stříbra	42

Experimentální část

6. Chemikálie	47
7. Přístrojové vybavení	48
8. Příprava nanočástic stříbra a jejich aplikace na povrch titanu	49
8.1. Přímá redukce	49
8.2. Sonochemická redukce	50
8.3. Layer by layer	51
8.4. Stanovení antibakteriální aktivity	51
9. Výsledky a diskuze	53
9.1. Vliv koncentrací reaktantů na vznik vrstev	53
9.2. Vliv čištění a aktivace substrátů na vznik vrstev	57
9.3. Charakterizace připravených vrstev	58
9.4. Antibakteriální aktivita	69
Závěr	72
Summary	74
Seznam použité literatury	76
Seznam obrázků a tabulek	80

Úvod

Nanotechnologie a nanomateriály zažívají v současnosti obrovský rozvoj. Postupně zasahují téměř do všech odvětví průmyslu a lidského života vůbec. Nanotechnologie se objevují nejen v elektrotechnice, letectví nebo textilním průmyslu, ale také v medicíně. Typickým příkladem nanomateriálů užívaných v lékařských aplikacích jsou nanočástice stříbra, které vykazují vysokou antimikrobiální aktivitu. Antibakteriální účinky stříbra jsou známy již od starověku, i když mechanismy jeho působení začaly být odhalovány až ve druhé polovině 20. století. Jednou z možností, jak v medicíně prakticky využít baktericidní a fungicidní účinky stříbra ve formě nanočástic, je antibakteriální úprava povrchů bránící bakteriální kolonizaci. Konkrétním příkladem může být úprava titanových slitin. Titanové slitiny se v medicíně používají především jako materiál pro výrobu zubních implantátů a totálních endoprotéz. Přes veškerou lékařskou péči a snahu zajistit sterilní prostředí před i po operaci, dochází v nezanedbatelném procentu případů ke komplikacím infekčního charakteru. Ani vyspělé technologie a moderní operační postupy nejsou schopny tyto komplikace zcela odstranit. Řešením těchto problémů by mohla být povrchová úprava titanových slitin nanočásticemi stříbra, které by zajišťovaly ochranu před bakteriální kolonizací a tím i před vznikem infekce.

Tato práce si klade za cíl prokázat, že titanová slitina používaná na kloubní implantáty, potažená nanočásticemi stříbra, vykazuje antibakteriální účinky a případné využití této úpravy v praxi by mohlo snížit riziko vzniku pooperačních komplikací. V teoretické části tato diplomová práce popisuje problematiku kloubních náhrad, využití titanu a jeho slitin, a dále pak přípravu nanočástic stříbra a jejich aplikaci v medicíně. Experimentální část se věnuje přípravě nanočástic stříbra pomocí metod chemické redukce a jejich nanosení na titanový vzorek.

Teoretická část

1. Koloidní soustavy

Koloidní soustavy patří mezi disperzní systémy, což jsou dvousložkové nebo vícesložkové systémy, ve kterých je jedna složka ve formě částic rozptýlená ve složce druhé. Jedná se o disperzní fázi a disperzní prostředí. Částice disperzní fáze mají velikost 1 nm – 1 μm. Pokud systém obsahuje pouze částice stejné velikosti, jedná se o systém monodisperzní. Pokud mají částice různou velikost, jde o systém polydisperzní.¹

Koloidní soustavy dělíme podle skupenství disperzní fáze a disperzního prostředí na emulze, aerosoly, pěny a soly (tabulka 1).

Tab. 1: Rozdělení koloidních soustav

označení	disperzní fáze	disperzní prostředí
aerosol	kapalná	plynné
aerosol	pevná	plynné
pěna	plynná	kapalné
emulze	kapalná	kapalné
lyosol	pevná	kapalné
tuhé pěny	plynná	pevné
tuhé emulze	kapalná	pevné
tuhé soly	pevná	pevné

Koloidní soustavy, které jsou tvořeny kapalným disperzním prostředím a pevnou disperzní fází se nazývají lyosoly. Podle vlastností fázového rozhraní je dělíme na soustavy lyofobní, lyofilní a asociativní. Lyofobní koloidy neboli koloidní disperze jsou takové soustavy, ve kterých existuje ostře vymezené fázové rozhraní mezi disperzním prostředím a disperzní fází. Se zmenšujícím se rozměrem částic roste velikost plochy tohoto rozhraní. Tyto systémy jsou velmi nestálé, většinou jsou tvořeny anorganickými látkami a musejí být dodatečně

stabilizovány. Naproti tomu u lyofilních koloidů neboli koloidních roztoků tvoří disperzní prostředí a disperzní částice jednu fázi. Tyto soustavy vznikají samovolným rozpouštěním a jsou stabilní. Pokud je disperzní prostředí tvořeno vodou, označujeme takovou soustavu jako hydrofobní, popřípadě hydrofilní. Třetí skupinou lyosolů jsou asociativní neboli micelární koloidy. Disperzní fázi tvoří micely, které vznikají spojováním molekul povrchově aktivních látek.¹

1.1. Metody přípravy koloidních soustav

Koloidní soustavy je možné připravit dvěma způsoby, jedná se o metody dispergační neboli **top-down**, a metody kondenzační neboli **bottom-up**. Metody dispergační jsou metodami fyzikálními, při přípravě koloidních částic musíme vynaložit určitou práci. Kondenzační metody jsou metody převážně chemické. Při využití dispergačních metod připravujeme z makroskopické látky látku o rozměrech koloidních částic. Je možné použít např. mechanické rozměňování pomocí mlýnů, drcení, laserovou ablací, dispergaci v elektrickém oblouku nebo rozměňování pomocí ultrazvuku.^{1,2}

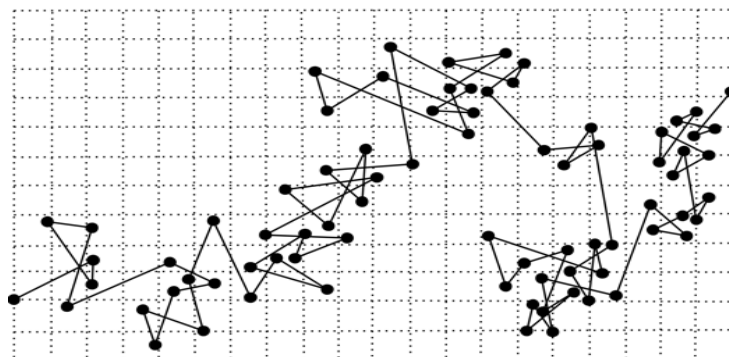
Při přípravě nanočástic mletím v kulových nebo tryskových mlýnech může docházet k nežádoucím jevům, hlavně ke kontaminaci nanočástic materiálem mechanického zařízení a také k jejich agregaci. Rozměňování ultrazvukem je možno použít pouze u materiálů, který má malou pevnost.

Pro vodivé materiály lze použít princip dispergace v elektrickém oblouku. Při tomto způsobu dochází k odtrhávání částic z elektrody během elektrického výboje. Nejmodernější metodou je laserová ablace. Jejím principem je zaměření laserového paprsku na plát materiálu, který je umístěn v reaktoru s vodou nebo surfaktantem. Velikost nanočástic, které jsou takto získávány, záleží na intenzitě laserového paprsku, na jeho vzdálenosti od materiálu nebo na úhlu, pod kterým paprsek dopadá. Důležitá je i vlnová délka použitého paprsku, která přímo úměrně ovlivňuje velikost vznikajících nanočástic. S rostoucí vlnovou délkou velikost nanočástic stoupá.

Kondenzační metody jsou založené na chemických reakcích, pomocí kterých z analytické disperzní soustavy získáme soustavu koloidní. Jedná se hlavně o oxidačně-redukční reakce, srážecí reakce a hydrolyzu solí. Pro vznik koloidních částic musíme dosáhnout přesycení roztoku.^{3,4}

1.2. Fyzikálně chemické vlastnosti koloidních soustav

V koloidní soustavě dochází neustále k chaotickému pohybu částic. Molekuly disperzního prostředí narážejí do částic disperzní fáze a tím je uvádějí do pohybu. Tento jev se nazývá **Brownův pohyb** podle svého objevitele, skotského botanika Roberta Browna. Částice pomocí Brownova pohybu opisují složité dráhy (obr. 1) a intenzita tohoto pohybu závisí na jejich velikosti a na teplotě systému. Čím vyšší teplota a čím menší velikost částic, tím je Brownův pohyb intenzivnější.



Obr. 1: Dráha částice při Brownově pohybu

Jedním z projevů Brownova pohybu je **difúze**, kdy se molekuly disperzní fáze přesunují z místa o vyšší koncentraci do místa s koncentrací nižší. Jedná se o pohyb na základě koncentračního gradientu. Pohyb molekul ve směru difúze popisuje 1. Fickův zákon

$$\frac{dn}{dt} = -SD \frac{dc}{dx}$$

kde dn/dt je látkové množství látky difundující za jednotku času, S je velikost plochy, D je difúzní koeficient a dc/dx je koncentrační gradient.^{1,5}

Vlivem gravitační síly dochází k pohybu částic směrem ke dnu nádoby a k jejich postupnému usazování, **sedimentaci**. Čím vyšší je hmotnost částic, tím rychleji

sedimentují. Síly, které v koloidní soustavě působí na částice disperzní fáze, jsou vyjádřeny Stokesovou rovnicí

$$F_g = F_{vztl} + F_{vis}$$

kde F_g je gravitační síla, F_{vztl} je vztlaková síla a F_{vis} je viskozitní odpor. Velmi malé částice nesedimentují a vlivem Brownova pohybu zůstávají rozptýleny v celém objemu soustavy.

Při vyrovnávání různých koncentrací dvou roztoků, které jsou odděleny polopropustnou (semipermeabilní) membránou, dochází k jevu zvanému **osmóza**. Tento jev probíhá opačným směrem, než difúzní pohyb. Molekuly disperzní fáze nemohou proniknout přes membránu, ta propustí pouze molekuly rozpouštědla. Proto dochází k pohybu rozpouštědla do místa s vyšší koncentrací. Osmóza je charakterizována osmotickým tlakem. Velikost tohoto tlaku v koloidní soustavě lze vyjádřit pomocí vztahu

$$\pi = \frac{w}{M} RT$$

kde w je hmotnostní koncentrace disperzní fáze, M je hmotnost jednoho molu disperzních částic, R je univerzální plynová konstanta a T je absolutní teplota.^{1,2}

Optické vlastnosti koloidních soustav jsou závislé na vlastnostech částic. Při dopadu světelného záření dochází k rozptylu světla a k jeho absorpci, tyto jevy jsou závislé na velikosti částic disperzní fáze.

Při dopadu světelných paprsků dochází k jejich **rozptylu**. Ten je závislý na vlnové délce dopadajícího světla a na velikosti částic disperzní fáze. Větší částice rozptylují světlo více než částice malé. Světlo s kratší vlnovou délkou je rozptylováno více než světlo s delší vlnovou délkou.

Rozptyl světla v disperzní soustavě byl poprvé popsán anglickým fyzikem Johnem Tyndallem v 19. století a je po něm pojmenován. Tyndallův jev je difúzní rozptyl světla v roztoku, kdy vlivem odrazu od koloidních částic dojde ke splynutí paprsků odraženého světla a lidské oko je vnímá jako rozšiřující se kužel (obr. 2). Při průchodu světla pravým roztokem tento kužel viditelný není.



Obr. 2: Rozptyl světla v pravém roztoku (vlevo) a v koloidní disperzi (vpravo)

Teoreticky popsal tento statický rozptyl světla anglický fyzik lord Reyleigh v roce 1871. Teorie platí pro kulové částice malých rozměrů, které světlo neabsorbují, ale vlivem dopadajícího elektromagnetického záření u nich dochází k indukci elektrického dipólu. Tento dipól pak vyzařuje světlo s nezměněnou vlnovou délkou. Vlnová délka dopadajícího světla musí být větší než poloměr částic. Pro nepolarizované světlo pak platí rovnice

$$\frac{I}{I_0} = R_\theta \frac{c}{r^2}$$

kde I_0 je intenzita dopadajícího záření, I je intenzita rozptýleného záření, R_θ je Rayleighův poměr, c je koncentrace částic a r je jejich poloměr.^{1,6} Rayleighův poměr umožňuje přepočítat intenzitu záření dopadajícího pod úhlem θ na jednotkovou intenzitu, jednotkovou vzdálenost a úhel $\theta = 0^\circ$ podle vztahu

$$R_\theta = \frac{I_\theta}{I_0} \frac{r^2}{(1 + \cos^2 \theta)}$$

Účinnost tohoto rozptylu je nepřímo úměrná čtvrté mocnině vlnové délky, světlo s kratší vlnovou délkou se tedy rozptyluje více: $i \approx \lambda^{-4}$

Pokud nahradíme klasický zdroj světla laserem, dojde k dynamickému rozptylu světla (Dynamic light scattering – DLS) v důsledku zesílení intenzity rozptýleného záření. Částice jsou ozářeny laserem, dochází k rozptylu světla ve všech směrech a v důsledku Brownova pohybu k fluktuaci intenzity rozptýleného záření. Kolísání intenzity je způsobeno právě difúzním pohybem částic. Čím rychleji se částice pohybují, tím rychleji se intenzita rozptýleného záření mění. Pomocí časového průběhu tohoto kolísání můžeme měřit rychlost

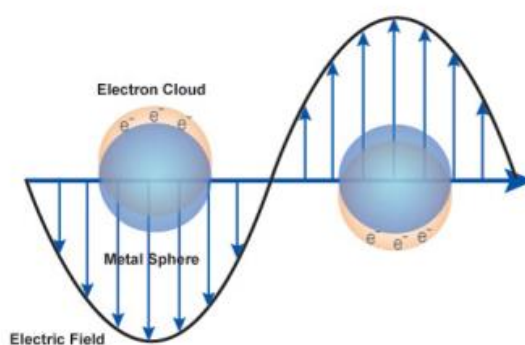
částice a následně její velikost. Dynamický rozptyl světla je jednou z nejpoužívanějších metod, je jím možno změřit i částice o velikosti 1 nm. Pro částice větší než 3 μm nelze metodu DLS použít, protože u takto velkých částic se už neprojeví Brownův pohyb.^{1, 6}

Při **absorpci** světla dochází k pohlcení kvanta elektromagnetického záření a tím ke změně energetických stavů. Při absorpci dojde ke zvýšení vnitřní energie molekul soustavy. Tato energie se změní na energii tepelnou. Absorpce záření je popsána Lambert–Beerovým zákonem

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l = -\log T$$

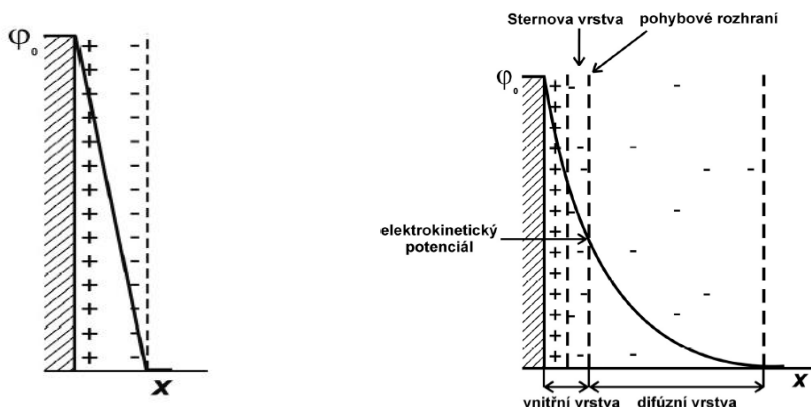
kde A je absorpance, ε je molární absorpční koeficient, c je molární koncentrace, l je délka absorbující vrstvy a T je transmitance.^{1, 5}

Pokud jsou koloidní částice elektricky vodivé (např. částice zlata nebo stříbra), dochází ke specifické absorpci některých vlnových délek dopadajícího světla. Intenzita rozptýleného záření prochází určitým maximem, jehož poloha ve spektru závisí na druhu kovu, stupni disperzity částic a míře agregace těchto částic. Čím je velikost částic větší, tím více se toto maximum posouvá směrem k delším vlnovým délkám. Důvodem tohoto posunu je **povrchový plasmon**. Tento jev je popisován jako kolektivní kmitání vodivostních elektronů ve fázi s elektromagnetickým vlněním (obr. 3). Povrchový plasmon způsobuje při určitých vlnových délkách změnu barvy koloidních roztoků.⁷



Obr. 3: Povrchový plasmon

Při pohybu elektricky nabitě částice disperzní fáze vůči disperznímu prostředí dochází ke vzniku **elektrokinetických jevů**. Příčinou je elektrický náboj na fázovém rozhraní mezi disperzní fází a disperzním prostředím. Vzniká zde elektrická dvojvrstva. Základní teorii uspořádání této dvojvrstvy vypracoval německý lékař, matematik a fyzik H. L. F. von Helmholtz (obr. 4), kde vrstvě iontů odpovídá vrstva protiiontů. Novou teorii elektrické dvojvrstvy navrhl Otto Stern. K vrstvě iontů jsou přitahovány protiionty, které jsou svázány adsorpčními silami a tvoří tzv. Sternovu vrstvu. Další protiionty jsou přitahovány elektrostatickými silami a tvoří difúzní vrstvu (obr. 5).



Obr. 4: Elektrická dvojvrstva (Helmholtz)

Obr. 5: Elektrická dvojvrstva (Stern)

Elektrický náboj na povrchu částic disperzní fáze je důležitý pro stabilitu koloidní soustavy. Stabilita znamená schopnost soustavy odolávat tendenci částic ke spojování do agregátů, které by díky své vyšší hmotnosti následně sedimentovaly. Elektricky nabitě částice se díky shodnému náboji vzájemně odpuzují a k agregaci tak nedochází. Velikost síly, kterou se odpuzují dvě částice, je přímo úměrná velikost jejich elektrického náboje a nepřímo úměrná druhé mocnině jejich vzdálenosti. Tuto sílu můžeme vyjádřit pomocí Coulombova zákona

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \cdot \frac{q_1q_2}{r^2}$$

K nejdůležitějším elektrokinetickým jevům patří elektroforéza, elektroosmóza, potenciál proudění a sedimentační potenciál.

Při elektroforéze dochází k pohybu částice v důsledku vnějšího elektrického pole. Částice se pohybuje v kapalném prostředí směrem k elektrodě. Pokud je prostředí tvořeno tuhou fází, dochází k jevu zvanému elektroosmóza. Vlivem elektrického pole dojde k pohybu kapalně disperzní fáze. Inverzními jevy jsou potenciál proudění a sedimentační potenciál, kdy v důsledku mechanického pohybu částic vzniká elektrického pole.^{1,2,8}

2. Nanomateriály a nanotechnologie

Nanomateriál je takový materiál, který je tvořen nanočásticemi, což jsou shluky atomů v řádu nanometrů, tedy o velikosti 10^{-7} – 10^{-9} m. Velikostí spadají nanočástice mezi koloidní disperze. Podle prostorového uspořádání mohou nanočástice vytvářet různé struktury, např. nanotrubičky, nanovlákna, nanovrstvy, nanopolymery a další.⁹

2.1. Historie nanomateriálů

Nanočástice byly využívány již ve středověku, i když tehdy lidé nevěděli, že je používají. Nanočástice zlata, stříbra i jiných kovů o velikosti cca 70 nm byly zjištěny ve skleněných předmětech, kde svými vlastnosti ovlivňovaly barevné vlastnosti skla.¹⁰

Prvním vědcem, který využívání nanočástic předpověděl, byl Richard P. Feynman, nositel Nobelovy ceny za fyziku (obr. 6). Ve své legendární přednášce „There’s Plenty of Room at the Bottom“ z roku 1959 hovořil o možnostech manipulace s jednotlivými atomy a molekulami, a předpokládal změnu některých vlastností u materiálů na této úrovni. Termín nanotechnologie jako první použil japonský fyzik Norio Taniguchi v roce 1974 (obr. 7).^{11, 12}



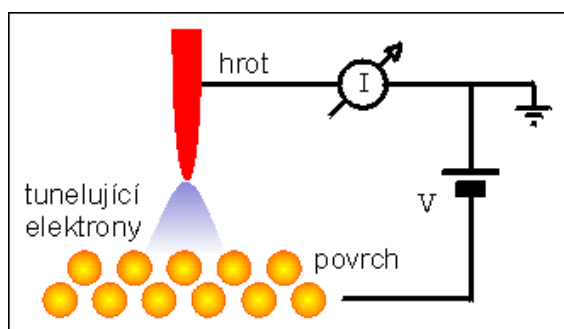
Obr. 6: Richard P. Feynman



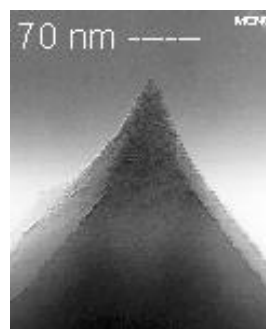
Obr. 7: Norio Taniguchi

Důležitým momentem, který přispěl k rozvoji nanotechnologie, byl vynález skenovacího tunelového mikroskopu v roce 1981 (Binnig, Röhrer). Tento

mikroskop mapuje povrch zkoumaného vzorku pomocí změny potenciálu, ke kterému dochází při pohybu sondy s vodivým hrotem nad povrchem. Při tomto zobrazení lze rozlišit jednotlivé atomy. Povrch tohoto vzorku musí být vodivý. STM pracuje na základě kvantového tunelového jevu, kdy dochází k měření změn tunelového proudu (obr. 8 a 9). Množství elektronů, které tuneluje ze vzorku do hrotu, je závislé na vzdálenosti a lze tak vykreslit podrobný povrch vzorku.¹³



Obr. 8: Schéma skenovacího tunelového mikroskopu



Obr. 9: Hrot STM

V roce 1985 byl objeven fullerén C_{60} , za jehož objev získali Kroto, Smalley a Curl Nobelovu cenu za chemii. Tento fullerén je modifikací uhlíku s molekulovou krystalickou stavbou, je kulovitý a tvoří ho 60 atomů uhlíku. Je to nejstabilnější forma fullerenu. V přírodě se vykytuje jako minerál šungit (obr. 10 a 11). Fullereny mohou být připraveny uměle např. laserovou pyrolýzou nebo vypařováním grafitu v elektrickém oblouku.¹⁴



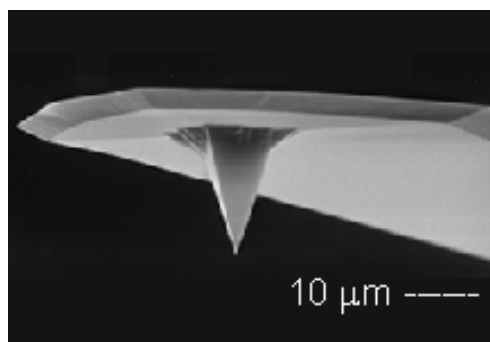
Obr. 10: Fullerén C_{60}



Obr. 11: Minerál šungit

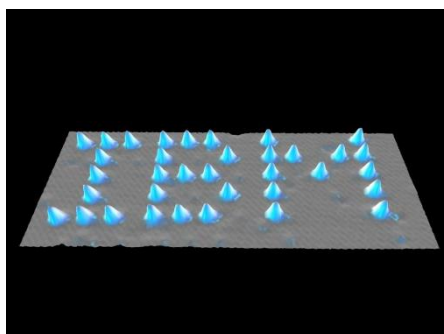
Fullereny mohou být využity jako ochranná vrstva pro svou vysokou tvrdost nebo jako supravodiče ve spojení s různými alkalickými kovy (K_3C_{60}).

V roce 1986 byl vynalezen mikroskop atomárních sil – AFM. Toto zařízení využívá elektrostatické a van der Waalsovy síly, kterými je přitahován hrot na pružném raménku (obr. 12). AFM může být využit i při zkoumání vzorků, které nejsou vodivé. Byl vynalezen Quatem, Binnigem a Gerberem.¹⁵



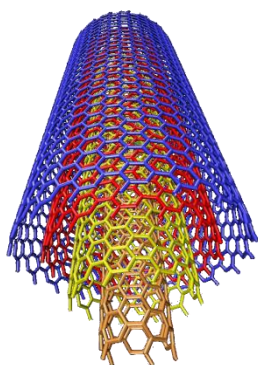
Obr. 12: AFM – pohyblivé raménko s hrotem

V roce 1989 dokázal vědec z institutu IBM Don Eigler využít STM k manipulaci s jednotlivými atomy a naplnit tak vizi R. Feynmana. Na chlazený krystal niklu zapsal pomocí 35 atomů xenonu nápis IBM (obr. 13).



Obr. 13: Logo IBM vytvořené atomy xenonu pomocí STM

V roce 1991 byly poprvé popsány uhlíkové nanotrubičky. Vznikly při pokusu japonského fyzika Sumia Iijmy připravit fulleren C_{60} metodou obloukového výboje mezi dvěma uhlíkovými elektrodami v argonové atmosféře. Kromě fullerenů vznikly i vícestěnné uhlíkové nanotrubičky (MWNT – obr. 14). O dva roky později se stejnému vědci podařilo připravit nanotrubičky jednostěnné (SWNT – obr. 15). Uhlíkové nanotrubičky mají široké spektrum využití, např. jako senzory, vodiče, chladičí prvky nebo výztuže v kompozitních materiálech.¹⁶

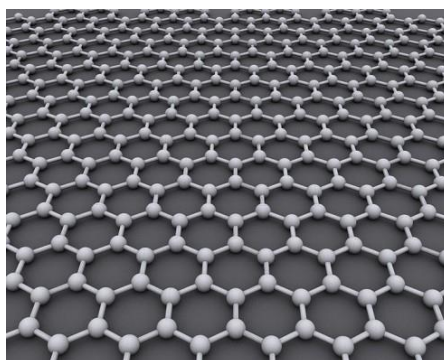


Obr. 14: Vícetěnná nanotrubička



Obr. 15: Jednotěnná nanotrubička

V roce 2004 byl objeven grafen, dvourozměrná forma uhlíku. Je to v podstatě vrstva uhlíku o síle jednoho atomu, uspořádaná do pravidelných šestiúhelníků (obr. 16). Grafen byl objeven dvěma fyziky Manchesterské univerzity, Andre Geimem a Konstantinem Novoselovem. Za tento objev obdrželi v roce 2010 Nobelovu cenu.



Obr. 16: Schéma struktury grafenu

Grafen je nejpevnějším známým materiálem, je asi 100 x pevnější než ocel. Má vysokou elektrickou a tepelnou vodivost a vysokou pružnost. Možnosti jeho využití jsou široké, může být použit při výrobě vodičů a polovodičů, při výrobě televizních obrazovek nové generace, výrobě elektrod nebo výrobě tranzistorů, kde by mohl nahradit křemík.¹⁷

2.2. Vlastnosti nanomateriálů

Mechanické, optické, magnetické i elektrické vlastnosti materiálu se zásadním způsobem změni, pokud velikost jeho částic klesne pod 100 nm alespoň

v jednom směru. Unikátní vlastnosti těchto nanostrukturních materiálů jsou způsobeny hlavně obrovským nárůstem poměru povrchu a objemu.

S klesající velikostí částic narůstá plocha fázového rozhraní mezi disperzní fází a disperzním prostředím, protože dochází ke zvyšování podílu povrchových částic. Změna velikosti povrchu kulových částic v konstantním objemu je znázorněna v tabulce 2, kde r je poloměr částice, N počet částic v daném objemu, V_p objem jednotlivé částice, V_{celk} celkový objem, S_p povrch jednotlivé částice a S_{celk} celkový povrch částic v daném objemu.^{18, 19}

Tab. 2: Změna velikosti povrchu v závislosti na poloměru částic

r (m)	N	V_p (m ³)	V_{celk} (m ³)	S_p (m ²)	S_{celk} (m ²)
10^{-2}	1	$4,2 \cdot 10^{-6}$	$4,2 \cdot 10^{-6}$	$12,6 \cdot 10^{-4}$	$12,6 \cdot 10^{-4}$
10^{-6}	10^{12}	$4,2 \cdot 10^{-18}$	$4,2 \cdot 10^{-6}$	$12,6 \cdot 10^{-10}$	$12,6 \cdot 10^0$
10^{-9}	10^{21}	$4,2 \cdot 10^{-27}$	$4,2 \cdot 10^{-6}$	$12,6 \cdot 10^{-16}$	$12,6 \cdot 10^3$

Podle normy ISO/TS 27687 rozdělujeme nanoobjekty podle počtu souřadnic, ve kterých objekt splňuje rozměr 1–100 nm:

- 0 dimenzionální nanoobjekty – vyhovují tomuto intervalu ve všech 3 osách, jsou to např. kvantové tečky, nanokrystaly, nanopěny;
- 1 dimenzionální nanoobjekty – vyhovují tomuto intervalu ve 2 osách, např. nanovlákná, nanotrubičky, nanotyče, nanopásky, nanopilíře;
- 2 dimenzionální nanoobjekty – vyhovují tomuto intervalu v 1 ose, např. nanovrstvy, deskovité nanokrystaly, nanostěny, rovinné makromolekuly (grafen).²⁰

3. Nanočástice stříbra

Stříbro je prvkem I. B skupiny společně s mědí a zlatem. Je to ušlechtilý kov bílé barvy, nejlepší vodič tepla a elektřiny. V přírodě se vyskytuje jako argentit Ag_2S , jako ryzí kov pouze ojediněle. Argentit bývá součástí sulfidických rud mědi, olova a niklu. Antibakteriální vlastnosti stříbra byly známy už ve starověku, stříbro se používalo jako dezinfekční prostředek k uchování vody, při léčbě zánětů nebo popálenin. Ještě na začátku 20. století se pomocí různých sloučenin stříbra (např. dusičnanu, nitrátu nebo sulfadiazinu) léčily infekce způsobené bakteriemi nebo viry. Po objevení penicilínu (Alexander Fleming, 1929) a následném rozšíření antibiotik během 2. světové války využívání stříbra v medicíně pokleslo. V 60. letech 20. století popsal americký lékař Carl Moyer používání 0.5% dusičnanu stříbrného při léčbě popálenin a jeho vynikající účinku proti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. V současnosti dochází k novému nárůstu zájmu o antimikrobiální účinky stříbra hlavně díky rozvoji nanotechnologií.^{21, 22}

3.1. Příprava nanočástic stříbra

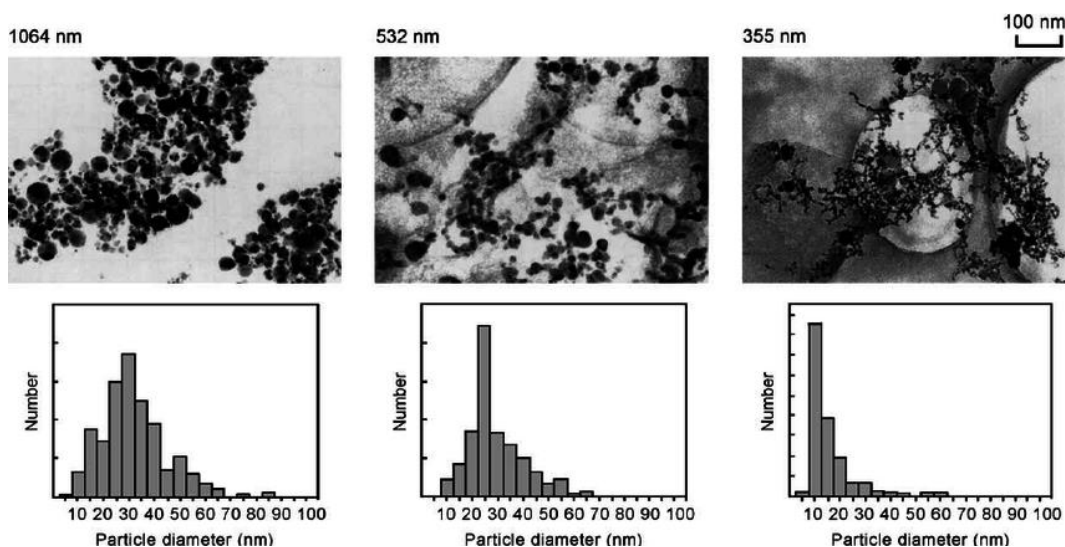
Nanočástice stříbra lze připravit dvěma základními způsoby: metodami top-down a bottom-up. Metoda top-down je metoda dispergační, jedná se o mechanickou redukci velikosti. Metody bottom-up jsou metody kondenzační, jsou založeny na chemických reakcích. Jde o přípravu nanočástic z jednotlivých atomů nebo molekul.²³

3.1.1. Metody top-down

K dispergačním metodám patří např. mletí, drcení, rozměňování pomocí laseru, ultrazvuku, dispergace v elektrickém oblouku nebo litografie.

Nejmodernější metodou je laserová ablace. Jejím principem je působení laserového paprsku na stříbrný plát o tloušťce 1 mm, který je umístěn v reaktoru. Velikost nanočástic stříbra závisí na intenzitě laserového paprsku, na jeho

vzdálenosti od stříbrného plátu nebo na úhlu, pod kterým paprsek dopadá. S rostoucí vlnovou délkou laserového paprsku velikost nanočástic stoupá (obr. 17). Nevýhodou této metody je vysoká finanční náročnost.^{3, 24}



Obr. 17: Závislost velikosti nanočástic stříbra na vlnové délce laserového paprsku

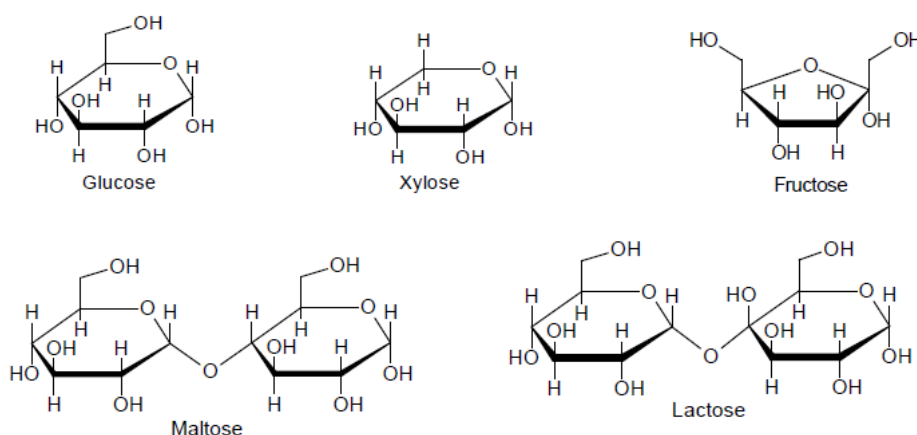
3.1.2. Metody bottom-up

Kondenzační metody využívají chemické reakce, při nichž z analytických roztoků vznikají roztoky koloidní. Jedná se především o srážecí nebo oxidačně-redukční reakce. Nejvýznamnější metodou je redukce stříbrných solí pomocí organických nebo anorganických činidel. Jako redukční činidlo může být použit například citrát sodný, tetrahydroborát sodný, peroxid vodíku, redukující sacharid nebo alkoholy.

Základní redukční metodou je modifikovaný Tollensův proces. Jeho podstatou je redukce amoniakálního komplexu redukujícími sacharidy:



Reakcí stříbrné soli s amoniakem vzniká diaminstříbrný komplex, který je redukován sacharidem. Tímto sacharidem může být např. maltóza, glukóza, xylóza, fruktóza nebo laktóza (obr. 18).



Obr. 18: Redukující sacharidy modifikovaného Tollensova procesu

Velikost stříbrných nanočástic, připravených modifikovaným Tollensovým procesem, se pohybuje od 25 do 450 nm. Tato velikost je ovlivněna použitým sacharidem a koncentrací amoniaku. S rostoucí koncentrací amoniaku velikost připravených částic roste. Rozměry částic při použití maltózy se pohybují kolem 25 nm, u laktózy je to 30 nm a u glukózy 40 nm. Reakční pH je upraveno roztokem hydroxidu sodného. Koloid s menšími částicemi je stabilnější, protože větší částice jsou náchylnější k sedimentaci.^{25, 26}

Borohydridová redukce spočívá v postupném přidávání roztoku dusičnanu stříbrného do silně podchlazeného vodného roztoku tetrahydroborátu sodného NaBH_4 v poměru 1:6. Za stálého míchání vznikne stabilní koloidní disperze s nanočásticemi stříbra o velikosti 5 – 20 nm. Velikost nanočástic lze ovlivnit poměrem reaktantů a změnou pH. Jako první tuto metodu použili Creighton, Blatchford a Albrecht.²⁷

Další kondenzační metodou je citrátová redukce. Jako první ji použili Lee a Meisel. Tato metoda spočívá v přidavku roztoku citrátu sodného $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ k roztoku AgNO_3 . Následným varem po dobu jedné hodiny vzniknou částice o velikosti 30 – 100 nm. Při dalším zahřívání roztoku dochází ke vzniku monodisperzního koloidu s velikostí částic 27 nm.²⁸

3.2. Metody a způsoby přípravy vrstev nanočástic stříbra

Vrstva je takové uspořádání atomů, molekul nebo částic, jehož tloušťka je vzhledem k ostatním dvěma rozměrům zanedbatelná. Vrstvy mohou být připraveny chemickou depozicí z kapalně fáze (např. layer by layer) nebo depozicí částic z fáze plynné (např. napařování).

Přímá redukce: roztok koloidního stříbra je připravován metodou chemické redukce modifikovaným Tollensovým procesem. Velikost nanočástic v tomto roztoku závisí mimo jiné na použitém redukčním činidle (NaBH_4 , N_2H_4 , citrát sodný, redukující sacharidy). Hodnota pH je upravena přidáním NaOH. Před přípravou vrstev nanočástic stříbra je nutná úprava povrchu substrátu (např. laboratorních sklíček). Povrch je vyčištěn saponátem a opláchnut v destilované vodě. Pro účinnější navázání nanočástic stříbra je dále možno povrch substrátu aktivovat. Vrstva nanočástic je získána ponořením substrátu do připravovaného koloidního roztoku.³

Sonochemická redukce: roztok koloidního stříbra je připraven obdobně jako u metody přímé redukce. Působením ultrazvuku na tento roztok dochází k rozkladu vody na vodíkové a hydroxylové radikály. Tyto radikály pak reagují s vhodnými molekulami a touto reakcí vznikají vlastní činidla pro redukcí stříbrných iontů.²⁸

Fotochemická redukce: při této metodě je nutné, aby v roztoku byl přítomen fotocitlivý prekurzor radikálů, který po excitaci UV zářením poskytne vhodné redukující činidlo. Může se jednat např. o aceton, acetofenon nebo kyselinu askorbovou. Zdrojem záření bývá většinou rtuťová výbojka.²⁹

Layer by layer: roztok koloidního stříbra je připraven modifikovaným Tollensovým procesem. Substrát je vyčištěn saponátem a poté vložen do piranha roztoku ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$). Následně je vložen na delší časový úsek do roztoku polymeru (např. PDDA), který změní jeho povrchový náboj. Po opláchnutí je substrát vložen do připraveného koloidního roztoku. Tento proces je opakován podle požadovaného počtu vrstev. Principem této metody je využití elektrostatických interakcí mezi složkami s opačným nábojem. Dalším

polyelektrolytem, který je možné ke změně náboje použít, je např. polyethylenimin (PEI), kyselina polymetakrylová (PMA) nebo kyselina polyakrylová (PAA).^{30, 31, 32}

Napařování: u této metody je substrát umístěn ve vakuové komoře společně se zdrojem, který převede napařovaný materiál do plynného stavu. Depozice probíhá za sníženého tlaku a substrát může být podle potřeby zahříván, protože tím se zvyšuje jeho povrchová energie a může tak být regulována rychlost tvorby vrstev. Substrát bývá umístěn na rotující podložce, aby byla zajištěna stejnoměrná tvorba vrstvy.³³

Naprašování: tento proces probíhá v naprašovací komoře, která je většinou vyplněna argonem. Substrát a tzv. terč z materiálu, z jehož atomů nebo molekul se vrstva vytváří, mají funkci elektrod. Po zavedení elektrického pole dojde k výboji, kterým jsou atomy vyraženy z terče a postupně deponovány na substrát.³⁴

3.3. Antibakteriální účinky nanočástic stříbra

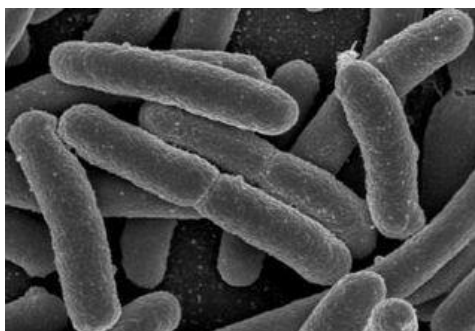
Výzkum antibakteriálních účinků nanočástic stříbra zažívá v posledních letech velký rozvoj, a to hlavně proto, že se mnohé mikroorganismy stávají rezistentní vůči antibiotikům. Léčba antibiotiky je pro lidský organismus vždy zátěží, protože kromě původců choroby jsou zároveň ničeny prospěšné a pro zdraví velmi důležité kmeny bakterií.

Při dlouhodobém a nekontrolovaném užívání stříbra ve formě stříbrných sloučenin docházelo v minulosti k postižení organismu argyrií. Ta se projevuje šedým až modrým zbarvením pokožky, sliznic a očního bělma postiženého člověka. Příliš vysoké dávky stříbrných iontů není lidský organismus schopen zpracovat a vyloučit. Na rozdíl od iontového stříbra nebyla zatím prokázána toxicita stříbrných nanočástic pro vyšší organismy.^{35, 36}

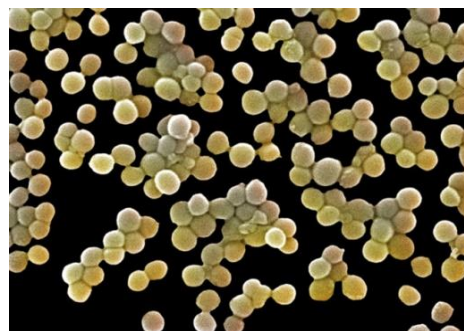
Stříbro se používá jako součást kompozitů pro dentální výplňové materiály a jako součást obvazových materiálů. Díky své schopnosti ničit bakterie jsou obvazy se stříbrem (např. Askina Calgitrol Ag nebo Actisorb Plus) využívány hlavně

u popálenin, kožních štěpů a chronických ran, jako jsou bérkové vředy. Nanostříbro je součástí některých přípravků na léčbu popálenin ve formě mastí. Další oblastí, ve které se uplatňují antibakteriální vlastnosti stříbrných nanočástic, je výroba zdravotnických oděvů, např. chirurgických roušek a plášťů z tkaniny se stříbrným vláknem.³⁷

Yung Sun Kim *et al.* (2007) ve své práci popisuje výzkum antimikrobiálních účinků nanočástic stříbra na vybrané druhy bakterií, konkrétně *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* kultivované na Mueller-Hintonově agaru.³⁸ MHA je standardizované médium, určené pro testování antimikrobiální citlivosti. Skládá se především z kaseinového hydrolyzátu, agaru, peptonu a dalších složek.³⁹ Bakterie *Escherichia coli* se řadí mezi gram-negativní bakterie, má tyčinkovitý tvar a je součástí střevní mikroflóry teplokrevných živočichů (obr. 19). Její výskyt mimo trávicí trakt je patogenní a způsobuje těžká průjemová onemocnění hlavně u malých dětí. Dále mohou vzniknout rozsáhlé infekce a hnisavé záněty, např. zánět močových cest nebo zánět pobřišnice. *Staphylococcus aureus* je gram-pozitivní bakterie kulového tvaru (obr. 20), způsobující hnisavé infekce, kterou mohou skončit až toxickým šokem (tzv. otrava krve).⁴⁰



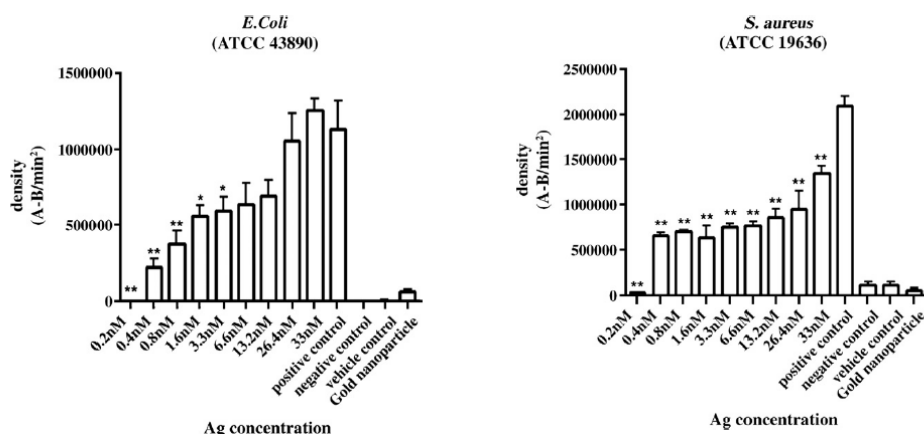
Obr. 19: *Escherichia coli*



Obr. 20: *Staphylococcus aureus*

Při uvedeném výzkumu byly použity nanočástice stříbra o velikosti 10–18 nm ve vodném roztoku o 0.2–33.0 nM koncentraci. Nanočástice byly připraveny redukcí roztoku AgNO_3 borohydridem sodným. Byla zkoumána minimální inhibiční koncentrace (MIC), což je nejmenší koncentrace antimikrobiální látky, která zamezí růstu bakteriálních kolonií. Účinek nanočástic stříbra proti *E. coli*

byl vynikající, proti *S. aureus* dobrý. Na obr. 21 je vidět závislost usmrčených bakterií na koncentraci nanočástic Ag. Se vzrůstající koncentrací Ag účinnost roztoku stoupá.³⁸



Obr. 21: Závislost usmrčených bakterií na koncentraci nanočástic Ag

Poněkud nižší účinnost nanočástic stříbra proti *Staphylococcus aureus* je zřejmě způsobena tím, že ve srovnání s gram-negativní *Escherichia coli* mají gram-pozitivní bakterie mnohem silnější buněčnou stěnu, tvořenou peptidoglykany a kyselinou teichoovou. Tato silná buněčná stěna chrání bakterie lépe před pronikáním nanočástic stříbra do cytoplazmy. Buněčná stěna gram-negativních bakterií je oproti tomu tvořena pouze tenkou vrstvou peptidoglykanů a fosfolipidovou membránou.^{38, 40}

Důležitým faktorem ovlivňujícím antibakteriální účinnost nanočástic stříbra je jejich velikost – čím menší nanočástice, tím větší účinek. Srovnání antimikrobiální aktivity nanočástic stříbra o velikosti 28 a 8 nm je uvedeno v práci Panáčka *et al.* (2016). Minimální inhibiční koncentrace (MIC) proti např. *E. coli* měla u nanočástic o velikosti 28 nm hodnotu 25 µg/ml, zatímco při velikosti 8 nm byla dostačující koncentrace pouze 6.3 µg/ml. Při testování proti *S. aureus* byla hodnota MIC více než 50 µg/ml u velikosti 28 nm a pouze 25 µg/ml u velikosti 8 nm. Antibakteriální účinnost menších nanočástic stříbra byla tedy prokazatelně vyšší.⁴¹

Hlavním cílem výše uvedené práce bylo zkoumání účinnosti kombinované léčby, tedy současného podávání antibiotik a nanočástic stříbra. Bakterie, které

postupně získávají rezistenci proti antibiotikům, jako jsou např. amoxicillin, penicillin G nebo gentamicin, se stávají závažným zdravotnickým problémem. Proti některým z těchto bakterií (*S. aureus*, *E. coli* nebo *A. pleuropneumoniae*), byla použita antibiotika v kombinaci s nanočásticemi stříbra o velikosti 28 a 8 nm. Zvýšený účinek kombinované léčby se projevil proti většině zkoumaných bakterií, nejlepší účinek byl pozorován u kombinace penicillinu G s nanočásticemi o velikosti 8 nm proti *A. pleuropneumoniae*.⁴¹

Zesílená účinnost antibiotik použitých v kombinaci s nanočásticemi stříbra proti enterobakteriím (*E. coli*, *K. pneumoniae*) je popisována v práci Panáčka *et al.* (2016). Proti těmto kmenům bylo použito několik druhů antibiotik (cefotaxim, meropenem, gentamicin a další), a to nejprve samostatně, a následně v kombinaci s nanočásticemi stříbra různých koncentrací. Zatímco samotná antibiotika byla proti rezistentním kmenům velmi málo účinná, společná antimikrobiální účinnost těchto antibiotik v kombinaci s nanočásticemi stříbra byla vysoká.⁴²

Důležitý je také tvar nanočástic, nejvyšší antimikrobiální aktivitu mají nanočástice ve tvaru trojbokého jehlanu. Mechanismus působení stříbra na bakterie není zcela přesně znám. Při používání iontového stříbra nebo nanostříbra dochází pravděpodobně k nevratné vazbě těchto částic na buněčnou membránu bakterie, popřípadě na její DNA, která tak ztrácí schopnost replikace. Nanočástice stříbra také zřejmě působí jako enzymatické inhibitory, omezují nebo zastavují enzymatické reakce a způsobují tak buněčnou smrt bakterie.⁴³

Nanočástice stříbra mohou být využity k přípravě nanokompozitů, které tímto získají antibakteriální a antifungicidní vlastnosti. Práce Zbořila *et al.* (2011) se zabývala účinností magnetických nanokompozitů oxidů železa (magnetitu a maghemitu) proti enterobakteriím a kvasinkám. Při přípravě byly použity nanočástice stříbra o velikosti 20–40 nm. Oba nanokompozity vykazovaly vysokou účinnost proti sledovaným mikroorganismům. Díky antimikrobiální aktivitě a zároveň magnetickým vlastnostem mohou být tyto nanokompozity využity v biomedicínských aplikacích.⁴⁴

Antibakteriální vlastnosti nanočástic stříbra se využívají také při přípravě

kompozitů vhodných k filtraci vody. Keramický nanokompozit s nanočásticemi stříbra byl testován při filtraci vody znečištěné bakterií *E. coli* o koncentraci 10^5 CFU/ml (Yaohui Lv *et al.*, 2009). Přefiltrovaná voda byla po uplynutí 24 hodin testována a bylo zjištěno usmrcení všech bakterií.⁴⁵ Rovněž nanokompozit Ag/PDDA-křemelina má vysoké antibakteriální a antifungicidní účinky. Práce Panáčka *et al.* (2013) popisuje přípravu tohoto nanokompozitu s vysokým obsahem nanočástic stříbra (46.6 mg Ag/1g křemeliny) a jeho následné testování proti bakteriím a kvasinkám. Nanokompozit prokázal vysokou antibakteriální a antifungicidní účinnost už při velmi nízké koncentraci 0.11 g/l, což odpovídá koncentraci stříbra 5 mg/l. Díky těmto vlastnostem se jeví jako velmi slibný materiál pro využití při úpravě vody.⁴⁶

3.4. Využití nanočástic stříbra k povrchové antibakteriální úpravě

Antibakteriální povrchová úprava materiálů má velkou budoucnost. Využitím přirozených antimikrobiálních vlastností stříbra v medicínských oborech se v současnosti zabývá mnoho výzkumných prací. Povrchová úprava stříbrnými nanočásticemi by měla bránit šíření bakteriálních kolonií a vzniku následných zdravotních komplikací. Stříbro je už nyní součástí materiálů sterilního chirurgického krytí, obvazů, náplastí, operačních roušek, pokrývek hlavy, plášťů a chirurgických šicích nití.

Při vážných kožních traumatech, např. hlubokých popáleninách, je riziko vzniku infekce nadprůměrné. Speciální krytí s obsahem stříbra (např. Askina, Aquacel, Atrauman) snižuje riziko sepse na minimum.⁴⁷

Často používanou lékařskou pomůckou jsou katetry. Katetr je jednoduchá, nicméně velmi důležitá pomůcka, která slouží k podávání léků, vyplachování tělních dutin, drenážování nebo vyšetřování vnitřních orgánů (např. srdce, plic nebo močového měchýře). Katetr je tvořen plastovou hadičkou s různými přídatnými nástavci, zavaděči nebo jehlami. Podle způsobu a oblasti použití rozlišujeme např. cévní, žilní nebo urinální katetry (obr. 22). Jsou vyrobeny z polyuretanu, silikonového kaučuku, latexu nebo nylonu.⁴⁸

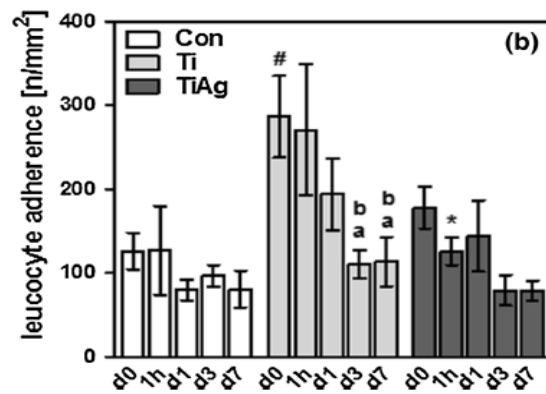
Protože katetry zasahují přímo do cév nebo vnitřních orgánů, je důležité zabránit jejich kontaminaci. Uvádí se, že katetry jsou příčinou více než 40 % všech nozokomiálních infekcí, tedy těch infekcí, které vznikají během pobytu pacienta



Obr. 22: Žilní katetr a katetr pro vyšetření srdce (výrobce B. Braun, Německo)

v nemocnici. Práce Galiana *et al.* (2013) zkoumala růst bakteriálních kolonií v drenážních katetrech, jednak bez povrchové úpravy a jednak impregnovaných stříbrnými nanočásticemi.⁴⁹ Jednalo se o katetry, které jsou používány v mozkomíšní oblasti. Infekce mozkomíšního moku je pro pacienta závažné riziko. Katetry byly ponořeny v tekutině a po dobu sedmi dnů bylo vyhodnocováno množství bakterií *Staphylococcus Aureus*. Bylo zjištěno snižování počtu bakterií v roztoku s katetry impregnovanými nanočásticemi stříbra a zároveň se neprokázalo žádné uvolňování těchto nanočástic do tekutiny. Další oblastí, u které se zkoumá možnost antibakteriální impregnace povrchu stříbrnými nanočásticemi, jsou cévní náhrady. V současné době jsou vyráběny z polytetrafluorethylenu nebo polyesteru impregnovaného albuminem a k získání antiseptických vlastností jsou namáčeny v acetátu stříbra.⁵⁰

Velice slibné jsou pokusy s titanovou slitinou pro kloubní implantáty, jejíž povrch je pokryt vrstvou stříbra. Přes veškerou péči se u totálních endoprotéz nedá zcela vyhnout následné infekci, hlavně u pacientů, jejichž přirozená imunita je narušená. V práci Ann-Kathrin Behrendtové *et al.* (2015) bylo zkoumáno použití čisté titanové slitiny a slitiny s povrchem, který obsahoval stříbro.⁵¹ Bylo zkoumáno jejich přijetí živou tkání a hlavně zvýšený výskyt leukocytů, který signalizuje existenci infekce a počínající zánět. Výskyt leukocytů byl sledován pomocí fluorescenční mikroskopie, a to postupně po 1 hodině, 24 hodinách, 3 dnech a 7 dnech od implantace (obr. 23).



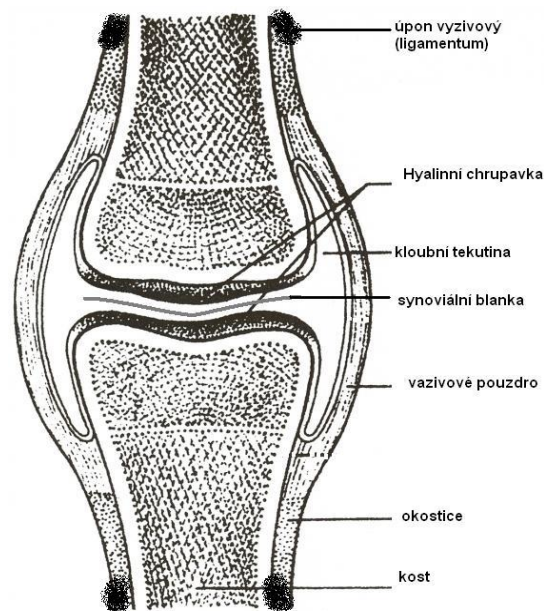
Obr. 23: Množství leukocytů na zkoumaném povrchu

Při tomto výzkumu byly použity tři skupiny laboratorních myší. První skupině (kontrolní) nebyl proveden žádný zákrok. Druhé skupině byl voperován neupravený titanový implantát a třetí skupině implantát z kompozitního materiálu TiAlAg. Titanová slitina se stříbrem vykazovala nižší výskyt leukocytů, a to téměř na úrovni kontrolní skupiny, kde nebyl žádný zákrok proveden a kde se tedy možnost infekce nepředpokládá, což dokládá antiseptické účinky stříbra.

4. Kloubní náhrady

4.1. Stavba kloubů

Kloub je pohyblivé spojení dvou nebo více kostí. Je tvořen kloubní dutinou, kloubním pouzdem a kloubními plochami. Kloubní plochy jsou tvořeny kloubní hlavicí a kloubní jamkou. Kloubní dutina je vyplněna tekutinou, která se nazývá synovie a která snižuje tření při pohybu kloubu (obr. 24).



Obr. 24: Stavba kloubu

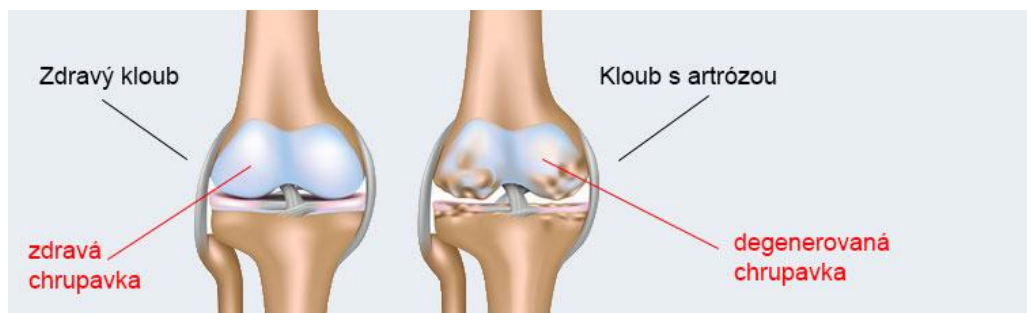
Styčné plochy kloubu jsou pokryty kloubní chrupavkou, která je vyživována synovií a jejímž účelem je tlumení nárazů vznikajících při pohybu. Právě poškození chrupavky vede k bolestem a později k omezení pohybu.^{52, 53}

4.2. Artróza kloubů

Artróza patří mezi onemocnění pohybového aparátu a je nejčastější příčinou bolesti kloubů. Je to degenerativní proces chrupavky, který postihuje asi 10 % populace. Nejvíce se objevuje u velkých nosných kloubů, tedy kyčle a kolene (obr. 25). Diagnóza se stanovuje na základě vyšetření, při kterém se zjistí

hybnost kloubu, bolestivost pohybu, degenerativní změny, popř. otoky. Používají se všechny dostupné metody včetně CT a NMR.^{53, 54}

Artróza se dělí na primární a sekundární. Primární artróza je metabolická porucha, v jejímž důsledku dochází k měknutí chrupavky a vytváření trhlin. Sekundární artróza je důsledkem přetížení kloubů při výkonu zaměstnání, při sportu, v důsledku nadváhy nebo vrozené vady.^{52, 55}



Obr. 25: Zdravý a postižený kloub

Typickým projevem artrózy je bolest při zátěži kloubu (později i bolest bez jakékoli námahy, např. v noci), ranní ztuhlost a citlivost na chlad.

Artróza je nejčastějším kloubním onemocněním. Její výskyt se zvyšuje s přibývajícím věkem, populace nad 70 let vykazuje zhruba 50% postižení.

Nejčastěji jsou artrózou postiženy kyčelní klouby (koxartróza), kolenní klouby (gonartróza) a klouby ramene (omartróza). Pokud už nezabírá běžná léčba a pacient je omezen v pohybu natolik, že mu to komplikuje každodenní život, je poslední možností aloplastika – náhrada postiženého kloubu implantátem.^{54, 56}

4.3. Kloubní náhrady

Jako první se moderními endoprotézami kloubů začal zabývat sir John Charnley, britský ortoped, který žil v letech 1911 až 1982. Během své válečné chirurgické praxe v Káhiře se nejprve věnoval vývoji vylepšených protéz, po 2. světové válce se začal soustředit na náhrady poškozených kloubů, zkoumal spojení různých plastových a kovových materiálů a jejich snášenlivost pro lidský organismus.

V 60. letech 20. století provedl první skutečně úspěšnou operaci kyčelního

kloubu. Pro hlavici kloubu s dříkem byla použita chrom-kobalt-molybdenová slitina a pro kloubní jamku vysokomolekulární polyetylén. Tato kloubní náhrada byla pomocí kostního cementu neboli metylmetakrylátu fixována do kostního lůžka v pánvi a stehenní kosti pacienta.^{57, 58}

V České republice (přesněji v tehdejší Československu) se začaly vyrábět kloubní náhrady v bývalé SONP Kladno. V roce 1969 vznikla první česká náhrada kolenního kloubu, později i náhrady kyčelních a ramenních kloubů.

V současné době se pro výrobu totálních endoprotéz (TEP) používá několik typů kovových slitin, plastů a keramiky (obr. 26 a 27). Jsou to hlavně titanové slitiny, kobaltové slitiny, korozivzdorné oceli, korundová biokeramika nebo ultravysokomolekulární polyethylen UHMWPE.^{57, 58}



Obr. 26: TEP, titanový dřík, oxiniová hlavička



Obr. 27: Kloubní jamka z polyethylenu

Podle typu fixace dělíme implantáty na cementované, bezcementové a hybridní:

- cementovaný implantát – ukotven pomocí tzv. kostního cementu, což je metylmetakrylát;
- bezcementový implantát – má speciálně upravený povrch, potažený hydroxyapatitem, do kterého přímo vrůstá kostní tkáň;
- hybridní implantát – spojuje obě výše uvedené metody; nejčastěji je stehenní část implantátu cementovaná a kloubní jamka necementovaná.

V současnosti se bezcementové implantáty jeví jako výhodnější, protože u pacientů s tímto typem kloubní náhrady dochází méně často k aseptickému uvolnění. Rovněž je důležitá menší destrukce kloubního okolí při tomto typu operace a předpoklad delší doby užívání náhrady.^{58, 59}

4.4. Pooperační komplikace

Jako u každého chirurgického zákroku, je také u aloplastiky velmi důležitá prevence pooperačních komplikací, zejména infekce. Sterilita operačního a pooperačního prostředí je samozřejmostí, riziko pooperační infekce je však závislé na mnoha dalších faktorech:

- celkový zdravotní stav pacienta;
- životospráva;
- diabetes;
- defekt imunity;
- léčba kortikoidy;
- alkoholismus.

Nejčastějším původcem pooperačních infekcí u tohoto typu zákroků je *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a další gram-negativní a gram-pozitivní bakterie.

Infekce se dělí podle doby vzniku na tři typy: časná, mitigovaná a pozdní:

a) **typ I** – časná infekce

Tato infekce vzniká v 1. nebo 2. měsíci po operaci, způsobují ji velmi virulentní kmeny bakterií. Je to akutní stav s rychlým, dramatickým průběhem. Pacient trpí vysokými teplotami, postižené místo je oteklé, zarudlé a bolestivé.

b) **typ II** – mitigovaná (mírná) infekce

Tato infekce je způsobena málo virulentními organismy, které se do těla pacienta dostanou během operace. Příznaky se projeví po 6 až 12 měsících, jde hlavně o bolestivost a omezení pohyblivosti operovaného kloubu.

c) **typ III** – pozdní (hematogenní) infekce

Vzniká za několik let po operaci. Příčinou tohoto typu infekce je proniknutí bakterií do jinak zdravého kloubu přes krevní oběh pacienta. Dochází k omezení pohybu, lokálnímu zarudnutí, otokům. Průběh je závislý na typu bakterií.^{60, 61}

Léčba pooperačních infekcí je komplikovaná. Antibiotika jsou často neefektivní, většinou je třeba vyjmout implantát, vyléčit infekci a poté znovu implantovat

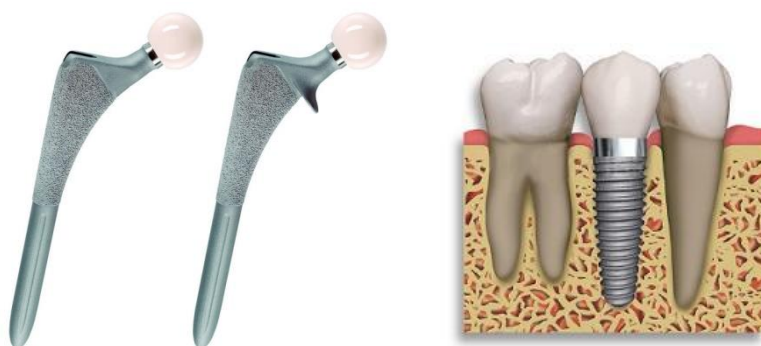
kloubní náhradu. Tento postup je velmi nákladný (terapie je 4x až 5x dražší než původní operace) a pro pacienta velmi bolestivý a obtěžující. Zamezení vzniku infekce by znamenalo nejen finanční úspory pro medicínská zařízení, ale hlavně menší nebezpečí a utrpení pro pacienty. Využívání materiálů upravených nanočásticemi stříbra je jednou z možných cest.⁶²

5. Titan a jeho využití

Titan je prvkem IV. B skupiny společně se zinkem, rutherfordiem a hafniem. Je to bílý až šedý lesklý kov podobný oceli, je tvrdý a křehký (tvrdost 6). Je dobrým vodičem, při teplotách blízkých se absolutní nule se stává supravodičem I. typu. Je vysoce odolný proti korozi ve vodných roztocích a dobře odolává působení většiny kyselin. Rozpouští se pouze v kyselině fluorovodíkové nebo v zahřáté kyselině chlorovodíkové. Titan má vysokou pevnost a zároveň nízkou měrnou hmotnost ($4,5 \text{ g/cm}^3$), což z něj dělá výborný konstrukční materiál.

Titan má také vysokou tepelnou odolnost. Ani při teplotách kolem $500 \text{ }^\circ\text{C}$ neztrácí pevnost a rovněž při teplotách pod bodem mrazu zůstávají jeho mechanické vlastnosti zachovány. Negativní vlastností je však to, že při teplotách nad $500 \text{ }^\circ\text{C}$ má vysokou chemickou reaktivitu s vodíkem, dusíkem a kyslíkem, a rovněž jeho pružnost nedosahuje parametrů některých ocelí.^{63, 64}

Titan se používá hlavně ve formě slitin v leteckém průmyslu, při konstrukci družic, raketoplánů a vesmírných stanic. Díky své odolnosti vůči působení mořské vody se využívá při výrobě součástí pro lodi a ponorky, dále při výrobě nástrojů, jako ochranná vrstva různých komponent nebo při výrobě šperků a hodinek. Díky své biokompatibilitě se titan využívá v lékařství jako materiál při výrobě kloubních náhrad a dentálních implantátů (obr. 28).



Obr. 28: Titanové kloubní náhrady a dentální náhrada

V přírodě se titan vyskytuje např. jako TiO_2 ve třech modifikacích jako rutil, brookit a anatas, jako FeTiO_3 v ilmenitu nebo jako perovskit ve formě CaTiO_3 .⁶³

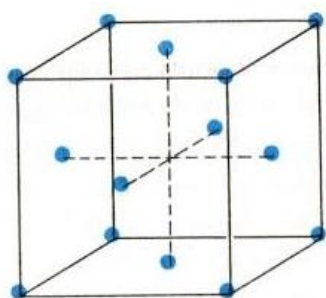
5.1. Sloučeniny titanu a jejich využití

Oxid titaničitý TiO_2 – je nejpoužívanější sloučeninou titanu. Je velmi stabilní, nejedovatý a i jinak zdravotně nezávadný. Je to bílá amfoterní látka, která se jako titanová běloba využívá při výrobě barev, keramiky, drogistického zboží, ve farmacii a v potravinářství.

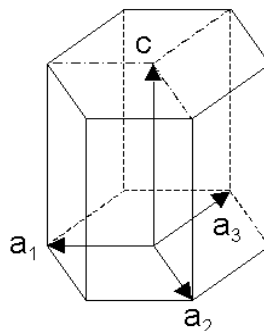
Chlorid titaničitý TiCl_4 – používá se jako náplň do dýmovnic v pyrotechnice. Na vzduchu ve spojení se vzdušnou vlhkostí vytváří hustý bílý dým.

Nitrid titanu TiN – patří k nejtvrdějším sloučeninám, má tvrdost 9. Používá se k povrchovým úpravám nástrojů.

Titan vytváří slitiny s mnoha prvky, pouze některé však mají praktický význam. Slitiny se většinou rozdělují podle typu krystalické mřížky titanu. Titan je polymorfní kov a může se vyskytovat jako α -titan s hexagonální krystalickou mřížkou a β -titan s mřížkou kubickou (obr. 29 a 30).



Obr. 29: Kubická mřížka



Obr. 30: Hexagonální mřížka

K překrystalizaci titanu dochází při teplotě 882 °C. Přidáním některých prvků, tzv. α -stabilizátorů, dochází ke zvýšení transformační teploty a tím k rozšíření oblasti α , jedná se např. o hliník, dusík nebo uhlík. K těmto slitinám patří např. $\text{TiAlSn}_{2,5}$ nebo $\text{TiAl}_2\text{Mo}_4\text{Sn}_{11}$. Naopak vanad, niob a molybden rozšiřují oblast β a působí jako β -stabilizátory. Ke slitinám typu β patří $\text{TiV}_{13}\text{Cr}_{11}\text{Al}_3$ nebo $\text{TiMo}_{11}\text{Zr}_6\text{Sn}_5$.^{64, 65}

Třetím typem titanových slitin jsou dvoufázové $\alpha+\beta$ slitiny, které obsahují titan typu α i titan typu β . Vlastnosti těchto slitin jsou závislé na poměru jednotlivých

fázi. Všechny tyto slitiny obsahují hliník, který stabilizuje alfa fázi, a pak další prvky, které stabilizují fázi beta, zejména vanad, molybden, železo nebo mangan. Nejpoužívanější slitinou titanu je TiAl6V4. Patří k dvoufázovým slitinám. V tabulce 3 je uvedeno chemické složení této slitiny podle normy AMS (Aerospace Material Specifications).⁶⁶

Tab. 3: Chemické složení slitiny TiAl6V4 dle AMS

Prvek	Al	V	Fe	O	C	N	H	Y	Ti
%	5,50 - 6,75	3,50 - 4,50	0,30	0,20	0,08	0,05	0,015	0,005	zbytek

Původně byla vyvinuta pro letecký průmysl, od 70. let 20. století se využívá i v ortopedii a stomatologii jako materiál pro výrobu implantátů.

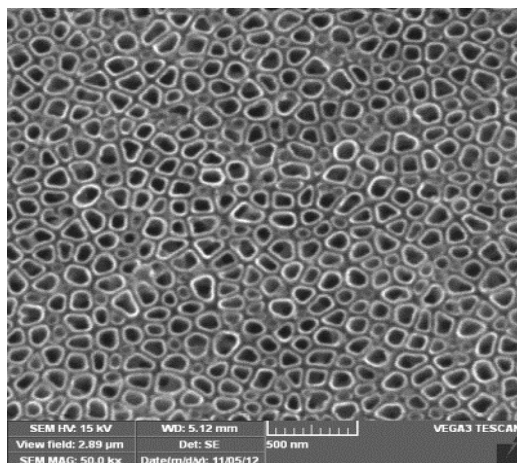
5.2. Biokompatibilita titanu

Pokud je nějaký materiál přijat živou tkání bez odmítavé reakce, hovoříme o biokompatibilním materiálu. Při výrobě jakýchkoliv implantátů je kromě jejich pevnosti a korozní odolnosti důležité právě to, aby nevyvolaly negativní reakci v těle pacienta. Mohlo by docházet k zánětlivým reakcím, otokům a dokonce k alergickým reakcím, které mohou následně ohrozit pacientův život.

Titan a jeho slitiny se vyznačují výbornými mechanickými vlastnostmi a zároveň vysokou biokompatibilitou. Při implantování titanových náhrad přichází povrchový materiál do styku s kostí, okolní tkání i tělními tekutinami. Proto je důležité, aby riziko odmítavé reakce organismu bylo co nejmenší. Při styku s okolním ovzduším vytváří titanová slitina na povrchu vrstvu TiO_2 , v průměru 10 nm silnou. Právě tato vrstva je v přímém kontaktu s tělesnou tkání a její vysoká kompatibilita je hlavním důvodem dobrého přijetí implantátů.^{67, 68}

Za určitou dobu od provedení operace dochází ke spojení kosti a implantátu, kost se formuje přímo na jeho povrchu. Tento jev se nazývá kontaktní osteogeneze nebo osteointegrace a je velmi důležitý pro hojení a možnost postupného zatěžování operovaného místa.

Osteointegraci lze urychlit povrchovou úpravou implantátu, např. nanostrukturováním titanu a jeho slitin metodou anodické oxidace (obr. 31). V důsledku pasivace titanu a leptání povrchu fluoridovými anionty dochází k růstu nanotrubiček, které zvyšují bioaktivitu povrchu. Výrazný nárůst povrchu umožňuje adsorpci většího množství antibiotik, proteinů, hormonů apod.⁶⁹



Obr. 31: Nanostrukturovaný titan

Nanotrubičky na povrchu implantátu zároveň stimulují růst hydroxyapatitu, který je pro úspěšnou osteointegraci nezbytný. Poprvé byly tyto nanotrubičky popsány v roce 1991 V. Zwillingem.

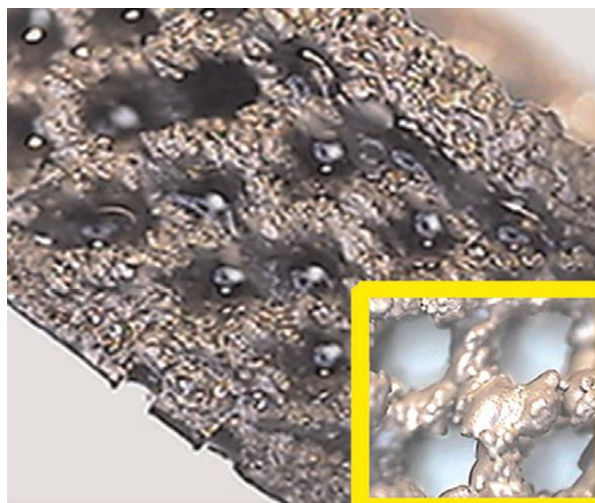
5.3. Titanové slitiny upravené nanočásticemi stříbra

Titanové slitiny jsou v současnosti nejpoužívanějším materiálem pro výrobu medicínských implantátů používaných v ortopedii, stomatologii a dalších oborech. Jedná se hlavně o náhrady kloubů, zubů a cév, popřípadě jejich částí. V případě cév jde spíše o vytvoření titanové kostry, která je následně pokryta polymerem. Materiály na bázi titanu jsou využívány hlavně pro své výborné mechanické a fyzikálně-chemické vlastnosti (odolnost proti korozi, odolnost proti otěru, dobrá tvarovatelnost, vysoká pevnost, nízká hmotnost). Neméně důležitou vlastností je biokompatibilita, díky které jsou implantáty zpravidla přijaty okolními tkáněmi bez problémů.⁷⁰

Při vhojování implantátu do těla pacienta je důležité zamezit infekci a následnému vzniku bakteriálních kolonií na rozhraní slitina-tkáň. Použití

antibiotik není vždy účinné a navíc je stále více bakteriálních kmenů, které si na běžná antibiotika vypěstovaly rezistenci. Velká pozornost je proto věnována povrchové úpravě materiálů, která by zajistila co největší antiseptický účinek. Pro zlepšení těchto vlastností a zajištění maximálního účinku se používá nanostrukturování povrchu a následná impregnace nanočásticemi stříbra.^{69, 71}

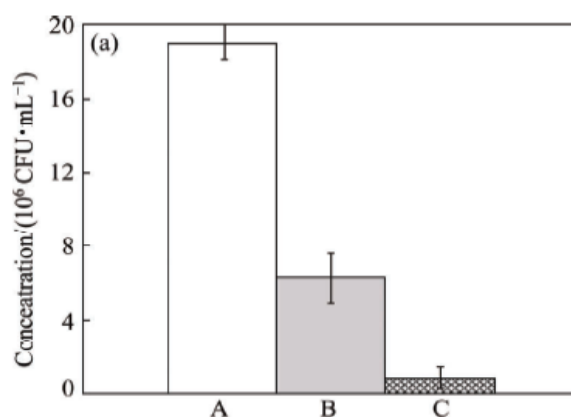
Práce Zhaojun Jia *et al.* (2014) popisuje titanovou slitinu Ti6Al4V se speciálně upraveným povrchem pomocí technik EBM (tavení elektronovým paprskem) a MAO (micro-arc oxidation).⁷² Povrch byl následně pokryt nanočásticemi stříbra. Povrch takto upravené titanové slitiny vykazoval vysokou pórovitost. Byl tvořen šestiúhelníkovými strukturami, které byly vyplněny nanočásticemi stříbra o průměrné velikosti 50 nm (obr. 32). Byla testována snášenlivost vzorku slitiny s kostními buňkami. Speciálně upravený povrch vykazoval nadprůměrnou přilnavost a vysokou buněčnou kompatibilitu.



Obr. 32: Povrch upravené titanové slitiny Ti6Al4V s nanočásticemi stříbra

Práce K. Jurczyka *et al.* (2015) se zabývala studiem antimikrobiální aktivity mikrostrukturovaného titanu v porovnání s nanokompozitem Ti-45S5 bioglass a stejným nanokompozitem s povrchem upraveným nanočásticemi stříbra Ti-45S5 bioglass-Ag.⁷³ Všechny tři vzorky byly testovány proti bakteriím *Streptococcus mutans* a *Staphylococcus aureus*. Byly použity kultury bakterií s koncentrací 10^8 CFU/ml u kmene *S. mutans* a 10^9 CFU/ml u kmene *S. aureus*.

U nanokompozitu Ti-45S5 bioglass-Ag byla zjištěna největší antimikrobiální aktivita proti oběma zkoumaným kmenům bakterií v porovnání s materiály, které nanočástice stříbra neobsahují (obr. 33).



Obr. 33: Antibakteriální aktivita povrchu (A – mikrostrukturovaný titan, B – kompozit Ti-45S5 bioglass, C – kompozit Ti-45S5 bioglass-Ag)

Vliv koncentrace stříbrných nanočástic na povrchové vlastnosti titanu popisuje práce Ki Ryong Shin *et al.* (2015). Na titanové vzorky byla pomocí plazmatické elektrolytické oxidace (PEO) v elektrolytickém roztoku KOH a $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ s různými koncentracemi stříbrných nanočástic nanášena vrstva oxidu. Byly použity koncentrace nanočástic 0.0, 0.1, 0.3 a 0.5 g/litr. Přítomnost stříbrných nanočástic v povrchové vrstvě byla ověřena pomocí SEM. Poté byla zkoumána antimikrobiální aktivita takto vytvořených povrchových vrstev proti bakterii *Escherichia coli* s koncentrací 10^6 CFU/ml . Zároveň byla zkoumána schopnost srůstání této povrchové vrstvy s kostními buňkami. Po vyhodnocení výsledků bylo zjištěno, že všechny tři použité koncentrace nanočástic Ag byly dostačující k vytvoření vrstvy s tak vysokými antimikrobiálními účinky, že byly usmrceny všechny bakterie inkubované v roztoku. Dále bylo zjištěno, že vrstva, která vznikla za použití koncentrace nanočástic stříbra 0.1 g/l měla lepší vlastnosti z hlediska biokompatibility a osteointegrace než vrstvy s koncentracemi 0.3 a 0.5 g/l, protože vykazovala stejnou povrchovou strukturu jako původní neupravený materiál, kdežto při použití vyšších koncentrací stříbrných nanočástic došlo k povrchovým změnám.⁷⁴

Povrchovou úpravou nanotrubiček TiO₂ nanočásticemi stříbra se zabývá práce Soo-Hyuk Uhm *et al.* (2013). Nanotrubičky byly připraveny pomocí plazmatické elektrolytické oxidace (PEO) a následně byl jejich povrch pokryt nanočásticemi stříbra metodou magnetronového naprašování. Povrch nanotrubiček byl charakterizován pomocí SEM a analyzován pomocí XPS (rentgenová fotoelektronová spektroskopie). Následně byla testována antimikrobiální aktivita vzorku proti bakteriím *Staphylococcus aureus* s koncentrací 10⁶ CFU/ml. Po sedmi dnech bylo zjištěno usmrcení všech inkubovaných bakterií a tedy vysoká antibakteriální účinnost vzorku.⁷⁵

Antimikrobiální vlastnosti nanočástic typu core-shell byly předmětem výzkumu Abubakera H. H. *et al.* (2015). Pomocí laserové ablace kompozitu TiO₂@Ag v deionizované vodě a následném rozkladu ultrazvukem byly připraveny částice s novou strukturou, tedy s titanovým jádrem a stříbrnou slupkou. Předcházející výzkumy se věnovaly core-shell strukturám s jádrem tvořeným Ag a slupkou z TiO₂. Následně byl zkoumán antibakteriální účinek takto připravených core-shell nanočástic proti *Escherichia coli*. Pro srovnání byly zkoumány účinky nanočástic TiO₂@Ag bez core-shell úpravy. Antibakteriální aktivita u core-shell částic byla vyšší než u nanočástic, které nebyly ultrazvukem upraveny. Důvodem je právě core-shell struktura, protože povrch částic je tvořen výhradně nanočásticemi stříbra, které přímo přicházejí do styku s bakteriemi.⁷⁶

Výzkum úpravy titanových slitin pomocí nanočástic stříbra prokazuje vynikající antimikrobiální účinky takto upravených povrchů proti vysoce infekčním druhům bakterií jako je *Escherichia coli* nebo *Staphylococcus aureus* a předpokládá jejich široké medicínské využití.

Experimentální část

6. Chemikálie

Pro přípravu koloidní disperze nanočástic stříbra byl použit dusičnan stříbrný AgNO_3 (p.a., 99.8%, Penta), amoniak NH_3 (p.a., 28-30%, Sigma-Aldrich), redukující sacharidy monohydrát D(+)-maltózy $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (p.a., Sigma-Aldrich) a glukóza $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (p.a., Lach-Ner), a hydroxid sodný NaOH mikroperly (p.a., 99.7%, Lach-Ner).

K aktivaci skleněných substrátů byl použit chlorid cínatý SnCl_2 (p.a., Lach-Ner) a k jejich odmaštění uhličitan draselný K_2CO_3 bezvodý (p.a., 99%, Lach-Ner).

Roztok poly(diallyldimethylammonium) chloridu PDDA (p.a., 20%, Sigma-Aldrich) byl použit jako mezivrstva k modifikaci skleněného substrátu.

Pro čištění substrátů využívaných pro metodu layer by layer byl použit piranha roztok, tedy směs kyseliny sírové H_2SO_4 (p.a., 96%, Lach-Ner) a peroxidu vodíku H_2O_2 (p.a., 30%, Penta) v poměru 3:1.

7. Přístrojové vybavení

Velikost a distribuce připravených nanočástic stříbra byla měřena metodou DLS (dynamický rozptyl světla) na přístroji NanoBrook 90Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corp., USA). UV/VIS spektra koloidních roztoků nanočástic stříbra byla měřena pomocí UV-VIS spektrofotometru Specord S 600 (Analytik Jena, Germany). Struktura povrchu připravených vzorků byla charakterizována skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) Hitachi SU6600 (Hitachi, Japan). Koncentrace stříbra na povrchu vzorků byla stanovena atomovým absorpčním spektrometrem (AAS) ContrAA 300 (Analytik Jena, Germany). Sonochemická redukce byla provedena pomocí sonikátoru Q700 (QSonica LLC, USA).



Obr. 34: SEM Hitachi SU6600



Obr. 35: sonikátor Q700

8. Příprava nanočástic stříbra a jejich aplikace na povrch titanu

8.1. Přímá redukce

Vrstvy nanočástic stříbra byly připraveny modifikovaným Tollensovým procesem, který spočívá v redukci amoniakálního komplexu redukujícím sacharidem. Postup byl optimalizován zvolením nejvhodnějších koncentrací reaktantů, aby bylo dosaženo co nejlepšího výsledku při tvorbě vrstev nanočástic na povrchu substrátu. Nejprve byl připraven roztok A, což byla směs 15 ml 0.1M AgNO_3 a 10 ml 0.5M NH_3 . Redukce roztoku A byla inicializována přidáním roztoku B, což byla směs 5ml 1.1M redukujícího sacharidu, 10 ml 1M NaOH a 10 ml H_2O . Redukujícím sacharidem byla buď maltóza nebo glukóza. Reakce probíhala při teplotě 22 °C a $\text{pH} = 12.0$, tedy v zásaditém prostředí. Reakční systém byl po celou dobu reakce (5 minut) míchán pomocí magnetické míchačky. Dále byla vyzkoušena poloviční koncentrace (0.05M AgNO_3 , 0.25M NH_3 , 0.55M sacharid, 0.5M NaOH) a čtvrtinová koncentrace oproti původní (0.025M AgNO_3 , 0.125M NH_3 , 0.275M sacharid, 0.25M NaOH). Jako substrát byla nejprve použita mikroskopická sklíčka (obr. 36) a po optimalizaci postupu byly jako finální substráty použity titanové disky o průměru 15 mm, vyrobené ze slitiny TiAl6V4 (obr. 37), které byly dodány z ortopedické kliniky LF UP Olomouc. Tyto dva druhy substrátu byly použity ve všech metodách přípravy. Během experimentů byla sklíčka vložena do kádinky a opřena o její stěnu. Titanové disky byly do reakční kádinky zavěšeny.



Obr. 36: Mikroskopické sklíčko



Obr. 37: Titanový disk

V rámci optimalizace metody přímé redukce nanočástic stříbra na zvoleném substrátu byly rovněž provedeny tři různé úpravy povrchu substrátu. Úpravy povrchu byly prováděny jednak z důvodu odmaštění substrátu pomocí saponátu a roztoku K_2CO_3 , a rovněž z důvodu aktivace (tvorba redukčních center) substrátu pomocí roztoku $SnCl_2$. První skupina substrátů byla před aplikací pouze přečištěna saponátem, opláchnuta destilovanou vodou a následně vložena do reakční kádinky k přípravě vrstvy nanočástic stříbra. Reakce probíhala v plastové kádince namísto skleněné, aby se zamezilo navazování nanočástic stříbra na skleněném povrchu. Druhá skupina substrátů byla po přečištění v saponátu a opláchnutí v destilované vodě vložena do 1% [w/w] aktivačního roztoku $SnCl_2$. Po aktivaci a opláchnutí destilovanou vodou byly substráty vloženy do reakční kádinky k přípravě vrstvy nanočástic stříbra. Třetí skupina substrátů byla po přečištění v saponátu a opláchnutí v destilované vodě vložena do vroucího nasyceného roztoku K_2CO_3 . Po opláchnutí destilovanou vodou byly substráty vloženy do 1% [w/w] roztoku $SnCl_2$ a po opětovném opláchnutí do reakční kádinky k přípravě vrstvy nanočástic stříbra.

8.2. Sonochemická redukce

Vrstvy nanočástic stříbra byly opět připraveny modifikovaným Tollensovým procesem, v tomto případě navíc za využití sonikátoru. Postup byl optimalizován zvolením nejvhodnějších koncentrací reaktantů. Po smíchání 1 ml 0.5M $AgNO_3$, 22.7 ml H_2O , 1 ml 0.5M redukujícího sacharidu byla zahájena sonikace se současným přidáním 0.3 ml 0.2M NH_3 . Redukujícím sacharidem byla buď maltóza nebo glukóza. Frekvence ultrazvuku byla nastavena na hodnotu 20 kHz a intenzita na 200 W, doba sonikace byla 5 minut. Substráty byly před aplikací přečištěny saponátem, opláchnuty destilovanou vodou a vloženy do reakční kádinky k přípravě vrstvy nanočástic stříbra. Sklíčka byla po vložení opřena o stěnu reakční kádinky. Titanové disky byly do kádinky zavěšeny.

Při této metodě se skla ani titanové disky nijak neaktivovaly. Následně byla vyzkoušena poloviční (0.25M AgNO₃, 0.25M sacharid a 0.1M NH₃) a čtvrtinová koncentrace (0.125M AgNO₃, 0.125M sacharid a 0.05M NH₃).

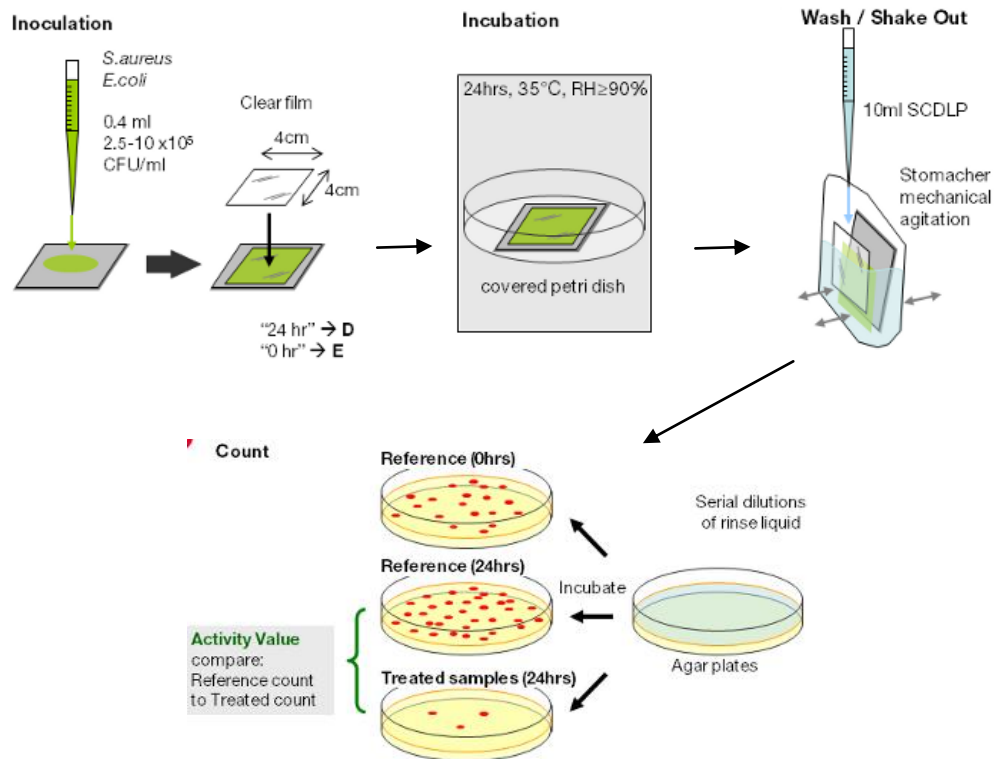
8.3. Layer by layer

Vrstvy nanočástic stříbra byly rovněž připraveny za využití modifikovaného Tollensova procesu. Metoda layer by layer spočívá v opakovaném nanášení vrstev látek s opačným nábojem, tedy polymeru a koloidní disperze nanočástic stříbra. Bylo připraveno 500 ml koloidní disperze smícháním 100 ml 0.005M AgNO₃, 25 ml 0.1M NH₃, 255 ml H₂O, 20 ml 0.29M NaOH a 100 ml 0.05M sacharidu. Redukujícím sacharidem byla v tomto případě maltóza. Reakce probíhala při teplotě 22 °C. Jako substrát byla opět použita mikroskopická sklíčka a titanové disky (slitina TiAl6V4). Substráty byly před aplikací přečišťovány dvěma způsoby. V prvním případě byly substráty omyty saponátem a po opláchnutí destilovanou vodou byly ještě očištěny 15 minut piranha roztokem. V druhém případě byly substráty očištěny pouze samotným piranha roztokem. Po opláchnutí destilovanou vodou byly takto přečištěné substráty vloženy do 0.5% roztoku PDDA na dobu 120 minut a po dalším opláchnutí destilovanou vodou do připravené koloidní disperze nanočástic Ag rovněž na dobu 120 minut. Tímto postupem byly připraveny substráty s jednou vrstvou nanočástic. Opakováním těchto kroků byly následně připraveny substráty se dvěma a třemi vrstvami.

8.4. Stanovení antibakteriální aktivity

Antibakteriální účinnost nanočástic stříbra na povrchu substrátu byla testována proti bakteriálním kmenům *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus aureus* CCM 3953. Testování proběhlo podle normy ISO 22196 - Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces (obr. 38). Testování proti *Escherichia coli* a proti *Staphylococcus aureus* bylo provedeno u všech vzorků (metoda přímé redukce s glukózou i maltózou, metoda

sonochemické redukce s glukózou i maltózou, metoda layer by layer s maltózou). Vzorky byly nejprve sterilizovány v autoklávu a poté inokulovány bakteriální suspenzí naředěnou fyziologickým roztokem. Inkubace probíhala při teplotě 35 °C po dobu 24 hodin. Poté byl odečten počet CFU (colony forming unit) a přepočten na CFU/cm². CFU se používá pro vyjádření počtu mikroorganismů ve vzorcích, označuje počet jednotek tvořících bakteriální kolonie.



Obr. 38: Schéma testování antibakteriální aktivity dle normy ISO 22196

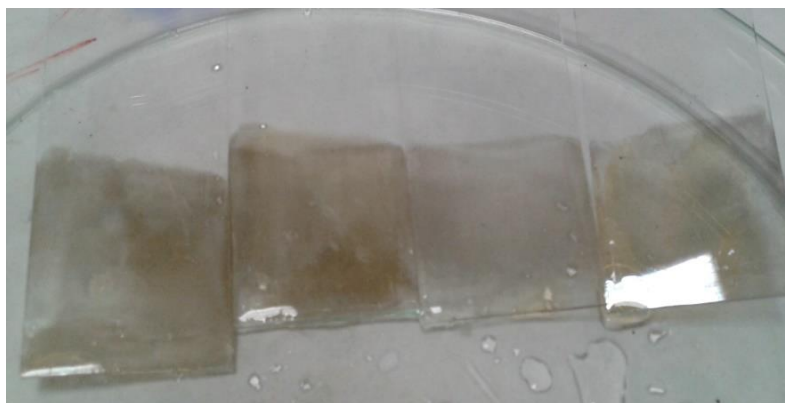
9. Výsledky a diskuze

9.1. Vliv koncentrací reaktantů na vznik vrstev

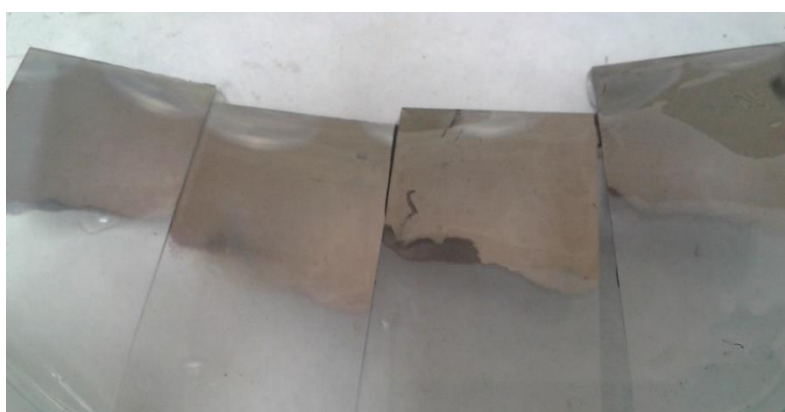
U metody přímé redukce byly původní koncentrace 0.1M AgNO₃, 0.5M NH₃, 1.1M redukující sacharid a 1M NaOH. Obsah stříbra ve výsledném roztoku byl však příliš vysoký (obr. 39) a po redukci docházelo k agregaci nanočástic stříbra, proto byly upraveny koncentrace jednotlivých složek na polovinu (0.05M AgNO₃, 0.25M NH₃, 0.55M sacharid, 0.5M NaOH) a následně na čtvrtinu (0,025M AgNO₃, 0.125M NH₃, 0.275M sacharid, 0.25M NaOH). Čtvrtinové koncentrace však byly vyhodnoceny jako nevyhovující, jelikož vrstva stříbra na substrátu nebyla dostatečně hustá a homogenní (obr. 40). V dalších experimentech pro úpravu titanových disků byly používány koncentrace poloviční, jelikož při těchto koncentracích docházelo ke tvorbě homogenní vrstvy nanočástic stříbra na substrátech, aniž by docházelo k agregaci nanočástic stříbra na povrchu substrátu či v disperzi (obr. 41).



Obr. 39: Mikroskopické sklíčko s vrstvou stříbra, původní koncentrace



Obr. 40: Mikroskopická sklíčka s vrstvou stříbra, čtvrtinová koncentrace



Obr. 41: Mikroskopická sklíčka s vrstvou stříbra, poloviční koncentrace

Při sonochemické redukci byly původní koncentrace 0.5M AgNO_3 , 0.5M sacharidu a 0.2M NH_3 . Obsah stříbra ve výsledném roztoku byl příliš vysoký a docházelo k agregaci nanočástic stříbra (obr. 42). Proto byly upraveny koncentrace jednotlivých reakčních složek na polovinu (0.25M AgNO_3 , 0.25M sacharid a 0.1M NH_3) a následně na čtvrtinu oproti původní koncentraci. Čtvrtinové koncentrace (0.125M AgNO_3 , 0.125M sacharid a 0.05M NH_3) však již byly příliš nízké a na substrátech se nevytvořila dostatečná vrstva nanočástic stříbra (obr. 43). Proto se při všech zbylých experimentech používala poloviční koncentrace, tedy 0.25M AgNO_3 , 0.25M sacharid a 0.1M NH_3 . Při redukci docházelo k tvorbě souvislé a homogenní vrstvy nanočástic Ag na substrátech, aniž by docházelo k agregaci nanočástic stříbra na povrchu substrátu či v disperzi (obr. 44 a 45).



Obr. 42: Mikroskopické sklíčko s vrstvou stříbra, původní koncentrace



Obr. 43: Mikroskopické sklíčko s vrstvou stříbra, čtvrtinová koncentrace

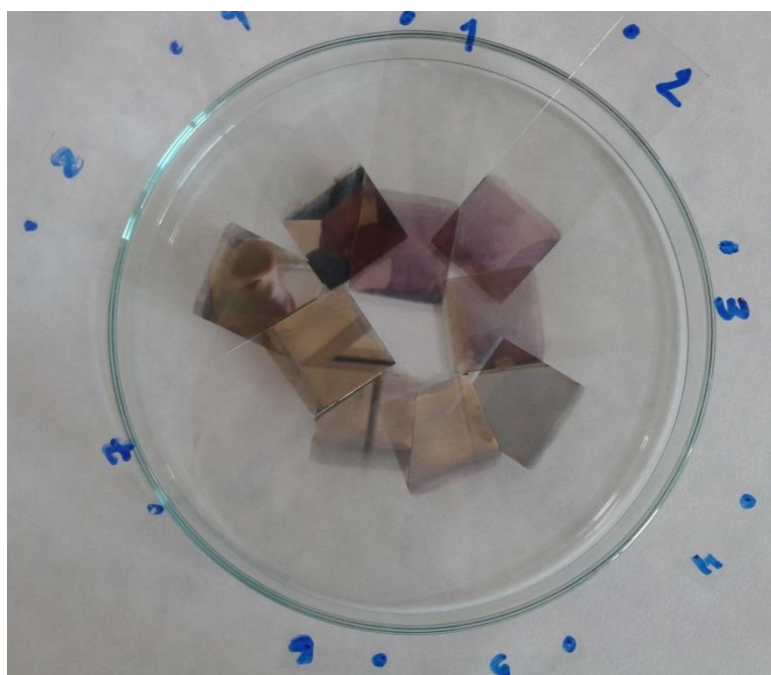


Obr. 44: Mikroskopická sklíčka s vrstvou stříbra, poloviční koncentrace, glukóza



Obr. 45: Mikroskopická sklíčka s vrstvou stříbra, poloviční koncentrace, maltóza

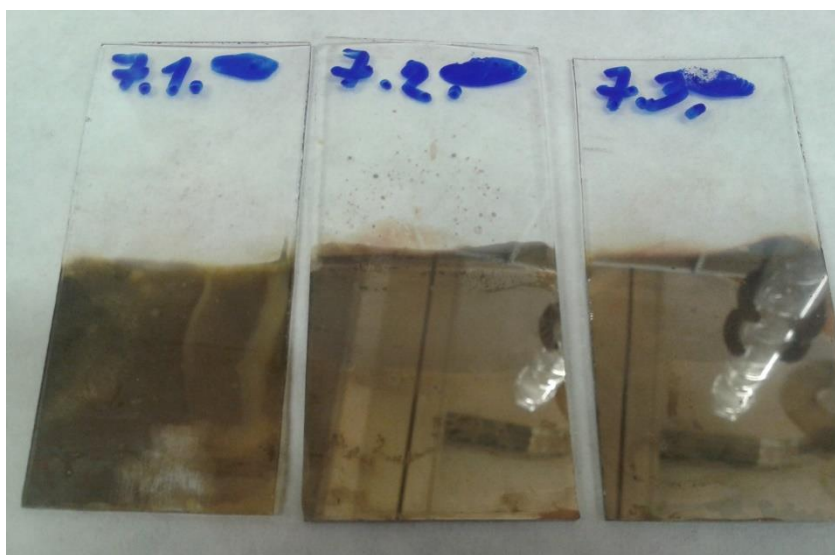
Metoda layer by layer již byla ověřená, nebylo potřeba ji optimalizovat. Proto byly u této metody použity pouze jedny koncentrace a jako redukující sacharid byla použita pouze maltóza. Po jedné aplikaci se na substrátu nevytvořila dostatečná a homogenní vrstva nanočástic. Substráty po druhé a třetí aplikaci již měly na svém povrchu dostatečnou vrstvu (obr. 46). Pro podrobnější výzkum byly proto vybrány substráty se třemi vrstvami, u kterých se daly předpokládat nejlepší výsledky.



Obr. 46: Mikroskopická sklíčka s vrstvami stříbra (1,2,3 – 1 vrstva, 4,5,6 – 2 vrstvy, 7,8,9 – 3 vrstvy)

9.2. Vliv čištění a aktivace substrátů na vznik vrstev

Čištění a aktivace substrátu se optimalizovaly především u metody přímé redukce. Pro spolehlivou přípravu vrstvy je nutné používat substrát dokonale očištěný od mechanických nečistot a dokonale odmaštěný. Byly provedeny dva různé typy čištění a odmaštění povrchu substrátu, a to čištění a odmaštění pouze saponátem, a čištění a odmaštění saponátem a následně uhličitánem draselným. Použití K_2CO_3 se však na kvalitě tvorby vrstvy nanočástic Ag nijak neprojevalo, výsledky se nijak nelišily a byly srovnatelné s výsledky substrátů odmaštěných pouze saponátem. Tento krok tak byl označen za nadbytečný a u dalších experimentů byl proto pro čištění a odmaštění používán pouze saponát. Pro aktivaci substrátů podporující redukci stříbra spočívající v tvorbě zárodečných center se používal 1% [w/w] roztok chloridu cínatého $SnCl_2$. Po aplikaci tohoto roztoku byla vzniklá vrstva nanočástic stříbra výrazně hustší (obr. 47). Nanočástice stříbra se díky aktivaci pomocí $SnCl_2$ na substrát vázaly lépe než na substráty bez jeho použití. Vzniklá vrstva byla hustější a homogennější, proto byla tato aktivace ve všech zbylých experimentech nadále využívána.



Obr. 47: Mikroskopická sklíčka s různým postupem čištění a aktivace (vlevo pouze saponát, uprostřed saponát a $SnCl_2$, vpravo saponát, K_2CO_3 a $SnCl_2$)

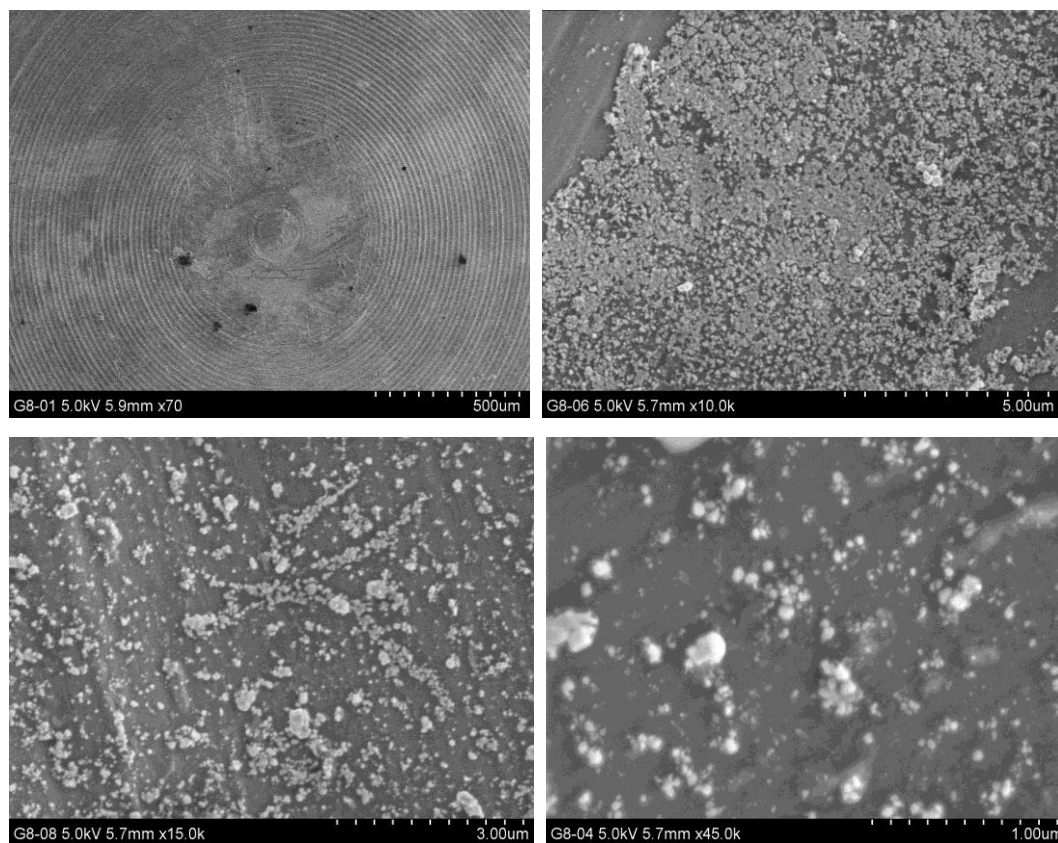
U sonochemické redukce se žádná aktivace mikroskopických sklíček a titanových disků neprováděla. Vycházelo se z výsledků čištění skla získaných v rámci metody přímé redukce. Použití ultrazvuku způsobilo vibrace částic koloidní disperze a vznik jevu zvaného akustická kavitace. Kmity plynových kavitačních mikrobublin zvýšily rychlost pohybujících se nanočástic. Při kolapsu bublin byly nanočástice stříbra přeneseny velkou rychlostí na povrch substrátu. Metoda layer by layer již byla optimalizována a žádná další aktivace kromě aplikace PDDA se u této metody nepoužívala. Co se týká čištění substrátů, zde byly vyzkoušeny dva postupy. Čištění piranha roztokem, a čištění saponátem a následně piranha roztokem. Výsledky těchto dvou čištění byly totožné a to z důvodu, že piranha roztok je velmi silné a účinné oxidační činidlo, a tak je jakékoliv předcházející čištění zbytečné. Proto byly substráty pro zbývající experimenty u této metody čištěny pouze v piranha roztoku, tedy směsi kyseliny sírové a peroxidu vodíku.

9.3. Charakterizace připravených vrstev

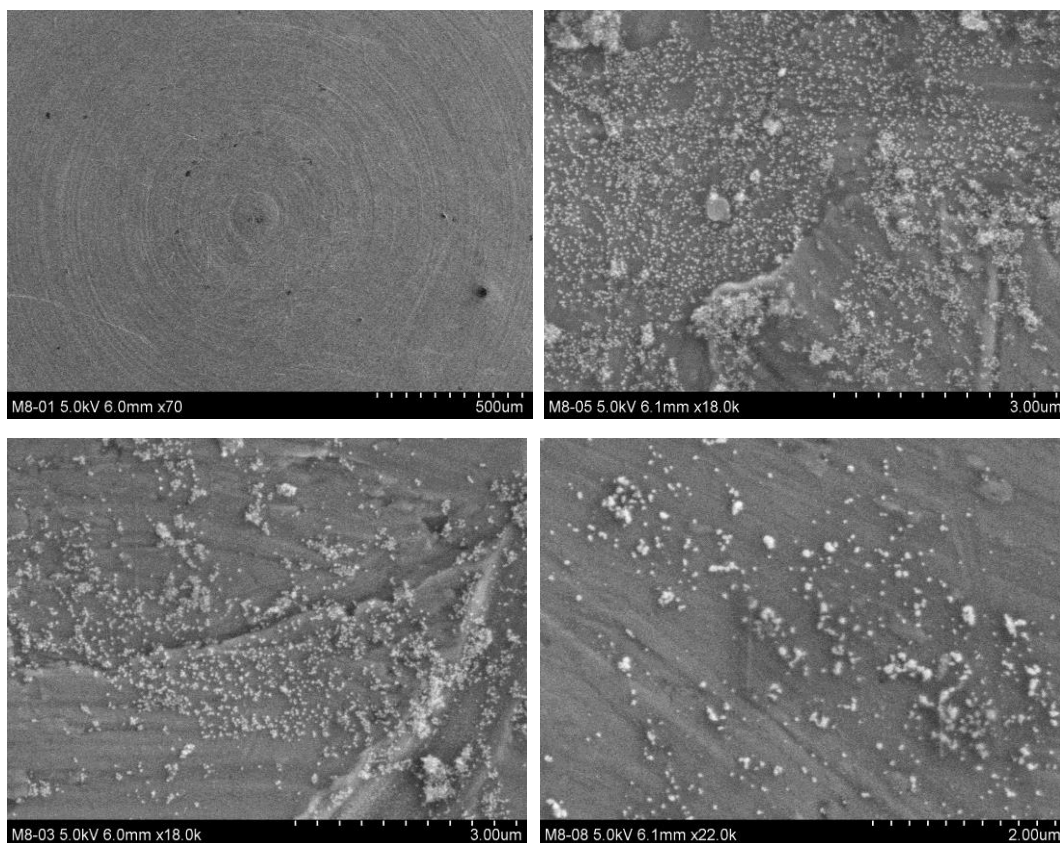
Po optimalizaci tvorby vrstvy nanočástic stříbra na mikroskopických sklíčkách a její charakterizaci bylo přikročeno k úpravě titanových disků vrstvou nanočástic stříbra a k její charakterizaci.

Charakterizace povrchu titanových disků pomocí SEM byla provedena u všech použitých metod a obou redukujících sacharidů. Na obrázku 48 je zobrazen povrch titanového disku s vrstvou nanočástic stříbra navázanou pomocí metody přímé redukce za použití glukózy jako redukujícího sacharidu. Na obrázku 49 je vrstva získaná stejnou metodou za použití maltózy. Ze snímků povrchu titanových disků je patrné, že se vrstva nanočástic stříbra vytvořila v dostatečném množství na celém povrchu substrátu. Metodou přímé redukce se na titanu vytvořila vrstva nanočástic stříbra, jejichž velikost se pohybovala mezi 20 a 60 nanometry. I když i s použitím maltózy jako redukujícího sacharidu se na substrátu vytvořila dostatečná vrstva, ve srovnání s použitím glukózy je tato vrstva a koncentrace stříbra mnohem nižší.

Tato metoda může být vyhodnocena jako vhodná pro depozici stříbrných nanočástic na povrch titanu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití glukózy jako redukující látky.



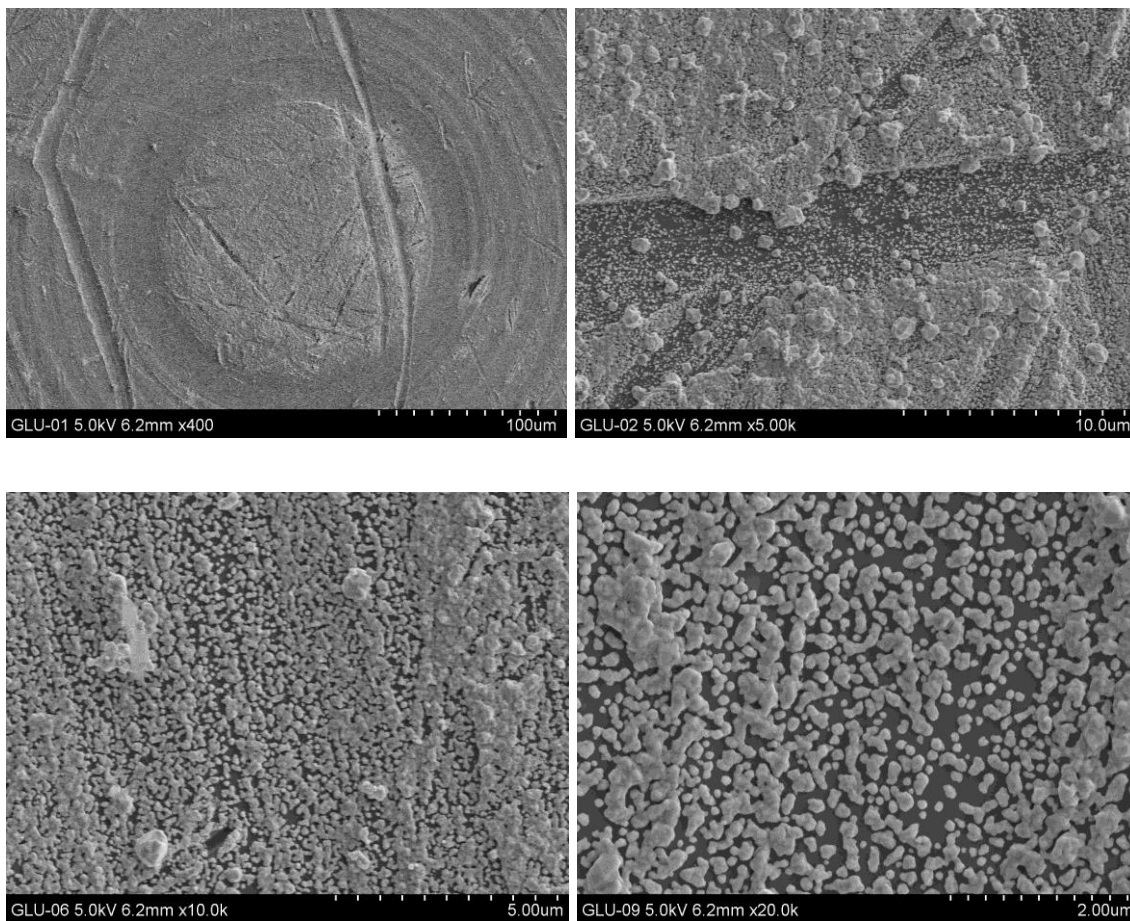
Obr. 48: SEM snímky vrstvy nanočástic Ag připravených přímou redukcí s glukózou



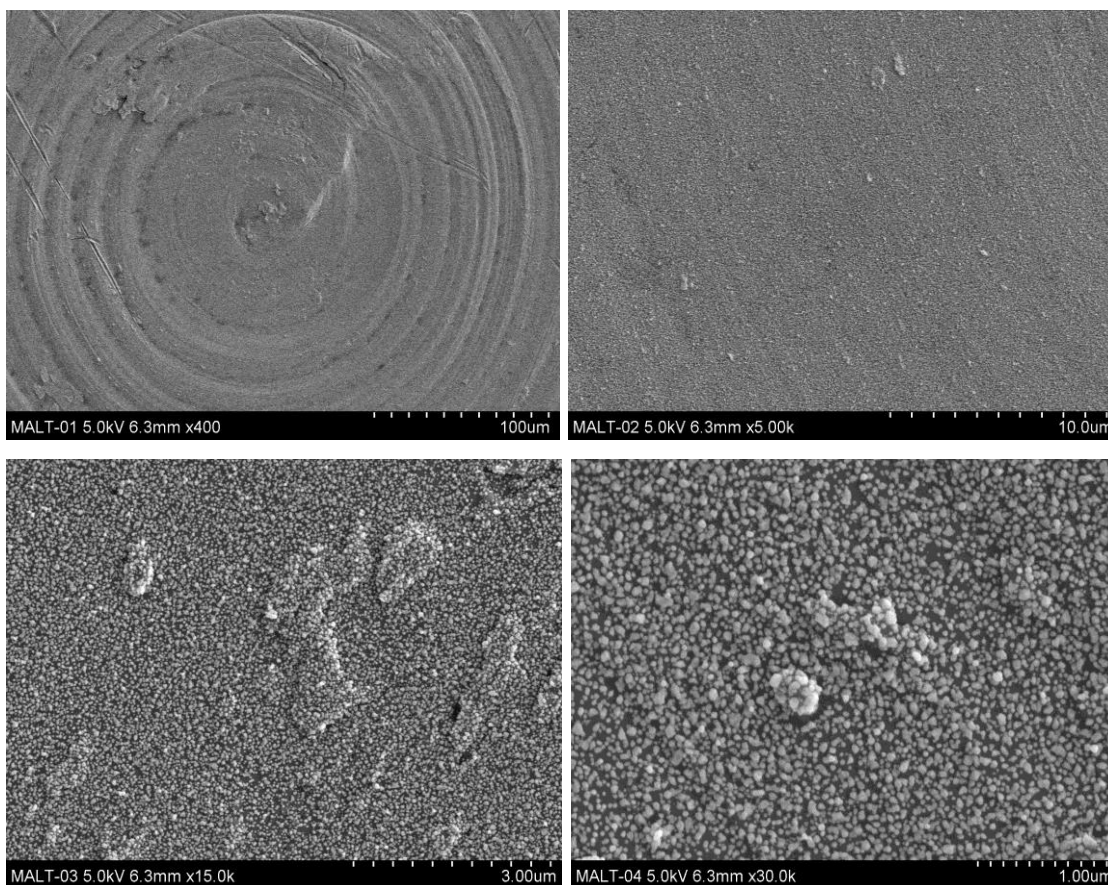
Obr. 49: SEM snímky vrstvy nanočástic Ag připravených přímou redukcí s maltózou

Na obrázku 50 je zobrazen povrch titanového disku s vrstvou nanočástic stříbra navázanou pomocí metody sonochemické redukce za použití glukózy jako redukujícího sacharidu. Na obrázku 51 je vrstva získaná stejnou metodou za použití maltózy. Metodou sonochemické redukce se na titanu vytvořila vrstva nanočástic stříbra, které měly velikost mezi 20 a 80 nm. S použitím glukózy jako redukujícího sacharidu se na povrch titanu naváže několikanásobně vyšší množství stříbra než při použití maltózy.

Při chemické redukci za využití sonikace se na povrchu titanových disků vytvořila nehomogennější vrstva nanočástic stříbra ze všech testovaných metod. Vrstva byla po celém povrchu substrátu ve vysoké koncentraci. Tato metoda může být vyhodnocena jako nejideálnější pro depozici stříbrných nanočástic na povrch titanového substrátu.

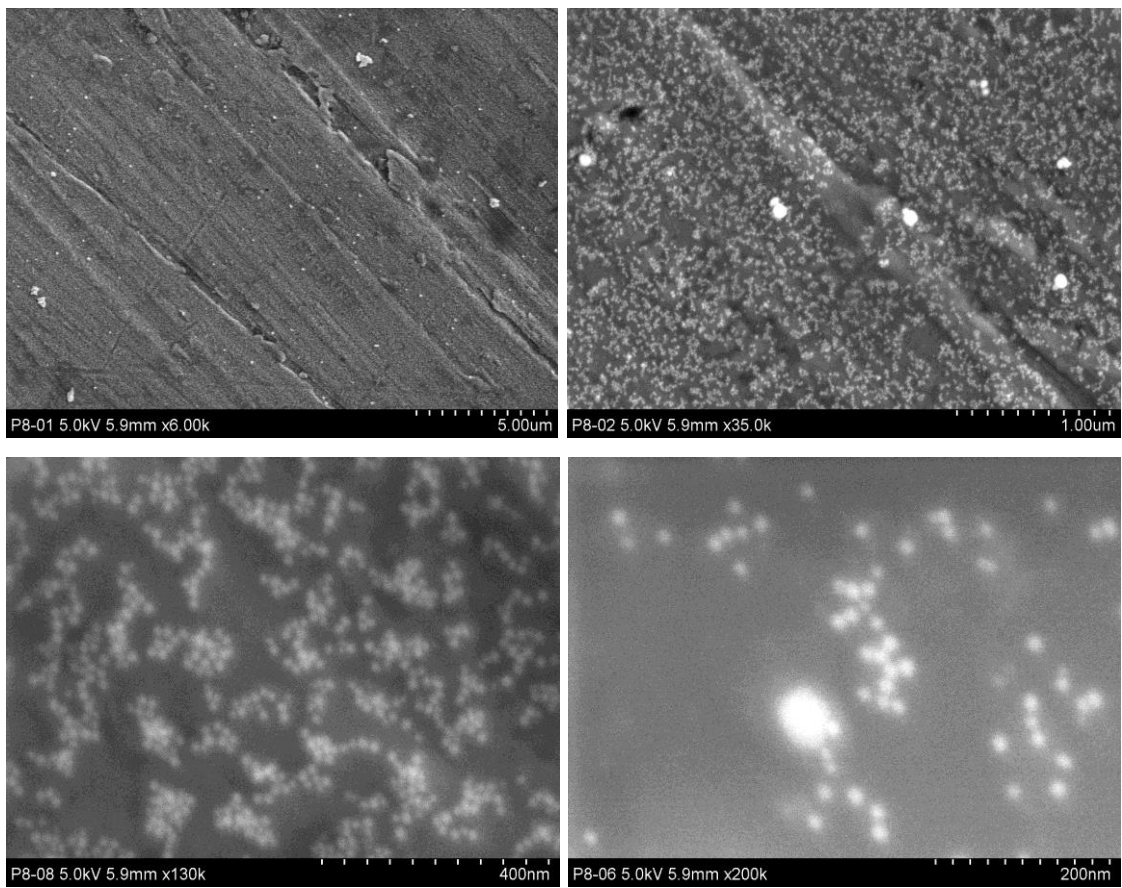


Obr. 50: SEM snímky vrstvy nanočástic Ag připravených sonochemickou redukcí s glukózou



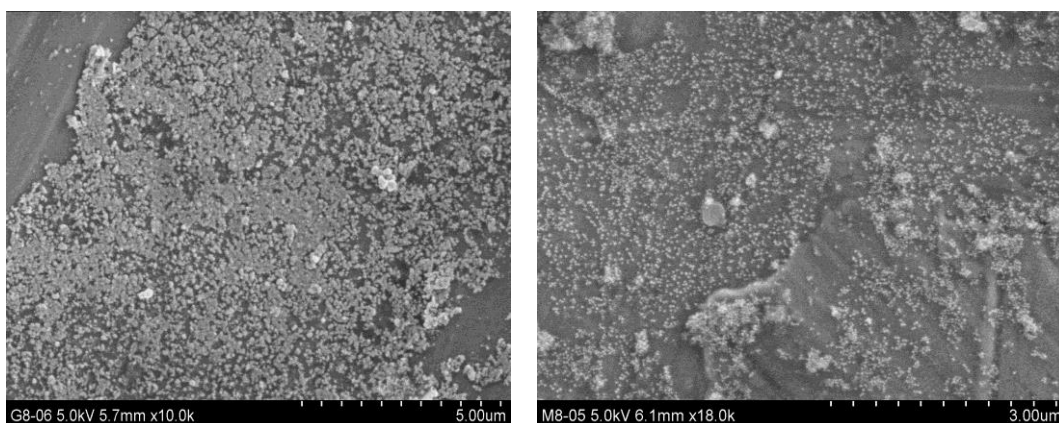
Obr. 51: SEM snímky vrstvy nanočástic Ag připravených sonochemickou redukcí s maltózou

Na obrázku 52 je zobrazen povrch titanových disků s vrstvou nanočástic stříbra navázanou pomocí metody layer by layer. Ze snímků je možné vyzorovat, že metodou layer by layer nebyla na povrch titanových disků navázána dostatečná vrstva nanočástic stříbra. Imobilizací pomocí polymeru byly na povrch substrátu navázány nanočástice o velikosti 28 nm. Tato metoda byla testována s maltózou jako redukujícím sacharidem. Jelikož se na povrchu titanu nevytvořila souvislá vrstva nanočástic stříbra, je nutné tuto metodu vyhodnotit jako méně vhodnou.

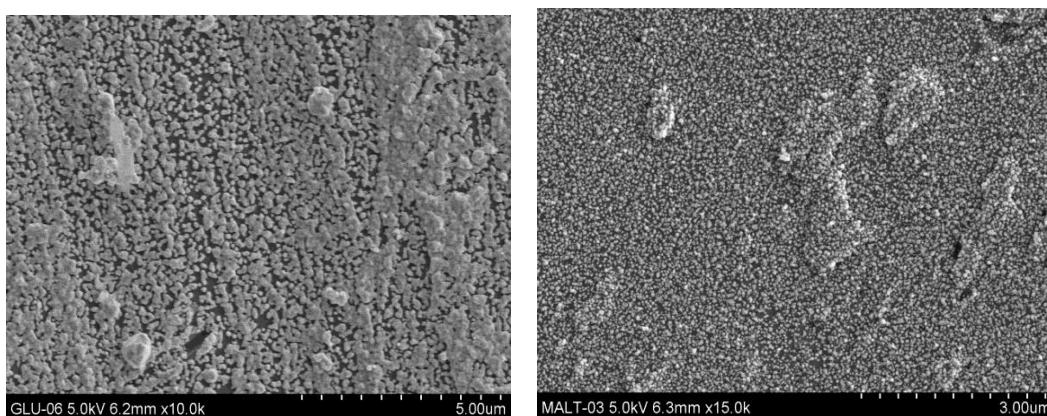


Obr. 52: SEM snímky vrstvy nanočástic Ag připravených metodou layer by layer

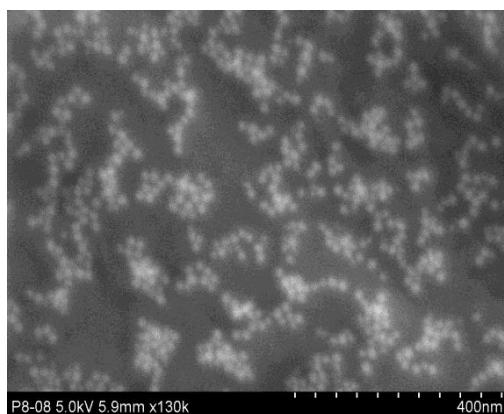
Srovnání metod:



Obr. 53: Vrstvy Ag připravené přímou redukcí s glukózou (vlevo) a maltózou (vpravo)



Obr. 54: Vrstvy Ag připravené sonochemickou redukcí s glukózou (vlevo) a maltózou (vpravo)

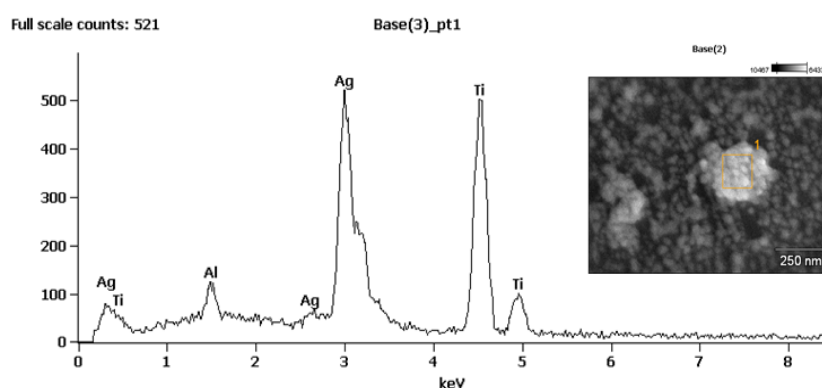


Obr. 55: Vrstva Ag připravená metodou layer by layer s maltózou

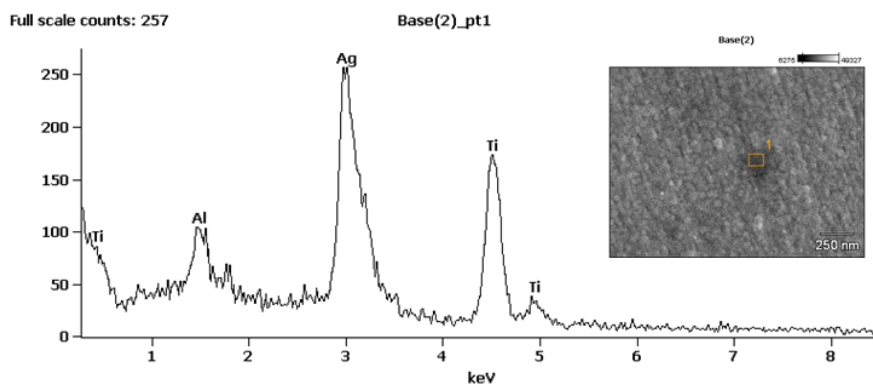
Příprava vrstev nanočástic stříbra na povrch substrátu byla provedena třemi různými metodami. Metodou přímé redukce, sonochemické redukce a metodou layer by layer (obr. 53–55). Pomocí přímé a sonochemické redukce byly připraveny homogenní vrstvy po celém povrchu substrátu. Stříbro se na povrch

titanu navázalo v dostatečném množství. Lepších výsledků bylo dosaženo při použití glukózy jako redukujícího sacharidu. Metodou layer by layer nebyly nanočástice stříbra navázány po celém povrchu substrátu. Nejvhodnější metodou pro depozici nanočástic tak byla vyhodnocena sonochemická redukce a následně redukce přímá. Nejméně vhodnou metodou naopak metoda layer by layer.

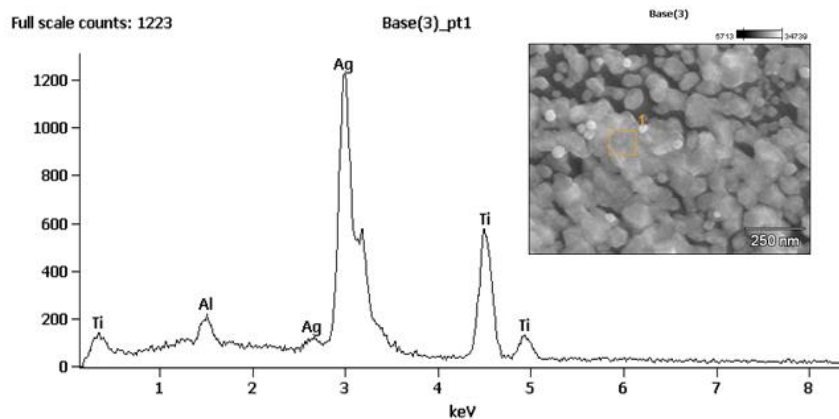
V rámci charakterizace vrstev nanočástic stříbra byla také provedena prvková analýza pomocí energiově disperzního analyzátoru (obr. 56–60).



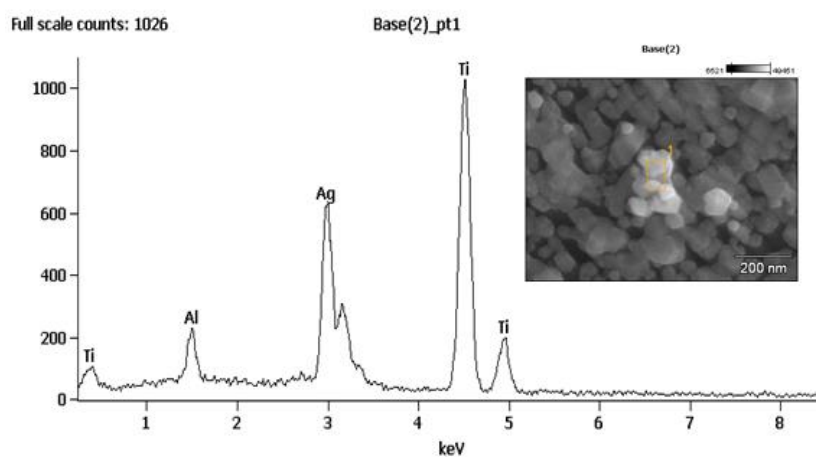
Obr. 56: EDAX spektrum – přímá redukce, glukóza



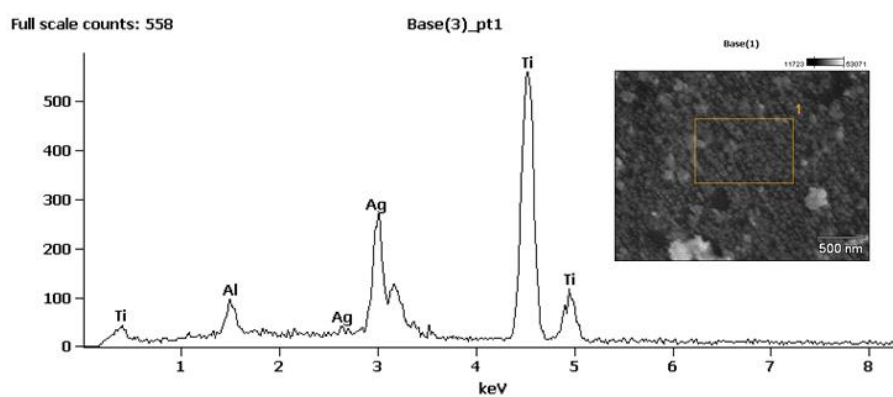
Obr. 57: EDAX spektrum – přímá redukce, maltóza



Obr. 58: EDAX spektrum – sonochemická redukce, glukóza



Obr. 59: EDAX spektrum – sonochemická redukce, maltóza



Obr. 60: EDAX spektrum – layer by layer

Píky ve spektrech odpovídaly jednotlivým prvkům a jejich výška odpovídala koncentraci daného prvku ve vzorku. Z jednotlivých spekter byl patrný výskyt titanu, hliníku a stříbra. Titan a hliník byly součástí materiálu, ze kterého byl vyroben substrát. Největší množství stříbra vykazovala vrstva připravená metodou sonochemické redukce s použitím glukózy (obr. 58). Naopak nejmenší množství stříbra je patrné u vrstvy připravené metodou layer by layer (obr. 60).

Následně byly porovnány velikosti nanočástic stříbra připravených pomocí jednotlivých metod. Jelikož se u metody layer by layer používala nízká koncentrace stříbra (0.005M AgNO₃), byl vytvořený systém monodisperzní. U metod přímé a sonochemické redukce byla koncentrace stříbra několikanásobně vyšší (0.05M a 0.25M AgNO₃), proto nebyl připravený koloidní roztok zcela monodisperzní. U těchto metod se navíc používaly dvě různé redukující látky, a proto se velikost nanočástic pohybovala v rozmezí desítek nanometrů, viz tabulka 4.

Tab. 4: Velikost částic stříbra ve vrstvě u jednotlivých metod

Metoda	Velikost částic (nm)
Přímá redukce	20 - 60
Sonochemická redukce	20 - 80
Layer by layer	28

Dále byly porovnány velikosti připravených nanočástic v závislosti na použitém redukujícím sacharidu. Jelikož připravené systémy nebyly zcela monodisperzní, pro porovnání se vybrala velikost těch částic, které se v systému vyskytovaly nejčastěji, viz tabulka 5.

Tab. 5: Velikost částic u jednotlivých metod v závislosti na sacharidu

Metoda, použitý sacharid	Velikost částic (nm)
Přímá redukce, glukóza	35
Přímá redukce, maltóza	30
Sonochemická redukce, glukóza	40
Sonochemická redukce, maltóza	35

Metodou přímé redukce vznikaly obecně menší nanočástice stříbra než metodou sonochemické redukce. Jednalo se však pouze o rozdíly v jednotkách nanometrů. Při použití glukózy jako redukujícího sacharidu vznikaly u obou metod větší nanočástice než při použití maltózy.

Pomocí atomové absorpční spektrometrie (AAS) bylo stanoveno množství stříbra navázané na povrchu titanových disků ve vrstvách, připravených metodami přímé redukce, sonochemické redukce a metodou layer by layer. Koncentrace byla stanovena po nalezení optimálních koncentrací pro přípravu nejlepší vrstvy. Hodnoty koncentrací stříbra jsou uvedeny v $\mu\text{g}/\text{disk}$ v tabulce 6, kde označení *G* znamená použití glukózy jako redukujícího sacharidu, *M* znamená použití maltózy, *PR* označuje použití metody přímé redukce, *S* označuje použití metody sonochemické redukce, *LbL* označuje metodu layer by layer a *SD* směrodatnou odchylku (standard deviation).

Tab. 6: Množství Ag na povrchu titanu

Metoda	Koncentrace Ag	
	Průměr	SD
M - PR	33.4	9.54
G - PR	311.13	28.99
M - S	83.79	5.21
G - S	968.26	72.41
M - LbL	12.61	2.29

Z tabulky 6 je patrné, že v případě aplikace metody layer by layer s použitím polymeru PDDA (poly(diallyldimethylammonium) chlorid) bylo navázáno na povrch titanu nejméně stříbra. I když se jednalo o vzorky se třemi navázanými vrstvami, byla průměrná hodnota množství stříbra na povrchu disků pouze kolem 12 $\mu\text{g Ag/disk}$. Při přímé redukci s maltózou byla koncentrace stříbra rovněž nízká, ale při použití glukózy jako redukujícího sacharidu došlo k několikanásobnému navýšení. U sonochemické redukce se s použitím maltózy sice naváže více stříbra než při použití PDDA a metody přímé redukce s maltózou, koncentrace však stále není příliš vysoká. Stejná metoda s použitím glukózy naopak vykazuje nejvyšší koncentraci stříbra na povrchu substrátu (968.26 $\mu\text{g/disk}$) a může být proto vyhodnocena jako nejlepší a nejvhodnější ze všech zkoumaných metod pro depozici vrstvy nanočástic stříbra.

9.4. Antibakteriální aktivita

Stanovení antibakteriální aktivity nanočástic stříbra na povrchu substrátu a výpočet antimikrobiální aktivity R byly provedeny podle normy ISO 22196. Zjištěné hodnoty CFU/cm^2 a R jsou uvedeny v tabulkách 7 a 8, kde označení G znamená použití glukózy jako redukujícího sacharidu, M znamená použití maltózy, PR označuje použití metody přímé redukce, S označuje použití metody sonochemické redukce, LbL označuje metodu layer by layer a číslo v závorce označuje počet vrstev.

Tab. 7: Mikrobiální testování pro *E. coli* CCM 3954

	Počet CFU/10	CFU/cm²	log	R
substrát t = 0	280	70 000	4.84509804	
substrát	122	30 500	4.48429984	
G1 - PR		10	1	3.48
G2 - PR		10	1	3.48
G3 - PR		10	1	3.48
M1 - PR		10	1	3.48
M2 - PR		10	1	3.48
M3 - PR		10	1	3.48
G4 - S		10	1	3.48
G5 - S		10	1	3.48
G6 - S		10	1	3.48
M4 - S		10	1	3.48
M5 - S		10	1	3.48
M6 - S		10	1	3.48
M7 - LbL (1)	44	11 000	4.04139269	0.23
M8 - LbL (2)	0	10		3.27
M9 - LbL (3)	0	10		3.27

Tab. 8: Mikrobiální testování pro *S. aureus* CCM 3953

	Počet CFU/10	CFU/cm ²	log	R
substrát t = 0	280	70000	4,84509804	
substrát	122	30500	4,48429984	
G1 - PR		10	1	3,48
G2 - PR		10	1	3,48
G3 - PR		10	1	3,48
M1 - PR		10	1	3,48
M2 - PR		10	1	3,48
M3 - PR		10	1	3,48
G4 - S		10	1	3,48
G5 - S		10	1	3,48
G6 - S		10	1	3,48
M4 - S		10	1	3,48
M5 - S		10	1	3,48
M6 - S		10	1	3,48
M7 - LbL (1)	44	11 000	4.04139269	0.23
M8 - LbL (2)	0	10		3.27
M9 - LbL (3)	0	10		3.27

Z výsledků je patrné, že veškeré vzorky připravené pomocí přímé redukce a sonochemické redukce mají vysokou antibakteriální aktivitu, což potvrzují vysoké hodnoty koeficientu R ($R = 3.48$). Druh použitého redukujícího sacharidu nemá na tuto aktivitu žádný vliv. Vrstva nanočástic stříbra na všech substrátech má skvělou antibakteriální účinnost proti oběma testovaným kmenům bakterií (*E. coli* a *S. aureus*). Substráty s jednou vrstvou nanočástic stříbra připravené pomocí metody layer by layer vykazují velmi nízkou antibakteriální aktivitu ($R = 0.23$). Jejich antibakteriální účinnost je nedostačující. Substráty připravené touto metodou vykazují dostatečnou antibakteriální účinnost teprve při nanesení druhé a třetí vrstvy nanočástic. Antibakteriální aktivita takto připravených vzorků je vysoká ($R = 3.27$). Příprava substrátů s více vrstvami nanočástic stříbra je však časově i materiálově náročná, proto tato metoda není pro budoucí využití v praxi ideální.

Závěr

Cílem této diplomové práce byla příprava, charakterizace a stanovení antibakteriální aktivity vrstev nanočástic stříbra nanesených na povrch titanové slitiny pomocí tří různých depozičních metod. Rovněž byl sledován vliv úpravy substrátu (čištění a aktivace) na tvorbu stříbrné vrstvy. Efektivita použitých metod byla posuzována na základě množství deponovaného stříbra, homogenity vrstvy nanesené na povrch titanové slitiny a velikosti částic stříbra tvořících vrstvu. Připravené vrstvy byly charakterizovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie, množství stříbra na povrchu substrátu bylo analyzováno metodou atomové absorpční spektrometrie.

K přípravě vrstev nanočástic stříbra byly použity metody přímé redukce, sonochemické redukce a metoda layer by layer. Po optimalizaci jednotlivých postupů na skleněném substrátu byly nanočástice stříbra navázány na disky z titanové slitiny. U metody přímé redukce byly vyzkoušeny tři různé koncentrace reaktantů. Jako nejvhodnější byly vyhodnoceny koncentrace 0.05M AgNO_3 , 0.25M NH_3 , 0.55M redukující sacharid a 0.5M NaOH . Při použití těchto koncentrací bylo dosaženo homogenní vrstvy s vysokým obsahem stříbra. Při sonochemické redukci byly rovněž vyzkoušeny tři různé koncentrace reaktantů. Jako nejvhodnější byly vyhodnoceny koncentrace 0.25M AgNO_3 , 0.25M sacharid a 0.1M NH_3 , při jejichž použití se vytvořila homogenní vrstva s vysokým obsahem stříbra. U metody layer by layer byly použity koncentrace 0.005M AgNO_3 , 0.1M NH_3 , 0.05M sacharid a 0.29M NaOH . Při využití této metody nebyla na povrch titanových disků navázána dostatečná vrstva nanočástic stříbra. Nejlepšího výsledku z pohledu kvality a kvantity připravené vrstvy v rámci všech použitých metod bylo dosaženo v případě sonochemické metody při redukci glukózou.

V případě úpravy a aktivace substrátu před deposicí vrstvy nanočástic bylo zjištěno, že u metody přímé redukce je použití K_2CO_3 nadbytečné a pro odmaštění substrátu postačuje použití saponátu. Nanočástice stříbra se na substrát navazovaly nejlépe po aktivaci substrátu pomocí SnCl_2 . U metody layer by layer

se pro čištění substrátu používal piranha roztok, jakékoli další čištění bylo vyhodnoceno jako nadbytečné. Jako mezivrstva k modifikaci substrátu byl použit roztok poly(diallyldimethylammonium) chloridu. Žádná další aktivace substrátu u této metody neproběhla.

Antibakteriální aktivita vůči bakteriím *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* byla u metod přímé a sonochemické redukce velmi vysoká ($R = 3.48$). U metody layer by layer byla při navázání jedné vrstvy antibakteriální aktivita nízká ($R = 0.23$), tato aktivita byla dostatečně vysoká až u vzorků se dvěma a třemi vrstvami nanočástic stříbra ($R = 3.27$).

Na základě výsledků dosažených v této diplomové práci lze konstatovat, že titanové kloubní náhrady pokryté nanočásticemi stříbra by mohly díky vynikajícím antibakteriálním účinkům zabránit komplikacím spojeným s bakteriální kolonizací titanových implantátů a se vznikem pooperačních infekcí u pacientů.

Summary

The main aim of this MA thesis was the preparation, characterization and assessment of antibacterial activity of the layers of silver nanoparticles applied to the surface of titanium alloy using three different deposition methods. Moreover, this thesis monitored the influence of substrate modification (cleaning and activation) on the formation of the silver layer. Efficiency of the methods used in this experiment was assessed based on the quantity of deposited silver, homogeneity of layers applied to the surface of titanium alloy and the size of silver particles which formed the layer. All the prepared layers were characterized by scanning electron microscopy and the amount of silver on the substrate surface was analyzed by atomic absorption spectrometry.

The layers of silver nanoparticles were prepared using the following methods: direct reduction, sonochemical reduction and the layer-by-layer method. After optimization of individual procedures on a glass substrate, the silver nanoparticles were transferred to discs made of titanium alloy. For the method of direct reduction three different concentrations of reactants were examined. These concentrations were evaluated as the most suitable ones: 0.05M AgNO_3 , 0.25M NH_3 , 0.55M reducing saccharide and 0.5M NaOH. Homogeneous layer with high content of silver was achieved while using these concentrations. For the method of sonochemical reduction three different concentrations of reactants were used as well. These concentrations were evaluated as the most suitable ones: 0.25M AgNO_3 , 0.25M saccharide and 0.1M NH_3 due to the fact that a homogeneous layer with high content of silver was created while using them. For the layer-by-layer method these concentrations were used: 0.005M AgNO_3 , 0.1M NH_3 , 0.05M saccharide and 0.29M NaOH. While using this method sufficient layer of silver nanoparticles was not formed on the surface of titanium discs. Considering all methods with regard to both quantity and quality of the prepared layer the best result was achieved in the case of sonochemical method with glucose reduction. In case of substrate modification and activation before the deposition of the layer of nanoparticles it was discovered that for the method of direct reduction it is

redundant to use K_2CO_3 as it is sufficient to use a detergent. Silver nanoparticles were best tied to the substrate after the activation with $SnCl_2$. For the layer-by-layer method piranha solution was used to clean the substrate, all further cleaning was evaluated as redundant. Poly(diallyldimethylammonium chloride) solution was used for the layer in between the substrate modification. No further substrate activation was used for this method.

The antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was very high for both the direct and sonochemical reduction methods ($R = 3.48$). With one layer tied during the layer-by-layer method the antibacterial activity was low ($R = 0.23$), this activity was sufficiently high only in samples with two or three layers of silver nanoparticles ($R = 3.27$).

Based on the results achieved in this MA thesis it can be stated that titanium joint replacements covered with silver nanoparticles could – due to its outstanding antibacterial effect – prevent complications connected with bacterial colonization of titanium implants and the development of post-surgery infections.

Seznam použité literatury

1. KVÍTEK, L.; PANÁČEK, A. *Základy koloidní chemie*. Univerzita Palackého v Olomouci. 1. vyd. 2007.
2. BARTOVSKÁ, L.; ŠIŠKOVÁ, M. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. VŠCHT Praha. 6. přeprac. vyd. 2010
3. PANÁČEK, A. *Řízená příprava a antibakteriální aktivita koloidních částic stříbra*. Dizertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci. 2006.
4. PRUCEK, R. *Řízená příprava koloidních částic stříbra*. Dizertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci. 2004.
5. KVÍTEK, L.; PRUCEK, R.; PANÁČEK, A.; SOUKUPOVÁ, J. *Nanočástice stříbra – příprava, vlastnosti a aplikace*. [online] http://konsys-t.tanger.cz/files/proceedings/nanocon_09/Lists/Papers/008.pdf [cit. 6. 2. 2016]
6. POUCHLÝ, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. VŠCHT Praha. 3. vyd. 2008.
7. KVÍTEK, L. *Metody studia koloidních soustav*. Univerzita Palackého v Olomouci. 1. vyd. 2006.
8. NOVÁK, J. *Fyzikální chemie*. VŠCHT Praha. 1. vyd. 2008.
9. [online] <http://www.nanoprotech.cz/historie-a-soucasnost-nanotechnologie/> [cit. 21. 2. 2016]
10. [online] http://nanotechnologie.vsb.cz/Historie/nano_historie.pdf [cit. 25. 12. 2015]
10. [online] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1965/feynman-bio.html [cit. 16. 12. 2015]
11. [online] <http://www.kheper.net/topics/nanotech/nanotech-history.htm> [cit. 4. 2. 2016]
12. [online] http://nanosystemy.upol.cz/upload/18/safarova_sem.pdf [cit. 20. 1. 2016]
13. [online] <http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=print&sid=34> [cit. 12. 1. 2016]
14. [online] <http://ksm.fsv.cvut.cz/~nemecek/teaching/dmpo/AFM.pdf> [cit. 3. 3. 2016]
15. [online] <http://web.vscht.cz/~nadhernl/chi/nanotechnologie.html> [cit. 22. 1. 2016]
16. HANCOCK, Y. The 2010 Nobel Prize in physics—ground-breaking experiments on graphene. *Journal of Physics D*, 44. 2011.
17. FILIPOVÁ, Z.; KUKUTSCHOVÁ J.; MAŠLÁŇ, M. *Rizika nanomateriálů*. Univerzita Palackého v Olomouci. 1. vyd. 2012.
18. HOSOKAWA, M., NOGI, K., NAITO, M., YOKOYAMA, T. *Nanoparticle Technology Handbook*. 2007.
19. [online] <http://www.nano.bam.de/en/glossar/index.htm> [cit. 15. 1. 2016]
20. RADZIG, M. A., NADTOCHENKO, V. A., KOKSHAROVA, O. A., KIWI, J., LIPASOVA, V. A., KHMEL, I. A. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids and Surfaces B*, 102. 300–306. 2013.

21. MAHENDRA, R. *et al.* Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27. 76–83. 2009.
22. PANÁČEK, A. *et al.* Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry B*, 110. 16248–16253. 2006.
23. ŠIMEK, L. *Fyzikální chemie II*. Univerzita T. Bati ve Zlíně. 3. vyd. 2005.
24. GHORBANI, H. R. *et al.* Biological and non-biological methods for silver nanoparticles synthesis. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 25. 317–326. 2011.
25. HOŠEK, J. *Úvod do nanotechnologie*. ČVUT Praha. 1. vyd. 2010.
26. CREIGHTON, J. A., BLATCHFORD, C. G., ALBRECHT M. G. Plasma resonance enhancement of Raman–scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the Excitation Wavelength. *Journal of the Chemical Society - Faraday Transactoins II*, 75. 790-798. 1979.
27. LEE, P. C., MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *Journal of Physical Chemistry*, 86. 3391–3395. 1982.
28. N. A. DHAS, C. P. RAJ, A. GEDANKEN. Synthesis, characterization, and properties of metallic copper nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 10. 1446-1452. 1998.
29. GUANG-NIAN, X.; XUE-LIANG, Q.; XIAO-LIN, Q.; JIAN-GUO, CH. Preparation and characterization of stable monodisperse silver nanoparticles via photoreduction. *Colloids and Surfaces A*, 320. 222-226. 2008.
30. KVÍTEK, L. *et al.* Silver Voyage from Macro- to Nanoworld. *Journal of Chemical Education*, 87. 1094–1097. 2010.
31. KVÍTEK, L.; PRUCEK, R. The preparation and application of silver nanoparticles. *Journal of Material Chemistry*, 22. 2461–2473. 2005.
32. PRUCEK, R.; KVÍTEK, L.; HRBÁČ, J. Silver colloids - methods of preparation and utilization. *Chemica*. 59–67. 2004.
33. CAO, Guozhong. *Nanostructures & nanomaterials: synthesis, properties & applications* [online]. London :Imperial College Press, 2004
http://books.google.com/books?id=Ez1dYxO_ma8C&printsec=frontcover&dq=Nanostructured+and+Nanomaterials&hl=cs&cd=1#. [cit. 3. 1. 2016].
34. [online] <http://physics.ujep.cz/~mkormund/P219/NanoMataChar-prednaska11.pdf>. [cit. 13. 3. 2016]
35. LI, Q. *et al.* Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research*, 42. 4591–4602. 2008.
36. [online] <http://www.nanotechnologie.cz/storage/nanotechnologie200610.pdf> [cit. 15. 1. 2016]
37. GAVLASOVÁ, L. Výběr terapeutického krytí na ránu. *Ošetrovatelská péče*. 16. 2010.
38. YUNG, Sun Kim *et al.* Antimikrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3. 95–101. 2007.
39. [online] http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/Literature/inserts/56137_06_2010_CZ.pdf [cit. 12. 3. 2016]

40. [online] <http://www.about-ecoli.com/> [cit. 13. 3. 2016]
41. PANÁČEK, A. *et al.* Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. *Veterinary Journal*, 209. 174–179. 2016.
42. PANÁČEK, A. *et al.* Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant *Enterobacteriaceae*. *Colloids and Surfaces B*, 142. 392–399. 2016.
43. CHOI O. *et al.* The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*, 42. 3066–3074. 2008.
44. ZBOŘIL, R. *et al.* The targeted antibacterial and antifungal properties of magnetic nanocomposite of iron oxide and silver nanoparticles. *Biomaterials*, 32. 4704–4713. 2011.
45. Lv, Y., Liu, H. a Wang, Z. Silver nanoparticle-decorated porous ceramic composite for water treatment. *Journal of Membrane Science*, 331. 50–56. 2009.
46. PANÁČEK, A. *et al.* Preparation, characterization and antimicrobial efficiency of Ag/PDDA-diatomite nanocomposite. *Colloids and Surfaces B – Biointerfaces*, 110. 191–198. 2013.
47. [online] <http://www.hojeniran.cz/moderni-lecba/infekce.aspx> [cit. 18. 2. 2016]
48. HAMILTON, H.; BODENHAM, A. *Central venous catheters*. Chichester: WileyBlackwell. 2009.
49. GALIANO, K. *et al.* Silver segregation and bacterial growth of intraventricular catheters impregnated with silver nanoparticles in cerebrospinal fluid drainages. *Neurological Research*, 30. 285–287. 2013.
50. ZÍTKA, O. *et al.* Nanotechnologie pro efektivnější cévní náhrady. *Chemické listy*, 107. 24–29. 2013.
51. BEHRENDT, Ann-Kathrin *et al.* New TiAg composite coating for bone prosthesis engineering shows promising microvascular compatibility in the murine dorsal skinfold chamber model. *Journal of Material Science – Materials in Medicine*, 26. 2015.
52. SOSNA, A. a kol. *Základy ortopedie*. 1. vyd. 2001.
53. SOSNA, A., POKORNÝ, D. *Aloplastika ramenního kloubu*. 1. vyd. 2007.
54. RYCHLÍKOVÁ, E. *Funkční poruchy kloubů končetin*. 1. vyd. 2002.
55. DUNGL, Pavel a kol. *Ortopedie*. Grada Publishing Praha. 2. přeprac. vyd. 2005.
56. GALLO, Jiří a kol. *Artróza váhonosných kloubů ve světle medicíny založené na důkazu*. Univerzita Palackého v Olomouci. 1. vyd. 2007.
57. SOSNA, A.; POKORNÝ, D.; JAHODA, D. *Náhrada kyčelního kloubu*. 1. vyd. 2003.
58. LONG, M., RACK, H. J. Titanium alloys in total joint replacement a materials science perspective. *Biomaterials*, 19. 1621–1639. 1998.
59. [online] <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/totalni-nahrada-kycelniho-kloubu-soucasny-stav-468318> [cit. 26. 3. 2016]
60. SOSNA, A. a kol. *Infekční komplikace kloubních náhrad*. 1. vyd. 2008.
61. ČECH, O.; DŽUPA, V. *Revizní operace náhrad kyčelního kloubu*. Galén Praha. 1. vyd. 2004.

62. [online] <http://www.dungl.estranky.cz/clanky/clanky/nase-zkusenosti-s-nahradou-hlezn-aes.html> [cit. 15. 2. 2016]
63. ŠRÁMEK, V. *Obecná a anorganická chemie*. Univerzita Palackého v Olomouci. 1. vyd. 2005.
64. KAMENÍČEK, J. a kol. *Anorganická chemie*. Univerzita Palackého v Olomouci. 4. vyd. 2009.
65. MACEK, K. *Kovové materiály*. ČVUT Praha. 1. vyd. 2006.
66. [online] <http://www.totalmateria.com/subgroup.aspx?LN=CZ&id1=242638&db=N> [cit. 30. 1. 2016]
67. [online] http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_01_40-45.pdf [cit. 30. 1. 2016]
68. BRENNAN, S. A. *et al.* Silver nanoparticles and their orthopaedic applications. *Bone&Joint Journal*, 97 B. 582-589. 2015.
69. MORAVEC, H.; FOJT, J.; FILIP, V. Modifikace povrchu titanu pro medicínské aplikace. *Chemické listy*, 108. 40–45. 2014.
70. JANÍČEK, P. *Ortopedie*. Masarykova univerzita Brno. 3. přeprac. vyd. 2012.
71. FERRARIS, S.; SPRIANO, S. Antibacterial titanium surfaces for medical implants. *Materials Science&Engineering C*, 61. 965–978. 2015.
72. ZHAOJUN, Jia *et al.* A novel cytocompatible, hierarchical porous Ti6Al4V scaffold with immobilized silver nanoparticles. *Materials Letters*, 157. 143–146. 2015.
73. JURZCYK, K. *et al.* Antibacterial activity of nanostructured Ti–45S5 bioglass–Ag composite against *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus*. *Transaction of nonferrous metals society of China*, 26. 118–125. 2016.
74. KI RYONG SHIN *et al.* Effects of concentration of Ag nanoparticles on surface structure and in vitro biological responses of oxide layer on pure titanium via plasma electrolytic oxidation. *Applied Surface Science*, 347. 574–582. 2015.
75. SOO-HYUK UHM *et al.* Tailoring of antibacterial Ag nanostructures on TiO₂ nanotube layers by magnetron sputtering. *Journal of Biomedical Research*, 102. 592–603. 2014.
76. ABUBAKER, Hassan Hamad *et al.* Sequential laser and ultrasonic wave generation of TiO₂@Ag core-shell nanoparticles and their anti-bacterial properties. *Lasers in Medical Science*, 31. 263–273. 2015.

Seznam obrázků a tabulek

Obrázky:

1. Dráha částice při Brownově pohybu. [online] <http://edu.techmania.cz/cs/veda-v-pozadi/597> [cit. 19. 12. 2015]
2. Rozptyl světla v pravém roztoku a v koloidní disperzi. [online] http://beta.topperlearning.com/tpadmin/app/webroot/js/tiny_mce/jscripts/tiny_mce/plugins/imagemanager/files/tyndall-effect.jpg [cit. 9. 1. 2016]
3. Povrchový plasmon. [online] <http://server21.clanweb.eu/phymatsci/pro-studenty/nanotechnologie-nmgr/laboratorni-praktika-z-metod-pripravy-nanomaterialu-kfyp318/uloha-5-priprava-a-charakterizace-nanocastic-uslechtilych-kovu/> [cit. 12. 3. 2016]
4. Elektrická dvojvrstva (Helmholtz). KVÍTEK, L.; PANÁČEK, A. *Základy koloidní chemie*. Univerzita Palackého v Olomouci. 2007. Str. 24.
5. Elektrická dvojvrstva (Stern). KVÍTEK, L.; PANÁČEK, A. *Základy koloidní chemie*. Univerzita Palackého v Olomouci. 2007. Str. 26.
6. Richard P. Feynman. [online] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1965/feynman-bio.html [cit. 16. 12. 2015]
7. Norio Taniguchi. [online] <http://friendlyscienceguy.blogspot.cz/2013/05/nanotechnology-industry-of-very-small.html> [cit. 19. 1. 2016]
8. Schéma skenovacího tunelového mikroskopu. [online] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1965/feynman-bio.html [cit. 29. 1. 2016]
9. Hrot STM. [online] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1965/feynman-bio.html [cit. 9. 2. 2016]
10. Fulleren C₆₀. [online] <http://physics.ujep.cz/~msvec/nanomaterialy/Fullereny.pdf> [cit. 9. 2. 2016]
11. Minerál šungit. [online] <http://www.svetmineralu.cz/sungit/> [cit. 9. 1. 2016]
12. AFM – pohyblivé raménko s hrotem. [online] <http://www.observatory.cz/news/pump.php?pda=1&article=od-pralacky-k-zobrazovani-molekularnich-orbitalu> [cit. 19. 1. 2016]
13. Logo IBM vytvořené atomy xenonu pomocí STM. [online] <https://www-03.ibm.com/press/us/en/photo/28500.wss> [cit. 26. 1. 2016]
14. Vícetěnná nanotrubička. [online] <http://www.zschemie.euweb.cz/uhlik/uhlik2.html> [cit. 26. 1. 2016]
15. Jednotěnná nanotrubička. [online] <http://www.zschemie.euweb.cz/uhlik/uhlik2.html> [cit. 9. 2. 2016]
16. Schéma struktury grafenu. [online] <http://materialyinzynierskie.pl/przelomowa-metoda-wytwarzania-grafenu/> [cit. 9. 2. 2016]
17. Závislost velikosti nanočástic stříbra na vlnové délce laserového paprsku. [online] http://www.researchgate.net/publication/228534735_Preparation_of_silver_nanoparticles_by_laser_ablation_in_solution_influence_of_laser_wavelength_on_particle_size._Appl_Surf_Sci [cit. 28. 2. 2016]
18. Redukující sacharidy modifikovaného Tollensova procesu. [online]

- https://is.muni.cz/el/1411/jaro2014/BVCP0222p/um/2-01_Sacharidy.pdf [cit. 25. 2. 2016]
19. *Escherichia coli*. [online] <http://www.bacteriainphotos.com/Escherichia%20coli%20light%20microscopy.html> [cit. 3. 3. 2016]
20. *Staphylococcus aureus*. [online] <http://www.bacteriainphotos.com/Staphylococcus%20aureus%20electron%20microscopy.html> [cit. 29. 2. 2016]
21. Závislost usmrcených bakterií na koncentraci nanočástic Ag. YUNG, Sun Kim *et al.* Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3. 2007.
22. Žilní katetr a katetr pro vyšetření srdce. [online] <http://braunoviny.bb Braun.cz/centralni-zilni-katetry-certofixz-protect> [cit. 29. 1. 2016]
23. Množství leukocytů na zkoumaném povrchu. BEHRENDT, Ann-Kathrin *et al.* New TiAg composite coating for bone prosthesis engineering shows promising microvascular compatibility in the murine dorsal skinfold chamber model. *Journal of Material Science – Materials in Medicine*, 26. 2015.
24. Stavba kloubu. [online] <http://somatology.webnode.cz/lidska-kostra/stavba-kloubu/> [cit. 19. 1. 2016]
25. Zdravý a postižený kloub. [online] <http://www.histology.leeds.ac.uk/bone/cartilage.php> [cit. 8. 1. 2016]
26. TEP, titanový dřík, oxiniová hlavička. [online] <http://www.surgalclinic.cz/index.php?pg=spektrum-vykonu--ortopedie--endoproteza-kycelni-kloub> [cit. 9. 2. 2016]
27. Kloubní jamka z polyethylenu. [online] <http://www.surgalclinic.cz/index.php?pg=spektrum-vykonu--ortopedie--endoproteza-kycelni-kloub> [cit. 9. 2. 2016]
28. Titanové kloubní náhrady a dentální náhrada. [online] <http://www.sofident.cz/cs/zubni-implantaty> [cit. 12. 2. 2016]
29. Kubická mřížka. [online] <http://quizlet.com/110912732/latky-krystalicke-a-amorfni-flash-cards/> [cit. 19. 2. 2016]
30. Hexagonální mřížka. [online] <http://www.ped.muni.cz/wphy/fyzvla/> [cit. 5. 2. 2016]
31. Nanostrukturovaný titan. [online] http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_01_40-45.pdf [cit. 9. 2. 2016]
32. Povrch upravené titanové litiny Ti6Al4V s nanočásticemi stříbra. ZHAOJUN, Jia *et al.* A novel cytocompatible, hierarchical porous Ti6Al4V scaffold with immobilized silver nanoparticles. *Materials Letters*, 157. 2015.
33. Antibakteriální aktivita povrchu. JURZCYK, K. *et al.* Antibacterial activity of nanostructured Ti–45S5 bioglass–Ag composite against *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus*. *Transaction of nonferrous metals society of China*, 26. 2016.
34. SEM Hitachi SU6600. [online] <http://www.sysmex.nl/products/hitachi-su6600-analytical-vp-feg-sem-200.html> [cit. 12. 3. 2016]
35. Sonikátor Q700 (RCPTM Olomouc)
36. Mikroskopické sklíčko
37. Titanový disk
38. Schéma testování antibakteriální aktivity dle normy ISO 22196

39. Mikroskopické sklíčko s vrstvou stříbra, původní koncentrace
40. Mikroskopická sklíčka s vrstvou stříbra, čtvrtinová koncentrace
41. Mikroskopická sklíčka s vrstvou stříbra, poloviční koncentrace
42. Mikroskopické sklíčko s vrstvou stříbra, původní koncentrace
43. Mikroskopické sklíčko s vrstvou stříbra, čtvrtinová koncentrace
44. Mikroskopická sklíčka s vrstvou stříbra, poloviční koncentrace, glukóza
45. Mikroskopická sklíčka s vrstvou stříbra, poloviční koncentrace, maltóza
46. Mikroskopická sklíčka s vrstvami stříbra
47. Mikroskopická sklíčka s různým postupem čištění a aktivace
48. SEM snímky vrstvy nanočástic Ag připravených přímou redukcí s glukózou
49. SEM snímky vrstvy nanočástic Ag připravených přímou redukcí s maltózou
50. SEM snímky vrstvy nanočástic Ag připravených sonochemickou redukcí s glukózou
51. SEM snímky vrstvy nanočástic Ag připravených sonochemickou redukcí s maltózou
52. SEM snímky vrstvy nanočástic Ag připravených metodou layer by layer s maltózou
53. Vrstvy Ag připravené přímou redukcí s glukózou a maltózou
54. Vrstvy Ag připravené sonochemickou redukcí s glukózou a maltózou
55. Vrstva Ag připravená metodou layer by layer s maltózou
56. EDAX spektrum – přímá redukce, glukóza
57. EDAX spektrum – přímá redukce, maltóza
58. EDAX spektrum – sonochemická redukce, glukóza
59. EDAX spektrum – sonochemická redukce, maltóza
60. EDAX spektrum – layer by layer

Tabulky:

- tab. 1: Rozdělení koloidních soustav
- tab. 2: Změna velikosti povrchu v závislosti na poloměru částic
- tab. 3: Chemické složení slitiny TiAl6V4 dle AMS
- tab. 4: Velikost částic stříbra ve vrstvě u jednotlivých metod
- tab. 5: Velikost částic u jednotlivých metod v závislosti na sacharidu
- tab. 6: Množství Ag na povrchu titanu
- tab. 7: Mikrobiální testování pro *E. coli* CCM 3954
- tab. 8: Mikrobiální testování pro *S. aureus* CCM 3953