



Antibakteriální nanovláknenné vrstvy pro prevenci infekcí z důvodu kolorektálního leaku

Diplomová práce

Studijní program:

N0723A270001 Textilní inženýrství

Autor práce:

Bc. Kristýna Manhartová

Vedoucí práce:

Ing. Markéta Klíčová

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů





Zadání diplomové práce

Antibakteriální nanovláknenné vrstvy pro prevenci infekcí z důvodu kolorektálního leaku

Jméno a příjmení: **Bc. Kristýna Manhartová**
Osobní číslo: T20000010
Studijní program: N0723A270001 Textilní inženýrství
Zadávací katedra: Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů
Akademický rok: **2020/2021**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování literární rešerše současného stavu poznání na poli nanovláknenných antibakteriálních vrstev.
2. Vypracování literární rešerše ohledně řešení problematiky postoperačních komplikací v gastrointestinální chirurgii.
3. Vývoj biodegradabilních vrstev s obsahem antibiotické látky, potlačující aktivitu bakteriálních kolagenáz.
4. Kompletní charakterizace materiálů (morfologické vlastnosti, ověření cytokompatibility a antibiotických vlastností).
5. Diskuse výsledků, porovnání s aktuální literaturou.

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

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



Seznam odborné literatury:

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

Vedoucí práce:

Ing. Markéta Klíčová
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání práce:

1. listopadu 2020

Předpokládaný termín odevzdání:

16. května 2022

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

L.S.

doc. Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.
vedoucí katedry

V Liberci dne 1. listopadu 2020

Prohlášení

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

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

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

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

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

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

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

13. května 2022

Bc. Kristýna Manhartová

Prohlášení

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

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

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

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

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

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

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

12. května 2022

Kristýna Manhartová

Poděkování

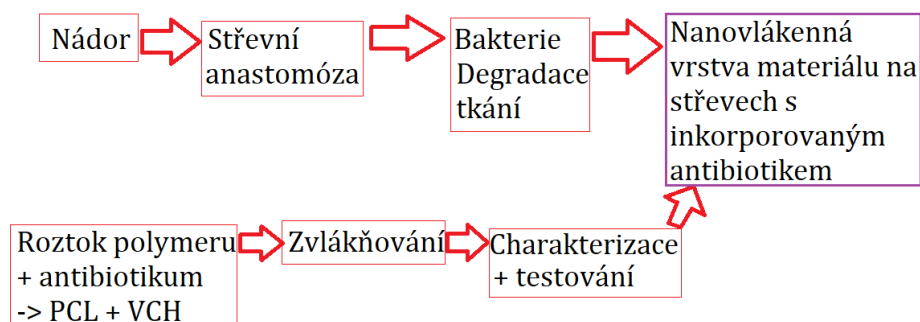
Mé poděkování patří v první řadě Ing. Markétě Klíčové za výborné vedení práce a trpělivost, motivaci a velkou pomoc při realizaci experimentální části. Děkuji také za možnost spolupracovat na velmi zajímavém tématu.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Pavlu Holcovi za věnovaný čas a pomoc s grafickým zpracováním grafu pro Hansenovy parametry rozpustnosti. Také moc děkuji Ing. Michaele Petržílkové za provedení antibakteriálního testování materiálů, prof. Daliboru Šatínskému za čas věnovaný provedení vysoko-účinné kapalinové chromatografie, Mgr. Janě Melicheríkové za provedení elementární analýzy a prof. Václavu Liškovi, vedoucímu skupiny v Biomedicínském centru, za cenné rady.

Abstrakt

Za účelem prevence infekcí z důvodu kolorektálního leaku byl vyvinut a následně také otestován nanovláknenný materiál, do něhož bylo inkorporováno antibiotikum Vankomycin hydrochlorid (VCH) o hmotnostních koncentracích 0%; 0,5%; 1% a 1,5%. Antibiotikum bylo inkorporováno do roztoku poly-ε-kaprolaktonu (PCL) a roztok byl následně zvlákněn na bezjehlovém elektrostatickém zařízení Nanospider™. Morfologie připravených vrstev byla sledována pomocí skenovací elektronové mikroskopie, ze získaných snímků byly měřeny průměry vláken pro ověření homogenity. Smáčivost vláknenných vrstev byla hodnocena pomocí kontaktního úhlu, byla sledována interakce s destilovanou vodou a simulovanou střevní tekutinou, která byla zvolena vzhledem k finální aplikaci. Obsah antibiotik byl otestován pomocí elementární analýzy a vysoce-účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Dále byly provedeny testy antibakteriální, jež potvrdily přítomnost, uvolňování a také účinnost antibiotika Vankomycin hydrochlorid v nanovláknenných materiálech. Pomocí testování *in vitro*, při kterém byly materiály osazeny buněčnou myší linií 3T3 myších fibroblastů, byla hodnocena cytotoxicita extraktů materiálů i samotného antibiotika VCH v médiu. Materiály byly vyhodnoceny jako cytokompatibilní a byla nalezena hraniční toxická koncentrace VCH v médiu. Pomocí testování *in vitro* byla také ověřena buněčná adheze a proliferace po osazení na materiál. Toho bylo dosaženo za použití metabolického CCK-8 testu, fluorescenční mikroskopie (morfologie buněk a jejich počet), a skenovací elektronové mikroskopie. Test byl vyhodnocován 4.; 7.; 14. a 21. den. Po celou dobu trvání experimentu bylo také pozorováno, jaký má na vyrobené nanovláknenné materiály vliv sterilizace ethylenoxidem, která je vybranou sterilizační metodou před aplikací materiálu *in vivo*. Žádné významné změny pozorovány nebyly.

Grafický abstrakt

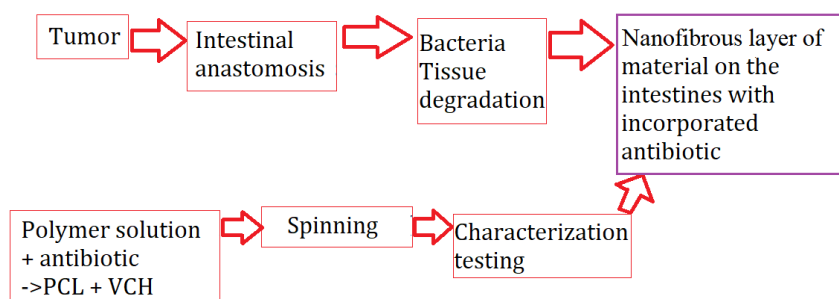


Klíčová slova: tkáňový nosič, nanovláknna, elektrostatické zvláknění, střevní anastomóza, antibiotika

Abstract

In order to prevent colorectal leak infections, a nanofibrous material was developed and subsequently tested, into which the antibiotic Vancomycin hydrochloride (VCH) by weight was incorporated at 0%; 0,5%; 1% and 1,5% concentration. The antibiotic was incorporated into the poly- ϵ -caprolactone (PCL) solution and the solution was subsequently spun on a Nanospider™ needleless electrostatic device. The morphology of the prepared layers was monitored by scanning electron microscopy, and the fiber diameters were measured from the obtained images to verify homogeneity. The wettability of the fibrous layers was evaluated by means of a contact angle, the interaction with distilled water and simulated intestinal fluid was monitored, which was chosen with respect to the final application. The antibiotic content was tested by elemental analysis and high performance liquid chromatography (HPLC). In addition, antibacterial tests were performed to confirm the presence, release and also the effectiveness of the antibiotic Vancomycin hydrochloride in nanofibrous materials. The cytotoxicity of the material extracts and the VCH antibiotic alone in the medium was evaluated by in vitro testing, in which the materials were seeded with the mouse fibroblast 3T3 cell line. The materials were evaluated as cytocompatible and the borderline toxic concentration of VCH in the medium was found. Cell adhesion and proliferation after attachment to the material were also verified by in vitro testing. This was achieved using a metabolic CCK-8 assay, fluorescence microscopy (cell morphology and number), and scanning electron microscopy. The test was evaluated 4th; 7th; 14th and 21st day. Throughout the experiment, the effect of sterilization with ethylene oxide, which is the chosen sterilization method before the application of the material in vivo, was also observed on the produced nanofibrous materials. No significant changes were observed.

Graphic abstract



Keywords: scaffold, nanofibers, electrospinning, intestinal anastomosis, antibiotics

Obsah

ÚVOD	10
TEORETICKÁ ČÁST	12
1. Břišní chirurgie.....	12
2. Tkáňové inženýrství.....	14
2.1 Historie tkáňového inženýrství	15
2.2 Materiály pro výrobu tkáňových nosičů	16
2.3 Polykaprolakton (PCL)	18
2.4 Výroba nanovláken.....	19
2.5 Možnosti sterilizace a dezinfekce tkáňových nosičů	21
3. Antibiotikum	22
3.1 Vankomycin hydrochlorid (VCH).....	24
4. Bakterie.....	25
4.1 Escherichia coli.....	26
4.2 Staphylococcus gallinarium	28
4.3 Pseudomonas aeruginosa	28
5. Inkorporace antibiotik do nanovláken	28
5.1 Možnosti inkorporace antibiotik do nanovláken	29
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
6. Metody.....	34
6.1. Příprava polymerních roztoků PCL	34
6.2. Výroba materiálů na zařízení Nanospider™	36
6.5. Optimalizace plošné hmotnosti vrstev	36
6.4 Sterilizace vrstev.....	36
6.5 SEM - morfologie vláknenných vrstev	36
6.6. Měření průměru vláken	36

6.8. Měření smáčivosti materiálů – kontaktní úhel.....	37
6.9 Elementární analýza – měření obsahu prvků ve vrstvách.....	38
6.10 Vysoko-účinná kapalinová chromatografie (HPLC) – měření obsahu antibiotik ve vrstvách.....	38
6.11 Antibakteriální testování	39
6.12 Buněčné testování <i>in vitro</i>	40
6.12.1 Cytotoxicita extraktů a Vankomycinu hydrochloridu v médiu DMEM ..	41
6.12.2. Test buněčné adheze a proliferace	41
6.13 Statistické vyhodnocení dat	43
7. Výsledky	45
7.1 Příprava polymerních roztoků PCL	45
7.2 Parametry výroby materiálů na zařízení Nanospider TM , plošná hmotnost.....	46
7.3 SEM - morfologie vlákněných vrstev	47
7.4 Měření průměrů vláken	50
7.5 Měření smáčivosti vrstev – kontaktní úhel	51
7.6 Elementární analýza – měření obsahu prvků ve vrstvách.....	54
7.7 Vysoko-účinná kapalinová chromatografie (HPLC) – měření obsahu antibiotika ve vrstvách.....	56
7.8 Antibakteriální testování	57
7.9 Buněčné testování <i>in vitro</i>	61
7.9.1 Cytotoxicita extraktů a Vankomycinu hydrochloridu v médiu DMEM ...	61
7.9.2 Test buněčné adheze a proliferace.....	63
8. Diskuze	69
8.1 Výběr polymeru a antibiotika	69
8.2 Výroba nanovlákněných vrstev	70
8.3 Testování obsahu a účinku Vankomycinu hydrochlorid v nanovlákněných vrstvách.....	71

8.4 Antibakteriální účinky vyrobených nanovlákných vrstev.....	73
8.5. Vliv sterilizace na nanovlákné vrstvy	74
ZÁVĚR	75
Literární zdroje	78
Seznam obrázků	84
Seznam tabulek.....	88

Seznam zkratek a symbolů

ANOVA	Analýza rozptylu
ACN	Acetonitril
BSA	Bovinní sérový albumin
CA	Celulóza acetát
CCK-8	Cell counting kit-8
CHEKO	Rozpouštědlový systém chloroform/ethanol/kyselina octová
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (buněčné médium)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dH ₂ O	Destilovaná voda
ECM	Extracelulární matrix
FBS	Fetální bovinní sérum
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA
FITC	Phalloidin-fluorescein isothiokyanát
hm. %	Hmotností procento
HPLC	Vysoko-účinná kapalinová chromatografie
IQR	Mezikvartilové rozpětí
KTJ/ml	Kolonie tvořící jednotky na 1 ml
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
M _w	Molekulová hmotnost
NC	Negativní kontrola
NH	Ninhydrin
PAN	Polyakrylonitril
PBS	Fosfátový pufr
PC	Pozitivní kontrola

PCL	Poly- ϵ -kaprolakton
PDLLA	Racemát kyseliny poly-L-mléčné
PDX	Polydioxanon
PEG	Polyethylenglykol
PEO	Polyethylenoxid
PET	Polyethylentereftalát
PEU	Polyethylenglykol
PGA	Kyselina polyglykolová
PLA	Kyselina polymléčná
PLGA	Kopolymer PGA a PLA
PLLACL	Kopolymer PCL a PLA
PMMA	Polymethylmethakrylát
PU	Polyuretan
PVA	Polyvinylalkohol
rpm	Otáčky za minutu
SD	Směrodatná odchylka
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
TCD detektor	Tepelně vodivostní detektor
T_g	Teplota skleného přechodu
TI	Tkáňové inženýrství
T_m	Teplota tání
UV	Ultrafialové záření
w/v %	Hmotnostně-objemová procenta

ÚVOD

Jedním z nejčastějších onkologických onemocnění v České republice (i ve světě) je kolorektální karcinom. Riziko výskytu karcinomu se zvyšuje s věkem, nezdravými stravovacími návyky, zlozvyky (alkohol, cigarety), nedostatkem aktivity nebo i dědičnými faktory. Jedná se o zhoubný nádor, při kterém v postižené oblasti dochází k nekontrolovatelnému množení buněk. Při tomto onemocnění je jedno z nejčastějších řešení odstranit část střeva chirurgicky. Proveďte se střevní anastomóza, což je chirurgické spojení dvou konců dutého orgánu (odstranění postižené části tkáně a sešití dvou nově vytvořených konců slepého/tlustého střeva). Velmi závažnou komplikací při této operaci je anastomotický leak, což je únik obsahu střev. Další závažnou komplikací jsou peritoneální adheze, za kterými stojí fyziologická reakce organismu na ránu vzniklou chirurgickým zákrokem.

Možným řešením obou komplikací je lokální prevence, která se dnes běžně v klinické praxi neuvžívá. Vhodný nanovláknenný scaffold musí být nezánětlivý, biokompatibilní, biologicky rozložitelný a nesmí způsobovat nežádoucí odezvu imunitního systému. Nanovláknenný scaffold, sloužící jako tkáňový nosič, by tedy měl být vyroben z vhodného biomateriálu a měl by pomoci zabránit pooperačním komplikacím. Je využíván jako bariérová ochrana („biodegradabilní náplast“) na oblast chirurgicky vytvořené střevní anastomózy, jelikož je prokázána jeho schopnost urychlit regeneraci tkání. Nanovláknenné struktury jsou v posledních letech považovány za velmi zajímavé v oblasti tkáňového inženýrství díky jejich podobné morfologii jako extracelulární matrix.

Byly vytvořeny čtyři materiály pomocí zvláknování na zařízení Nanospider™, které splňují požadavky biomateriálu. První vrstvou byla samostatná nanovláknenná vrstva tvořená poly-ε-kaprolaktonem (PCL). Další tři vrstvy byly tvořené PCL s různými koncentracemi antibiotika vankomycin hydrochlorid. Vrstvy byly sterilizovány etylenoxidem. Vlákenné materiály byly testovány pomocí kontaktního úhlu na rozhraní, aby byla zjištěna jejich smáčivost. Pomocí skenovací elektronové mikroskopie byla prozkoumána morfologie vláken a naměřeny jejich průměry. Byla provedena elementární analýza a vysoko-účinná kapalinová chromatografie. *In vitro* testy sloužily ke zhodnocení cytokompatibility materiálů a buněčné adheze a proliferace buněčné linie na vláknenný materiál. Byla provedena cytotoxicita extraktů dle normy ČSN ISO 1993:5

- zde byly otestovány extrakty vlákných materiálů, koncentrační řada samotného ATB a byla nalezena hraniční toxická koncentrace antibiotika vankomycin hydrochlorid. Byly provedeny také testy adheze a proliferace buněk – buňky byly nasazeny na všechny vybrané materiály.

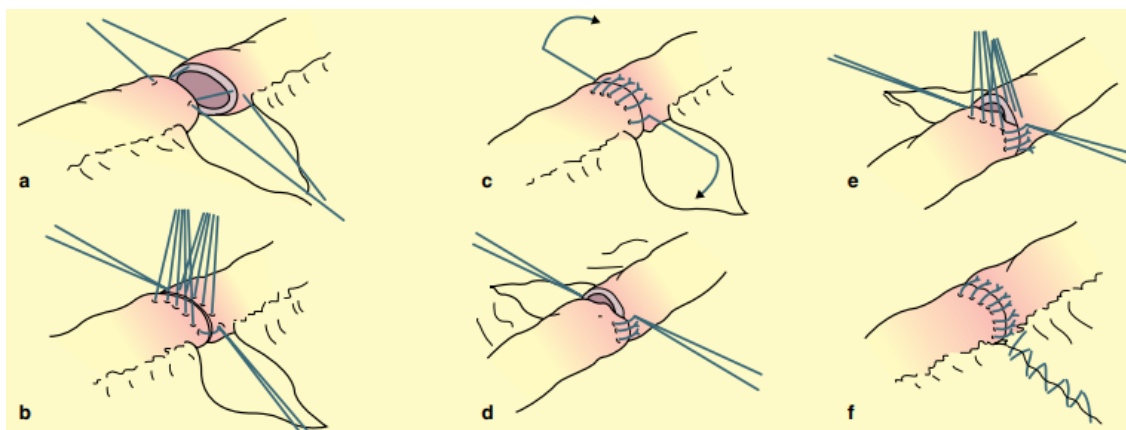
TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část se zabývá rešerší literatury ohledně dané problematiky. Zabývá se břišní chirurgií, užívanými materiály a možnostmi jejich desinfekce a sterilizace pro užití v tkáňovém inženýrství a jeho historií. Dále je popsána výroba nanovláken, antibiotika a bakterie. V poslední řadě se kapitola zabývá inkorporací různých antibiotik do nanovláknenných materiálů a možnostmi inkorporace.

1. Břišní chirurgie

V první kapitole teoretické části bude stručně nastíněn důvod řešení této problematiky, resp. problematika gastrointestinálních operací. Budou představeny možnosti šití střevních anastomóz a budou uvedeny dva závažné pooperační problémy. Cílem je výskyt těchto komplikací redukovat.

Břišní chirurgie zahrnuje širokou škálu operací, které vyžadují velkou škálu postupů, které do této kategorie spadají. Vážná operace břišní dutiny s sebou nese významné riziko pooperační morbidity a mortality. Velké procento pacientů, kteří podstupují závažnou břišní operaci, má často rakovinu a případně komorbiditu (současný výskyt více nemocí). Je u nich tudíž vysoké riziko perioperačních komplikací (komplikací, která nastanou již v průběhu operace). Je velký počet faktorů, které zvyšují výskyt těchto nemocí u pacientů. Pokud je část střeva třeba vyjmout a následně spojit oba konce k sobě, pak se jedná o střevní anastomózu (Obrázek 1) [1, 2].



Obrázek 1 Schéma provedení střevní anastomózy. A) První (přední) stehy jsou zavedeny na mezenterických a antimezenterických hranicích, vstupují přibližně 5-6 mm od řezné rány střeva a vystupují v ubmukózní rovině. Steh pak vstupuje do protějšího střeva ve stejné rovině. B) Druhé (zadní) stehy jsou umístěny podobným způsobem diagonálně proti prvním. Tyto stehy jsou zauzlovány a drženy, zatímco první stehy jsou postupně prokládány. C) První stehy jsou svázaný a přerézány. D) Anastomóza je otočena o 180 °. E) Po otočení anastomózy dochází

k přístupnějšímu uspořádání zadních stehů. F) Všechny zbývající stehy jsou podvázány a vyjmuty a defekt je uzavřen [3].

Jednou z nejzávažnějších perioperačních i pooperačních komplikací a zároveň nejčastější příčinou úmrtí, která nyní při těchto operacích nastává, je břišní sepse, jež je nyní definována jako „život ohrožující orgánová dysfunkce způsobená dysregulovanou odpovědí hostitele na infekci“. Navzdory novým terapeutickým možnostem zůstává úmrtnost na sepsi nepřijatelně vysoká, až 40%. Mnoho patofyziologických změn během sepse souvisí se zánětem a apoptózou (typ buněčné smrti). Úmrtnost úzce souvisí se změnami vaskulární reaktivity, sníženou hustotou kapilár, sníženou rychlostí červených krvinek, aktivací srážecích faktorů a hypoxií (nedostatkem kyslíku) tkání. Sepse může nastat v důsledku chirurgického zákroku, zejména v důsledku střevní anastomózy. Léčba sepse je často komplikovaná a dlouhá [4, 5].

Dalším pooperačním syndromem jsou peritoneální adheze (Obrázek 2), které mohou způsobit jak chronickou bolest břišní dutiny, tak střevní obstrukci nebo ženskou neplodnost. Podle statistické analýzy je míra výskytu peritoneálních adhezí okolo 66%. S tvorbou těchto adhezí souvisí mnoho faktorů, například orgány, které byly do operace zapojeny, typ operace nebo použití drenáže. Vyšší riziko vzniku adhezí mají také pacienti s obezitou, cukrovkou, hypertenzí (zvýšeným krevním tlakem) a hyperlipidémií (poruchou metabolismu lipoproteinů). Výzkum také prokázal, že nejvyšší riziko adhezí se nachází po vykonání střevní chirurgie. Díky studiím se podařilo zjistit, že peritoneální adheze jsou často způsobovány špatnou zpětnou vazbou srážení krve, záněty a fibrinolýzou (vedlejší děj hemostázy nutný pro odstranění fibrinové zátky). Z důvodu neproběhnutí procesu fibrinolýzy mohou právě vznikat adheze. Existuje mnoho pokusů zabránit tvorbě peritoneálních adhezí pomocí léků, bariér a různých terapeutických metod, ale jejich účinnost nebyla vysoká. Nejslibnější léčebnou metodou se v posledních letech jeví léčba bariérou, která je vyrobena z biomateriálů. Výzkum těchto biomateriálů je velice důležitý, protože míra recidivy střevní obstrukce je až 53% [6, 7].



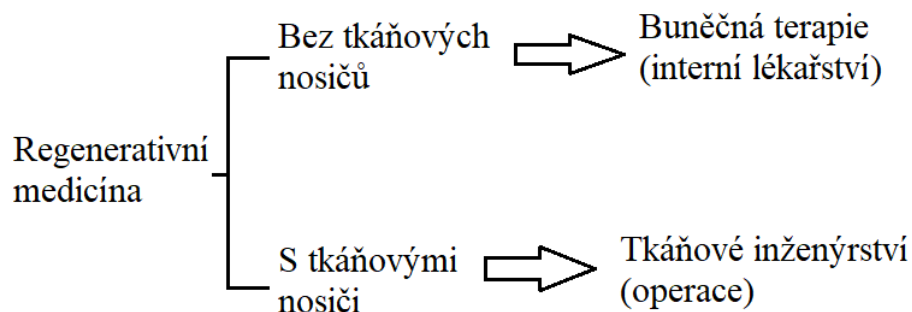
Obrázek 2 Adheze mezi břišní stěnou a slepým střevem u krys [8].

2. Tkáňové inženýrství

Práce se zabývá vývojem materiálů na bázi biodegradabilních nanovláken. Tyto materiály mají potenciál pro široké využití v oblasti regenerativní medicíny a tkáňového inženýrství a bude proto popsán úvod do těchto oborů. Dále jsou popsány biodegradabilní materiály, samotná kapitola je věnována poly- ϵ -kaprolaktonu, jelikož z něj byly nanovláčenné vrstvy použité pro experimentální část vytvořeny. PCL byl zvolen pro výrobu materiálů v experimentální části z důvodu jednak snadné zvláknitelnosti na zařízení NanospiderTM, ekonomické stránky věci a také díky tomu, že již vyvinutý planární vláčenný materiál Nanotardis na bázi PCL prošel plnou preklinickou zkouškou a byl SÚKL schválen pro testování na lidských pacientech. Je třeba také zvážit možnosti sterilizace materiálu pro aplikaci materiálů *in vivo*. Výroba nanovláčenných vrstev probíhala pomocí elektrostatického zvláčňování, jež je představeno v závěru kapitoly 2.

Obecně může být regenerativní medicína dělena dle toho, zda byly použity tkáňové nosiče (Obrázek 3). Pokud nebyly pro regeneraci použity, pak se jedná o buněčnou terapii ve vnitřním lékařství. Při použití tkáňových nosičů se jedná o tkáňové inženýrství a je třeba operace pro aplikaci (Obr. 3). Tkáňové inženýrství je oborem biomedicínského inženýrství, které využívá kombinaci mnoha oborů. Dříve bylo tkáňové inženýrství podoborem biomateriálů, avšak s rostoucím významem

a množstvím užití scaffoldů začalo být považováno za samostatný obor. Pracuje s buňkami, materiálovými metodami, inženýrstvím a vhodnými fyzikálními a chemickými faktory. Zabývá se obnovou, údržbou, zlepšením nebo úplným nahrazením různých typů lidských tkání. Tkáňové inženýrství často využívá tkáňové nosiče (scaffoldy), na které jsou nasazeny buňky dle finálního místa užití tkáňového nosiče. Pro užití buněk je nejprve třeba je izolovat, dále kultivovat (2D), nasadit na scaffold a následná kultivace na scaffoldu (3D). Následně je možno scaffold implantovat do těla. Scaffoldy mohou být tvořeny nanovlákný, hydrogely, 3D tiskem nebo se mohou tyto metody kombinovat a být hybridními scaffoldy. Obvyklými materiály užívanými pro výrobu scaffoldů jsou polymery, kovy nebo keramika. [9, 10].



Obrázek 3 Klasifikace regenerativní medicíny na základě použití tkáňových nosičů (scaffoldů) [11].

2.1 Historie tkáňového inženýrství

Historie tkáňového inženýrství se rozděluje do několika ér. První z nich je středověká éra, (17. století), kdy se řešilo základní pochopení vnitřního fungování lidských tkání. Již v období neolitu byly k uzavírání ran a napomáhání hojení používány stehy. Kolem roku 2500 př. n. l. byly ve starověké Indii vyvinuty kožní štěpy řezáním kůže z hýždí a jejich přišívání na místa poranění v uchu, nosu nebo rtech. Staří Egypťané často přišívali kůži z mrtvol na živé lidi a dokonce se pokoušeli používat med jako druh antibiotika a mazu jako ochrannou bariéru, aby se zabránilo infekci. V 1. a 2. století našeho letopočtu vyvinuli Gallo-Římané implantáty z tepaného železa. Zubní implantáty bylo možné nalézt u starých Mayů. Druhou érou je osvětenství (17. – 19. století). Zatímco starověké společnosti vyvinuly techniky, které výrazně předběhly svou dobu, stále jim chybělo mechanické pochopení toho, jak tělo na tyto postupy reaguje. Tento mechanistický přístup přišel s vývojem empirické metody vědy, kterou propagoval René Descartes. Sir Isaac Newton začal popisovat tělo

jako „fyzikálně-chemický stroj“ a domníval se, že nemoc je zhroucením stroje. V 17. století objevil buňku Robert Hooke a dopis, jež mu přišel od Benedicta de Spinozy, přinesl myšlenku homeostázy mezi dynamickými procesy v těle. V průběhu 19. století nastalo lepší porozumění tomu, jak různé kovy reagují s tělem, k vývoji lepších stehů a posunu ke šroubovým a dlahovým implantátům v kostní fixaci. Dále byla v polovině 19. století poprvé vyslovena hypotéza, že interakce mezi buňkami a prostředím a buněčná proliferace jsou životně důležité pro regeneraci tkání. V poslední éře, jež je nazývána moderní dobou (20. a 21. století), se tkáňové inženýrství nadále vyvíjelo. Na začátku se lidé dívali a používali vzorky přímo z lidských nebo zvířecích mrtvol. Nyní mají tkáňoví inženýři schopnost napodobovat mnoho tkání v těle pomocí moderních technologií, jako je mikrovýroba a trojrozměrný biotisk ve spojení s nativními tkáňovými buňkami/kmenovými buňkami. Tyto pokroky umožnily výzkumníkům vytvářet nové tkáně mnohem efektivněji. Tyto technologie například umožňují větší personalizaci, což umožňuje lepší biokompatibilitu, sníženou imunitní odpověď a buněčnou integraci [12].

Roku 1960 se Wichterle společně s Limem stali prvními, kdo publikoval experimenty s hydrogely pro biomedicínské aplikace při výrobě kontaktních čoček. V roce 1984 byl vyvinut biotisk Charlesem Hullem. Převedel inkoustovou tiskárnu Helwett – Packard na zařízení, jež bylo schopno ukládat buňky ve 2D, na základě čehož byl později vytvořen i 3D tisk (2003), který našel různé aplikace v lékařském inženýrství díky své vysoké přesnosti a účinnosti. V roce 1998 objevil kmenové buňky biolog James Thompson, po čemž následovala první transplantace laboratorně vypěstovaných vnitřních orgánů v roce 1999 [12].

2.2 Materiály pro výrobu tkáňových nosičů

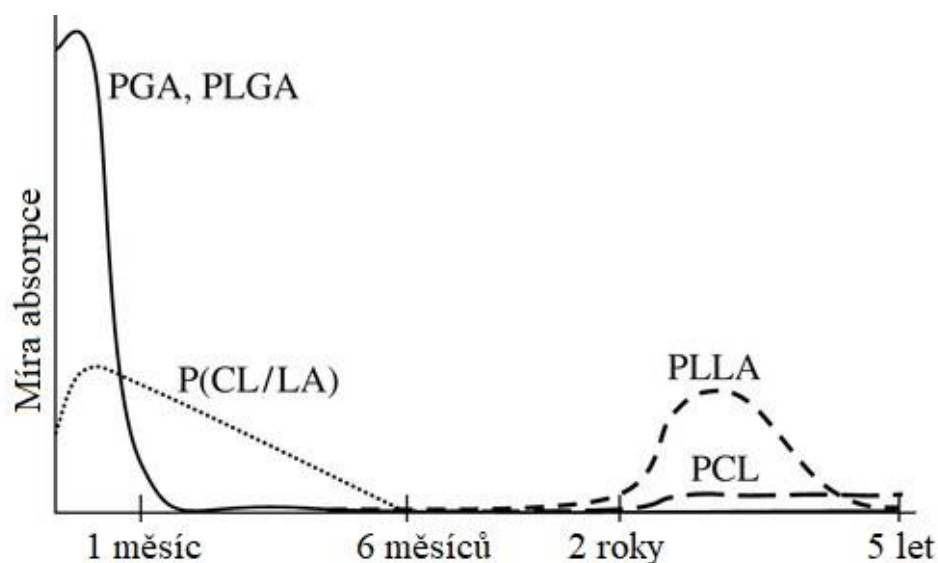
Biomateriál je definován jako jakákoli přírodní nebo syntetická látka, jež byla vyvinuta pro interakci s organismy za účelem přímého lékařského ošetření. Biomateriál musí být biokompatibilní, což znamená, že plní svojí funkci za odpovídající reakce uživatele. Pro budoucí aplikaci v organismu je důležité, aby bylo možno materiál desinfikovat nebo sterilizovat. Dále musí být vhodný biomateriál nezápálivý, biologicky rozložitelný a inertní vůči imunogenní reakci. [13, 14].

Pro výrobu těchto bariér jsou vhodnější materiály polymerní syntetické, oproti látkám přírodním. Je tomu tak z důvodu nižší úrovně imunogenicity, snadné manipulace

s polymerními látkami a zejména možnosti zajištění opakovatelnosti jednotlivých šarží. Toho nelze u přírodních látek dosáhnout, jelikož je každá jedinečná. Hlavním účelem při využívání těchto bariér je zamezení adhezí [14, 15].

Nejvíce užívanými látkami jsou biodegradabilní polymery. Jejich hlavní výhodou je, že není třeba dalšího zákroku pro odstranění materiálu, jelikož se materiál po čase v organismu rozloží nebo degraduje pomocí biologických činitelů (mikroorganismů). Další z mnoha výhod je schopnost přizpůsobit mechanické schopnosti a průběh degradace tak, aby byl vhodný pro různé aplikace. Použití nebiodegradabilních materiálů může mít za důsledek problémy s dlouhodobou kompatibilitou s organismem, což může vyústit i v reoperaci. V lidském těle se nachází podmínky vhodné pro hydrolytické procesy, proto je důležitým požadavkem na polymerní materiál, aby obsahoval hydrolyticky nestabilní vazby, v důsledku čehož bude schopen se v lidském těle rozložit v rozumném čase za fyziologických podmínek. Fyziologická podmínka je v případě lidského těla pH 7 – 7,4 [13, 16].

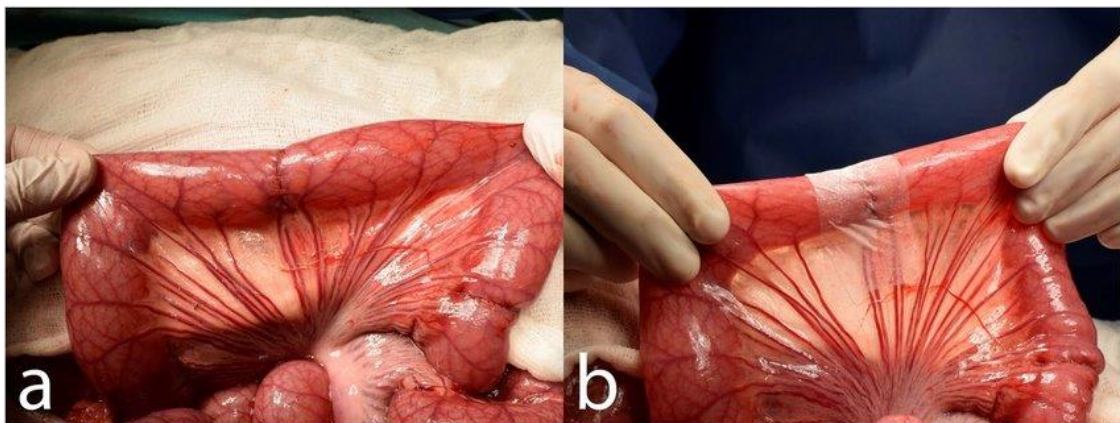
Biologicky odbouratelnými syntetickými polymery jsou například kyselina polyglykolová (PGA), kyselina polymléčná (PLA) a jejich kopolymery, polykaprolakton (PCL), polydioxanon (PDX) či kopolymery trimethylenkarbonátu s glykosidem. Tyto polymery byly již v řadě klinických aplikací využity. Mezi hlavní aplikace se řadí vstřebatelné stehy, stenty, systémy pro dodávání léčiv a ortopedické fixační prostředky (např. šrouby) [14, 16, 17].



Obrázek 4 Schéma míry absorpce degradabilních polymerů polymerů po dobu pěti let. PGA - polyglykolid, PLGA – kopolymer PGA a PLA, P(CL/LA) – kopolymer polykaprolaktonu a kyseliny poly-L-mléčné, PLLA - kyselina poly-L-mléčná, PCL - polykaprolakton [11].

Nanovláknenné scaffoldy (Obrázek 5) jsou vhodné jako biomateriál zejména díky své podobnosti s extracelulárním matrixem. Extracelulární matrix (mezibuněčná hmota) je hmota, která se ukládá v prostorách mezi buňkami různých tkání. Je složen převážně z proteinů (zejména kolagenu), z glykosaminoglykanů (proteoglykanů) a glykoproteinů (fibronektin, laminin), které poskytují strukturální a biochemickou podporu okolním buňkám. Běžnými funkcemi extracelulárního matrixu jsou buněčná adheze, komunikace mezi buňkami, proliferace a diferenciace [7].

Další důležitou vlastností pro materiály používané v břišní chirurgii je antiadhezivní úprava biomateriálu, jako prevence vzniku peritoneálních adhezí. Je nutno identifikovat úpravy materiálu, které by účinně snižovaly tvorbu adheze při i po různých chirurgických zákrocích, aniž by vyvolávaly vedlejší účinky. Antiadhezivní biomateriál by měl mít nejen vhodné mechanické vlastnosti pro usnadnění manipulace, ale také vhodné vlastnosti povrchové energie a vhodnou porozitu. Na povrchu příliš hydrofilním často dochází k usazování menšího počtu buněk [15].

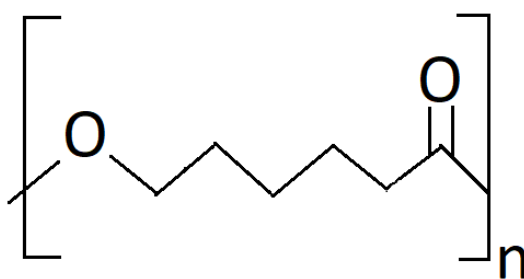


Obrázek 5 Posílení anastomózy na tenkém střevě v modelu prasete aplikací nanomateriálu: (a) vytvořená anastomóza, (b) PCL nanomateriál aplikovaný do oblasti anastomózy [6].

2.3 Polykaprolakton (PCL)

PCL je semikrystalický syntetický polyester s výbornou rozpustností v organických rozpouštědlech. Výroba probíhá za otevírání kruhu ϵ -kaprolaktonu. Teplota tání polymeru je 55 – 60 °C a teplota skelného přechodu -54 °C. Kvůli těmto poměrně nízkým hodnotám je PCL (Obrázek 6) snadno degradovatelný a má vysokou propustnost léčiva, tudíž je vhodný jako dlouhodobý implantát. Čas degradace je cca 2 – 3 roky. PCL má nízkou pevnost v tahu (23 MPa), ale vysoké prodloužení při přetržení (4700%), což z něj činí dobrý elastický biomateriál. Díky své zpracovatelnosti umožňuje PCL tvorbu scaffoldu pomocí elektrostatického zvláknování nebo za pomoci

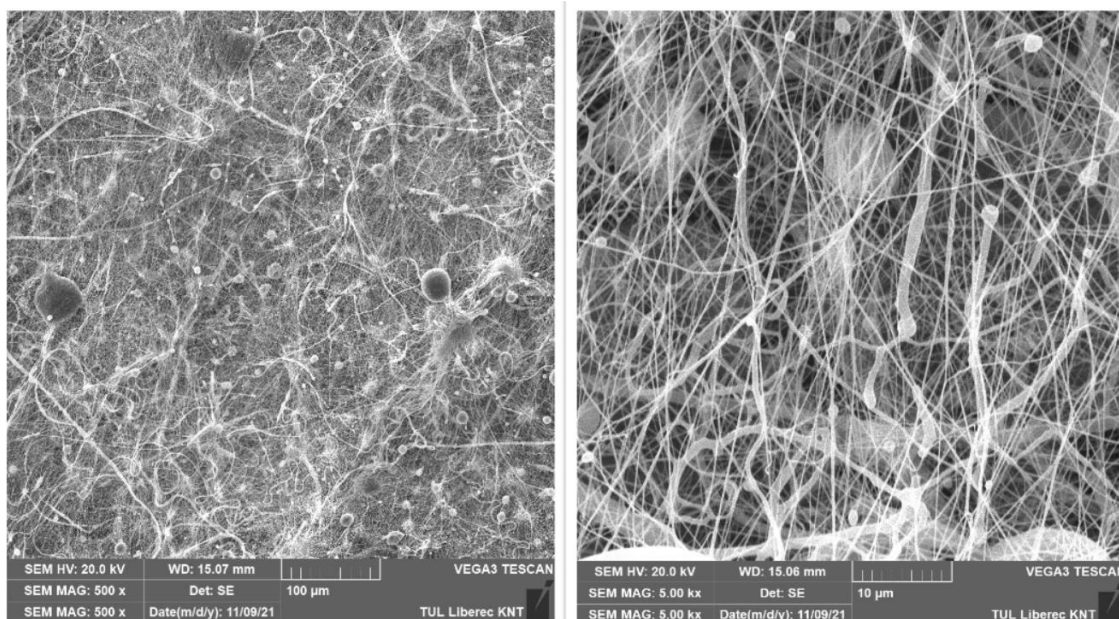
technologie solvent casting s následným vymýváním částic (particle solving), čímž se zajistí dobrá poréznost materiálu. PCL je často míchán nebo kopolymerován s PLLA, PDLLA, PGA nebo polyethery, aby byla urychlena celková degradace biomateriálu. PCL je užíváno v tkáňovém inženýrství jako tkáňový nosič pro regeneraci kostí, vazů, kůže, nervů a cév. Dále také jako vstřebatelné stehy nebo systémy pro podávání léčiv. PCL vykazuje dobré přilínání a šíření buněk a je tudíž zkoumán jako matrixový materiál pro buněčnou kulturu [14, 18].



Obrázek 6 Strukturální vzorec polykaprolaktonu.

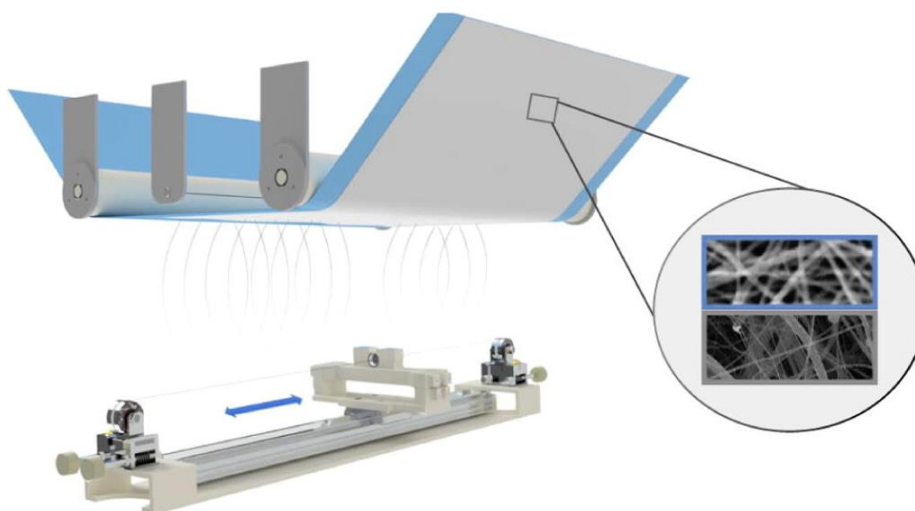
2.4 Výroba nanovláken

Elektrostatické zvlákňování je ekonomická a relativně jednoduchá metoda výroby kontinuálních a jednotných nanovláken (Obrázek 7) z téměř jakýchkoli syntetických a mnoha přírodních polymerů. Díky vysokému specifickému povrchu, laditelné velikosti pórů a flexibilitě nacházejí nanovláknenné membrány stále širší škálu aplikací. Existuje mnoho způsobů, jak vyrábět nanovláknena. Nejpoužívanější metodou pro průmyslovou výrobu nanovláken je bezjehlové elektrostatické zvlákňování, což je metoda, u které lze nastavit mnoho různých parametrů. Tím je umožněno vytvářet širokou škálu různých produktů odlišných tvarů a průměrů vláken [19].



Obrázek 7 Nanovláknenná vrstva PCL na podkladovém materiálu spunbond z polypropylenů. Snímky byly pořízeny na skenovacím elektronovém mikroskopu. Zvětšení: 500x a 5000x.

Princip elektrostatického zvlákňování (Obrázek 8) spočívá v dávkování polymerního roztoku nebo taveniny na nabitou elektrodu, jež je napojena na zdroj vysokého napětí. Za přítomnosti elektrického pole se kapka polymeru formuje do takzvaného Taylorova kužele ve chvíli, kdy je překonáno povrchové napětí. Z Taylorova kužele je materiál následně tažen a tím zároveň dloužen směrem na kolektor s podkladovou textilií, jež je uzemněn nebo nabit opačně než elektroda. Jsou zde důležité materiálové (koncentrace polymeru, rozpouštědlo, viskozita polymerního roztoku, vodivost roztoku a stabilita roztoku) a procesní podmínky (specifické pro každou technologii). Neméně významnou roli hrají okolní podmínky, jako je teplota vzduchu, vlhkost a sterilita prostředí [19].



Obrázek 8 Schéma bezjehlového elektrostatického zvlákňování ze struny [20].

2.5 Možnosti sterilizace a dezinfekce tkáňových nosičů

Další podstatnou vlastností materiálu je možnost jej sterilizovat, což má za následek odstranění mikroorganismů. Sterilizace má obvykle vliv na materiálové vlastnosti. Možnosti sterilizace jsou autokláv, suché teplo, gamma záření, záření svazkem elektronů, ethylenoxid, peroctová kyselina nebo plasma [21].

Sterilizace autoklávováním je prováděna pomocí ohřáté nasycené páry. Pára může způsobit hydrolytickou degradaci materiálu. Sterilizace suchým teplem je vhodná pro kapaliny nebo práškové materiály. Výhodou autoklávu a suchého tepla je, že se jedná o procesy bez použití dalších chemikálií. Většinou tyto metody nejsou použitelné pro polymerní materiály z důvodu nízké teploty tání, jež je například u polykaprolakonu 60 °C. Sterilizace gamma zářením je nejčastěji používaná forma sterilizace elektromagnetickým zářením s vysokou penetrační schopností (pětikrát vyšší než záření svazkem elektronů). Ozařování svazkem elektronů, fungující na principu urychleného proudu elektronů, má nižší penetrační schopnost než gama záření při vyšších dávkách. Sterilizace ethylenoxidem je chemickým procesem, při němž ethylenoxid je silné alkylační činidlo, které denaturuje DNA a proteiny, čímž narušuje běžné buněčné procesy, což může mít za následek zástavu buněčného dělení a metabolismu buněk. Zároveň se jedná o látku, jež je hořlavá, výbušná, karcinogenní a může mít vliv na změnu materiálových schopností. Materiál je nutno nechat po použití

ethylenoxidu dlouho odvětrávat, jelikož se zde tvoří toxická rezidua. Sterilizace kyselinou peroctovou je prováděna pomocí oxidace mnoha chemických skupin, včetně těch na buněčných membránách, čímž je iniciována buněčná smrt. Kyselina peroctová je silné oxidační činidlo. Při sterilizaci plasmatem je ozařován peroxid vodíku, jež se transformuje na hydroxylové a hydroperoxylové radikály, které napadají struktury mikroorganismů [21].

Dále je možné využít ultrafialové (UV) záření nebo roztok ethanolu. Tyto metody se nepovažují za metody sterilizační, ale za metody dezinfekční. Dezinfekce je soubor opatření ke zneškodňování mikroorganismů na základě fyzikálních nebo chemických postupů nebo jejich kombinací. Tato opatření mají přerušit přenos infekčních původců nákazy, jež žijí na plochách i povrchu těla. Dezinfekci roztokem ethanolu je mnohdy vhodné použít jako „předsterilizaci“ scaffoldů před nasazením buněk [21].

3. Antibiotikum

V této kapitole jsou popsána antibiotika z důvodu jejich inkorporace do vytvářené nanovlákněné vrstvy. Hlavním důvodem je snaha o dosažení bakteriální inhibice kmenů, které žijí ve střevech. Tyto kmeny obsahují enzym kolagenázu a štěpí nově vznikající tkáň. To vede k poruchám integrity střevní spojky a tedy anastomotickému leaku.

Antibiotikum, které je také nazýváno antiinfektivum, je druh antimikrobiální látky, jež působí proti bakteriím – může je usmrcovat nebo inhibovat jejich růst. Jedná se o nejdůležitější typ antibakteriálních látek užívaných pro boj s bakteriálními infekcemi nebo pro prevenci. Dříve byly termínem antibiotikum označovány pouze látky přírodního původu. Ostatní látky působící proti bakteriím byly nazývány termínem chemoterapeutika. V současné době je již tímto termínem označována jakákoli látka s tímto účinkem, nehlédě na jejich původ. Antibiotika nejsou účinná proti virům, které způsobují například běžné nachlazení nebo chřipku. Léky inhibující viry jsou antivirotika. Název pochází z řeckých slov anti – proti a bios – život [22].

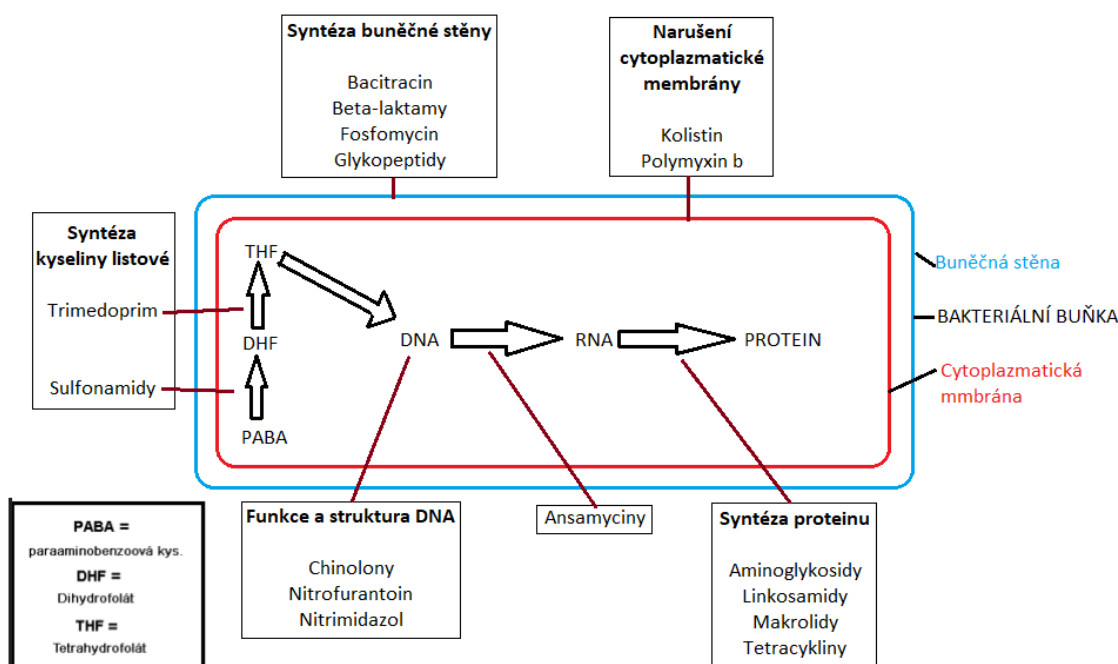
Jsou dvě třídy antibiotik. Ty, která jsou produkována přirozeně (penicilin) a plně syntetická (sulfoamidy, antiseptika). V současné době je ve veterinární nebo humánní medicíně užíváno asi 70 druhů látek s antibiotickým účinkem, přičemž jich je známo přes 6000. Užíván je tak malý zlomek, protože antibiotická látka může mít nežádoucí účinky nebo být toxická pro pacienta. Působí především proti bakteriím, ale může

působit i proti parazitickým prvokům či houbám. V České republice jsou antibiotika vydávána na předpis. Svým chemickým složením jsou antibiotika velmi různorodou skupinou látek [22, 23].

Antibiotika byla užívána již od starověku. Mnoho civilizací, například starověký Egypt, Čína, Srbsko, Řecko, Nubie nebo Řím, užívalo pro lokální aplikace plesnivý chléb, pro jeho blahodárné účinky. Největší revoluce ve vývoji antibiotik se odehrála v medicíně ve 20. století. Moderní penicilin byl objeven roku 1928 Alexandrem Flemingem. Tento objev se během války ukázal jako velmi přínosný. Snadný přístup k antibiotikům a vysoká účinnost však vedly k nadměrnému užívání a některé bakterie si vůči nim vyvinuly rezistenci. Nyní jsou antibiotika užívána také v zemědělství. Světová zdravotnická organizace klasifikovala antimikrobiální rezistenci jako rozšířenou „vážnou hrozbu, která již není předpovědí budoucnosti, děje se právě nyní v každé oblasti světa a má potenciál postihnout kohokoli, v jakémkoli věku, v kterékoli zemi.“ Celosvětová úmrtí způsobená antimikrobiální rezistencí dosáhla v roce 2019 1,27 milionu. Rezistivitu bakterií lze ovlivnit přidáním dalších chemických látek. Několik inovativních technik, jako jsou nanotechnologie, může být použito pro lokální dodání léčiv, což se ukázalo jako vhodné pro překonání fenoménu antibiotické rezistence [24, 25].

Jednou z nejméně důležitých vlastností antibiotik je selektivita jejich účinku. To znamená, že jsou pro pacienta téměř neškodné, přičemž zasahují struktury, které jsou specifické pro nechtěné mikroorganismy. Antibiotika lze rozdělit na dvě skupiny, dle působení – bakteriostatická a baktericidní. Baktericidní skupina bakterie usmrcuje, přičemž bakteriostatická zastavují jejich množení. Některá bakteriostatická antibiotika ovšem ve vyšších koncentracích mohou působit i baktericidně. Důležité je, že jsou obě skupiny schopny potlačit růst bakteriálních kolonií *in vitro* [22, 23].

Antibiotika je možno rozdělit do několika skupin dle mechanismu jejich účinku (Obrázek 9). První skupinou jsou antibiotika, která inhibují syntézu nukleových kyselin. Další významnou skupinou jsou antibiotika, jež narušují cytoplazmatickou membránu. Třetí skupina antibiotik inhibuje syntézu lipidů či jiných látek v buněčných stěnách. Dále existují antibiotika, která inhibují syntézu kyseliny listové. Poslední, ale neméně důležitou skupinou, jsou antibiotika, jež interferují s bakteriální proteinovou syntézou [23].



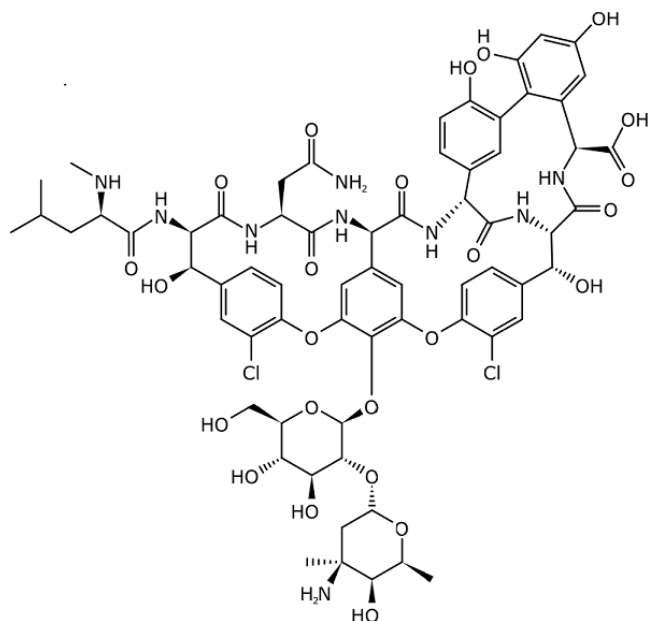
Obrázek 9 Schematický náčrt mechanismu účinku některých antibiotik (vlastní zpracování).

3.1 Vankomycin hydrochlorid (VCH)

Vankomycin (Obrázek 10) může být ve formě prášku, pak je určen pro perorální roztok nebo k přípravě roztoku infuzního. Spadá do skupiny antibiotik, která jsou nazývána „glykopeptidy.“ Mechanismus působení vankomycinu je blokování stavby buněčné stěny bakterií, které působí infekce. Vankomycin je možno užívat ve všech věkových skupinách k léčbě závažných infekcí. Například infekce kůže a podkožních tkání, kloubů, kostí, pneumonie, infekce vnitřní výstelky srdce (endokarditida) a její prevence po postoupení rozsáhlých chirurgických výkonů. Ústně bývá vankomycin podáván u dětí i dospělých k léčbě infekcí tlustého a tenkého střeva s poškozením sliznice, které jsou způsobené bakterií *Clostridium difficile* [26].

Mezi časté nežádoucí účinky patří bolest v oblasti vpichu a alergické reakce. Méně častými nežádoucími účinky jsou ztráta sluchu, nízký krevní tlak nebo úbytek kostní dřeně. Bezpečnost v těhotenství není vyjasněná, ale nebyly nalezeny žádné důkazy o škodlivosti. Je pravděpodobné, že použití při kojení je bezpečné [26, 27].

Poprvé byl vankomycin podán v roce 1954. Nachází se na seznamu základních léků Světové zdravotnické organizace. Světová zdravotnická organizace klasifikuje vankomycin jako kriticky důležitý pro humánní medicínu. Vankomycin je produkován půdní bakterií *Amycolatopsis orientalis*. Vankomycin je používán k léčbě infekcí, jež jsou způsobeny gram-pozitivními bakteriemi, které nereagují na jiná antibiotika [28].



Obrázek 10 Strukturní vzorec antibiotika vankomycin hydrochlorid.

4. Bakterie

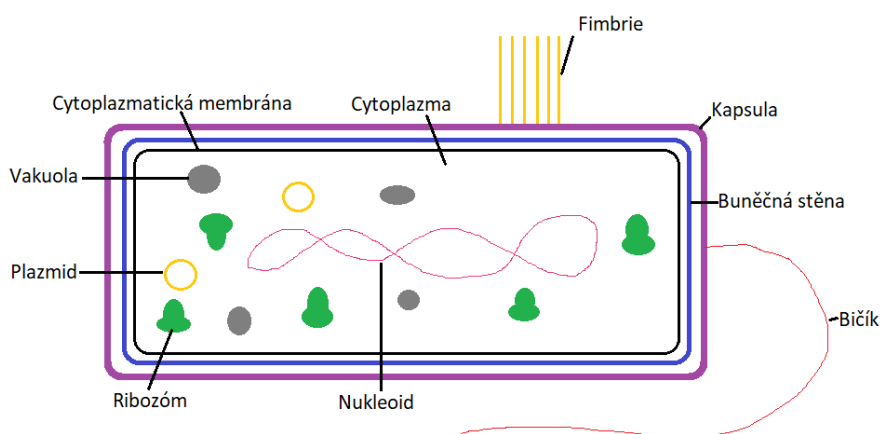
V následující kapitole jsou popsány bakterie obecně, jejich výskyt, stavba a funkce v těle. Je popsáno také jejich využití. Dále jsou popsány tři kmeny bakterií, s nimiž je třeba se po provedení střevní anastomózy vypořádat: *Escherichia coli*, *Staphylococcus gallinarium* a *Pseudomonas aeruginosa*.

Bakterie (Obrázek 11) jsou všudypřítomné, většinou volně žijící organismy, které se často skládají z jedné biologické buňky. Jsou nejrozšířenější skupinou organismů na světě. Tvoří dominantní skupinu prokaryotických mikroorganismů. Bakterie jsou typicky několik mikrometrů dlouhé a mají kokovitý nebo tyčinkovitý tvar. Patřily mezi první formy života, jež se na zemi objevily a byly přítomny ve většině jejich oblastí. Obývají jak půdu, tak vodu, kyselé horké prameny, radioaktivní odpad a biosféru (živý obal Země). Bakterie jsou významné v planetárním cyklu živin, například jsou schopné fixovat dusík z atmosféry. Cyklus živin zahrnuje také rozklad mrtvých těl, bakterie jsou zodpovědné za fázi hniloby. V okolí hydrotermálních průduchů přispívají bakterie k udržení života přeměnou rozpuštěných sloučenin, jako je metan a sirovodík na energii. Bakterie také žijí v symbiotických a parazitických vztazích s rostlinami, zvířaty a člověkem. Velká většina bakterií nebyla doposud charakterizována a je nemožné je pěstovat v laboratoři [29].

Studium bakterií je nazýváno bakteriologie, což je obor mikrobiologie. Tuto disciplínu významně rozvinuli Robert Koch a Louis Pasteur. Lidé a většina zvířat přenášejí

miliony bakterií. Většina se jich nachází ve střevech a mnoho se jich nachází na kůži. Většina bakterií nacházejících se v těle a na těle je neškodná nebo byly způsobeny ochrannými účinky imunitního systému. Mnohé z nich jsou také prospěšné, zejména ve střevech. Některé druhy bakterií jsou však patogenní a způsobují infekční onemocnění – například cholera, syfilis, anthrax, lepra, tuberkulóza, tetan nebo dýmějový mor. Nejčastějším smrtelným bakteriálním onemocněním jsou infekce dýchacích cest. K léčbě infekcí jsou užívána již dříve zmíněná antibiotika [30].

Bakterie jsou využívány při čištění odpadních vod, odbourávání ropných skvrn, výrobě sýrů, jogurtů, získávání zlata, palladia, mědi a dalších kovů v těžebním sektoru. Používají se také k výrobě antibiotik a jiných chemikálií. Bakterie se obvykle skládají z ribozomů, plazmidů, DNA, jaderné oblasti (nukleoid) a z peptidoglykanové buněčné stěny. Nevyskytuje se u nich pohlavní rozmnožování, nejčastěji se dělí binárně. Bakterie dříve považované za třídu Schizomycetes se nyní nazývají prokaryoty. Na rozdíl od eukaryot (buněk živočichů) nemají prokaryoty obvykle jádro a málokdy obsahují organely vázané na membránu [29].



Obrázek 11 Stavba bakteriální buňky.

4.1 Escherichia coli

Escherichia coli (E. coli) je gram-negativní, fakultativně anaerobní, tyčinkovitá bakterie která se běžně vyskytuje v dolní části střeva teplokrevných organismů, proto je její nález v pitné vodě indikací fekálního znečištění. Bakterie netvoří spóry a pohybuje se pomocí bičíků [29, 31].

Většina kmenů E. coli je neškodná, ale některé patogenní kmeny tohoto druhu mohou u svých hostitelů způsobit vážnou otravu jídlem a jsou příležitostně zodpovědné

za případy kontaminace potravin, které podněcují stažení produktu z trhu. Pro člověka a jeho mikroflóru se jedná o bakterii prospěšnou, podílí se na tvorbě některých vitamínů (K2) a na produkci látek, které brání šíření kolicinů (patogenních bakterií). *E. coli* patří k nejvíce prostudovaným prokaryotickým mikroorganismům, jelikož je intenzivně zkoumána již více než 60 let. Jedná se o důležitý druh bakterie v oblasti biotechnologie a mikrobiologie, kde složí jako hostitelský organismus pro většinu prací s rekombinantní (uměle syntetizovanou) DNA. Za příznivých podmínek 37 °C, dostatek živin) trvá reprodukce pouhých 20 minut [31].

E. coli a další fakultativní anaeroby tvoří asi 0,1 % střevní mikroflóry. Bakterie dosahuje šířky 0,6 μm a délky 2–3 μm . Fekálně-orální přenos je hlavní cestou, kterou patogenní kmeny této bakterie způsobují onemocnění. Buňky jsou schopny přežít mimo tělo po omezenou dobu, což z nich dělá potenciální indikátorové organismy k testování vzorků životního prostředí na fekální kontaminaci. Rostoucí skupina výzkumů však zkoumá environmentálně perzistentní *E. coli*, která může přežít mnoho dní a růst mimo tělo hostitele [31].

Na povrchu *E. coli* se vyskytují dva druhy fimbrií. První typ (sex pili) má velmi důležitou úlohu při konjugaci. Druhý typ je složen z kyselého hydrofobního proteinu (fimbrinu). Tento typ je vysoce antigenní a umožňuje bakterii se přichytit na epitel hostitele a kolonizovat jej. Bičíky bakterie jsou tvořeny flagelinem. Jsou také vysoce antigenní a mohou na povrchu bakterie tvořit kapsule při stresových podmínkách. Uvnitř *E. coli* se nachází molekula bakteriální DNA. Je v ní uložena dědičná informace bakterie. Cytoplazma je viskózní vodný roztok. Obsahuje rozpuštěné organické a anorganické látky a velké množství ribozomů, které umožňují rychlé dělení a proteosyntézu bakteriálních buněk. Peptidoglykanem je tvořena buněčná stěna těchto bakterií – tím je zajištěn rigidní tvar buňky. Pod touto vrstvou se nachází cytoplazmatická membrána složená převážně z proteinů – probíhá zde mnoho biochemických procesů, jako je například syntéza ATP nebo dýchání. Vnější membrána *E. coli* je vytvořena lipopolysacharidem. Ten je složen z lipidové dvouvrstvy. Prostor, jenž se nachází mezi buněčnou stěnou a vnější membránou je nazýván periplazmatický. Nachází se zde proteiny, které váží například cukry, enzymy či aminokyseliny [29, 31].

4.2 *Staphylococcus gallinarum*

Jedná se o člen, který je gram-pozitivní člen bakteriálního rodu *Staphylococcus*. Člen sestává z jednotlivých koků, párových koků a shluků koků. Kmeny tohoto druhu byly poprvé izolovány z kuřat a bažanta. Od svého počátečního objevu byl *Staphylococcus gallinarum* nalezen také ve slinách zdravých dospělých lidí [29, 31].

Staphylococcus gallinarum není obecně patogenní, i když byl izolován z infikovaných ran pacientů v nemocnici, z krve pacienta s chronickou infekcí hepatitidou B a z oční infekce (endofthalmitida). Míra infekce a nemocnost *Staphylococcus gallinarum* je poměrně nízká a její účinky na člověka jsou omezené [31].

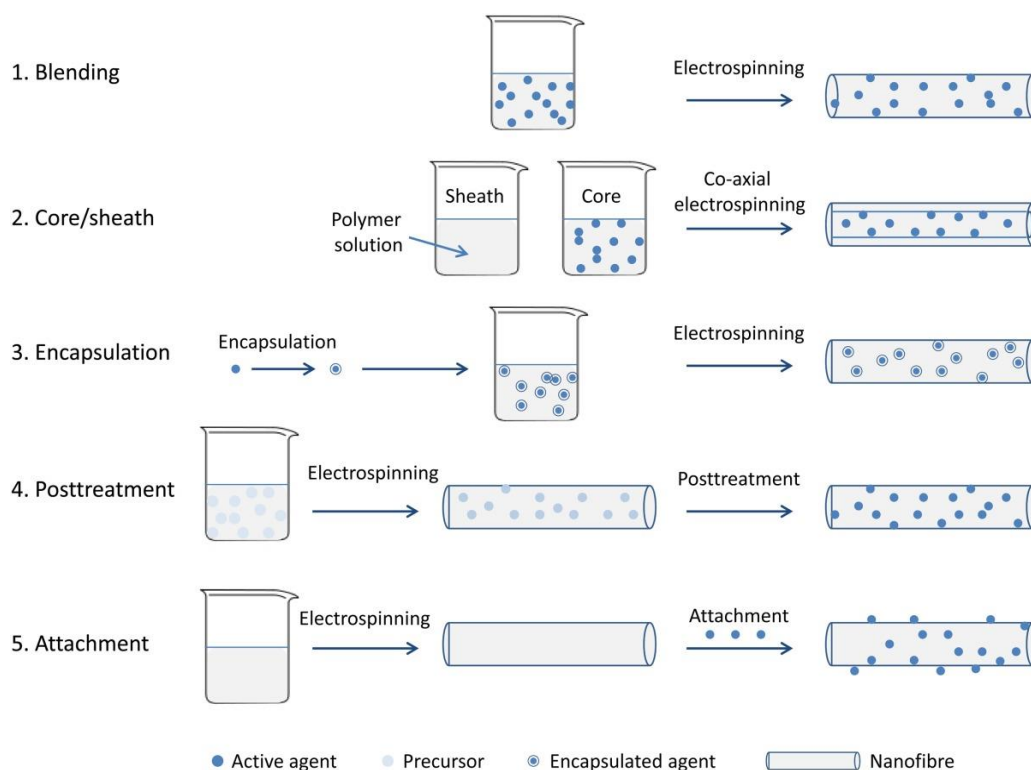
4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Tento druh bakterií patří mezi gram-negativní, pohyblivé, aerobní (ačkoli může růst anaerobně v přítomnosti dusičnanů) a nefermentující. Tvar bakterie je tyčinkovitý. Někdy bývá obalena slizovou vrstvou, jež se podobá bakteriálnímu pouzdru. Obvykle se vyskytuje v rostlinách, půdě a odpadních vodách. *Pseudomonas aeruginosa* může způsobit infekci celého organismu nebo jakéhokoliv orgánu. Infekce způsobuje nejhojněji u osob s porušenou imunitou nebo s těžkým onemocněním [31].

5. Inkorporace antibiotik do nanovláken

Infekce způsobované mikroorganismy, například bakteriemi nebo houbami, jsou hlavní překážkou v procesech hojení. Běžné způsoby podání antibiotik jsou orální, intravenózní/intramuskulární, povrchové (pokožkou) a inhalační. Tyto druhy podávání léků se potýkají s kritickými životně důležitými problémy, jako jsou: rychlejší dodání léku, než bylo zamýšleno, což může mít za následek bakteriální rezistenci, systémovou toxicitu související s dávkou, podráždění tkání a nakonec opožděný proces hojení, který je třeba řešit. V poslední době jsou studie zaměřovány na nové systémy podávání léků, překonání rezistence a toxikologických problémů a lokalizaci molekul antibiotika v místě působení ve správné dávce. V tomto ohledu bylo vyvinuto mnoho nanotechnologických postupů, jako jsou nanočásticové nebo nanovláknenné systémy, které řeší doprovodné problémy uvedené výše. Elektrostaticky tvořená nanovláknena plněná antibiotiky (Obrázek 12) nabízí výhody, jako je řízené dodávání léčiv, vysoká kapacita plnění léčiv, vysoká účinnost enkapsulace, současné dodávání více léčiv, snadnost výroby a nákladová efektivita pro farmaceutické a biomedicínské aplikace.

Nanovláknům je dnes věnována zvláštní pozornost, jako slibným antibakteriálním nosičům léčiv. Různé antibakteriální látky, např. biocidy, antibiotika, kvartérní amoniové soli, triclosan, kovové nanočástice (stříbro, oxid titaničitý a oxid zinečnatý) či antibakteriální polymery (chitosan, polyethylenimin atd.) byly impregnovány různými technikami do nanovláken, které vykazují silné antibakteriální aktivity ve standardních testech [32].



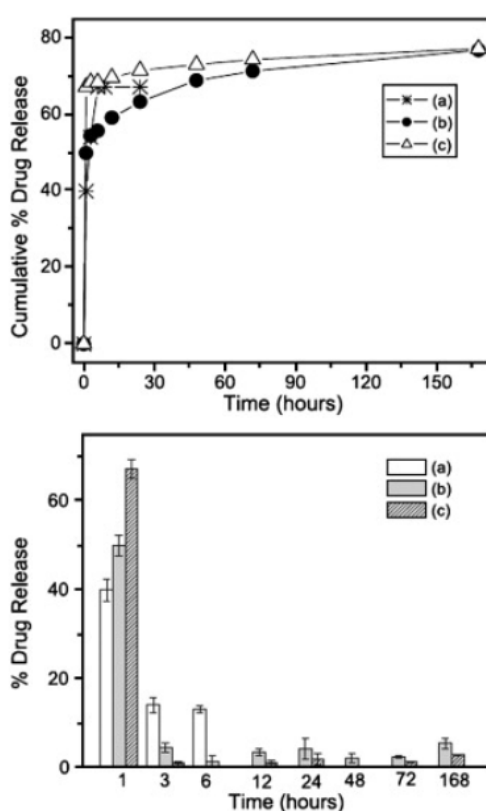
Obrázek 12 Různé metody začlenování léčiv do nanovláken. 1. vmíchání léčiva do roztoku polymeru před zvlákňováním, 2. uzavření léčiva v jádru vlákna pomocí koaxiálního elektrostatického zvlákňování, 3. enkapsulace/adsorpce léčiva v nanostrukturách před disperzí v roztoku pro elektrostatické zvlákňování, 4. navázání prekurzoru (sloučenina, která se účastní chemické reakce, kdy vzniká jiná sloučenina) na účinnou látku v nanovláčkách po elektrostatickém zvlákňování, 5. navázání aktivní látky na nanovláčka po elektrostatickém zvlákňování [32].

5.1 Možnosti inkorporace antibiotik do nanovláken

Jedním z prvních, kdo inkorporoval antibiotika do nanovláken prostřednictvím elektrostatického zvlákňování byl Keneway a kol. Antibakteriální aktivita výsledných nanovláken však nebyla v jejich studii zkoumána. Od té doby bylo mnoho různých polymerních antibiotik začleněno do řady hydrofilních a hydrofobních nanovláken. Tato nanovláčka vykazují slibné aplikace ve filtraci, obvazových materiálech, ochranných textilích, tkáňových nosičích a biomedicínských zařízeních. Obecně je polymer rozpuštěn v organickém rozpouštědle. Antibiotické činidlo je rozpuštěno

ve stejném nebo obvykle podobném druhu rozpouštědla. Antibiotické činidlo rozmíchané v rozpouštědle by mělo být pomalu přidáváno k roztoku polymernímu za míchání, aby se vytvořil homogenní roztok. Tímto způsobem může být obsazen do nanovláken velké množství antibiotik. Je třeba určit koncentraci léčiva v roztoku připravovaném pro elektrostatičké zvláknování. Zahrnutí antibiotik do polymerního roztoku může mít vliv na elektrostatičnost a morfologii nanovláken v důsledku změny viskozity, povrchového napětí či vodivosti materiálu [32].

Na Obrázku 13 se nachází příklad doby, za kterou se uvolňuje inkorporované léčivo z nanovláknenných vrstev.



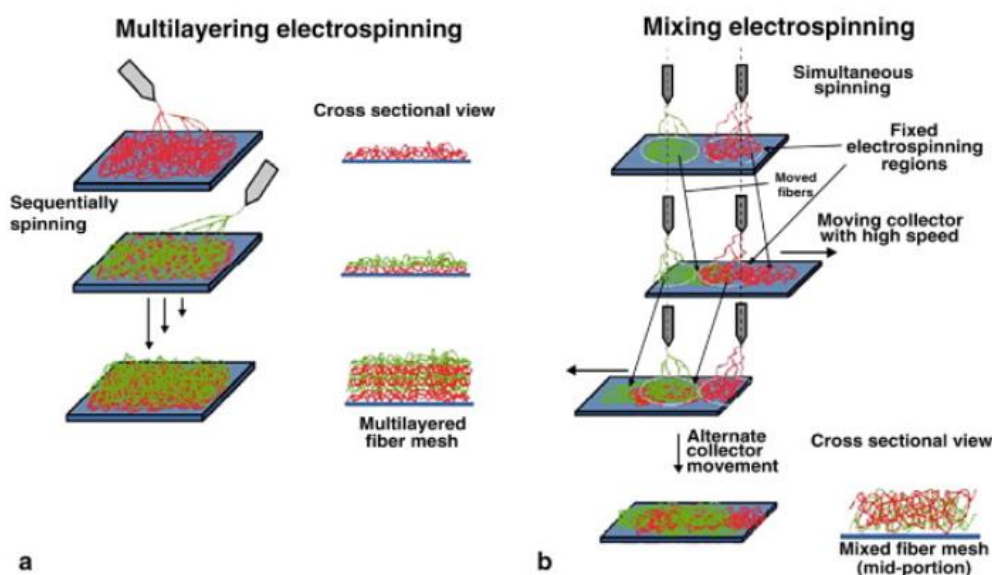
Obrázek 13 Příklad doby, po kterou se uvolňuje inkorporované léčivo (cefoxin sodný) z nanovláknenné vrstvy. Horní graf zobrazuje křivku kumulativní, spodní diferenciální. Data představují průměrnou hodnotu \pm směrodatnou odchylku. A: PLGA s 1% hmotnosti léčiva, B: PLGA/PLA/PEG-b-PLA s 5% hmotnosti léčiva, C: PLGA s 5% hmotnosti léčiva [33].

Sodná sůl cefoxitinu například zvýšila vodivost a zlepšila zvláknitelnost roztoku PLGA/PLA/PEG-b-PLA. Také byla pozorována produkce jednodušších nanovláken a zmenšení průměru vláken se závislostí na koncentraci polymerního roztoku. Podobné výsledky byly pozorovány u moxifloxacin hydrochloridu v roztoku PLA. Přítomností 1–20% tetracyklinu hydrochloridu v PLGA byl ovlivněn průměr vláken [33, 34, 35].

Smíchání antibiotik v roztoku polymeru před elektrostatičkým zvlákňováním je jednoduchá a všestranná metoda pro inkorporaci velkého množství léčiv do prakticky jakýchkoli polymerních nanovláken, bohužel má i své nevýhody. Malé průměry nanovláken napomáhají tomu, že začleněná léčiva se často uvolňují, jakmile jsou materiály ponořeny do vodného roztoku [32, 33].

Lze využít koaxiálního elektrostatičkého zvlákňování, kdy plášť vlákna obsahuje polymer a jeho jádro antibiotikum, k zajištění déletrvajícího uvolňování. Dalšími možnostmi, jak zajistit dlouhodobější uvolňování je kovalentní vazba léčiva na povrch vlákna, zapouzdření antibiotik v nanodiscích či adsorpce léčiva v nanostrukturách. Další možností k dosažení prodlouženého uvolňování antibiotik je adsorbovat nebo zapouzdřit léčivo do nanostruktury před jeho dispergováním v roztoku polymeru. Je také možné použít vícevrstvé nebo směšovací elektrostatičké zvlákňování, pro poskytnutí antibakteriální aktivity a zároveň poskytnutí příznivých fyzikálních vlastností v nanomembránách. Pro směšovací elektrosponing je možno použít dvouproudové uspořádání elektrostatičkého zvlákňování, k současné výrobě dvou různých druhů nanovláken na stejné membráně. Výsledné kompozitní materiály vykazovaly vysokou elasticitu, pevnost v tahu a schopnost retence stehů, ale výrazně snížené smrštění materiálu viz.: Obrázek 14 [33, 35, 36, 37, 38, 39].

V Tabulce 1 se nachází již zvlákňované polymery, metoda inkorporace a inkorporovaná antibiotika.



Obrázek 14 Schématický diagram (a) vícevrstvého elektrostatičkého zvlákňování, (b) směšovacího elektrostatičkého zvlákňování [33].

Tabulka 1 Tabulka zobrazující zvláknovaný polymer, inkorporovaná antibiotika a metodu inkorporace antibiotik do nanovláken [32].

Zvláknovaný polymer	Antibakteriální látky	Metoda inkorporace
PLA, PEVA, PLA/PCL, PEUU/PLGA	Tetracycline	Smíchání s roztokem polymeru při jeho výrobě
PLGA	Cefoxitin	Smíchání s roztokem polymeru při jeho výrobě
PLA	Mupirocin	Smíchání s roztokem polymeru při jeho výrobě
PLA, PLA/PEG, PU	Ciprofloxacin	Smíchání s roztokem polymeru při jeho výrobě
PLGA	Cefazolin	Smíchání s roztokem polymeru při jeho výrobě
PLGA	Amoxicillin	Smíchání s roztokem polymeru při jeho výrobě
PLA, PLA/kolagen, PCL	Gentamycin	Zvláknování jádro/plášť
PLLACL	Tetracycline	Zvláknování jádro/plášť
PMMA/nylon	Ampicillin	Zvláknování jádro/plášť
PLGA	Amoxicillin	Adsorpce/enkapsulace do nanostruktur
PCL/PLA	Triclosan	Smíchání s roztokem polymeru při jeho výrobě
PLA	Triclosan	Komplexování s β g-CD
CA	Chlorhexidine	Smíchání s roztokem polymeru při jeho výrobě
PAN, PLA, PLA/PEG	QACs	Smíchání s roztokem polymeru při jeho výrobě
CA/PEU	PHMB	Smíchání s roztokem polymeru při jeho výrobě
PAN	PHMB	Kovalentní navázání na nanostrukturu
PAN	N-Halamine	Smíchání s roztokem polymeru při jeho výrobě
PEO/chitosan	K5N8Q	Smíchání s roztokem polymeru při jeho výrobě
PDLLA, PEO	Antibacterial peptides	Smíchání s roztokem polymeru při jeho výrobě
PVDF, PVA/PU, Nylon 6, PVP, PLGA, PBS	AgNP	Disperze v roztoku polymeru
Nylon 6, PAN, PLLCL, PCL, PVA	AgNP	Syntéza v roztoku polymeru
PLA, PCL, PAN, PVA, PEO	AgNP	<i>In situ</i> syntéza
PLA/chitosan	AgNP	<i>In situ</i> syntéza
PEO/chitosan	AgNP	<i>In situ</i> syntéza
PVA/chitosan	AgNP	<i>In situ</i> syntéza
PVA/chitosan	AgNP	Disperze v roztoku polymeru

PEO/chitosan	AgNP	Disperze v roztoku polymeru
PU, PVA, hedvábná vlákna	ZnO, TiO ₂	Disperze v roztoku polymeru
PU	TiO ₂	<i>In situ</i> syntéza
Nylon 6	ZnO	Electrospraing na povrch nanotructury
PMMA	ZnO/TiO ₂	Syntéza v roztoku polymeru
PLA, PVA	Deriváty chitosanu	Vmíchání léčiva do roztoku polymeru
PET, PCL, PEO	Chitosan	Vmíchání léčiva do roztoku polymeru
PLA	Chitosan	Zvlákňování jádro/plášť

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část obsahuje popis postupu výroby nanovlákněných vrstev z poly-ε-kaprolaktonu (PCL). Do nanovlákněných vrstev bylo v různých koncentracích inkorporováno antibiotikum Vankomycin. Byly porovnány vrstvy sterilní a nesterilní. Sterilizace vrstev probíhala za pomoci etylenoxidu. Dále byly vrstvy zkoumány za pomoci několika metod. Byly nasnímány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a byly vyhodnoceny průměry vláken. Dále byla měřena jejich smáčivost za pomoci měření kontaktního úhlu s destilovanou vodou a simulovanou střevní tekutinou. Elementární analýza byla provedena ke zjištění reálného obsahu antibiotik ve zvlákněných vrstvách. Další použitou metodou byla fluorescenční mikroskopie. V neposlední řadě byla zjišťována cytotoxicita materiálů, proběhlo buněčné testování a antibakteriální testy. V následujících kapitolách jsou popsány metody experimentů, výsledky experimentů a na závěr jejich celkové zhodnocení.

6. Metody

V této kapitole jsou popsány použité metody, postupy, přístroje a chemikálie k provedení experimentů.

6.1. Příprava polymerních roztoků PCL

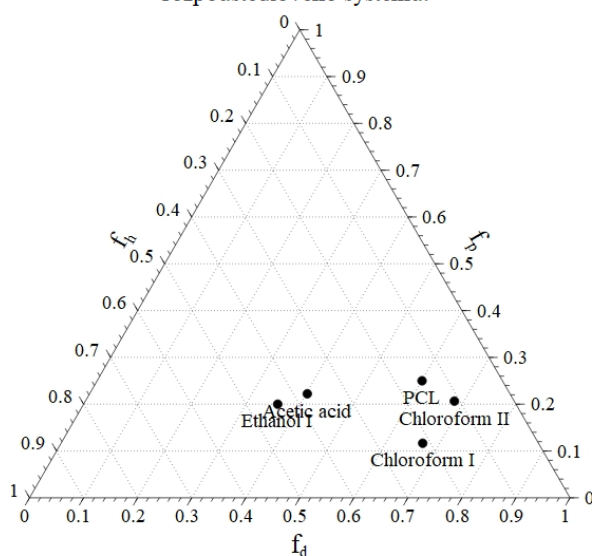
Byly připraveny čtyři různé druhy roztoků. Základem všech byl granulát PCL (Mw 45000 g/mol, Sigma Aldrich, USA) v roztoku o koncentraci 16 hm. %. Granulát byl rozpuštěn v rozpouštědlovém systému chloroform/etanol/kyselina octová (Penta Chemicals, Česká republika) v poměru 8/1/1. Z důvodu rozpustnosti nemohl být VCH přidán do roztoků. Nejprve byl před-rozpuštěn v ethanolu, po dobu tří hodin a následně byl do tohoto systému vmíchán zbytek antibiotika Vankomycin hydrochlorid (Mylan, používáno i Kabi) v práškové formě. Metodika přidávání Vankomycinu musela být pro jeho špatnou rozpustnost upravena, viz kapitola 7.1. Byly zvoleny koncentrace 0,5; 1; 1,5 hmotnostních %. Tyto koncentrace byly vypočítány z hmotnosti sušiny PCL. Roztoky byly následně 24 hodin míchány, byly homogenizovány pomocí ultrazvukové sonotrody a následně byly hned zvlákněny. Použité chemikálie se nachází v Tabulce 2.

Tabulka 2 Použité chemikálie.

Název	Firma
PCL 45000 g/mol	Sigma Aldrich
Vankomycin hydrochlorid	Mylan (používáno i Kabi)
Chloroform	Penta
Ethanol	Penta
Kyselina Octová	Penta

Výběr vhodné polymerní látky závisí na mnoha faktorech, jako je materiál, stav daného materiálu a klimatické podmínky. Velmi důležitým kritériem výběru rozpustnosti polymerní látky je její případná změna v důsledku stárnutí, jež ovlivňuje případné možnosti odstranění látek a tím určuje i reversibilitu zásahu. Pro odhad, zda bude daný polymer rozpustný ve vybraném rozpouštědlovém systému, lze použít srovnání parametrů rozpustnosti – Hansenových parametrů rozpustnosti. U Hansenových parametrů je celkový parametr dán na základě tří dílčích parametrů, které vychází ze tří různých typů interakcí pozorovatelných u látek organických. Každý parametr lze převést na tzv. redukované parametry rozpustnosti, díky kterým lze sestavit Teasův (ternální) diagram. Pomocí tohoto diagramu lze na základě experimentálních dat určit limitní hodnoty pro každý dílčí parametr rozpustnosti, který musí látka splňovat, aby bylo možno danou látku rozpustit. Sestavený teasův diagram na Obrázku 15 je tedy užitečnou pomůckou při výběru vhodného rozpouštědla. Na jeho základě byl vybrán pro před-rozpuštění VCH ethanol, jelikož se v diagramu nachází nejdále od PCL, bude tedy pravděpodobně nejbližší antibiotiku Vankomycin hydrochlorid.

Teasův diagram s vyznačenými parametry rozpustnosti rozpouštědlového systému.



Obrázek 15 Grafické zobrazení Teasova diagramu s vyznačenými parametry rozpustnosti v rozpouštědlovém systému CHEKO.

6.2. Výroba materiálů na zařízení Nanospider™

Materiály byly vyrobeny pomocí zvláknění polymerních roztoků na zařízení Nanospider™ NS 1WS500U (Elmarco, Česká Republika). Teplota, vlhkost a další klimatické podmínky byly udržovány pomocí klimatizace NS AC150 (Elmarco, Česká Republika). Polymerní roztok byl přidán do zásobníku, ze kterého byl nanášen po celé délce struny, která působila jako zvlákňovací elektroda. Nanovláknenné vrstvy byly po zvláknění ukládány na podkladovou netkanou textilii – polypropylenový spunbond.

6.5. Optimalizace plošné hmotnosti vrstev

Nastavení parametrů zvlákňovacího zařízení Nanospider™ bylo optimalizováno, aby plošná hmotnost vrstev byla 10 g/m². Z vyrobené vrstvy byl vyřezán čtverec o velikosti 10 x 10 cm, byl zvážen na analytických vahách a výsledná plošná hmotnost byla vypočítána.

6.4 Sterilizace vrstev

Sterilizace nanovláknenných vrstev proběhla za pomoci etylenoxidu (Aprolene, UK) dle normy ČSN EN ISO 11135-1 Sterilizace výrobků pro zdravotní péči – Sterilizace ethylenoxidem – Část 1: Požadavky na vývoj, validaci a průběžnou kontrolu sterilizačního postupu pro zdravotnické prostředky. Sterilizace probíhala při 37 °C a po dobu 12 hodin.

6.5 SEM - morfologie vláknenných vrstev

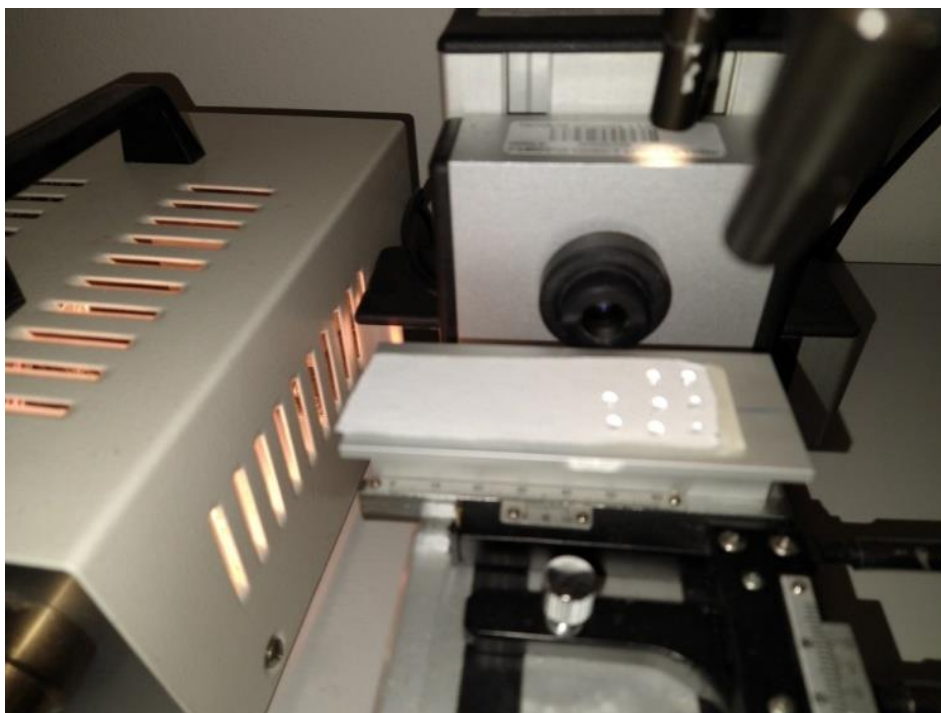
Byl odebrán malý vzorek ze zvlákněných vrstev. Ten byl pokoven pomocí zařízení Quorum Q150R ES (Quorum Technologies). Byla nanesena vrstva zlata o tloušťce 10 nm. Pozlacení vzorku proběhlo, aby byl vzorek vodivý. Vzorky byly následně snímány na skenovacím elektronovém mikroskopu TESCAN VEGA 3 SB Easy Probe (TESCAN, Česká republika). Snímky byly pořizovány při různých zvětšeních.

6.6. Měření průměru vláken

Měření průměrů vláken probíhalo na snímcích z elektronového skenovacího mikroskopu pomocí programu ImageJ. Pro měření byly použity snímky při zvětšení 5000x. Pro každý materiál bylo provedeno 500 měření.

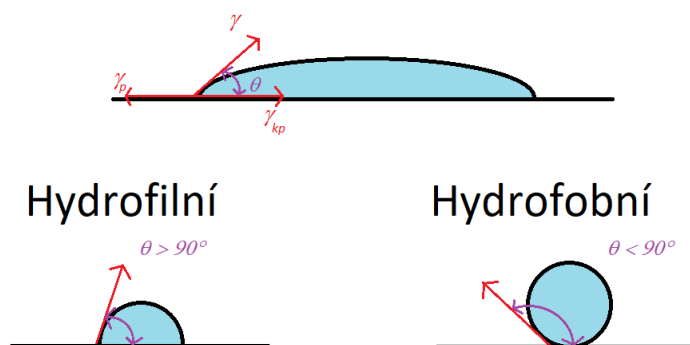
6.8. Měření smáčivosti materiálů – kontaktní úhel

Vyhodnocení smáčivosti materiálu proběhlo pomocí měření kontaktního úhlu metodou přisedlé kapky. Pro nafocení a zpracování byl použit program programu See System 9.0 (Advex Instruments, Česká republika). Po obvodu podložního sklíčka byla nalepena oboustranná lepící páska, na kterou byl následně připevněn testovaný materiál. K nanesení kapky tekutiny o objemu 5 μl byla použita pipeta. Kapka přisedlá na testovaných materiálech byla nasnímána pomocí CCD kamery a následně byl vyhodnocen kontaktní úhel v programu z fotografií. Vyhodnocení kontaktního úhlu probíhalo pomocí vyznačení tří bodů na rozhraní mezi kapkou, povrchem materiálu a vzduchem. Body byly následně spojeny a byla vytvořena kružnice. Tangenta této kružnice odpovídá velikosti kontaktního úhlu. Byly testovány jak materiály sterilní, tak nesterilní. Pro testování byla použita destilovaná voda a simulovaná střevní tekutina (Biochemazone). Na každém materiálu bylo provedeno 20 měření. Na Obrázku 16 se nachází měření smáčivosti materiálu pomocí CCD kamery a na Obrázku 17 se nachází povrch hydrofobní a hydrofilní.



Obrázek 16 Měření kontaktního úhlu pomocí CCD kamery.

Kontaktní úhel



Obrázek 17 Kontaktní úhel s vyznačenou rovnováhou sil, kontaktní úhel: hydrofilní povrch (smáčivý) a hydrofobní povrch (nesmáčivý).

6.9 Elementární analýza – měření obsahu prvků ve vrstvách

Cílem tohoto experimentu je ověřit, kolik obsahu prvků dusíku zůstalo ve vyrobeném nanovlákněném materiálu s přidaným antibiotikem Vankomycin hydrochlorid, který byl přidán do roztoku PCL před zvlákněním. Zvláknění (electrospinning) bylo provedeno na zařízení Nanospider™.

Nejprve byly připraveny dva vzorky o hmotnosti 5 mg z různých míst každého materiálu. Dále byla připravena lodička z aluminiové folie, byly do ní vloženy vzorky. Pro každý materiál s každým obsahem antibiotika byly provedeny dvě měření. Vzorky v lodičkách byly znovu zváženy, aby měly přesně 5 mg. Lodička byla následně složena do tvaru tablety a opět převážena. Dále bylo připraveno kontrolní měření a standarty. Kontrolním měřením byly prázdné lodičky a standartem byl sulfanilamid. Měření bylo provedeno pomocí přístroje Elementar Vario Cube s TCD detektorem. Testování probíhalo při 1200 °C po dobu 90 sekund. Pro všechny čtyři testované seriály byly testovány jak materiály sterilní, tak nesterilní.

6.10 Vysoko-účinná kapalinová chromatografie (HPLC) – měření obsahu antibiotik ve vrstvách

Aby byl stanoven procentuální obsah Vankomycinu hydrochlorid ve vyrobených nanovlákněných vrstvách, které antibiotikum obsahují, bylo potřeba provést test za pomoci vysoko-účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Nejprve bylo třeba připravit zásobní roztok 1 mg VCH v 1 ml PBS, dále roztok ninhydrinu (NIN, Sigma Aldrich, USA) – 0,1 g ninhydrinu v 20 ml PBS. Poté byly připraveny vzorky materiálu o hmotnostech 10 až 50 mg – hmotnost závisela na použitém materiálu. Tyto vzorky

byly uloženy do zkumavek a byly zalaty 2,5 ml PBS. V poslední řadě je třeba připravit kalibrační roztoky ze zásobního roztoku VCH o koncentracích: 0,075; 0,1 a 0,15 mg/ml o objemu 2,5 ml.

Nejprve byly všechny připravené roztoky (i kalibrační) a vzorky zahřívány na 95 °C po dobu 15 minut. Těsně před započítím zahřívání bylo ke všem vzorkům přidáno 2,5 ml ninhydrinu. Při zahřátí materiálu došlo k rozpuštění nanovláken, čímž se uvolnilo antibiotikum VCH. S ninhydrinem reagovalo antibiotikum VCH, což mělo za důsledek vznik fialově zbarveného komplexu vankomycin-ninhydrin. Po dokončení zahřívání byly vzorky nejprve zchlazeny pod studenou tekoucí vodou po dobu 60 sekund. Jelikož se nanovláknenné vzorky pod tekoucí vodou vysrážely, bylo třeba je před naměřením přefiltrovat přes filtrační papír. Vzorky určené pro kalibraci bylo třeba ihned analyzovat.

Pro měření bylo použito zařízení chromatogram Shimadzu LC-10ADVP. Od každého vzorku proběhl nástřik kapaliny o objemu 20 µl na analytickou kolonu (Ascentis Express ES-CN, 10 cm × 4,6 mm, 5 µm). Mobilní fázi roztoku tvořila destilovaná voda (dH₂O) a acetonitril (ACN, Thermo Fischer, Francie). Jejich poměr byl měněn. Nejprve byl ACN:dH₂O měněn z poměru 5:95 na 100:0 po dobu tří minut. Během následující minuty se poměr opět vrátil do koncentrace o poměru 5:95. Aby bylo vzorek možné změřit znovu, bylo třeba kolonu ekvilibrovat po dobu 1 minuty. Každý vzorek byl testován dvakrát. Kalibrační roztoky zde sloužily pro stanovení rovnice kalibrační přímky a ověření linearity hodnot. Výsledkem z tohoto měření byly chromatogramy, ze kterých byly spočítány plochy peaků a pomocí rovnice kalibrační přímky byla vypočítána koncentrace VCH ve všech testovaných nanovláknenných materiálech.

6.11 Antibakteriální testování

Cílem tohoto testování je ověřit, zda nanovláknenné materiály s antibiotikem Vankomycin hydrochlorid (VCH), jež byly připraveny za pomoci zvláknění (electrospinning) na zařízení Nanospider™, jsou nepříznivé pro rozvoj buněčných kultur: E. coli a Staphylococcus gallinarum pomocí difúzí účinnosti antibiotika - testování velikostí halo zón.

Testování difúzní účinnosti antibiotika VCH vycházelo z normy AATCC Test Method: 147-2004 – Antibacterial Activity Assessment of Textile materials: Parallel Streak Method. Podle potřeb testování byla však metodika upravena.

Pro difúzní experiment bylo připraveno deset vzorků o rozměru 10 x 40 mm od každého připraveného nanovláčenného materiálu.

Testovanými bakteriálními kulturemi jsou *Escherichia coli* CCM 7929 (gram-negativní) a *Staphylococcus gallinarum* CCM 3572 (gram-pozitivní). Pro testování byl připraven agar do Petriho misek, který sloužil jako živná půda pro bakteriální kultury. V Petriho miskách pro testování *Escherichia coli* byl připraven Nutrient agar. V miskách pro testování *Staphylococcus gallinarum* se nacházel Braid Parker agar. Byla připravena bakteriální suspenze – inokulum. Do fyziologického roztoku (NaCl v destilované vodě) byly přidány bakterie z vyočkované kolonie, jež byla kultivována na agaru o koncentraci $1,5 \cdot 10^8$ KTJ/ml. Koncentrace vypovídá o počtu kolonií tvořících jednotky na 1 ml. Koncentrace je měřena pomocí přístroje nefelometru, jež měří zákal v základních jednotkách McFarland. 1 McFarland je $3 \cdot 10^8$ KTJ/ml. Do Petriho misek s připraveným agarem bylo napipetováno přesné množství inokula – 1 ml s vyočkovanými koloniemi bakterií *Escherichia Coli* a *Staphylococcus gallinarum*. Nejprve bylo inokulum rozetřeno po příslušném agaru v Petriho misce. Poté byl vložen do každé misky právě jeden vzorek materiálu. Misky bylo třeba inkubovat – byly vloženy do inkubátoru po dobu 24 hodin o teplotě 37 °C. Testovány byly koncentrace antibiotika v materiálu: 0,5 %; 1 % a 1,5 % o plošných hmotnostech 10 a 12 g/m².

6.12 Buněčné testování *in vitro*

Byla použita buněčná linie 3T3 myších fibroblastů, která byla kultivována v Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biosera, Francie). K této buněčné linii bylo přidáno 10 % bovinního fetálního séra (FBS, Biosera, Francie), 1% směs antibiotik (penicilin, streptomycin, amfotericin B) a 1 % Glutaminu (Biosera, Francie). Buňky byly následně uchovávány v kultivačních lahvičkách, které byly vloženy do inkubátoru, ve kterém byl 5 % obsah CO₂ a teplota 37 °C. Poté, co vznikla celistvá (konfluentní) vrstva buněk na dně lahvičky, byly buňky pasážovány. Aby mohly být buňky pasážovány, musí nejdříve být odsáto z lahviček médium, poté jsou buňky opláchnuty v PBS (fosfátový pufr) a následně je přidán trypsin (Lonza, Švýcarsko), jež buňky uvolňuje ze dna lahvičky. Trypsin působí při 37 °C. Poté byly lahvičky opět inkubovány po dobu pěti minut při teplotě 37 °C. Po inkubaci je třeba buňky rozsuspendovat do nového média. Aby mohl být zjištěn počet buněk v lahvičce, tak bylo odebráno 10 µl buněčné suspenze do mikrozkuřavky (typ Eppendorf) a přidáno 10 µl trypanové modři. Na automatickém

počítadle LUNA™ (Logos Biosystems, Jižní Korea) byl následně proveden výpočet buněk, které zůstaly živé a tedy i buněčné viability.

6.12.1 Cytotoxicita extraktů a Vankomycinu hydrochloridu v médiu DMEM

Cílem testování je ověřit, zda nanovláknenné materiály, jež byly připraveny za pomoci zvlákňování (electrospinning) na zařízení Nanospider™ nejsou cytotoxické.

Bylo naváženo 100 mg materiálů do centrifugační zkumavky, aby byly vysterilizovány a zality 10 ml média. Do jamek s kolečky bylo napipetováno kompletní médium: DMEM + 10% FBS + 1% ATB + 1% glutamin. Vzorky byly umístěny do třepačky na 24 hodin. Třepačka byla nastavena na teplotu 37 °C a 100 rpm. Byly pořízeny extrakty z materiálu a přidány ke subkonfluentní vrstvě buněk (fibroblastů), jež byly osázeny v destičce s 96 jamkami. Byla provedena pozitivní (PC) a negativní (NC) kontrola. Pozitivní kontrola byla tvořena buňkami s přídavkem cytotoxického činidla Triton X-100 o koncentraci 0,1 % v kompletním médiu. Při negativní kontrole bylo užito médium, které bylo inkubováno při stejných podmínkách, jako extrakty. Destička byla následně inkubována po dobu 24 hodin a následně byla stanovena viabilita buněk pomocí kolorimetrického MTT testu (n=9 pro každou skupinu). Hodnota absorbance, jež byla naměřena u negativní kontroly, byla považována za 100 % viabilitu. U všech ostatních materiálů a koncentrací byly hodnoty přepočítány a poté byly zpracovány do grafu. Za cytotoxický účinek je považován pokles viability kontrolních buněk pod 70 %.

6.12.2. Test buněčné adheze a proliferace

Tento experiment má za cíl ověřit adhezi, proliferaci a množství buněk na nanovláknenných materiálech s obsahem Vankomycinu hydrochloridu (VCH), jež byly připraveny za pomoci zvlákňování (electrospinning) na zařízení Nanospider™.

Nanovláknenné vzorky materiálu byly testovány *in vitro* na buněčnou adhezi a proliferaci. Materiál byl vyřezán do koleček o průměru 1,6 cm, vložen do 24 jamkových destiček a zatížen skleněnými kroužky, které kopírovaly okraj jamky. Pro každý testovaný materiál byly připraveny tři vzorky na test metabolický, jeden vzorek pro negativní kontrolu (NC), jeden pro fluorescenční mikroskopii a jeden pro skenovací elektronovou mikroskopii. Destičky obsahující materiály byly následně sterilizovány pomocí etylenoxidu (Anprolene, UK) po dobu 12 hodin a byly ponechány odvětrávat jeden týden při pokojové teplotě.

Do každé jamky destičky s připravenými materiály byla přidána buněčná suspenze o objemu 1 ml. Koncentrace buněk v jedné jamce byla $7 \cdot 10^3$ buněk/ml. Pozitivní kontrolu (PC) zastávaly buňky nasazené v jamce bez jakéhokoliv materiálu. Negativní kontrolou byly materiály pouze s médiem, bez osazených buněk.

Test buněčné adheze a proliferace byl prováděn po dobu 21 dní. Materiál byl testován 4.; 7.; 14. a 21. den. Buněčná interakce s materiály byla hodnocena za pomoci metabolického testu CCK-8, fluorescenční a skenovací elektronové mikroskopie.

Metabolický test CCK-8

Pomocí metabolického CCK-8 testu, což je test kolorimetrický, byla sledována metabolická aktivita 4.; 7.; 14. a 21. den. Při tomto testu je na základě absorbance hodnocena viabilita buněk. V buňkách vzniká žlutě zbarvená látka formazan na základě redukování vodorozpustné tetrazoliové soli WST-8 dehydrogenázovými aktivitami, jež probíhají v buňkách. Na materiály, které byly osázeny buňkami, byl přidán 1 ml 10 % CCK-8 v médiu DMEM. Poté byly materiály inkubovány po dobu 3 hodin při teplotě 37 °C a s obsahem 5% CO₂ v inkubátoru. Po dokončení inkubace bylo napipetováno 200 µl CCK-8 v médiu do nové prázdné destičky s 96 jamkami. Následně byla naměřena absorbance při 450 nm pomocí spektrofotometru a z ní byla vyhodnocena viabilita buněk, jež odpovídá absorbanci.

Fluorescenční mikroskopie

Pomocí fluorescenční mikroskopie byla sledována interakce buněk s materiály. Dny sledování - 4.; 7.; 14. a 21. den. Nejprve byly vzorky opláchnuty pomocí PBS a vloženy do 2,5 glutaraldehydu o objemu 1 ml po dobu 15 minut a tím byly buňky na materiálu zafixovány. Aby mohly být buňky obarveny, bylo třeba narušit buněčnou stěnu buněk za pomoci permeabilizačního roztoku na dobu 5 minut. To umožnilo proniknutí barviva do buněk. Tento roztok byl připraven z 0,1% Tritonu X-100 (Sigma Aldrich, USA), 0,01 g bovinního sérového albuminu (BSA) v 10 ml PBS. Následně byl obarven cytoskelet buňky za pomoci barvicího roztoku phalloidin-fluorescein izothiokyanát (FITC, Sigma Aldrich, USA) v permeabilizačním roztoku, který byl zředěn v poměru 1:1000. Nakonec bylo přidáno do každé jamky 300 µl barviva phalloidinu-FITC, destička byla inkubována ve tmě po dobu 30 minut – byla zakryta alobalem. Cytoskelet byl obarven zeleně, jelikož se Phalloidin-FITC váže na aktinová vlákna, která se v něm nachází. Jádra byla obarvena pomocí barviva

DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol, Sigma Aldrich, USA), který byl zředěn v poměru 1:1000.

Do všech jamek destičky bylo přidáno 300 μ l zředěného barviva DAPI a destička byla ponechána inkubovat ve tmě po dobu 5 minut bez přístupu světla. Jaderná DNA je obarvena barvivem DAPI modře. Po inkubaci a tedy i po obarvení byly vzorky nejprve v PBS opláchnuty, poté v čistém PBS ponechány, inkubovány alobalem a uchovány v lednici do snímání na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse-Ti-E (Nikon Imaging, Česká republika).

Vyhodnocení počtu buněk

Aby mohl být vyhodnocen počet buněk, bylo nasnímáno 10 snímků od každého materiálu. Snímky byly vyhodnoceny v softwaru MATLAB (MathWorks, USA).

Skenovací elektronová mikroskopie

Pro pořízení snímků pomocí elektronové skenovací mikroskopie (SEM) byly vzorky nejdříve opláchnuty v PBS a následně byly vloženy do 2,5% glutaraldehydu pro zafixování buněk na materiálu o objemu 1 ml. Poté byly vzorky odvodněny za použití etanolové řady o koncentracích: 60 %; 70%; 80%; 90%; 96% a 100%. Ethanolové roztoky byly ke vzorku přidány cca 2 ml, od nejnižší koncentrace po nejvyšší, každá koncentrace byla u materiálu ponechána po dobu 5 minut. Následně byly vzorky ponechány vyschnout na parafilmu, nalepeny na terčíky k SEM a pokovovány vrstvou zlata o velikosti 10 nm, aby šla dobře pozorovat struktura vláken. Snímky byly pořízeny pomocí skenovacího elektronového mikroskopu TESCAN VEGA 3 SB Easy Probe (TESCAN, Česka Republika).

6.13 Statistické vyhodnocení dat

Získaná data v experimentální části byla vyhodnocována za pomoci softwaru GraphPad Prism 7.05 (GraphPad Software, USA). U všech získaných dat byl nejprve proveden test, kterým byla ověřena normalita dat pomocí Shapiro-Wilkova testu. Pro porovnání párových skupin byl použit parametrický t-test a neparametrický (Mann-Whitney test). Pokud bylo třeba porovnat parametricky několik skupin mezi sebou, pak byl zvolen ANOVA *Bonferroni* test s hladinou významnosti $p \geq 0,001$. Pro neparametrické porovnání skupin byl zvolen test ANOVA *Kruskal-Wallis* test. Hvězdičky v grafech nad skupinami označují statisticky významné rozdíly mezi skupinami podle hodnoty p (* $p < 0,0332$; ** $p < 0,0021$; *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$). Pokud mezi skupinami

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

Data jsou znázorněna ve sloupcových, krabicových a bodových grafech. Krabicové grafy byly vykresleny za pomoci Tukey testu. Okraje krabicového grafu znamenají první a třetí kvartil, vevnitř krabicového grafu se nachází medián a červeným křížkem byl vyznačen průměr. Vousy krabicového grafu jsou ve vzdálenosti, která odpovídá hodnotě $Q3 + 1,5 \cdot (IQR)$ a $Q1 - 1,5 \cdot IQR$. Odlehlá měření značí samostatné body. Některá získaná data byla uvedena jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD). Jelikož jsou některá naměřená data získána z různých míst materiálu, tak nebyla průměrována.

7. Výsledky

7.1 Příprava polymerních roztoků PCL

Pro bezjehlové zvláknění na Nanospider™ byly připraveny 4 polymerní roztoky. Jednalo se o roztok poly- ϵ -kaprolaktonu PCL bez antibiotika a následně PCL roztoky s různou koncentrací vankomycin hydrochloridu (VCH), viz níže. Koncentraci PCL (45 000 g/mol, Sigma Aldrich) činila 16% w/w v rozpouštědlovém systému chloroform, ethanol a kyselina octová v poměru 8:1:1 (v/v/v). Bylo zjištěno, že VCH je v zmíněném rozpouštědlovém systému nerozpustný, v roztocích zůstal bílý prášek i po 24-hodinovém míchání. Metodika přípravy roztoků byla tedy upravena, nejprve byla příslušná navážka VCH rozpuštěna v ethanolu (mícháno 3 hodiny při pokojové teplotě) – Obrázek 18. Následně byl přidán granulát PCL a zbylé složky rozpouštědlového systému. Roztoky byly dále míchány po dobu 24 hodin. Před zvlákněním roztoků s VCH proběhla homogenizace pomocí ultrazvukové sonotrody, roztoky byly ponechány na míchadle a ihned zvláknovány.



Obrázek 18 Příprava polymerního roztoku, kdy byl Vankomycin vložen do celého rozpouštědlového systému a nešel rozptýlit.

Přehled připravených roztoků:

- 16% PCL,
- 16% PCL + 0,5% VCH,
- 16% PCL + 1% VCH,
- 16% PCL + 1,5% VCH.

7.2 Parametry výroby materiálů na zařízení Nanospider™, plošná hmotnost

Na zařízení Nanospider™ (Elmarco, CZE) byly připravené polymerní roztoky postupně zvlákněny. Schématické znázornění přístroje lze vidět na Obrázku 8. Z prvotních *in vivo* experimentů se jeví, že nejvhodnější jsou plošné hmotnosti nanovlákněné vrstvy okolo 10 g/m². Při této plošné hmotnosti docházelo k hojení anastomózy a infiltraci buněk. Plošná hmotnost může být upravena pomocí odtahové rychlosti substrátu (polypropylenový spunbond). Vzhledem k nízké viskozitě roztoků byl zvolen průvlak 0,6 mm). Ostatní parametry jsou uvedeny v Tabulce 3. V tabulce 4 se nachází přehled materiálů, jež byly vybrány pro další experimenty.

Tabulka 3 Parametry tvorby vlákněných vrstev.

Pracovní název vlákněné vrstvy	Polymerní roztok	Rychlost odtahu [mm/min]	Vzdálenost kolektoru [mm]	Napětí [kV]	Teplota/vlhkost	Plošná hmotnost vlákněné vrstvy [g/m ²]
Vzorek 0	16% PCL	72	170	+40/ -10	22 °C/52 %	10
Vzorek 1	16% PCL + 0,5% VCH	70	170	+40/ -10	22 °C/52 %	19
Vzorek 2	16% PCL + 0,5% VCH	75	170	+40/ -10	22 °C/52 %	14
Vzorek 3	16% PCL + 0,5% VCH	80	170	+40/ -10	22 °C/52 %	13,8
Vzorek 4	16% PCL + 0,5% VCH	90	170	+40/ -10	22 °C/52 %	12
Vzorek 5	16% PCL + 0,5% VCH	92	170	+40/ -10	22 °C/52 %	10

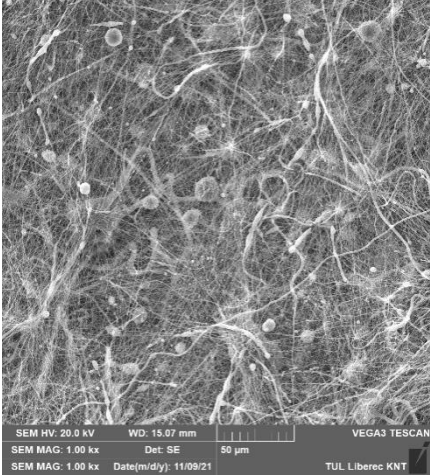
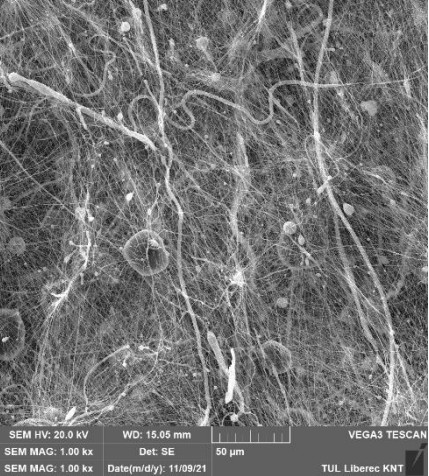
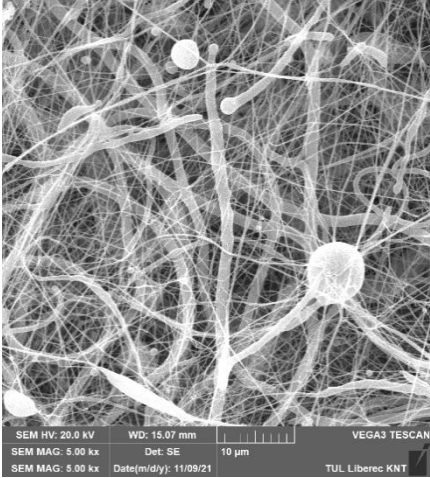
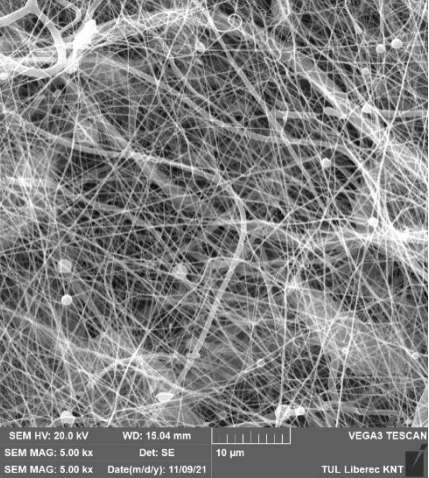
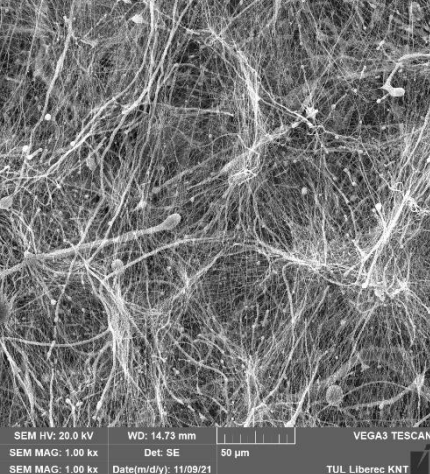
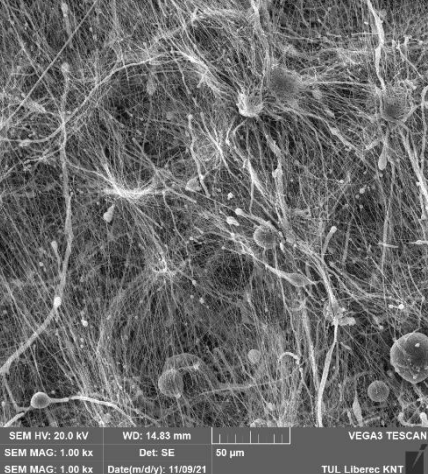
Vzorek 6	16% PCL + 0,5% VCH	70	170	+40/ -10	22 °C/52 %	19
Vzorek 7	16% PCL + 1% VCH	45	170	+40/ -10	22 °C/52 %	24
Vzorek 8	16% PCL + 1% VCH	70	170	+40/ -10	22 °C/52 %	11
Vzorek 9	16% PCL + 1,5% VCH	93	170	+40/- 10	22 °C/52 %	9,2
Vzorek 10	16% PCL + 1,5% VCH	90	170	+40/ -10	22 °C/52 %	10,5

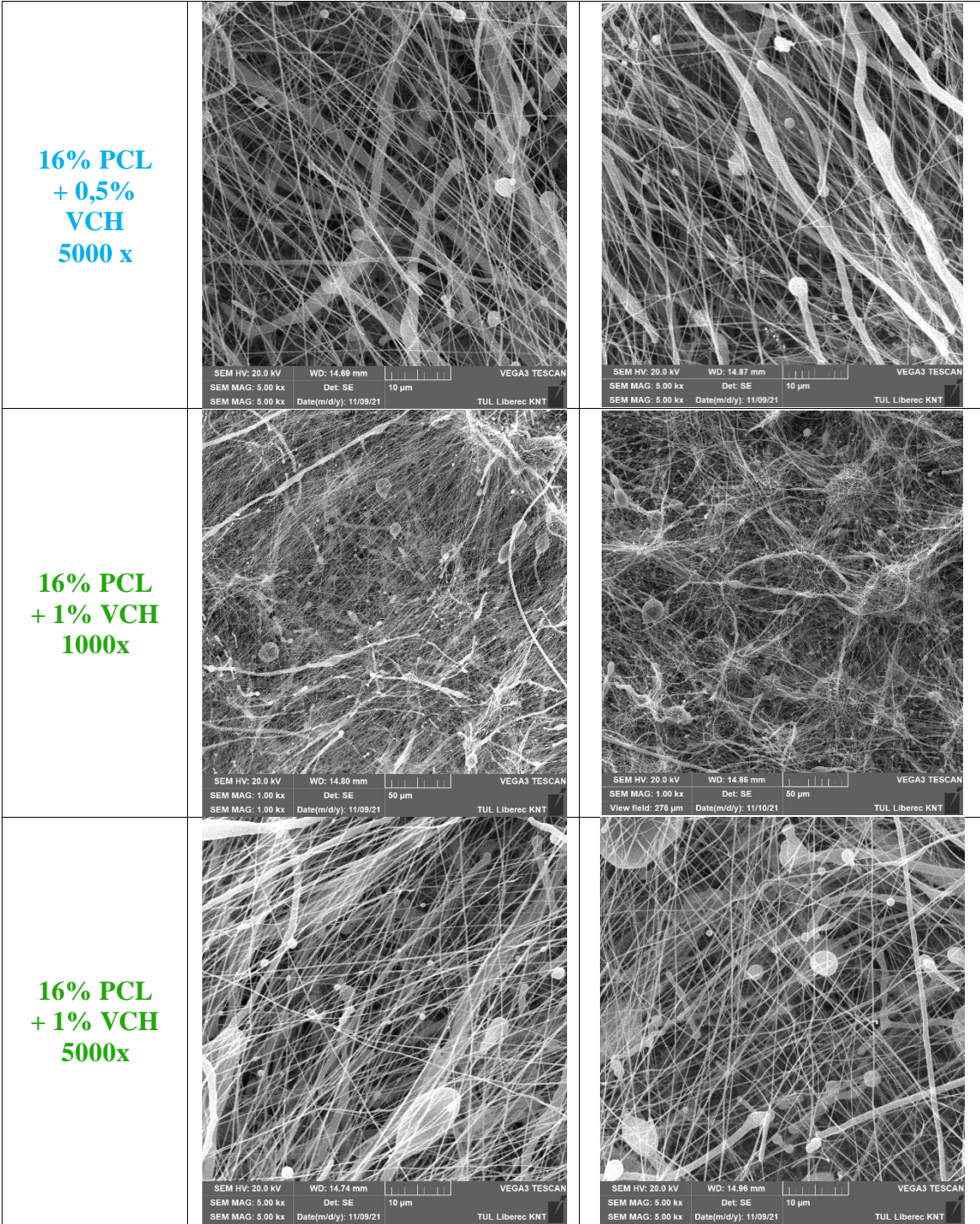
Tabulka 4 Vybrané vzorky pro další experimenty.

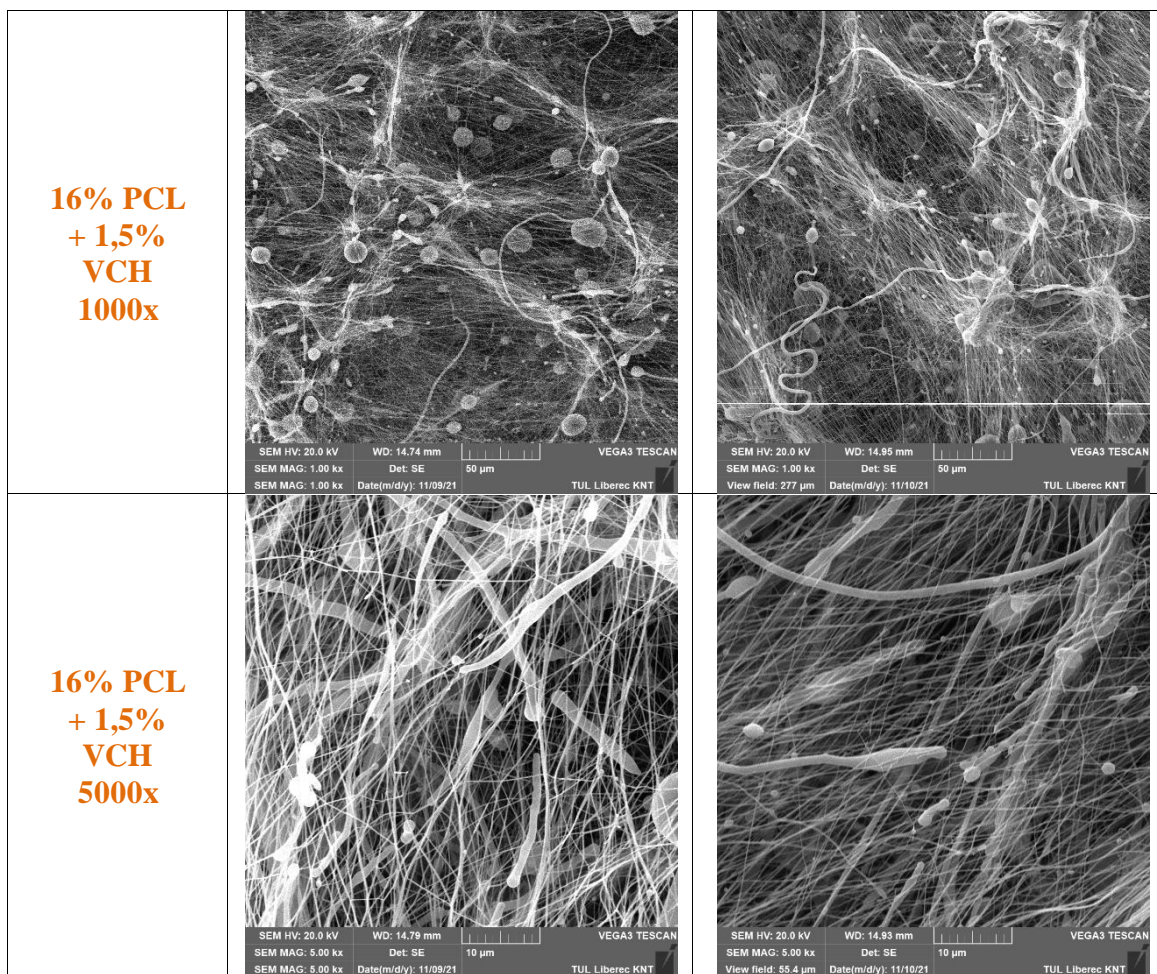
Číslo vzorku			
<u>Vzorek 0</u>	<u>Vzorek 5</u>	<u>Vzorek 8</u>	<u>Vzorek 10</u>

7.3 SEM - morfologie vlákných vrstev

Morfologie nanovlákných vrstev byla pozorována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) TESCAN VEGA 3 SB Easy Probe, Česká Republika. Vzorky byly před snímáním připevněny na terčíky a pro zvýšení vodivosti byly pokryty 10 nm vrstvou zlata pomocí přístroje QUORUM Q50ES Quorum Technologies. Jak lze vidět na Obrázku 19, materiály byly hodnoceny po výrobě a po sterilizaci ethylenoxidem. Vzhledem k předpokládané aplikaci (regenerativní medicína) je nutné zajistit kompletní charakterizaci materiálů i po expozici sterilizační metodou. Cílem bylo vyhodnotit, zda nedochází k patrným změnám ve vlákně morfologii, což bylo vyvráceno. Vlákna jsou randomizovaně orientována, jsou patrné kulové defekty, jejichž výskyt roste se vzrůstající koncentrací antibiotika.

Materiál	Vrstva po výrobě - nesterilní	Vrstva po sterilizaci EtOx - sterilní
<p>16% PCL 1000 x</p>		
<p>16% PCL 5000 x</p>		
<p>16% PCL + 0,5% VCH 1000 x</p>		





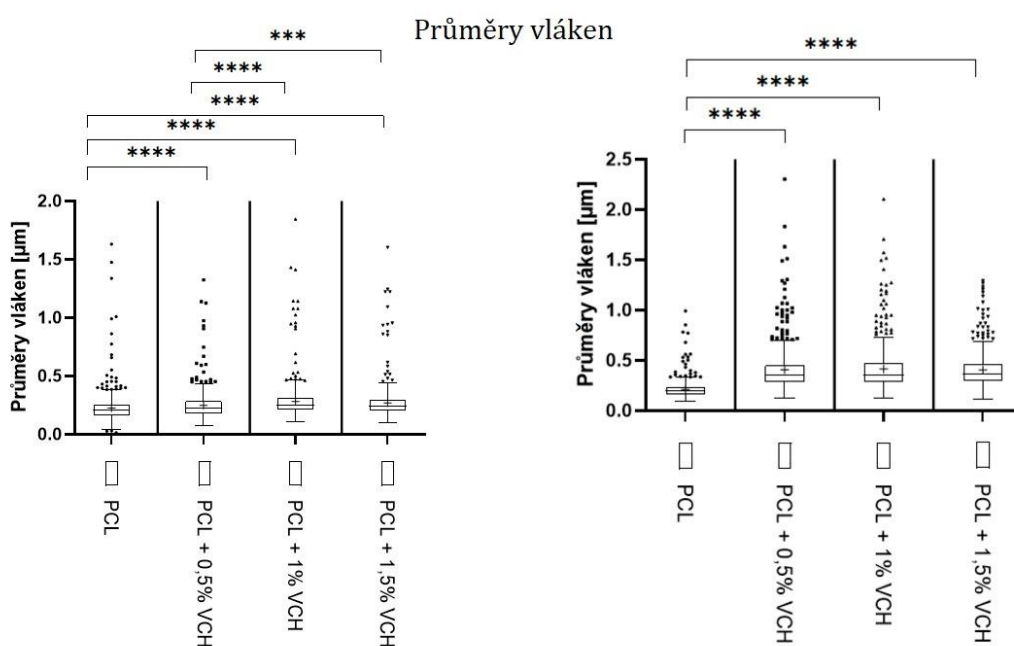
Obrázek 19 Morfologická analýza – SEM snímky nanovláknenných vrstev. Porovnání vrstev: po výrobě a po sterilizaci ethylenoxidem. Měřítko 10 µm a 50 µm.

7.4 Měření průměrů vláken

Pro každý materiál bylo pořízeno 500 měření na snímcích ze skenovacího elektronového mikroskopu. Snímky byly o zvětšení 5000x a průměry vláken byly měřeny v mikrometrech a následně převedeny na nanometry. Průměry byly naměřeny pomocí programu ImageJ. V Tabulce 5 se nachází průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka ze všech 500 měření na každém sterilním i nesterilním materiálu. Obrázek 20 obsahuje grafické zpracování ve formě krabicového grafu. Největší průměrná hodnota byla zaznamenána u sterilního materiálu PCL + 1 % VCH: (417 ± 231) nm. Všechny sterilní materiály s obsahem antibiotika mají značně vyšší průměrné hodnoty průměru vláken, než vlákna nesterilní.

Tabulka 5 Tabulka s naměřenými průměrnými hodnotami ± směrodatná odchylka průměrů vláken v nanometrech.

	PCL	PCL + 0.5% VCH	PCL + 1% VCH	PCL + 1.5% VCH
Nesterilní materiály	226 ± 143	251 ± 143	283 ± 163	270 ± 146
Sterilní materiály	212 ± 890	408 ± 231	417 ± 231	407 ± 181



Obrázek 20 Grafické zobrazení průměrů vláken ve formě krabicového grafu. Průměry jsou zobrazeny v mikrometrech. Vlevo se nachází graf pro vlákna nesterilní, vpravo pro vlákna sterilní, + značí průměrnou hodnotu, Tukey; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; ANOVA Kruskal-Wallis; $n = 500$.

7.5 Měření smáčivosti vrstev – kontaktní úhel

Podle velikosti naměřeného kontaktního úhlu lze určit smáčivost vyrobených nanovláknenných materiálů. Pokud je kontaktní úhel větší, než 90° , pak není vrstva kapalinou smáčena a povrch materiálu je hydrofobní. Pokud je úhel menší než 90° , pak je materiál testovanou tekutinou smáčen, povrch materiálu je tedy hydrofilní. Kontaktní úhel je označován řeckým písmenkem θ . Pro testování smáčivosti materiálu byly využity dvě kapaliny: destilovaná voda a simulovaná střevní tekutina.

Měření kontaktního úhlu u každého sterilního i nesterilního materiálu bylo provedeno 20 krát. V Tabulkách 6 až 9 a na Obrázcích 21 a 22 (zde jsou nesterilní materiály označeny písmenem N za názvem materiálu) v grafickém zpracování se nachází naměřené průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ze všech dvaceti měření. Materiály, které vyšly jako hydrofobní, mají kontaktní úhel větší než 90°. Jsou jimi - z nesterilních materiálů: PCL + 0,5% VCH při použití destilované vody a PCL; PCL + 0,5% VCH a PCL + 1% VCH. Všechny ostatní materiály na obě testované tekutiny vyšly jako hydrofilní, tedy materiály smáčivé. Pravděpodobným vysvětlením pro tento výsledek je, že má simulovaná střevní voda vyšší viskozitu a hustotu roztoku. Čím vyšší je v materiálu obsažena koncentrace antibiotik, tím uzavřenější je celková zvlákněná struktura, to mohlo vést také k mírnému snížení smáčivosti materiálu. Byly také pozorovány rozdíly mezi materiály sterilními a nesterilními, které jsou statisticky významné, jelikož žádný ze sterilních materiálů není hydrofobní. Sterilizace etylenoxidem má tedy vliv na smáčivost materiálu.

Tabulka 6 Tabulka s průměrnými hodnotami naměřených kontaktních úhlu a se směrodatnou odchylkou. Kontaktní úhly byly měřeny na nesterilním materiálu za pomoci destilované vody.

	PCL	PCL + 0,5% VCH	PCL + 1% VCH	PCL + 1,5% VCH
Průměr	44	100	66	82
SD	12	21	17	16

Tabulka 7 Tabulka s průměrnými hodnotami naměřených kontaktních úhlu a se směrodatnou odchylkou. Kontaktní úhly byly měřeny na nesterilním materiálu za pomoci simulované střevní tekutiny.

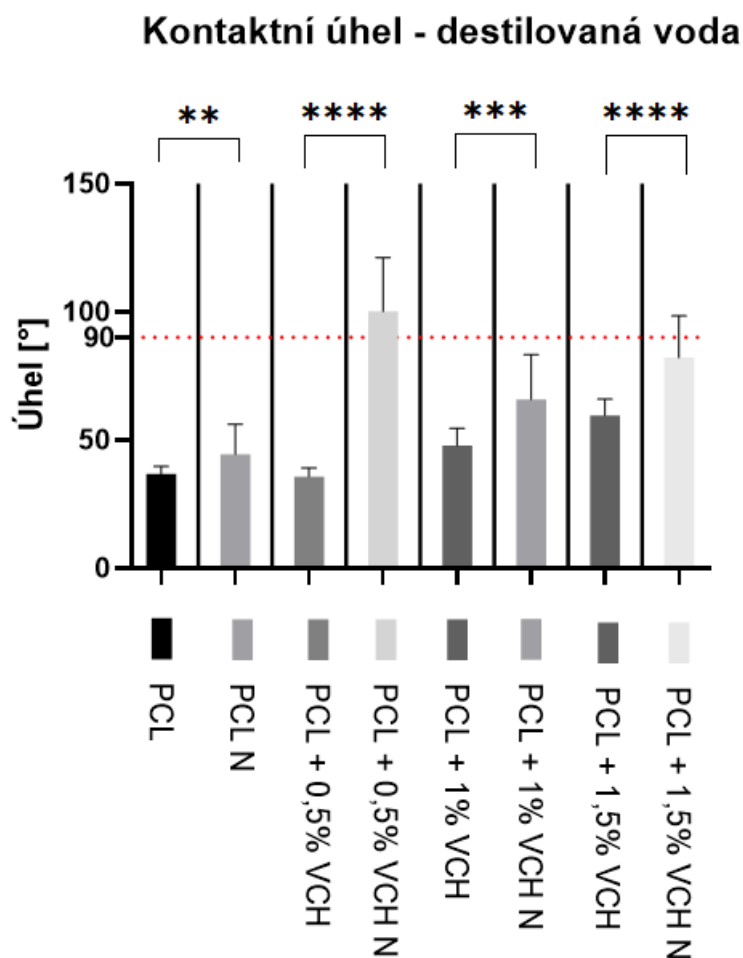
	PCL	PCL + 0,5% VCH	PCL + 1% VCH	PCL + 1,5% VCH
Průměr	95	123	104	53
SD	19	9	9	8

Tabulka 8 Tabulka s průměrnými hodnotami naměřených kontaktních úhlu a se směrodatnou odchylkou. Kontaktní úhly byly měřeny na sterilním materiálu za pomoci destilované vody.

	PCL	PCL + 0,5% VCH	PCL + 1% VCH	PCL + 1,5% VCH
Průměr	38	36	48	60
SD	3	3	7	6

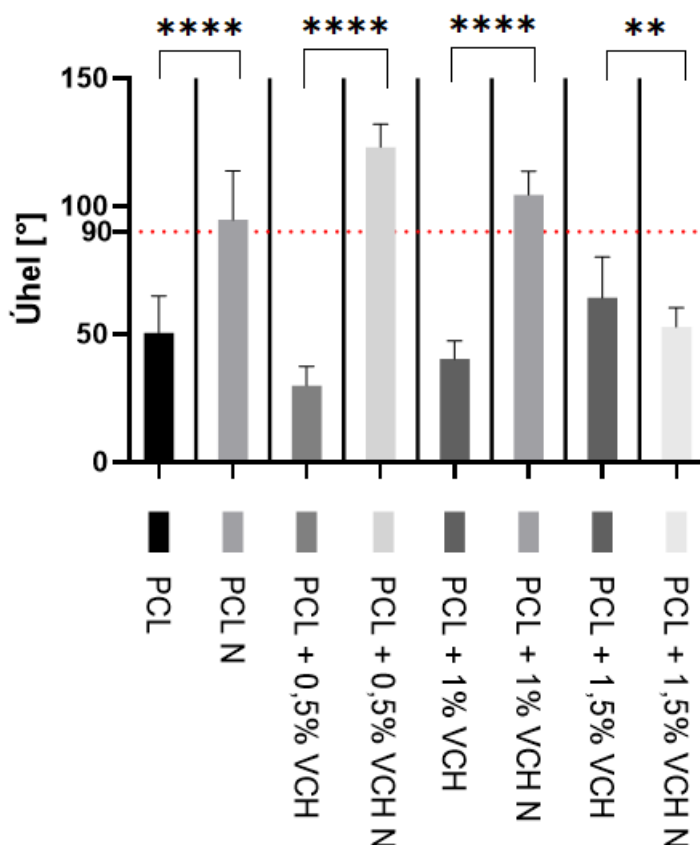
Tabulka 9 Tabulka s průměrnými hodnotami naměřených kontaktních úhlu a se směrodatnou odchylkou. Kontaktní úhly byly měřeny na sterilním materiálu za pomoci simulované střevní tekutiny.

	PCL	PCL + 0,5% VCH	PCL + 1% VCH	PCL + 1,5% VCH
Průměr	51	30	40	64
SD	14	8	7	16



Obrázek 21 Graf s naměřenými kontaktními úhly pro destilovanou vodu. Sterilní i nesterilní materiály, nesterilní materiály jsou označeny písmenem N za názvem materiálu; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; parametrický t-test, neparametrický t-test (Mann-Whitney test); $n=20$.

Kontaktní úhel - simulovaná střevní tekutina



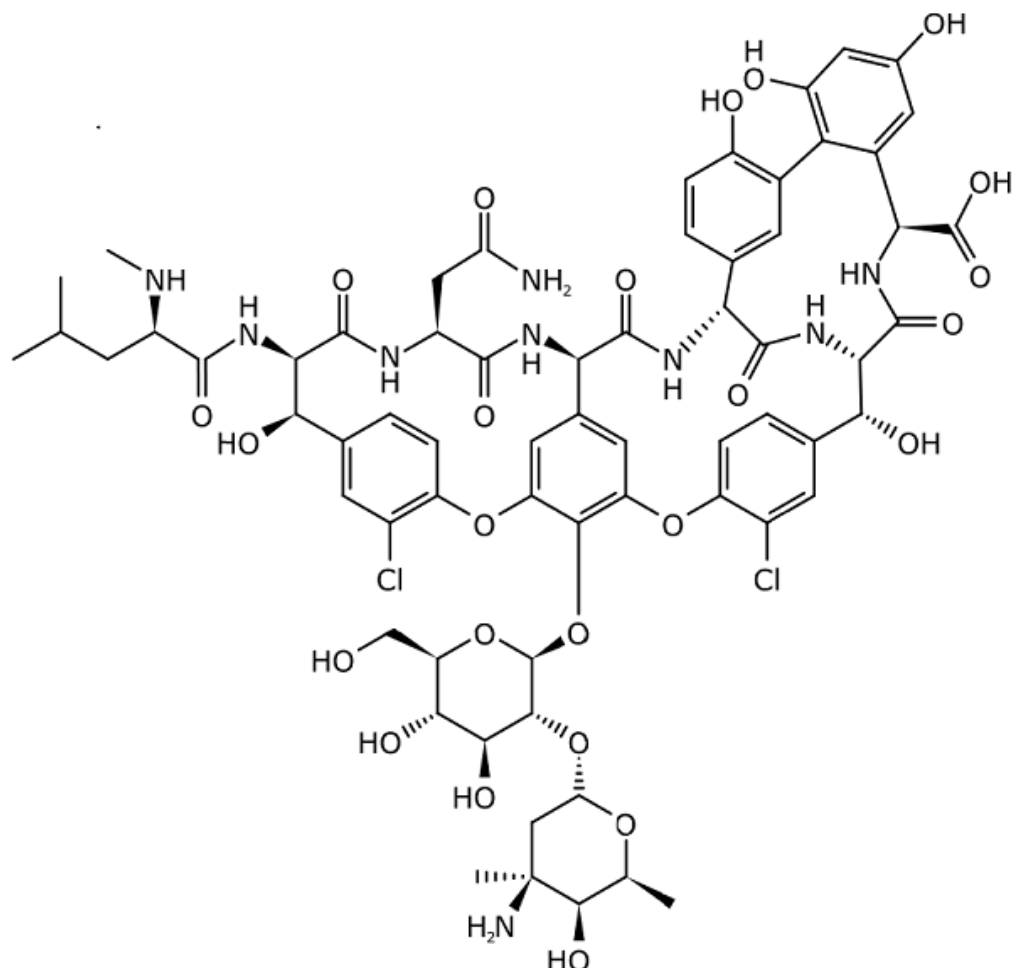
Obrázek 22 Graf s naměřenými kontaktními úhly pro simulovanou střevní tekutinu. Sterilní i nesterilní materiály, nesterilní materiály jsou označeny písmenem N za názvem materiálu; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; parametrický t -test, neparametrický t -test (Mann-Whitney test); $n=20$.

7.6 Elementární analýza – měření obsahu prvků ve vrstvách

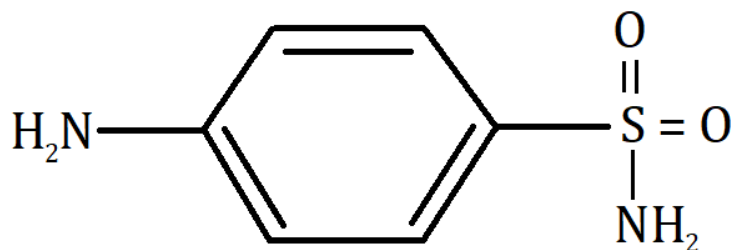
Aby bylo určeno množství prvků ve vyrobeném nanovlákněném materiálu, byla použita elementární analýza. Díky ní bylo možno kvantitativně vyhodnotit obsah prvků ve vybraných vzorcích materiálů. Bylo sledováno množství dusíku, jelikož Vankomycin hydrochlorid (Obrázek 23), jež byl do vrstvy inkorporován, obsahuje chemické aminové skupiny $-NH_2$. Dále bylo také sledováno množství síry, jelikož tento prvek v sobě samotný Vankomycin hydrochlorid neobsahuje. Absencí tohoto prvku ve výsledné vrstvě lze tedy potvrdit, že se forma Vankomycin hydrochloridu pravděpodobně nezměnila. Na Obrázku 24 se nachází strukturní vzorec sulfanilamidu, který byl použit jako standart.

Na Obrázku 25 se nachází graf naměřeného hmotnostního procentuálního obsahu dusíku (N) ve sterilních i nesterilních materiálech. Obsah dusíku se dle výsledků zvyšuje s množstvím inkorporovaného antibiotika, což lze vidět i v Tabulce 10.

Nezměněná forma antibiotika je potvrzena i absencí procentuálního hmotnostního obsahu síry (S), jež se v antibiotiku původně nenacházela. Naměřené hodnoty pro sterilní i nesterilní materiály se nachází v Tabulce 11. Graf nebyl třeba zpracovávat, jelikož jsou všechny naměřené hodnoty 0 %.

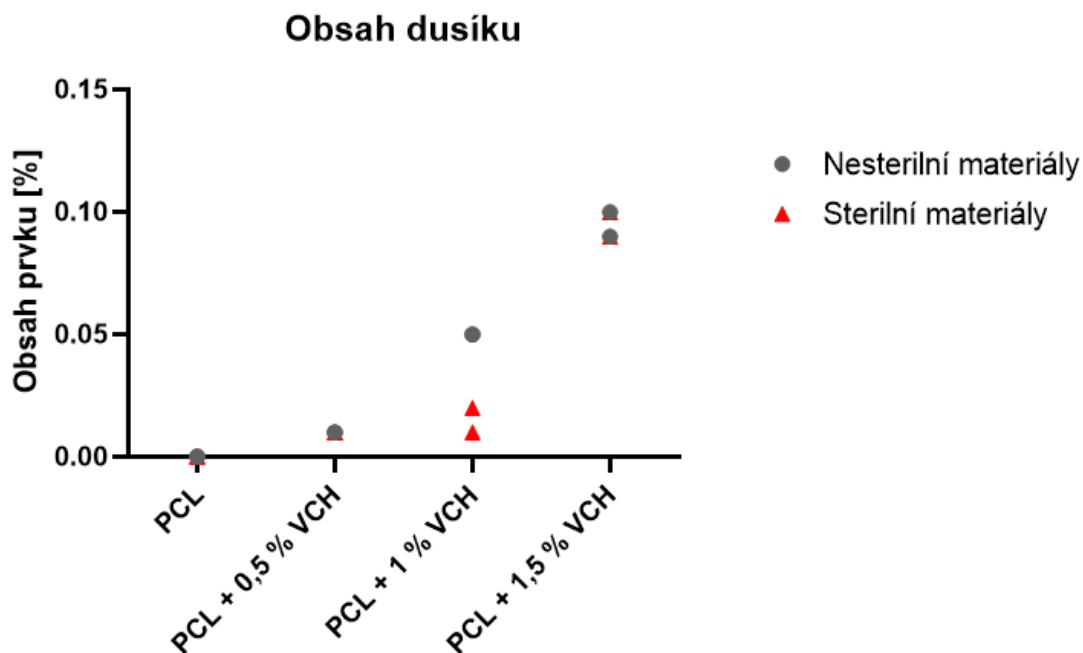


Obrázek 23 Strukturální vzorec Vankomycin hydrochloridu.



Obrázek 24 Strukturální vzorec sulfanilamidu.

Obsah dusíku



Obrázek 25 Graf vyjadřující obsah N (dusíku) ve všech testovaných nanovláčkových materiálech s obsahem i bez obsahu antibiotika, sterilní i nesterilní. 2 měření z různých míst.

Tabulka 10 Obsah dusíku v materiálech sterilních i nesterilních.

Obsah dusíku [%]	Nesterilní materiály		Sterilní materiály	
PCL	0	0	0	0
PCL + 0,5 % VCH	0,01	0,01	0,01	0,01
PCL + 1 % VCH	0,05	0,05	0,01	0,02
PCL + 1,5 % VCH	0,09	0,1	0,1	0,09

Obsah síry

Tabulka 11 Obsah síry v materiálech sterilních i nesterilních.

Obsah síry [%]	Nesterilní materiály		Sterilní materiály	
PCL	0	0	0	0
PCL + 0,5 % VCH	0	0	0	0
PCL + 1 % VCH	0	0	0	0
PCL + 1,5 % VCH	0	0	0	0

7.7 Vysoko-účinná kapalinová chromatografie (HPLC) – měření obsahu antibiotika ve vrstvách

Aby byl potvrzen obsah antibiotika Vankomycin hydrochlorid ve vrstvách, byla použita vysoko-účinná kapalinová chromatografie. Provedl ji pan prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D. z Farmaceutické fakulty Karlovy Univerzity v Hradci Králové.

Z časových důvodů byly zatím analyzovány pouze materiály nesterilní. Obsah antibiotika VCH neseděl s předpokladem, což potvrzuje to, že při zvlákňování nedošlo k úplnému přenosu antibiotika – se zvyšující se koncentrací v roztoku přestávají hodnoty odpovídat. Naměřené hodnoty u všech materiálů jsou uvedeny v Tabulce 12. Výsledné hodnoty byly vypočteny pomocí podílu koncentrace Vancomycinu z navážky (mg/ml) a skutečné koncentrace (mg/ml).

Tabulka 12 Tabulka s naměřenými procentuálními obsahy antibiotika Vankomycin hydrochloridu ve výsledném nesterilizovaném materiálu.

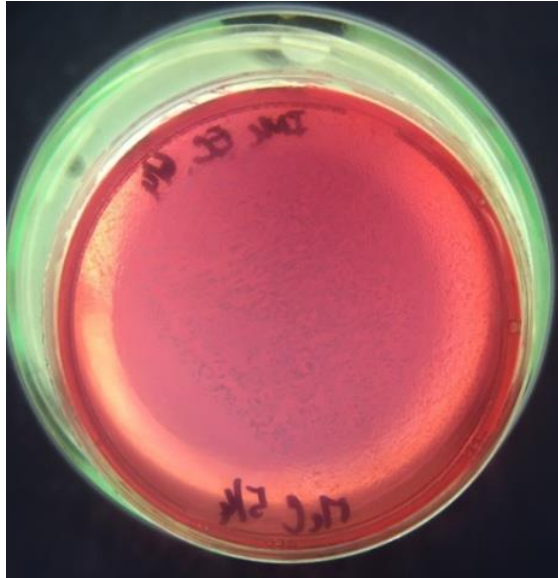
Materiál	Obsah VCH v [%]
PCL + 0,5% VCH	82,49
PCL + 1% VCH	48,59
PCL + 1,5% VCH	54,39

7.8 Antibakteriální testování

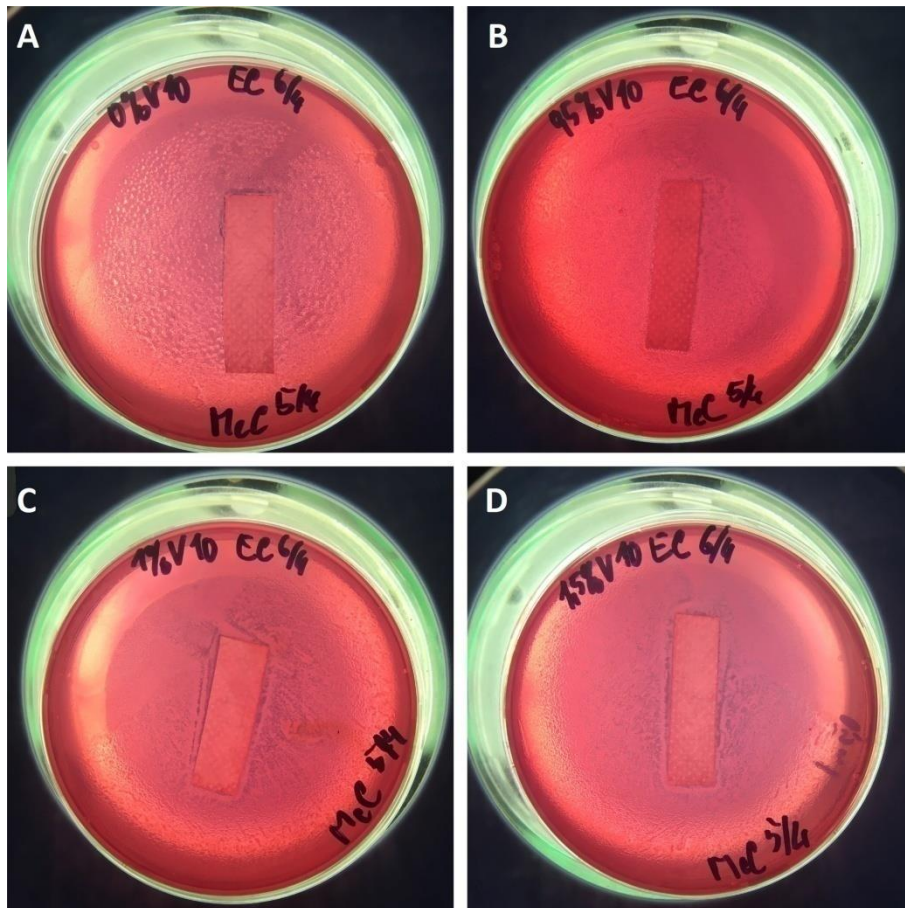
Nejprve byl proveden prvotní experiment, při kterém byly připraveny vzorky o rozměru 10 x 40 mm a následně byly vzorky vloženy do agarů, jež obsahovaly buněčnou suspenzi. Byly testovány obě bakteriální kultury - *Escherichia Coli* a *Staphylococcus gallinarum*. Byly pozorovány halo zóny nebo-li zóny inhibiční, jež se tvořily kolem vzorků. Tyto zóny se mohou tvořit také při snaze vyhnout se působení antibiotika. Bakterie se pak v místě a blízkém okolí vzorku neproliferují.

Escherichia Coli:

Na Obrázku 26 se nachází samotný agar Nutrient bez testovaného nanovlákněného materiálu. Na materiálu se nenachází žádné antibiotikum, bakterie přes něj tedy přerůstají a nenachází se zde žádné halo zóny. Slouží pro porovnání s Petriho miskami s inokulací s vyočkovanými koloniemi bakterií *Escherichia Coli*, které se nachází na Obrázku 27. Materiály na Obrázku 27 jsou v pořadí: A – PCL; B – PCL + 0,5 % VCH; C - PCL + 1 % VCH; D - PCL + 1,5 % VCH. Na Obrázku 28 se nachází porovnané všechny materiály mezi sebou. Materiál s čistým PCL slouží také jako kontrolní, nenachází se na ní žádné antibiotikum. Na žádném z testovaných materiálů se nenachází žádné halo zóny bakteriálních kolonií bakterie *E. coli*. Materiál je tedy kompletně pokryt bakteriemi.



Obrázek 26 *E. coli* na agaru bez testovaného materiálu – pro kontrolu.



Obrázek 27 Testované materiály o plošné hmotnosti 10 g/m² a o velikosti 10 x 40 mm, na kterých byly sledovány halo zóny Petriho misce na agaru Nutrient v inokulum *Escherichia Coli*. A – PCL, B – PCL + 0,5 % VCH, C - PCL + 1 % VCH, D - PCL + 1,5 % VCH.



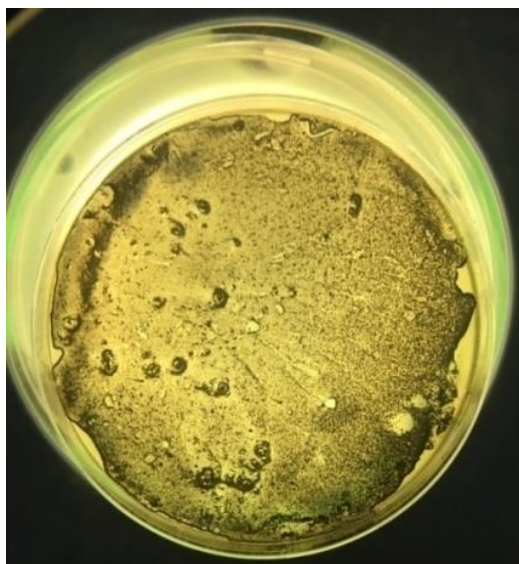
Obrázek 28 Porovnání všech testovaných materiálů o plošné hmotnosti 10 g/m² a o velikosti 10 x 40 mm, na kterých byly sledovány halo zóny Petriho misce na agaru Nutrient v inokulum *Escherichia Coli*.

Tabulka 13 Průměrná velikost inhibičních zón, průměr ± SD pro *Escherichia Coli*.

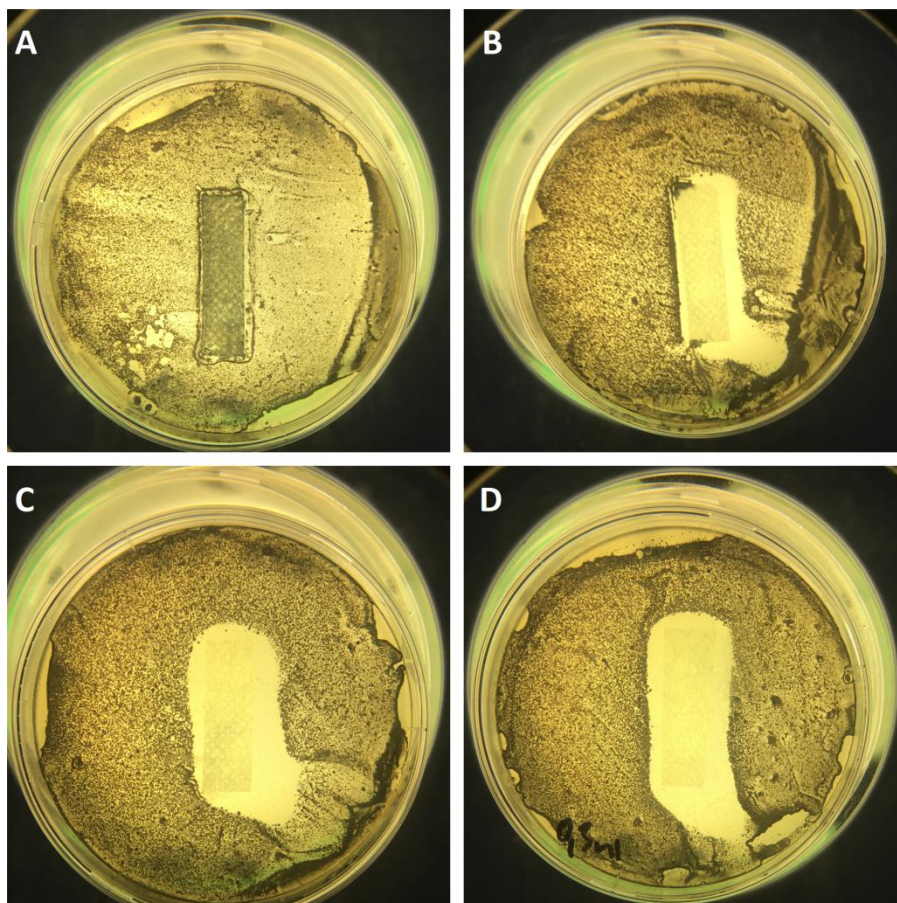
	Bakteriální kultura	PCL	PCL + 0,5 % VCH	PCL + 1 % VCH	PCL + 1,5 % VCH
Průměrná velikost inhibiční zóny [cm], n = 10	<i>Escherichia Coli</i> na materiálu o plošné hmotnosti 10 g/m ²	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Staphylococcus gallinarum:

Na Obrázku 29 se nachází samotný agar Braid Parker bez testovaného nanovláčenného materiálu. Na materiálu se nenachází žádné antibiotikum, bakterie přes něj tedy přerůstají a nenachází se zde žádné halo zóny. Slouží pro porovnání s Petriho miskami s inokulum s vyočkovanými koloniemi bakterií *Staphylococcus gallinarum*, které se nachází na Obrázku 30. Obrázek obsahuje testované materiály o plošné hmotnosti 10 g/m². Materiály na Obrázku 30 jsou v pořadí: A – PCL; B – PCL + 0,5 % VCH; C - PCL + 1 % VCH; D - PCL + 1,5 % VCH. Na obrázku 31 se nachází porovnané všechny materiály mezi sebou. Materiál s čistým PCL slouží také jako kontrolní, nenachází se na ní žádné antibiotikum. Na materiálech s obsahem antibiotika jsou halo zóny jasně zřetelné, materiál je tedy antibakteriální proti této buněčné kultuře. V Tabulce 14 jsou uvedeny průměrné velikost inhibičních zón pro materiál, průměr ± směrodatná odchylka.



Obrázek 29 Bakterie *Staphylococcus gallinarum* na agaru bez testovaného materiálu – pro kontrolu.



Obrázek 30 Testované materiály o plošné hmotnosti 10 g/m² a o velikosti 10 x 40 mm, na kterých byly sledovány halo zóny v Petriho misce na agaru Braid Parker v inokulum *Staphylococcus gallinarum*. A – PCL, B – PCL + 0,5 % VCH, C - PCL + 1 % VCH, D - PCL + 1,5 % VCH.



Obrázek 31 Porovnání všech testovaných materiálů o plošné hmotnosti 10 g/m² a o velikosti 10 x 40 mm, na kterých byly sledovány halo zóny Petriho misce na agaru Braid Parker v inokulum *Staphylococcus gallinarum*.

Tabulka 14 Průměrná velikost inhibičních zón, průměr ± SD.

	Bakteriální kultura	PCL	PCL + 0,5 % VCH	PCL + 1 % VCH	PCL + 1,5 % VCH
Průměrná velikost inhibiční zóny [cm], n = 10	<i>Staphylococcus gallinarum</i> na materiálu o plošné hmotnosti 10 g/m ²	0 ± 0	0,75 ± 0,08	1,01 ± 0,09	1,05 ± 0,07

7.9 Buněčné testování *in vitro*

V následující kapitole byly provedeny dva experimenty s buněčnou linií myších fibroblastů 3T3. Nejprve byl proveden test na cytotoxicitu materiálů. Druhým testem je test buněčné adheze a proliferace.

7.9.1 Cytotoxicita extraktů a Vankomycinu hydrochloridu v médiu DMEM

Pomocí kolorimetrického MTT testu byla provedena kvantifikace buněčné viability. Výsledky se nachází v Tabulce 15 a 16. Dále jsou vyneseny na Obrázku 32 v grafu. Je zde vyznačena hranice, kde viabilita buněk poklesla pod 70 %. Odsátím části konfluentní vrstvy nebo jinou manipulací s materiálem mohly být způsobeny odchylky. Z grafu je patrné, že viabilita buněk poklesla pod sedmdesát procent u 20 % a 40 % koncentrace vankomycinu hydrochloridu.

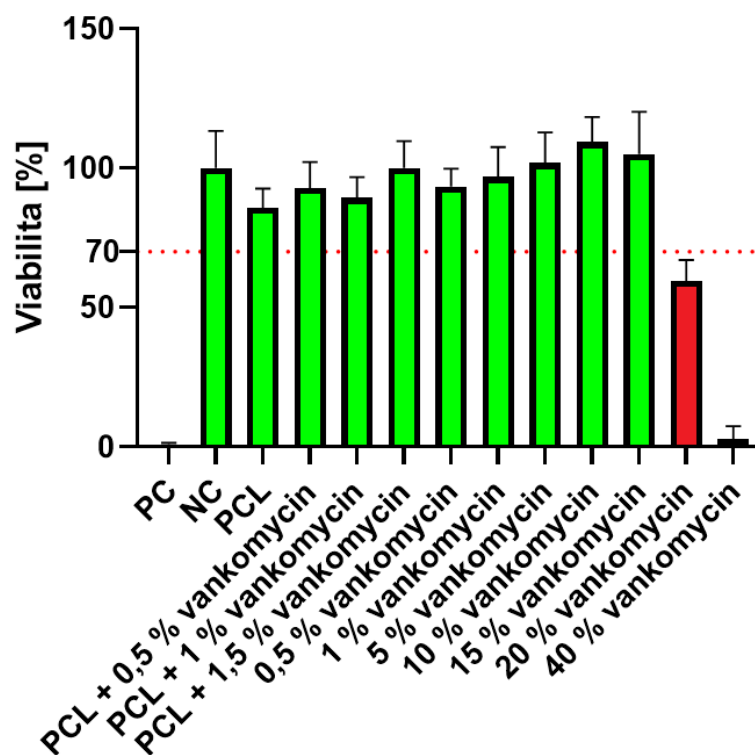
Tabulka 15 Tabulka obsahující hodnoty viability a směrodatné odchylky PC, NC a materiálů PCL.

PC	NC	PCL	PCL + 0,5 % vankomycin	PCL + 1 % vankomycin	PCL + 1,5 % vankomycin
0,97827614	100	85,783068	92,8953653	89,36284	100,0983
0,460823422	13,347695	6,957503	9,23904295	7,430432	9,554837

Tabulka 16 Tabulka obsahující hodnoty viability a směrodatné odchylky koncentrací vankomycinu hydrochloridu v kompletním médiu.

0,5 % VCH	1 % VCH	5 % VCH	10 % VCH	15 % VCH	20 % VCH	40 % VCH
93,42153995	96,922134	101,75099	109,340507	105,0817	59,51055	2,731342
6,433111955	10,585145	11,095208	8,9814458	15,11179	7,532192	4,760387

Cytotoxicita



Obrázek 32 Graf zobrazující metabolickou aktivitu fibroblastů pomocí kolorimetrického MTT testu. Zobrazena 70 % hranice viability.

7.9.2 Test buněčné adheze a proliferace

Materiály byly testovány po dobu 21 dní *in vitro*. Nejprve byly materiály osazeny buněčnou linií 3T3 myších fibroblastů a poté byla sledována buněčná adheze a proliferace - 4.; 7.; 14. a 21. den. Byla hodnocena metabolická aktivita buněk, počet buněk a také byly buňky pozorovány pomocí mikroskopie – fluorescenční a skenovací elektronové (SEM).

V tabulkách 17 až 20 jsou uvedeny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky metabolické aktivity osazených buněk. Z těchto hodnot byl vytvořen graf, jenž se nachází na Obrázku 33. Metabolická aktivita byla hodnocena pomocí CCK-8 metabolického testu, který pomáhá zjistit absorbanci buněk, která odpovídá metabolické aktivitě, tudíž viabilitě buněk. Po 4 a 7 dnech byla buněčná viabilita poměrně malá. Vyšší viabilita se projevila pouze u vzorků, jež byly použity jako pozitivní kontrola – čistý materiál bez antibiotik. Po 14 dnech došlo k velkému nárůstu buněčné absorbance, který setrval až do 21 dne, kdy byly materiály porostlé buňkami celé. Buňky z toho důvodu již neměly prostor k dalšímu růstu.

Tabulka 17 Průměrná hodnota a směrodatná odchylka výsledku metabolického testu po 4 dnech pro každý materiál.

	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka
PC	0,712	0,102
PCL	0,481	0,014
PCL + 0,5 VCH	0,467	0,029
PCL + 1 VCH	0,488	0,026
PCL + 1,5 VCH	0,498	0,013

Tabulka 18 Průměrná hodnota a směrodatná odchylka výsledku metabolického testu po 7 dnech pro každý materiál.

	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka
PC	3,473	0,205
PCL	0,771	0,112
PCL + 0,5 VCH	0,643	0,018
PCL + 1 VCH	0,801	0,065
PCL + 1,5 VCH	0,589	0,022

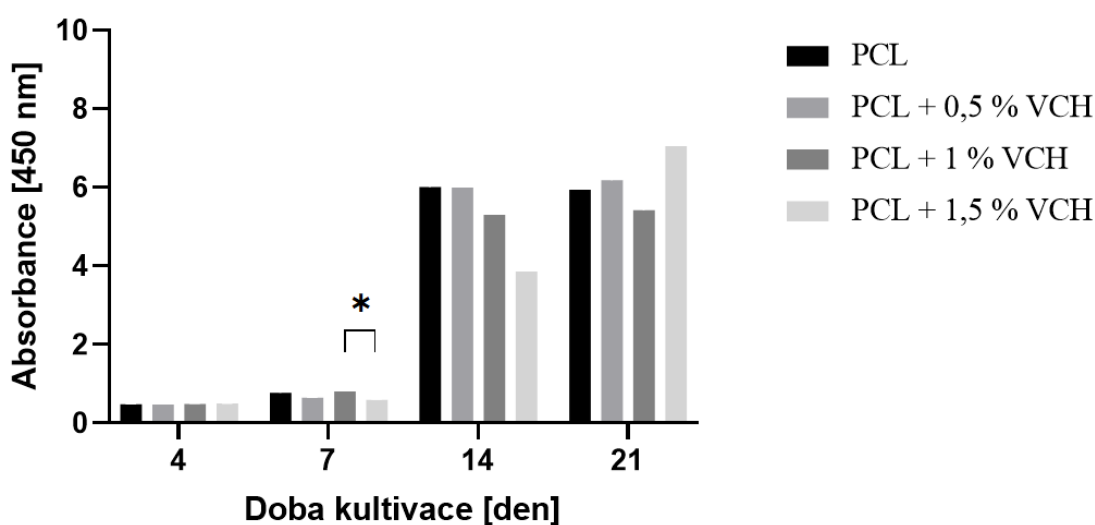
Tabulka 19 Průměrná hodnota a směrodatná odchylka výsledku metabolického testu po 14 dnech pro každý materiál.

	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka
PC	8,243	0,522
PCL	6,015	0,302
PCL + 0,5 VCH	5,944	1,168
PCL + 1 VCH	5,303	0,095
PCL + 1,5 VCH	3,862	2,590

Tabulka 20 Průměrná hodnota a směrodatná odchylka výsledku metabolického testu po 21 dnech pro každý materiál.

	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka
PC	11,571	4,685
PCL	5,942	0,293
PCL + 0,5 VCH	6,189	0,438
PCL + 1 VCH	5,418	2,767
PCL + 1,5 VCH	7,052	0,315

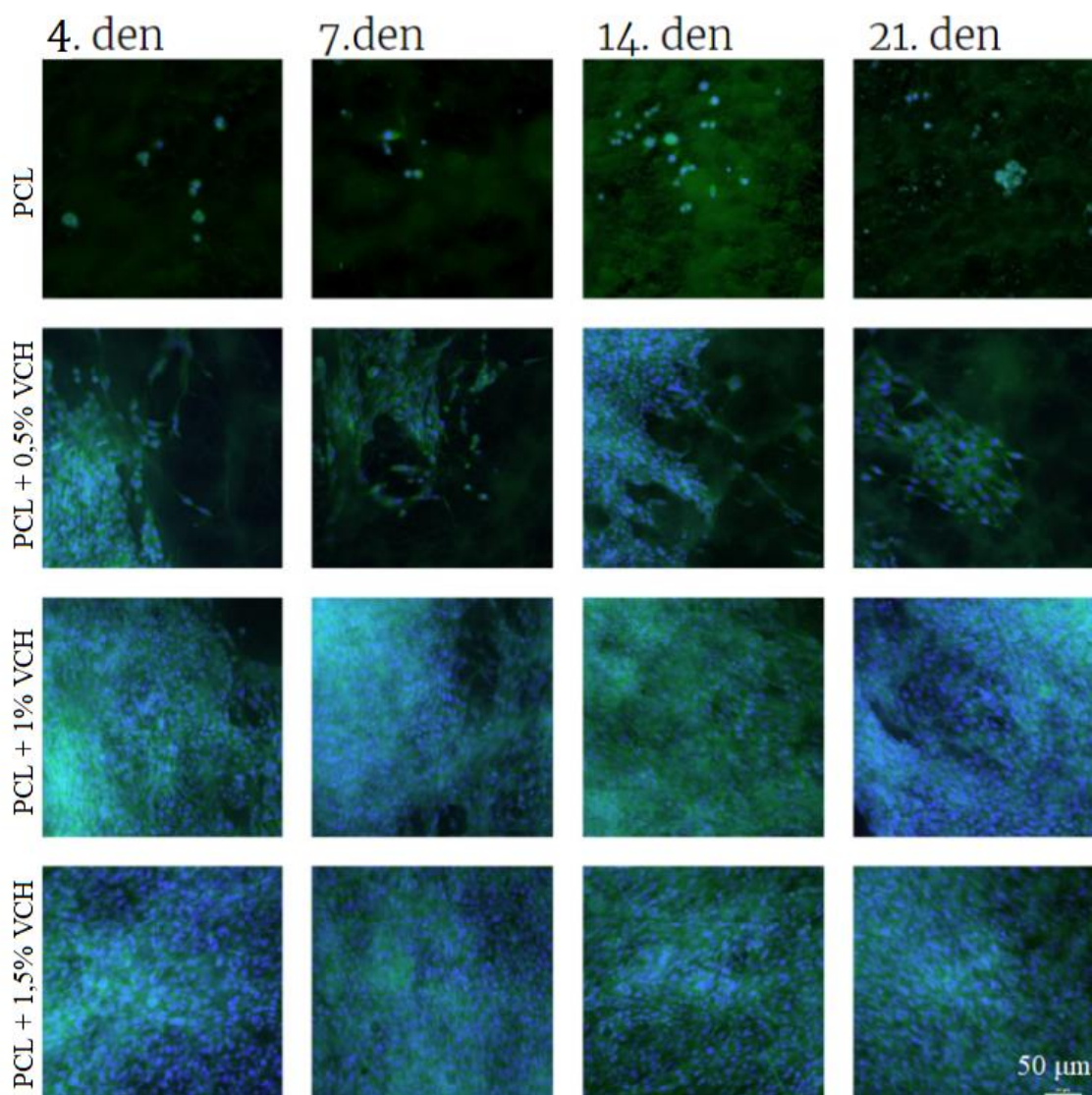
Metabolická aktivita



Obrázek 33 Graf metabolické aktivity buněčné linie 3T3 myších fibroblastů na nanovláčkových materiálech. 4.; 7.; 14. a 21. den testování; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; ANOVA. Bonferroni; $n = 3$.

Na Obrázku 34 jsou zobrazeny pořizené snímky z fluorescenční mikroskopie. Materiály o všech koncentracích antibiotika byly pořizovány po čtvrtém, sedmém, čtrnáctém a dvacátém prvním dnu od započetí buněčné kultivace. Pro možnost buňky pozorovat, byla jejich jádra obarvena modře a buněčný cytoskelet byl obarven zeleně. Po čtvrtém

dnu se na materiálu nevyskytuje mnoho buněk, avšak s dobou trvání experimentu se jejich počet zvyšoval. Při testování materiálu 14 a 21 den byly již buňkami porostlé kompletně po celém svém povrchu. Výsledky ze snímků odpovídají tedy výsledkům z testu metabolické aktivity buněk, kde vyšší metabolickou aktivitu značil vyšší počet buněk.



Obrázek 34 Snímky z fluorescenční mikroskopie, jež byly barveny modře - buněčná jádra (DAPI) a zeleně - cytoskelet buněk (Phalloidin-FITC); měřítko pro všechny snímky - 50 μm.

V softwarovém programu Matlab byl vyhodnocován počet buněk na ploše o velikosti 1 mm² všech testovaných materiálů. Výsledky se nachází v Tabulkách 21 až 24 a v grafu na obrázku 35. Čím déle byly buňky na materiálu osázeny, tím více se jich zde nacházelo. Dvacátý první den nastalo u některých materiálů k mírnému poklesu počtu buněk, což je pravděpodobně důsledkem toho, že byly buňky příliš přerostlé a pravděpodobně jim nezbývalo jak místo, tak živiny k dalšímu růstu. Tyto výsledky

odpovídají výsledkům z testu metabolického. Dle směrodatné odchylky nastává 14. a 21. den větší variabilita nacházejícího se počtu buněk.

Tabulka 21 Průměrná hodnota a směrodatná odchylka hodnoty počtu buněk na 1mm² materiálu po 4 dnech pro všechny materiály.

	PCL	PCL + 0,5 % VCH	PCL + 1,5 % VCH	PCL + 1 % VCH
Průměrná hodnota	63,042	31,235	126,085	61,900
Směrodatná odchylka	27,563	12,830	101,614	40,634

Tabulka 22 Průměrná hodnota a směrodatná odchylka hodnoty počtu buněk na 1mm² materiálu po 7 dnech pro všechny materiály.

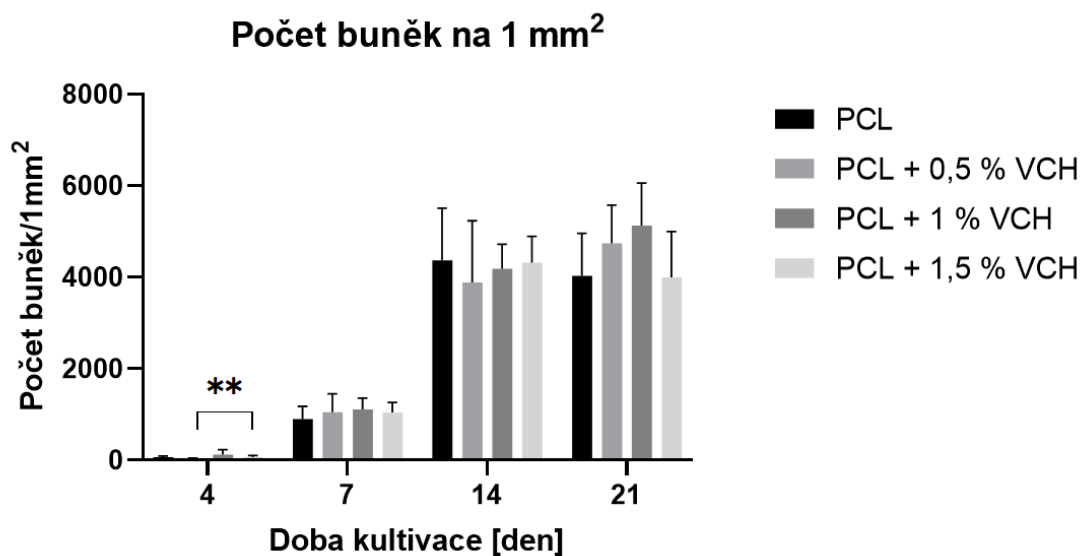
	PCL	PCL + 0,5 % VCH	PCL + 1,5 % VCH	PCL + 1 % VCH
Průměrná hodnota	896,300	1048,100	1110,400	1046,600
Směrodatná odchylka	278,885	399,283	245,411	219,790

Tabulka 23 Průměrná hodnota a směrodatná odchylka hodnoty počtu buněk na 1mm² materiálu po 14 dnech pro všechny materiály.

	PCL	PCL + 0,5 % VCH	PCL + 1,5 % VCH	PCL + 1 % VCH
Průměrná hodnota	4371,824	3889,959	4191,885	4322,685
Směrodatná odchylka	1136,929	1344,500	528,431	576,425

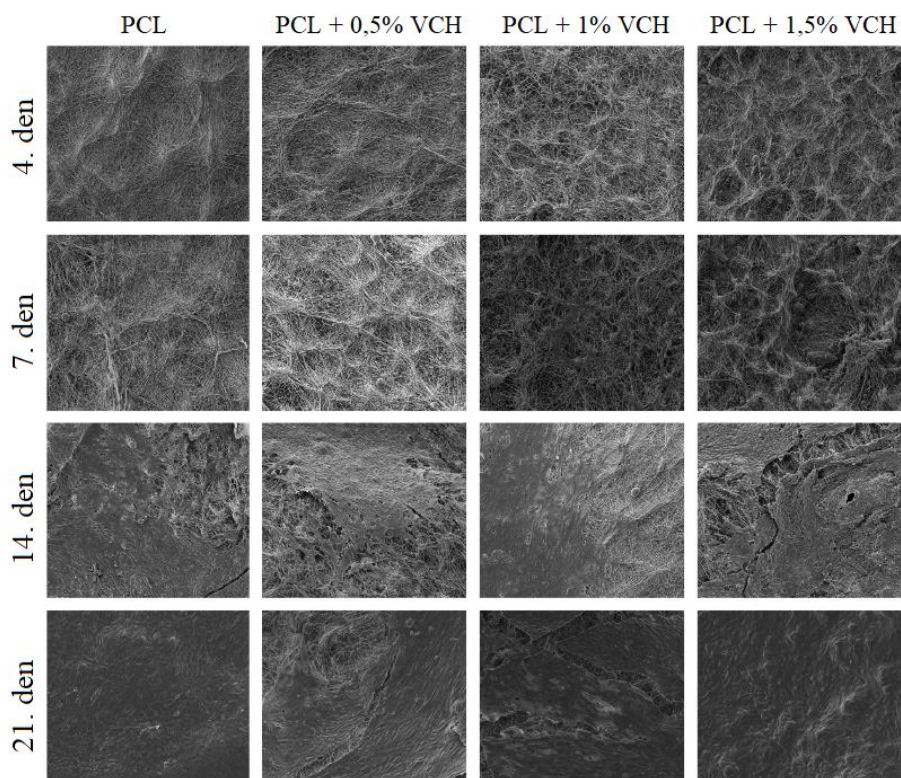
Tabulka 24 Průměrná hodnota a směrodatná odchylka hodnoty počtu buněk na 1mm² materiálu po 21 dnech pro všechny materiály.

	PCL	PCL + 0,5 % VCH	PCL + 1,5 % VCH	PCL + 1 % VCH
Průměrná hodnota	4028,614	4744,554	5127,189	3994,331
Směrodatná odchylka	932,732	833,985	937,302	1010,069

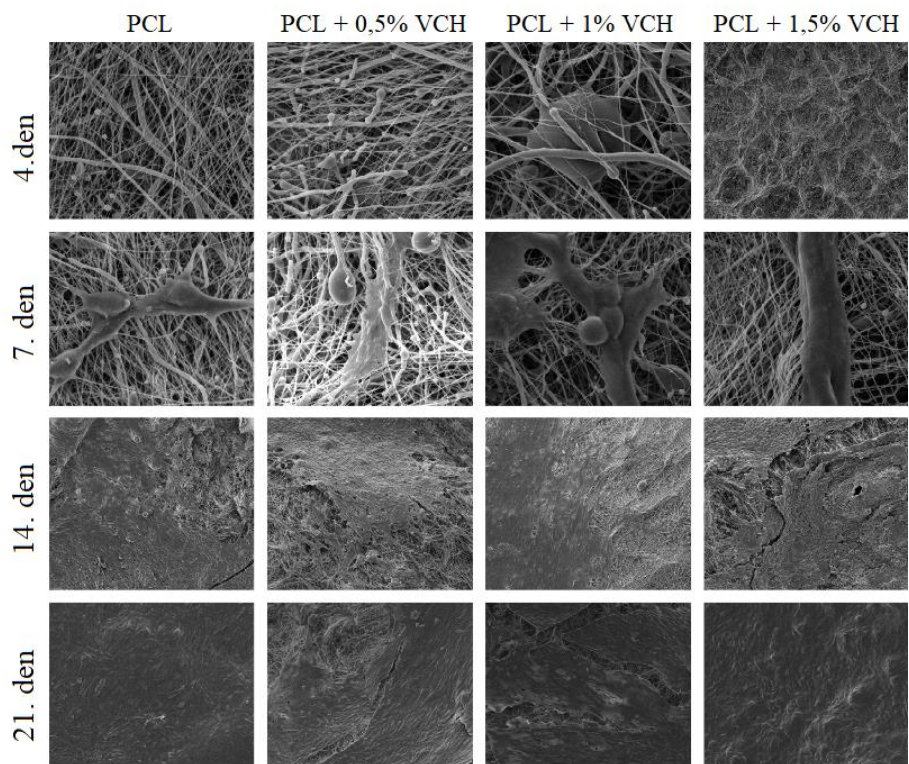


Obrázek 35 Počet buněk 3T3 myších fibroblastů na 1 mm² plochy materiálu 2.; 7.; 14. a 21. den testování. * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; ANOVA. Bonferroni; $n=10$.

Vyrobené materiály osázené buňkami byly také snímány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Na Obrázku 36 se nachází vlákna všech testovaných materiálů z každého testovacího dne při zvětšení 500x. Na Obrázku 37 se nachází stejné materiály, při zvětšení 5000x. Čtvrtý a sedmý den jsou vidět na snímcích nanovlákna, která však byla již čtrnáctý a dvacátý první den porostlá vrstvou buněk, která byla konfluentní natolik, že nebyla vlákna téměř vidět.



Obrázek 36 Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie, po čtvrtém, sedmém, čtrnáctém a dvacátém prvním dnu po osazení materiálu buňkami – zvětšení 500x.



Obrázek 37 Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie, po čtvrtém, sedmém, čtrnáctém a dvacátém prvním dnu po osazení materiálu buňkami – zvětšení 5000x.

8. Diskuze

V sedmé (experimentální) kapitole této práce byl popsán vývoj nanovlákněné vrstvy z polymerního roztoku poly- ϵ -kaprolakton, do které bylo v různých hmotnostních koncentracích inkorporováno antibiotikum Vankomycin hydrochlorid.

Několik studií již popsal inkorporaci různých typů antibiotik do různých nanovlákněných vrstev. V literatuře byly popsány postupy inkorporace antibiotik do nanovrstev, málokteré se však používají pro poloprůmyslovou nebo průmyslovou výrobu vláken. Většinou je zde také používáno jehlové zvlákňovací zařízení. Jen pro málo postupů byly popsány vlastnosti materiálu i po sterilizaci a málokdy byla optimalizována plošná hmotnost vyráběných vrstev. Publikace jsou popsány v kapitole 5 a částečně byly použity jako inspirace pro sestavení experimentální části.

8.1 Výběr polymeru a antibiotika

Z důvodu již předešlého častého užívání v tkáňovém inženýrství, při řízeném uvolňování antibiotik a také pro další aplikace, byl zvolen polymer PCL. Jedná se o polymer, jež je biokompatibilní, biodegradabilní (dlouhá doba degradace), má dobré mechanické vlastnosti. Hlavní výhodou tohoto polymeru je, že byl již v minulosti schválen federací pro kontrolu léčiv (FDA).

Dalším důvodem pro zvolení tohoto polymerního materiálu je, že veškeré testy byly provedené *in vivo* na prasatech. V publikaci *Rosendorf et al. (2020)* bylo uvedeno, že jsou nanovlákněné materiály vyrobené z PCL biokompatibilní, nezpůsobovaly imunitní odezvy u zvířat a *in vivo* experimenty vykazovaly nulovou mortalitu. Dále je v publikacích uvedeno, že při hojení střevních anastomóz, je nejčastějším problémem výskyt bakterií. Pro zlepšení toho problému bylo do nanovlákněných vrstev inkorporováno antibiotikum.

Pro inkorporaci do materiálu bylo zvoleno antibiotikum Vankomycin hydrochlorid. Účelem této inkorporace je zabraňovat vznikajícím infekcím, zánětu a degradaci nově vznikající tkáně v místě střevní anastomózy. Toto antibiotikum působí na gram-pozitivní bakterie, jež produkují enzym kolagenázu. Kolagenáza má za následek štěpení kolagenu v nově vznikající tkáni. Bakterie byly popsány v kapitole 4. Vankomycin hydrochlorid byl zvolen pro inkorporaci do materiálu na základě konzultace s prof. Ing. Jaroslavem Hrabákem, Ph.D. a prof. MUDr. Václavem Liškou, Ph.D. z Biomedicínského centra v Plzni.

8.2 Výroba nanovláknenných vrstev

Byly vyrobeny čtyři vrstvy, z toho byla jedna vrstva samostatného PCL a ostatní měly inkorporované antibiotikum VCH o hmotnostních koncentracích 0,5%; 1% a 1,5%. Tyto koncentrace byly zvoleny z toho důvodu, že se koncentrace 1,5% VCH jeví jako koncentrace limitní jak pro zvlákňování roztoku, tak pro rozpustnost antibiotik ve zvoleném rozpouštědlovém systému. Při zvlákňování materiálů s inkorporovaným antibiotikem o koncentraci 1,5% došlo k mírnému zhoršení průběhu zvlákňování. Výsledné vrstvy obsahovaly nanovláknena o vyšším průměru a s více defekty. Vyšší koncentrace by tedy byly ještě obtížněji zvlákňitelné, popřípadě by nešly zvláknit vůbec. Při vyhodnocování cytotoxicity různých koncentrací Vankomycinu hydrochloridu v médiu DMEM se jevila ještě 15 % hmotnostní koncentrace VCH v médiu jako cytotoxická. Hmotnostní koncentrace 20 % již byla toxická.

Výsledná přidaná koncentrace antibiotika Vankomycin hydrochlorid byla počítána ze sušiny PCL. Bylo předpokládáno, že se přibližně takové koncentrace budou také vyskytovat ve výsledné nanovláknenné vrstvě. Všechny připravené polymerní roztoky byly zvlákňovány za pomoci bezjehlového zařízení Nanospider™. Výroba vrstev byla optimalizována tak, aby výsledná vzniklá vrstva měla plošnou hmotnost 10 g/m². Na tomto zařízení je usnadněn případný převod na výrobu materiálu v průmyslovém měřítku, zařízení je již běžně užíváno v provozu.

Na základě vyhodnocených snímků ze skenovací elektronové mikroskopie (SEM) inkorporace antibiotika VCH mírně zvětšila průměrný průměr vláken. Bylo to však pozorováno pouze u vrstev sterilních. Příčinou mohly být také jiné klimatické podmínky při zvlákňování vrstev pomocí přístroje Nanospider™, jelikož se zde vyskytly mírné problémy s klimatizační jednotkou. Průměrná hodnota ± směrodatná odchylka vláken nesterilních s obsahem antibiotika (0,5%; 1%; 1,5%) byla (251 ± 143) nm až (283 ± 163) nm. Průměrná hodnota ± směrodatná odchylka vláken sterilních s obsahem antibiotika (0,5%; 1%; 1,5%) byla (407 ± 181) nm až (417 ± 231) nm. Průměry vláken byly měřeny na nanovláknenných vrstvách o plošné hmotnosti 10 g/m².

Dále byla vyhodnocována také smáčivost vrstev. Měření probíhalo pomocí kontaktního úhlu metodou přisedlé kapky. Původně bylo předpokládáno, že materiál s vyšší koncentrací VCH bude smáčivý více (na základě toho, že je VCH rozpustný v H₂O).

Všechny vyrobené materiály (sterilní i nesterilní) byly testovány pomocí dvou tekutin: destilované vody a simulované střevní tekutiny. Z výsledků vyplývá, že hydrofobními materiály jsou materiály nesterilní – zkoušené dH₂O: PCL + 0,5% VCH a zkoušené simulovanou střevní tekutinou: PCL; PCL + 0,5% VCH a PCL + 1% VCH. Ostatní materiály se chovaly jako smáčivé, tedy hydrofilní. Je to dáno pravděpodobně vyšší viskozitou testované simulované střevní tekutiny, než jsou tyto parametry u destilované vody. S vyšší koncentrací antibiotika v materiálu se také uzavírá nanostruktura materiálu. Všechny sterilní testované materiály vyšly jako materiály smáčivé, je zde tedy významný rozdíl oproti materiálům nesterilním. Z výsledků také vyplývá, že nemuselo být antibiotikum ve vrstvě rozmístěno rovnoměrně.

8.3 Testování obsahu a účinku Vankomycinu hydrochlorid v nanovlákněných vrstvách

Díky elementární analýze bylo prokázáno, že se zvyšujícím se obsahem antibiotika Vankomycin hydrochlorid se zvyšuje také obsah dusíku, který se v původní struktuře antibiotika vyskytuje. Bylo také potvrzeno, že obsah síry je při každé koncentraci nulový, jelikož se síra v původním složení antibiotika nevyskytuje. Celkově lze z provedené analýzy tedy vypovědět, že přítomnost prvku antibiotika zůstala i po zvláknění na zařízení NanospiderTM nezměněná.

Pro kontrolu, zda je antibiotikum ve vrstvách ve správné formě, byla použita vysoko-účinná kapalinová chromatografie, při které byl vyhodnocován obsah barevného komplexu vankomycin-ninhydrin. Bylo prokázáno, že se ve všech vyrobených vrstvách s inkorporovaným antibiotikem opravdu nachází Vankomycin hydrochlorid v nezměněné formě. Čím vyšší však byla původní koncentrace Vankomycinu hydrochlorid ve vrstvě, tím byla jeho koncentrace skutečná nižší. Je to důsledkem toho, že limitní zvláknitelnosti budou níže, než jsme předpokládali. Čím vyšší je koncentrace polymerního roztoku, tím horší je zpracovatelnost roztoků. Měření bylo provedeno ve spolupráci s prof. RNDr. Daliborem Šatínským, Ph.D., aby byla metodika optimalizována. Pro měření byla použita vlnová délka 570 nm – neabsorbovalo se při ní činidlo, pouze komplex vankomycin-ninhydrin. Ninhydrin reagoval s primárními a sekundárními aminoskupinami ve struktuře Vankomycin hydrochloridu za vzniku komplexu.

Nanovláknenné materiály vyrobené z roztoku PCL byly již dříve testovány v některých publikacích (Kličová *et al.* 2020) a vyšly zde jako necytotoxické a cytokompatibilní. Nově vyvíjené materiály s obsahem antibiotika VCH bylo však třeba otestovat na cytokompatibilitu a cytotoxicitu. Bylo třeba ověřit, zda nebyly zvolené koncentrace antibiotika (0,5%; 1%; 1,5%) cytotoxické. Pro tento účel bylo testováno samotné antibiotikum v médiu i extrakty všech vyrobených materiálů. Všechny testované vyrobené nanomateriály vyšly jako cytokompatibilní. Koncentrace 20 % a 40 % VCH v médiu se již jeví jako cytotoxické pro testovanou buněčnou linii 3T3 myši fibroblastů, jelikož byla viabilita buněk nižší než 70%. Těchto koncentrací ovšem ve zvláknovacích roztocích nebylo dosaženo, takže bylo ověřeno, že nebylo pracováno s toxickými koncentracemi, proto byla cytotoxicita antibiotik provedena. Jako negativní kontrola zde byly použity buňky kultivované pouze v médiu.

Pomocí testování byla ověřována adheze, proliferace, množství a také viabilita buněk (metabolický test) na materiály, jež byly zvlákněny s určitým obsahem antibiotika (0%; 0,5%; 1% a 1,5%) Vankomycin hydrochlorid. Pro testování byla použita buněčná linie 3T3 myších fibroblastů. Experimenty byly provedeny za použití metabolického testu CCK-8, fluorescenční mikroskopie, výpočtu buněk a skenovací elektronové mikroskopie.

Nejprve byly vytvořeny tabulky s průměrnou hodnotou a směrodatnou odchylkou metabolické aktivity buněk, jež byly na materiál osazeny. Byla zjištěna viabilita buněk na základě zjištěné absorbance buněk, která odpovídá právě metabolické aktivitě buněk. Viabilita buněk se zvyšovala společně s dobou trvání experimentu. Mezi 14. a 21. dnem se již růst buněk zpomalil, jelikož buňky dosáhly na materiálech nejvyššího stupně konfluence. Nejvýraznější rozdíl je mezi 7. a 14. dnem. Dále bylo na všech materiálech provedeno snímání materiálu za pomoci fluorescenčního mikroskopu. Snímky byly pořízeny každý testovací den na každém testovaném materiálu a porovnány. Aby bylo možné buňky dobře pozorovat, bylo nejprve jejich jádro obarveno modře a jejich cytoskelet zeleně. Čtvrtý testovací den ještě nebylo na materiálu mnoho buněk, čtrnáctý a dvacátý první den jsou však materiály již kompletně porostlé celistvou vrstvou buněk. Výsledky tedy korespondují s výsledky z metabolického testu CCK-8. Byl také vyhodnocen počet buněk, který se nacházel na materiálu o velikosti 1 mm². Opět platí podobnost s metabolickým testem a s fluorescenční mikroskopií, jelikož se počet buněk postupně zvyšuje s delší uplynulou dobou experimentu. Dvacátý první den se průměrný

počet buněk u některých materiálů i snížil, což je dáno tím, že buňkám začal docházet prostor i výživa pro růst, jelikož vrstvy byly buňkami porostlé souvisle. Poslední snímání materiálu bylo provedeno za pomoci SEM na každém testovaném materiálu každý testovací den. Pro představení výsledků byly vybrány snímky nanovláken s buňkami o velikosti zvětšení 500x a 5000x. Nanovlákná jsou dobře zřetelná 4. a 7. testovací den, jelikož materiál nebyl ještě kompletně porostlý buňkami. 14. testovací den již téměř nanovlákná nejsou vidět a 21. den jsou kompletně porostlá souvislou vrstvou buněk. Výsledky všech výsledků jsou tedy obdobné, testování vyrobených materiálů proběhlo úspěšně.

8.4 Antibakteriální účinky vyrobených nanovláknenných vrstev

Jelikož je uvolňování antibiotik nebo jiných aktivních látek z polymerních struktur (nanovláken) všeobecně velmi složité, je třeba dbát na vlastnosti polymerního materiálu. Těmito vlastnostmi jsou například: stupeň krystalinity, doba degradace, molekulová hmotnost, ohebnost řetězců, poréznost. Důležitými vlastnostmi jsou také vlastnosti inkorporované látky: hydrofilita/hydrofobicita, použité množství, rozpustnost látky. Neméně důležitými jsou vlastnosti okolí: pH a teplota. Ve finále je třeba charakterizovat vlastnosti celé vzniklé polymerní struktury s inkorporovanými antibiotiky: měrný povrch, tvar, velikost. Na struktuře výsledné látky záleží rychlost uvolňování antibiotika.

Pomocí antibakteriálního testování bylo prokázáno, že vyrobené nanovláknenné vrstvy mají vliv pouze na gram-pozitivní bakterie. Čím vyšší byla koncentrace antibiotika, tím větší byly halo zóny při testování gram-pozitivních bakterií *Staphylococcus gallinarum*. K uvolňování antibiotika došlo za krátký čas – 24 hodin. Pro kontrolu byl použit materiál bez antibiotika, přes který bakterie kompletně přerostly. Na gram-negativní bakterie *Escherichia Coli* neměl materiál s antibiotikem vliv. Všechny testované materiály, které obsahovaly antibiotikum, byly tedy cytocompatibilní pro testovanou buněčnou kulturu *Staphylococcus gallinarum*, ale nebyly cytocompatibilní pro testovanou kulturu *Escherichia Coli*. Materiály taktéž nebyly toxické pro testovanou buněčnou linii 3T3 myších fibroblastů. Pozorování uvolňování Vankomycinu hydrochlorid z PCL v čase nebylo v této práci provedeno. Pro prodloužení uvolňování antibiotika je doporučeno použít jinou metodu inkorporace – kapitola 5.

8.5. Vliv sterilizace na nanovláknenné vrstvy

Pokud to bylo možné, bylo testování provedeno jak na materiálech sterilních, tak nesterilních. Sterilní materiály byly sterilizovány etylenoxidem. Další možnosti sterilizace a dezinfekce zdravotnických výrobků se nachází v kapitole 2.5. Sterilizace etylenoxidem byla zvolena na základě nízké teploty tání PCL (kolem 60 °C), jelikož teplota sterilizace je 37 °C. Pokud by při sterilizaci byla použita teplota vyšší, mohlo by dojít k degradaci nebo tání polymeru. Na základě morfologické analýzy, měření průměrů vláken a smáčivosti vláken destilovanou vodou a simulovanou střevní tekutinou lze usoudit, že měla sterilizace na vláknenný materiál vliv. Tento vliv však nebyl zásadní, jelikož měla vyrobená nanovláknenná vrstva antibakteriální účinky i po sterilizaci. Při morfologické analýze byla porovnávána struktura vyrobených vrstev. Při vyšší koncentraci antibiotik se ve vrstvě vyskytovalo více defektů. Velikosti vláken byly po sterilizaci materiálů obsahující antibiotikum mírně větší, příčinou však budou spíše jiné klimatické podmínky pro zvlákňování. Při měření smáčivosti vrstev se naměřený kontaktní úhel na sterilních materiálech zmenšil u obou použitých tekutin (destilovaná voda a simulovaná střevní tekutina), oproti materiálům nesterilním. Po sterilizaci se všechny materiály jeví jako smáčivé u obou použitých tekutin. Podle elementární analýzy a vysoko-účinné kapalinové chromatografii bylo však prokázáno, že se chemické složení nijak významně nezměnilo.

Antibakteriální testování bylo provedeno pouze na materiálech sterilních, stejně jako veškeré buněčné testování *in vitro* zde tedy nebylo vliv sterilizace možné pozorovat. Antibakteriální testy však potvrdily, že vyrobené nanovláknenné materiály mají antibakteriální účinky, což znamená, že je antibiotikum účinné i po sterilizaci materiálu. Lze tedy prohlásit, že sterilizace etylenoxidem nemá vliv na antibakteriální účinky antibiotika Vankomycin hydrochlorid.

ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce bylo inkorporovat antibiotikum Vankomycin hydrochlorid do nanovláknenných materiálů vyrobených z roztoků poly- ϵ -kaprolaktonu. Vyrobené nanovláknenné nosiče v této diplomové práci jsou určeny hlavně pro aplikaci na střevní anastomózy. Střevní anastomózy vznikají v důsledku chirurgického zákroku, při kterém je odebrána poškozená část střeva. Duté konce tkáně jsou následně spojeny a je na ně aplikován nanovláknenný scaffold s inkorporovaným antibiotikem. Materiál je zde umístěn pro zpevnění vzniklého střevního spoje, zlepšení hojení tkáně a zabránění pooperačních komplikací, které vznikají v důsledku výskytu bakterií. Tyto bakterie nacházející se ve střevech totiž produkují extracelulární enzymy, jež štěpí nově vzniklou a hojící se tkáň a tím způsobují zhoršené hojení tkáně a další komplikace.

Teoretická část této práce obsahuje rešerši literatury na problematiku, které bylo nutno porozumět v části experimentální. Experimentální část této diplomové práce se zabývala vývojem nanovláknenného materiálu, do kterého bylo inkorporováno antibiotikum. Zvoleným materiálem byl poly- ϵ -kaprolakton (PCL) pro jeho dobré vlastnosti a zvoleným antibiotikem byl Vankomycin hydrochlorid (VCH), jelikož působí na bakterie (které produkují extracelulární enzymy) běžně se vyskytující ve střevech. Pro zvláknění polymerních roztoků bez antibiotika i s inkorporovaným antibiotikem bylo použito zařízení NanospiderTM. Bylo zjištěno, že limitní koncentrací pro zvláknování je koncentrace 1,5 % Vankomycinu hydrochloridu v PCL, jelikož jeho zvláknování bylo v porovnání s ostatními připravenými polymerními roztoky pomalé a výsledné vrstvy více defektní. Těsně před zvlákněním polymerního roztoku byly všechny roztoky promíchány a homogenizovány pomocí ultrazvukové sonotrody. Bezjehlové zařízení NanospiderTM zajišťuje vyšší produkci vrstev a vyšší homogenitu vrstev, než zvláknování jehlové, při kterém může dojít například i k ucpání jehel. Jelikož však antibiotikum nemuselo být v polymerním roztoku zcela homogenně rozptýleno, nelze předpokládat, že byly výsledné vrstvy homogenní. Ve výsledných vyrobených nanovláknenných vrstvách s inkorporovaným antibiotikem tedy nemuselo být antibiotikum inkorporováno rovnoměrně. Na základě této teorie by mohly být vysvětleny některé výsledky u materiálů s vyšší koncentrací antibiotika (PCL + 1,5 % VCH). Výsledky se v některých analýzách nedržely trendů či se vychylovaly. Díky výrobě nanovláknenných vrstev na průmyslovém zařízení

Nanospider™ dochází k usnadnění případného převedení finálního vyrobeného materiálu do velkovýroby a průmyslu.

Pro ověření chemického složení a obsahu VCH byla použita elementární analýza a vysoce-účinná kapalinová chromatografie. Oběma metodami bylo potvrzeno, že je vyrobených nanovrstvách antibiotikum inkorporováno a že se zde nachází ve správné formě. Žádný z vyrobených materiálů není cytotoxický. Hraniční koncentrace cytotoxicity antibiotika VCH v médiu je 20 % VCH v médiu vůči buněčné linii 3T3 myších fibroblastů. Díky antibakteriálním testům byla potvrzena antibakteriální účinnost materiálu s inkorporovanými antibiotiky vůči buněčnému kmenu *Staphylococcus gallinarum*, jelikož antibiotikum VCH působí proti gram-pozitivním bakteriím. Materiál neměl antibakteriální účinnost proti bakteriálnímu kmenu *Escherichia Coli*, jelikož tyto buňky jsou gram-negativní. Materiály byly také testovány *in vitro*. Po celých dvacet jedna dní, kdy probíhalo testování, vykazovaly materiály vysokou metabolickou aktivitu buněk. Již po čtrnácti dnech byly materiály téměř celé porostlé konfluentní vrstvou buněk. Interval testování byl zvolen na základě toho, že i do praset budou materiály vsívány pouze na tři týdny.

Na základě všech získaných výsledků lze prohlásit, že sterilizace materiálu etylenoxidem, výrazně neovlivnila účinnost Vankomycinu hydrochloridu, jež byl inkorporován ve vrstvách. Nelze však s jistotou určit, který materiál o které koncentraci VCH je možno považovat za nejvíce vhodný. Materiál PCL + 1,5 % VCH byl nejvíce obtížně zvláknitelný. Výsledky se pro některé materiály mírně odchylovaly. Toto mohlo být zapříčiněno nehomogenní distribucí VCH ve vyrobených nanovláknenných materiálech. Nejlepší kombinaci PCL + VCH by mohlo odhalit opakování testování HPLC (dále plánováno s profesorem Šatínským), měření uvolňování ATB, *in vitro* testy přímo s bakteriemi ve střevech jako je *Pseudomonas aeruginosa* (plánováno s týmem profesorem Hrabáka v Biomedicínském centru).

Materiály budou v blízké době testovány *in vivo* na zvířecích modelech. Na základě těchto testů by mohlo být zjištěno a prokázáno, jaká nebo jaká koncentrace antibiotik je nejvhodnější. Vyrobené vrstvy mají antibakteriální účinky a zároveň jsou cytokompatibilní s buňkami, které se na nich usadily a proliferovaly. Kombinace těchto vlastností je výhodná právě při řešení problémů, které se pojí se střevními anastomózami. Materiály by mohly zamezit problémům, kdy bakterie přítomné ve střevech degradují hojící se tkáň. Antibakteriální účinky a cytokompatibilita

materiálu jsou tedy klíčovými vlastnostmi pro budoucí aplikace a plánované testování *in vivo*. Toto testování může tyto vlastnosti materiálu potvrdit. Dalším zajímavým experimentem by bylo sledování uvolňování VCH z materiálu v čase. Toho lze dosáhnout třeba pomocí UV-spektrofotometrie nebo chromatografie při testování *in vitro*. Pokud by materiál při testování *in vivo* vykazoval příliš vysokou koncentraci antibiotika VCH ihned po aplikaci materiálu, pak by bylo vhodné zvolit jinou metodu inkorporace antibiotika.

Literární zdroje

- [1] DUŠEK, Ladislav. *Epidemiologie, prevence a léčba kolorektálního karcinomu dle dostupných českých a mezinárodních dat*. Praha: Fakultní nemocnice v Motole, 2012. ISBN 978-80-87347-07-2.
- [2] MCDERMOTT, F D, A HEENEY, M E KELLY, R J STEELE, G L CARLSON a D C WINTER. Systematic review of preoperative, intraoperative and postoperative risk factors for colorectal anastomotic leaks. *British Journal of Surgery* [online]. 2015, **102**(5), 462-479 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0007-1323. Dostupné z: doi:10.1002/bjs.9697.
- [3] ASHKANANI, F a ZH KRUKOWSKI. Intestinal Anastomosis. *Surgery (Oxford)* [online]. 2002, **20**(5), 104-107 [cit. 2022-05-09]. ISSN 02639319. Dostupné z: doi:10.1383/surg.20.5.104.14630.
- [4] BLAŽEJ, S., J. PÁRAL and M. KAŠKA. *Vývoj konstrukcí střevních anastomóz a současný stav jejich možností. Rozhledy v chirurgii*. 2015, vol. 94, iss. 8, pages 316-321.
- [5] LIAKAKOS, Theodoros, Nikolaos THOMAKOS, Paul M. FINE, Christos DERVENIS a Ronald L. YOUNG. Peritoneal Adhesions: Etiology, Pathophysiology, and Clinical Significance. *Digestive Surgery* [online]. 2001, **18**(4), 260-273 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0253-4886. Dostupné z: doi:10.1159/000050149.
- [6] ROSENDORF, Jachym, Jana HORAKOVA, Marketa KLICOVA, et al. Experimental fortification of intestinal anastomoses with nanofibrous materials in a large animal model. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1) [cit. 2022-05-09]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-58113-4.
- [7] THEOCHARIS, Achilleas D., Spyros S. SKANDALIS, Chrysostomi GIALELI a Nikos K. KARAMANOS. Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2016, **97**, 4-27 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2015.11.001.
- [8] QIAN, ZhiYong, YANG, Chang-yang GONG, et al. Preventing postoperative abdominal adhesions in a rat model with PEG-PCL-PEG hydrogel. *International*

Journal of Nanomedicine [online]. [cit. 2022-05-09]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S26141.

[9] LIU, Wei a Yilin CAO. Tissue Engineering Technology for Tissue Repair and Regeneration. *Comprehensive Biotechnology* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 173-201 [cit. 2022-05-09]. ISBN 9780444640475. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-64046-8.00300-1.

[10] SPEER, Allison L. Current Concepts for Tissue Engineering of the Gastrointestinal Tract. Reference Module in Biomedical Sciences [online]. Elsevier, 2019, 2019 [cit. 2022-05-09]. ISBN 9780128012383. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.65847-6.

[11] IKADA, Yoshito. Challenges in tissue engineering. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2006, **3**(10), 589-601 [cit. 2022-05-09]. ISSN 1742-5689. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2006.0124.

[12] VACANTI, Joseph P. a Charles A. VACANTI. The History and Scope of Tissue Engineering. *Principles of Tissue Engineering* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 3-8 [cit. 2022-05-09]. ISBN 9780123983589. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-398358-9.00001-X.

[13] WANG, Zhanhui, Nan LI, Rui LI, Yawei LI a Liqun RUAN. Biodegradable intestinal stents: A review. *Progress in Natural Science: Materials International* [online]. 2014, **24**(5), 423-432 [cit. 2022-05-09]. ISSN 10020071. Dostupné z: doi:10.1016/j.pnsc.2014.08.008.

[14] ULERY, Bret D., Lakshmi S. NAIR a Cato T. LAURENCIN. Biomedical applications of biodegradable polymers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* [online]. 2011, **49**(12), 832-864 [cit. 2022-05-09]. ISSN 08876266. Dostupné z: doi:10.1002/polb.22259.

[15] JAMSHIDI-ADEGANI, Fatemeh, Ehsan SEYEDJAFARI, Nematollah GHEIBI, Masoud SOLEIMANI a Mehdi SAHMANI. Prevention of adhesion bands by ibuprofen-loaded PLGA nanofibers. *Biotechnology Progress* [online]. 2016, **32**(4), 990-997 [cit. 2022-05-09]. ISSN 87567938. Dostupné z: doi:10.1002/btpr.2270.

- [16] CHEN, D.R, J.Z BEI a S.G WANG. Polycaprolactone microparticles and their biodegradation. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2000, **67**(3), 455-459 [cit. 2022-05-09]. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-3910(99)00145-7.
- [17] MIDDLETON, J.C. and A.J. TIPTON. *Synthetic Biodegradable Polymers as Medical Devices*. Medical Plastics and Biomaterials Magazine, 1998, vol. 3-4.
- [18] MÁŠ ESTELLÉS, Jorge, Ana VIDAURRE, José M. MESEGUER DUEÑAS a Isabel CASTILLA CORTÁZAR. Physical characterization of polycaprolactone scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2008, **19**(1), 189-195 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0957-4530. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-006-0101-2.
- [19] HAVLÍČEK, Karel, Lucie SVOBODOVÁ, Totka BAKALOVA a Tomáš LEDERER. Influence of electrospinning methods on characteristics of polyvinyl butyral and polyurethane nanofibres essential for biological applications. *Materials & Design* [online]. 2020, **194** [cit. 2022-05-09]. ISSN 02641275. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2020.108898.
- [20] KLICOVA, Marketa, Andrea K LAPSTOVA, Jiri CHVOJKA, Barbora KOPRIVOVA, Vera JENCOVA a Jana HORAKOVA. Novel double-layered planar scaffold combining electrospun PCL fibers and PVA hydrogels with high shape integrity and water stability. *Materials Letters* [online]. 2020, **263** [cit. 2022-05-09]. ISSN 0167577X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2019.127281.
- [21] REDIGUIERI, Carolina Fracalossi, Rogério Corte SASSONIA, Kamal DUA, Irene Satiko KIKUCHI a Terezinha DE JESUS ANDREOLI PINTO. Impact of sterilization methods on electrospun scaffolds for tissue engineering. *European Polymer Journal* [online]. 2016, **82**, 181-195 [cit. 2022-05-09]. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2016.07.016.
- [22] SCHLOSSBERG, David a Rafik SAMUEL. *Antibiotics manual: a guide to commonly used antimicrobials*. Second edition. [Hoboken]: Wiley Blackwell, 2017. ISBN 978-1-119-22075-6.
- [23] MOIR, Donald T, Timothy J OPPERMAN, Michelle M BUTLER a Terry L BOWLIN. New classes of antibiotics. *Current Opinion in Pharmacology* [online].

2012, **12**(5), 535-544 [cit. 2022-05-09]. ISSN 14714892.
Dostupné z: doi:10.1016/j.coph.2012.07.004.

[24] MOHR, Kathrin I. History of Antibiotics Research. STADLER, Marc a Petra DERSCH, ed. *How to Overcome the Antibiotic Crisis* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016, 2016-10-15, s. 237-272 [cit. 2022-05-09]. Current Topics in Microbiology and Immunology. ISBN 978-3-319-49282-7. Dostupné z: doi:10.1007/82_2016_499.

[25] KUMAR, Mohit, Shweta JAISWAL, Kushneet Kaur SODHI, Pallee SHREE, Dileep Kumar SINGH, Pawan Kumar AGRAWAL a Pratyooosh SHUKLA. Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance. *Environment International* [online]. 2019, **124**, 448-461 [cit. 2022-05-09]. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2018.12.065.

[26] MONTEIRO, Joaquim F., Siomara R. HAHN, Jorge GONÇALVES a Paula FRESCO. Vancomycin therapeutic drug monitoring and population pharmacokinetic models in special patient subpopulations. *Pharmacology Research & Perspectives* [online]. 2018, **6**(4) [cit. 2022-05-09]. ISSN 20521707. Dostupné z: doi:10.1002/prp2.420.

[27] ISHII, Hidetoshi, Keita HIRAI, Kyohei SUGIYAMA, Eiji NAKATANI, Midori KIMURA a Kunihiko ITOH. Validation of a Nomogram for Achieving Target Trough Concentration of Vancomycin: Accuracy in Patients With Augmented Renal Function. *Therapeutic Drug Monitoring* [online]. 2018, **40**(6), 693-698 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0163-4356. Dostupné z: doi:10.1097/FTD.0000000000000562.

[28] TIAN, Ye, Xiaomeng CHONG, Shangchen YAO a Mingzhe XU. Spectral Data Analysis and Identification of Vancomycin Hydrochloride. *Frontiers in Chemistry* [online]. 2021, **9** [cit. 2022-05-09]. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2021.753060.

[29] HERNÁNDEZ CALVO, Paula, Noelia CALVO SÁNCHEZ a Juan Luis MUÑOZ BELLIDO. General Characteristics of Bacteria. *Encyclopedia of Infection and Immunity* [online]. Elsevier, 2022, 2022, s. 481-491 [cit. 2022-05-09]. ISBN 9780323903035. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818731-9.00219-6.

[30] LEVINSON, Warren. *Review of medical microbiology and immunology*. 13th ed. New York: McGraw-Hill Education Medical, c2014. ISBN 978-0-07-181811-7.

- [31] MACFARLANE, G. T. a S. MACFARLANE. Human Colonic Microbiota: Ecology, Physiology and Metabolic Potential of Intestinal Bacteria. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* [online]. 2016, **32**(sup222), 3-9 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0036-5521. Dostupné z: doi:10.1080/00365521.1997.11720708.
- [32] Gao, Y., Bach Truong, Y., Zhu, Y., & Louis Kyratzis, I. (2014). Electrospun antibacterial nanofibers: Production, activity, and *in vivo* applications. *Journal of Applied Polymer Science*, *131*(18). Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/app.40797.
- [33] LIANG, Dehai, Benjamin S. HSIAO a Benjamin CHU. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2007, **59**(14), 1392-1412 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2007.04.021.
- [34] TONCHEVA, Antoniya, Dilyana PANEVA, Vera MAXIMOVA, Nevena MANOLOVA a Iliya RASHKOV. Antibacterial fluoroquinolone antibiotic-containing fibrous materials from poly(l-lactide-co-d,l-lactide) prepared by electrospinning. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2012, **47**(4), 642-651 [cit. 2022-05-09]. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2012.08.006.
- [35] HONG, Yi, Kazuro FUJIMOTO, Ryotaro HASHIZUME, Jianjun GUAN, John J. STANKUS, Kimimasa TOBITA a William R. WAGNER. Generating Elastic, Biodegradable Polyurethane/Poly(lactide-co-glycolide) Fibrous Sheets with Controlled Antibiotic Release via Two-Stream Electrospinning. *Biomacromolecules* [online]. 2008, **9**(4), 1200-1207 [cit. 2022-05-09]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm701201w.
- [36] HUANG, Zheng-Ming, Chuang-Long HE, Aizhao YANG, Yanzhong ZHANG, Xiao-Jian HAN, Junlin YIN a Qingsheng WU. Encapsulating drugs in biodegradable ultrafine fibers through co-axial electrospinning. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2006, **77A**(1), 169-179 [cit. 2022-05-09]. ISSN 1549-3296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.30564.
- [37] LI, Tingting, Yue SHEN, Haitao CHEN, Yuchen XU, Dangfeng WANG, Fangchao CUI, Yujuan HAN a Jianrong LI. Antibacterial Properties of Coaxial Spinning Membrane of Methyl ferulate/zein and Its Preservation Effect on Sea

Bass. *Foods* [online]. 2021, **10**(10) [cit. 2022-05-09]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods10102385.

[38] WANG, Shige, Fuyin ZHENG, Yunpeng HUANG, Yuting FANG, Mingwu SHEN, Meifang ZHU a Xiangyang SHI. Encapsulation of Amoxicillin within Laponite-Doped Poly(lactic- co -glycolic acid) Nanofibers: Preparation, Characterization, and Antibacterial Activity. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2012, **4**(11), 6393-6401 [cit. 2022-05-09]. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/am302130b.

[39] ZHENG, Fuyin, Shige WANG, Shihui WEN, Mingwu SHEN, Meifang ZHU a Xiangyang SHI. Characterization and antibacterial activity of amoxicillin-loaded electrospun nano-hydroxyapatite/poly(lactic-co-glycolic acid) composite nanofibers. *Biomaterials* [online]. 2013, **34**(4), 1402-1412 [cit. 2022-05-09]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2012.10.071.

Seznam obrázků

<i>Obrázek 1 Schéma provedení střevní anastomózy. A) První (přední) stehy jsou zavedeny na mezenterických a antimezentorických hranicích, vstupují přibližně 5-6 mm od řezné rány střeva a vystupují v ubmukózní rovině. Steh pak vstupuje do protějšího střeva ve stejné rovině. B) Druhé (zadní) stehy jsou umístěny podobným způsobem diagonálně proti prvním. Tyto stehy jsou zauzlovány a drženy, zatímco první stehy jsou postupně prokládány. C) První stehy jsou svázány a přeříznuty. D) Anastomóza je otočena o 180 °. E) Po otočení anastomózy dochází k přístupnějšímu uspořádání zadních stehů. F) Všechny zbývající stehy jsou podvázány a vyjmuty a defekt je uzavřen [3].</i>	12
<i>Obrázek 2 Adheze mezi břišní stěnou a slepým střevem u krysy [8].</i>	14
<i>Obrázek 3 Klasifikace regenerativní medicíny na základě použití tkáňových nosičů (scaffoldů) [11].</i>	15
<i>Obrázek 4 Schéma míry absorpce degradabilních polymerů polymerů po dobu pěti let. PGA - polyglykolid, PLGA – kopolymer PGA a PLA, P(CL/LA) – kopolymer polykaprolaktonu a kyseliny poly-L-mléčné, PLLA - kyselina poly-L-mléčná, PCL - polykaprolakton [11].</i>	17
<i>Obrázek 5 Posílení anastomózy na tenkém střevě v modelu prasete aplikací nanomateriálu: (a) vytvořená anastomóza, (b) PCL nanomateriál aplikovaný do oblasti anastomózy [6].</i>	18
<i>Obrázek 6 Strukturní vzorec polykaprolaktonu.</i>	19
<i>Obrázek 7 Nanovlákná vrstva PCL na podkladovém materiálu spunbond z polypropylenu. Snímky byly pořízeny na skenovacím elektronovém mikroskopu. Zvětšení: 500x a 5000x.</i>	20
<i>Obrázek 8 Schéma bezjehlového elektrostatického zvlákňování ze struny [20].</i>	21
<i>Obrázek 9 Schematický nákres mechanismu účinku některých antibiotik (vlastní zpracování).</i>	24
<i>Obrázek 10 Strukturní vzorec antibiotika vankomycin hydrochlorid.</i>	25
<i>Obrázek 11 Stavba bakteriální buňky.</i>	26
<i>Obrázek 12 Různé metody začlenování léčiv do nanovláken. 1. vmíchání léčiva do roztoku polymeru před zvlákňováním, 2. uzavření léčiva v jádru vlákna pomocí</i>	

<i>koaxiálního elektrostatického zvlákňování, 3. enkapsulace/adsorpce léčiva v nanostrukturách před disperzí v roztoku pro elektrostatické zvlákňování, 4. navázání prekursoru (sloučenina, která se účastní chemické reakce, kdy vzniká jiná sloučenina) na účinnou látku v nanovlákněch po elektrostatickém zvlákňování, 5. navázání aktivní látky na nanovlákně po elektrostatickém zvlákňování [32].</i>	29
<i>Obrázek 13 Příklad doby, po kterou se uvolňuje inkorporované léčivo (cefloxin sodný) z nanovlákněné vrstvy. Horní graf zobrazuje křivku kumulativní, spodní diferenciální. Data představují průměrnou hodnotu ± směrodatnou odchylku. A: PLGA s 1% hmotnosti léčiva, B: PLGA/PLA/PEG-b-PLA s 5% hmotnosti léčiva, C: PLGA s 5% hmotnosti léčiva [33].</i>	30
<i>Obrázek 14 Schématický diagram (a) vícevrstvého elektrostatického zvlákňování, (b) směšovacího elektrostatického zvlákňování [33].</i>	31
<i>Obrázek 15 Grafické zobrazení Teasova diagramu s vyznačenými parametry rozpustnosti v rozpouštědlovém systému CHEKO.</i>	35
<i>Obrázek 16 Měření kontaktního úhlu pomocí CCD kamery.</i>	37
<i>Obrázek 17 Kontaktní úhel s vyznačenou rovnováhou sil, kontaktní úhel: hydrofilní povrch (smáčivý) a hydrofobní povrch (nesmáčivý).</i>	38
<i>Obrázek 18 Příprava polymerního roztoku, kdy byl Vankomycin vložen do celého rozpouštědlového systému a nešel rozptýlit.</i>	45
<i>Obrázek 19 Morfologická analýza – SEM snímky nanovlákněných vrstev. Porovnání vrstev: po výrobě a po sterilizaci ethylenoxidem. Měřítka 10 μm a 50 μm.</i>	50
<i>Obrázek 20 Grafické zobrazení průměrů vláken ve formě krabicového grafu. Průměry jsou zobrazeny v mikrometrech. Vlevo se nachází graf pro vlákna nesterilní, vpravo pro vlákna sterilní, + značí průměrnou hodnotu, Tukey; *$p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; ANOVA Kruskal-Wallis; $n = 500$.</i>	51
<i>Obrázek 21 Graf s naměřenými kontaktními úhly pro destilovanou vodu. Sterilní i nesterilní materiály, nesterilní materiály jsou označeny písmenem N za názvem materiálu; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; parametrický t-test, neparametrický t-test (Mann-Whitney test); $n = 20$.</i>	53
<i>Obrázek 22 Graf s naměřenými kontaktními úhly pro simulovanou střevní tekutinu. Sterilní i nesterilní materiály, nesterilní materiály jsou označeny písmenem N za</i>	

názvem materiálu; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; parametrický t-test, neparametrický t-test (Mann-Whitney test); $n=20$	54
Obrázek 23 Strukturální vzorec Vankomycin hydrochloridu.	55
Obrázek 24 Strukturální vzorec sulfanilamidu.	55
Obrázek 25 Graf vyjadřující obsah N (dusíku) ve všech testovaných nanovláčkových materiálech s obsahem i bez obsahu antibiotika, sterilní i nesterilní. 2 měření z různých míst.	56
Obrázek 26 <i>E. coli</i> na agaru bez testovaného materiálu – pro kontrolu.....	58
Obrázek 27 Testované materiály o plošné hmotnosti 10 g/m ² a o velikosti 10 x 40 mm, na kterých byly sledovány halo zóny Petriho misce na agaru Nutrient v inokulum <i>Escherichia Coli</i> . A – PCL, B – PCL + 0,5 % VCH, C - PCL + 1 % VCH, D - PCL + 1,5 % VCH.	58
Obrázek 28 Porovnání všech testovaných materiálů o plošné hmotnosti 10 g/m ² a o velikosti 10 x 40 mm, na kterých byly sledovány halo zóny Petriho misce na agaru Nutrient v inokulum <i>Escherichia Coli</i>	59
Obrázek 29 Bakterie <i>Staphylococcus gallinarum</i> na agaru bez testovaného materiálu – pro kontrolu.	60
Obrázek 30 Testované materiály o plošné hmotnosti 10 g/m ² a o velikosti 10 x 40 mm, na kterých byly sledovány halo zóny v Petriho misce na agaru Braid Parker v inokulum <i>Staphylococcus gallinarum</i> . A – PCL, B – PCL + 0,5 % VCH, C - PCL + 1 % VCH, D - PCL + 1,5 % VCH.	60
Obrázek 31 Porovnání všech testovaných materiálů o plošné hmotnosti 10 g/m ² a o velikosti 10 x 40 mm, na kterých byly sledovány halo zóny Petriho misce na agaru Braid Parker v inokulum <i>Staphylococcus gallinarum</i>	61
Obrázek 32 Graf zobrazující metabolickou aktivitu fibroblastů pomocí kolorimetrického MTT testu. Zobrazena 70 % hranice viability.	62
Obrázek 33 Graf metabolické aktivity buněčné linie 3T3 myších fibroblastů na nanovláčkových materiálech. 4.; 7.; 14. a 21. den testování; * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; ANOVA. Bonferroni; $n = 3$	64

<i>Obrázek 34 Snímky z fluorescenční mikroskopie, jež byly barveny modře - buněčná jádra (DAPI) a zeleně - cytoskelet buněk (Phalloidin-FITC); měřítko pro všechny snímky - 50 μm.</i>	65
<i>Obrázek 35 Počet buněk 3T3 myších fibroblastů na 1 mm² plochy materiálu 2.; 7.; 14. a 21. den testování. * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; ANOVA. Bonferroni; $n=10$.</i>	67
<i>Obrázek 36 Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie, po čtvrtém, sedmém, čtrnáctém a dvacátém prvním dnu po osazení materiálu buňkami – zvětšení 500x.</i>	68
<i>Obrázek 37 Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie, po čtvrtém, sedmém, čtrnáctém a dvacátém prvním dnu po osazení materiálu buňkami – zvětšení 5000x.</i>	68

Seznam tabulek

<i>Tabulka 1 Tabulka zobrazující zvlákněvaný polymer, inkorporovaná antibiotika a metodu inkorporace antibiotik do nanovláken [32].</i>	32
<i>Tabulka 2 Použité chemikálie.</i>	35
<i>Tabulka 3 Parametry tvorby vláknenných vrstev.</i>	46
<i>Tabulka 4 Vybrané vzorky pro další experimenty.</i>	47
<i>Tabulka 5 Tabulka s naměřenými průměrnými hodnotami \pm směrodatná odchylna průměrů vláken v nanometrech.</i>	51
<i>Tabulka 6 Tabulka s průměrnými hodnotami naměřených kontaktních úhlu a se směrodatnou odchylkou. Kontaktní úhly byly měřeny na nesterilním materiálu za pomoci destilované vody.</i>	52
<i>Tabulka 7 Tabulka s průměrnými hodnotami naměřených kontaktních úhlu a se směrodatnou odchylkou. Kontaktní úhly byly měřeny na nesterilním materiálu za pomoci simulované střevní tekutiny.</i>	52
<i>Tabulka 8 Tabulka s průměrnými hodnotami naměřených kontaktních úhlu a se směrodatnou odchylkou. Kontaktní úhly byly měřeny na sterilním materiálu za pomoci destilované vody.</i>	52
<i>Tabulka 9 Tabulka s průměrnými hodnotami naměřených kontaktních úhlu a se směrodatnou odchylkou. Kontaktní úhly byly měřeny na sterilním materiálu za pomoci simulované střevní tekutiny.</i>	53
<i>Tabulka 10 Obsah dusíku v materiálech sterilních i nesterilních.</i>	56
<i>Tabulka 11 Obsah síry v materiálech sterilních i nesterilních.</i>	56
<i>Tabulka 12 Tabulka s naměřenými procentuálními obsahy antibiotika Vankomycin hydrochloridu ve výsledném nesterilizovaném materiálu.</i>	57
<i>Tabulka 13 Průměrná velikost inhibičních zón, průměr \pm SD pro Escherichia Coli.</i>	59
<i>Tabulka 14 Průměrná velikost inhibičních zón, průměr \pm SD.</i>	61
<i>Tabulka 15 Tabulka obsahující hodnoty viability a směrodatné odchylny PC, NC a materiálů PCL.</i>	62

<i>Tabulka 16 Tabulka obsahující hodnoty viability a směrodatné odchytky koncentrací vankomycinu hydrochloridu v kompletním médiu.</i>	62
<i>Tabulka 17 Průměrná hodnota a směrodatná odchytky výsledku metabolického testu po 4 dnech pro každý materiál.</i>	63
<i>Tabulka 18 Průměrná hodnota a směrodatná odchytky výsledku metabolického testu po 7 dnech pro každý materiál.</i>	63
<i>Tabulka 19 Průměrná hodnota a směrodatná odchytky výsledku metabolického testu po 14 dnech pro každý materiál.</i>	64
<i>Tabulka 20 Průměrná hodnota a směrodatná odchytky výsledku metabolického testu po 21 dnech pro každý materiál.</i>	64
<i>Tabulka 21 Průměrná hodnota a směrodatná odchytky hodnoty počtu buněk na 1mm² materiálu po 4 dnech pro všechny materiály.</i>	66
<i>Tabulka 22 Průměrná hodnota a směrodatná odchytky hodnoty počtu buněk na 1mm² materiálu po 7 dnech pro všechny materiály.</i>	66
<i>Tabulka 23 Průměrná hodnota a směrodatná odchytky hodnoty počtu buněk na 1mm² materiálu po 14 dnech pro všechny materiály.</i>	66
<i>Tabulka 24 Průměrná hodnota a směrodatná odchytky hodnoty počtu buněk na 1mm² materiálu po 21 dnech pro všechny materiály.</i>	66