



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií ■

Imobilizace chlorhexidinu na křemičitá nanovlákna a hodnocení jeho antibakteriální účinnosti

Bakalářská práce

Studijní program:

B3942 – Nanotechnologie

Studijní obor:

3942R002 – Nanomateriály

Autor práce:

Michal Puchřík

Vedoucí práce:

doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.

Konzultant:

prof. Ing. Ivan Stibor, CSc.



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michal Puchrík**
Osobní číslo: **M17000115**
Studijní program: **B3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Imobilizace chlorhexidinu na křemičitá nanovlákná a hodnocení jeho antibakteriální účinnosti**
Zadávající katedra: **Katedra chemie (KCH)**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte rešerši – chlorhexidin, mechanismus účinku na G^+ a G^- bakteriální kmeny, možnosti jeho ukotvení na různé nosiče, aplikace a současné využití (nejnovější poznatky).
2. S ohledem na strukturu chlorhexidinu navrhnete několik možností funkcionalizace povrchu křemičitých nanovláken s možností následné imobilizace chlorhexidinu.
3. Připravte vzorky nanovláken s imobilizovaným chlorhexidinem.
4. Ověřte jeho funkčnost mikrobiologickými metodami na vybrané patogenní bakteriální kmeny.

Rozsah práce: **40–50 stran**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. SMYTH, H., R. MCMULLAN a P. MCCONAGHY, 2019. Chlorhexidine and peri-operative anaphylaxis: an institute's approach to improving patient safety. *Anaesthesia*. **74**, 73–73. ISSN 0003-2409.
2. SRISANG, S., N. WONGSUWAN, A. P. BOONGIRD, M. UNGSURUNGSIE, P. WANASAWAS a N. NASONGKLA, 2019. Multilayer nanocoating of Foley urinary catheter by chlorhexidine-loaded nanoparticles for prolonged release and anti-infection of urinary tract. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 1–9. ISSN 0091-4037. Dostupné z doi: 10.1080/00914037.2019.1655752
3. VEVERKOVÁ, I. a I. LOVĚTINSKÁ-ŠLAMBOROVÁ, 2016. Modified Silica Nanofibers with Antibacterial Activity. *Journal of Nanomaterials*. **2016**, 1–6. ISSN 1687-4110, 1687-4129. Dostupné z doi: 10.1155/2016/2837197
4. EXNAR, P., I. LOVĚTINSKÁ-ŠLAMBOROVÁ a M. PAPRČKOVÁ, 2017. Solubility tests of silica nanofibers in body fluids as the default information for their application in medicine. *Nanofibers, Applications and Related Technologies*. **2017**, 121–128. ISBN 978-80-7494-393-5.
5. ŠLAMBOROVÁ, I., ZAJÍCOVÁ, V., EXNAR, P., STUDNIČKOVÁ, J.: Nanovláknenná struktura s imobilizovaným organickým agens a způsob její výroby. CZ 303 911, 14.8.2012, 9.5.2013; Nanofiber structure with immobilized organic agens and the method of its preparation. WO 2014026656. Uděleno 20.2.2014.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.**
Konzultant: **prof. Ing. Ivan Stibor, CSc.**

Datum zadání bakalářské práce: **7. října 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. června 2020**

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mě požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum:

Podpis:

Důležité upozornění

Díky mimořádnému stavu, způsobenému pandemií nemoci COVID-19, byl během vypracování této bakalářské práce znemožněn přístup do školních laboratoří na příliš dlouhou dobu na to, aby mohla být vypracována praktická část. K nahrazení chybějícího obsahu byla proto rozšířena teoretická část práce, aby byl splněn doporučený rozsah. Tato změna však není reflektována v zadání práce, které bylo na základě instrukcí děkana ponecháno v původní podobě.

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat paní doc. Mgr. Ireně Šlamborové Ph. D. za odborné vedení při vypracovávání této práce, za její ochotu a trpělivost a za pomoc při řešení nečekané situace, která vyvstala z důvodu zamezení přístupu do laboratoří, způsobeného výjimečným stavem. Dále chci poděkovat panu prof. Ing. Ivanu Stiborovi CSc. a panu RNDr. Michalu Řezankovi Ph. D. za poskytnutí konzultací, ze kterých jsem si odnesl cenné informace o postupech, kterými by bylo možno realizovat praktickou část mé práce. Nakonec si poděkování zaslouží děkan Fakulty mechatroniky, informatiky a mezioborových studií, pan prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D., který umožnil úpravu či zjednodušení obsahu závěrečných prací v akademickém roce 2019/2020, aby mohli své práce v řádném termínu dokončit i studenti, kterým zavedení výjimečného stavu a bezmála dvouměsíční uzavření univerzity zkomplikovalo práci na jejich závěrečných pracích.

Abstrakt

Obsahem této práce je studium vlastností antiseptické látky chlorhexidinu a křemičitých nanovláken s cílem navrhnout několik možných způsobů imobilizace chlorhexidinu na tento typ nanovláken. Výsledný materiál by mohl nalézt uplatnění v medicíně, např. jako krycí materiál usnadňující hojení ran. Na základě rešerše informací z vědecké činnosti převážně z posledních pěti let, která se zabývala problematikou imobilizace chlorhexidinu na různé nosiče na bázích nanomateriálů byly navrženy tři možné postupy imobilizace – pomocí cyklodextrinů (cyklické oligosacharidy které ve své centrální kavitě mohou ne vazebnými interakcemi vázat molekuly), kovalentní vazbou přes organokovový cross-linker a s využitím nanoporézních materiálů, které uvolní svůj obsah v reakci na pH prostředí. Prozkoumány byly také jiné způsoby imobilizace (např. s využitím nanočástic zlata, želatiny nebo jiných než křemičitých polymerních materiálů). Jedním z cílů práce bylo alespoň některé z navržených metod provést v laboratoři, otestovat antibakteriální aktivitu takto vytvořených materiálů a vlastnosti materiálů vzájemně porovnat. Naneštěstí byl v souvislosti se zavedením nouzového stavu znemožněn přístup do školních laboratoří, což znemožnilo praktickou část vypracovat v daném časovém rozmezí (některé z navržených syntéz a testování kinetiky uvolňování jsou poměrně časově náročné a nemusejí vést napoprvé k uspokojivým výsledkům). Proto byla místo toho teoretická část rozšířena, zejména o informace týkající se křemičitých nanovláken (jakožto nosiče chlorhexidinu, který měl být využit v praktické části), jejich výroby, vlastností a využití. Navržené postupy budou případně vyzkoušeny v rámci diplomové práce, která bude na tuto bakalářskou práci navazovat, pokud to bude tematicky vhodné vzhledem k jejímu obsahu.

Klíčová slova

chlorhexidin, křemičitá nanovláčka, imobilizace, antibakteriální účinky, drug-delivery systémy

Abstract

This thesis aims at studying the properties of chlorhexidine (an antiseptic) and silica nanofibers, in order to propose several options of immobilization of chlorhexidine onto this type of nanofibers. The resulting material could potentially find use in medical applications, for example as a wound dressing which promotes the healing process. Based on the information taken from scientific research in this area, mainly from the last five years, three methods of immobilization were suggested – using cyclodextrins (cyclic oligosaccharides that have the ability to non-covalently bind molecules in their central cavity), via a covalent bond using an organometallic cross-linker and with the use of nanoporous materials which release their contents in response to the pH value of the environment. Other methods of immobilization were also researched (such as those using gold nanoparticles, gelatine or different than silica-based polymer materials). One of the goals of this work was to test at least some of the proposed methods in laboratory conditions, assess the antibacterial activity of synthesized materials and compare the properties of the individual materials. Unfortunately, due to a state of emergency being declared, the access to school laboratories was restricted, which caused the work to be impossible to finish in time, because some of the proposed methods of synthesis and the tests of release kinetics are fairly time demanding and are not guaranteed to produce satisfactory results at the first attempt. Because of that, the theoretical part of the thesis was expanded instead and includes information regarding silica nanofibers (which were supposed to be used as the carrier for chlorhexidine), their synthesis, properties, and applications. Proposed methods of immobilization might be tested as a part of author's master thesis, which is going to further expand the topics presented in this work.

Keywords

chlorhexidine, silica nanofibers, immobilization, antibacterial activity, drug-delivery systems

Obsah

1	Úvod	11
2	Chlorhexidin	12
2.1	Historie využití.....	12
2.2	Chemická struktura	13
2.3	Syntéza	14
2.4	Mechanismus účinku.....	15
2.5	Toxicita a vedlejší účinky.....	18
2.6	Tradiční způsoby využití	19
2.7	Současný výzkum a příklady konkrétních aplikací	20
2.7.1	Využití cyklodextrinů k imobilizaci CHX.....	20
2.7.2	Napojení CHX na nanovlákná pomocí organokovového cross-linkeru	22
2.7.3	Nanoporézní křemičitany schopné pH-responzivního uvolňování CHX.....	24
2.7.4	Imobilizace CHX na zlaté nanočástice	27
2.7.5	Využití želatiny k imobilizaci CHG.....	28
3	Křemičitá nanovlákná.....	31
3.1	Syntéza křemičitých nanovláken.....	31
3.1.1	Princip elektrostatického zvlákňování.....	31
3.1.2	Parametry zvlákňovacího procesu a jejich vliv na vyprodukovaný materiál.....	32
3.1.3	Příprava solu pro syntézu křemičitých nanovláken	33
3.2	Vlastnosti křemičitých nanovláken	34
3.3	Biodegradace křemičitých nanovláken a její testování.....	35
3.3	Využití křemičitých nanovláken	37
3.3.1	Drug-delivery systémy.....	37
3.3.2	Biologické scaffoldy pro tkáňové inženýrství	38
3.3.3	Krycí materiály pro léčbu chronických a jiných ran.....	38
4	Závěr.....	40

Seznam použitých zkratek

AFM	mikroskopie atomových sil
APTES	3-aminopropyltriethoxysilan
ATP	adenosintrifosfát
BMPM	1,1'-(methylen-di-4,1-fenylen)bismaleinimid
CA	acetát celulózy
CD	cyklodextrin
CD-MA	cyklodextrin-methakrylát
CHG	(di)glukonát chlorhexidinu
CHX	chlorhexidin
CTAB	cetyltrimethylammoniumbromid
DMF	dimethylformamid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FDA	Food and Drug Administration – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (americká organizace)
HBMEC	lidské mozkové mikrovaskulární endotelní buňky
ICP-AES	emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
<i>in vitro</i>	v laboratorních podmínkách
MALDI-MS	hmotnostní spektrometrie s desorpční iniciovanou laserovým paprskem
NČ	nanočástice
PEO	polyethylenoxid
PLA	kyselina polylactonová
PVA	polyvinylalkohol
PVP	poly(4-vinylpyridin)
RNA	ribonukleová kyselina
TEOS	tetraethylorthosilikát
TGA	termogravimetrická analýza
TTE	triethanolamintitanát
UV-Vis	UV-viditelná spektrofotometrie

1 Úvod

Antiseptika a dezinfekce, tedy látky, sloužící k likvidaci potenciálně nebezpečných mikroorganismů na povrchu lidského těla a předmětů, jsou jedním ze základních pilířů moderní medicíny a nenahraditelné jsou zejména při chirurgických zákrocích.

Skutečnost, že rány je třeba udržovat čisté pro jejich správné hojení si uvědomovali již staří Sumerové (na záznamech z hliněných destiček, pocházejících z období přibližně 2150 př. n. l., byly popsány metody péče o povrchová poranění, které zahrnovaly např. vymývání rány horkou vodou a pivem či používání obkladů z usazenin ze dna vinných sudů či z ještěřčích exkrementů) či někteří antičtí lékaři (např. Hippokrates zmiňuje důležitost odstraňování hnisu, pokud se v ráně tvoří), avšak až v 19. století je všeobecně přijata myšlenka, že mnohé zdravotní komplikace, včetně těch vznikajících při hojení špatně ošetřených ran, jsou způsobovány mikroorganismy, zejména bakteriemi [1].

V roce 1867 byl publikován článek *Antiseptic Principle of the Practice of Surgery*, jehož autorem byl britský lékař a chirurg Joseph Lister. Ten vycházel z poznatků v oblasti mikrobiologie učiněných Louistem Pasteurem a přišel s myšlenkou, že operace je potřeba provádět ve sterilním prostředí, aby se zabránilo vzniku infekce [2]. Jako první antiseptikum byla používána kyselina karbolová, dnes lépe známá jako fenol. Její použití k dezinfekci operované oblasti výrazně snížilo četnost pooperačních komplikací, které předtím nezhledně končily i smrtí pacienta. Lister díky svému objevu získal velký ohlas a vysloužil si přezdívku „otec moderní chirurgie“ [3].

Od těchto pionýrských krůčků uběhlo již 150 let a za tu dobu vznikla celá řada antiseptických prostředků, vyvinutých s cílem maximalizovat jejich účinnost a omezit nežádoucí vedlejší účinky. Jedním z nejpoužívanějších antiseptik a desinfektantů se stal chlorhexidin, který nalézá uplatnění v chirurgii, dentální medicíně a mnoha dalších oblastech. S pomocí moderních technologií, zejména nanotechnologií, jsou otevírány stále nové možnosti využití této látky. Jednou z těchto moderních aplikací, která je zároveň tématem této bakalářské práce, je imobilizace chlorhexidinu na křemičitá nanovlákná, která mohou být aplikována přímo do rány a při jejich postupné degradaci se chlorhexidin průběžně uvolňuje a udržuje ránu sterilní i při déletrvajícím hojení.

Teoretická část této bakalářské práce pojednává o chlorhexidinu, jeho vlastnostech, možnostech jeho imobilizace a využití. Cílem praktické části je navrhnout několik způsobů imobilizace chlorhexidinu na křemičitá nanovlákná a otestovat antibakteriální účinnost a kinetiku uvolňování takto funkcionalizovaných vláken.

2 Chlorhexidin

Chlorhexidin (anglicky *chlorhexidine*), obvykle využívaný ve formě glukonátu (*chlorhexidine gluconate* – CHG), je organická látka, která je využívána jako dezinfekční a antiseptický prostředek. Následující kapitoly rozeberou chlorhexidin z různých hledisek, od historie využití, přes chemickou strukturu, syntézu a vlastnosti, až po aplikace, a to jak dlouhodobě zažité, tak i zcela nové nebo právě vyvíjené.

2.1 Historie využití

Chlorhexidin je v medicíně využíván již více než 70 let. Za dobu jeho používání byla prokázána jeho efektivita vůči širokému spektru mikroorganismů a také jeho zdravotní nezávadnost, která činí použití v naprosté většině případů bezpečným [4]. O jeho významu svědčí fakt, že je dnes zapsán na seznamu Model List of Essential Medicines (*Modelový seznam esenciálních léčiv*) Světové zdravotnické organizace (WHO) [5]. Tento seznam obsahuje léčiva, která jsou považována za natolik efektivní a bezpečná, že jsou v moderním lékařství nenahraditelná. Ačkoliv je tato látka využívána již poměrně dlouhou dobu, v kombinaci s novými technologiemi (ve velké míře s nanotechnologiemi) jsou nalézány stále nové možnosti jeho využití, nebo zvyšována efektivita těch již používaných.

Chlorhexidin byl objeven v 50. letech 20. století vědci britského konsorcia ICI (Imperial Chemical Industries), ve své době největšího výrobce chemických látek (včetně léčiv) ve Spojeném Království. K objevu došlo během vývoje nových prostředků k léčbě a prevenci malárie [6]. V médiích byla látka poprvé zmíněna v roce 1954, kdy ICI vydaly článek nazvaný „1:6-Di-4'-Chlorophenyldiguanidohexane ("Hibitane"). Laboratory Investigation of a New Antibacterial Agent of High Potency“, ve kterém pojednávají o slibných vlastnostech chlorhexidinu (tehdy nazývaného Hibitan) a jeho možném využití v medicíně [7]. V roce 1954 se také diglukonát chlorhexidinu poprvé objevil na trhu jakožto dezinfekční a antiseptický prostředek [8].

V 70. letech se chlorhexidin začal používat i ve Spojených Státech a byl proveden výzkum, který prokázal, že látka likviduje 86 až 92 % bakterií přítomných na lidské kůži [9]. V roce 1976 si lidé poprvé uvědomili potenciál, který má chlorhexidin v zubní medicíně, jelikož se ukázalo, že látka dokáže účinně omezovat tvorbu zubního plaku, a to dokonce lépe než jakýkoliv jiný do té doby známý prostředek. Navíc se chlorhexidin vyznačoval i vyšší bezpečností s minimem vedlejších účinků [8].

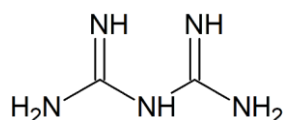
V roce 1981 byl americkým úřadem FDA (U. S. Food and Drug Administration) schválen k použití první urologický lubrikant s chlorhexidinem. O 11 let později, v roce 1992, se

poprvé objevil cévní katétr, impregnovaný touto látkou (společně se sulfazidinem stříbrným). Časem se chlorhexidin začal využívat k dezinfekci i dalších lékařských nástrojů, např. násad na injekční stříkačky. V roce 2005 se začala využívat k předoperační přípravě pacientů textilie napuštěná 2% roztokem glukonátu chlorhexidinu [4].

V současnosti je chlorhexidin součástí více než 60 léků a léčebných prostředků a ve většině zemí je dostupný i bez lékařského předpisu. Také se objevuje (v malém množství) v komerčních produktech, jako jsou dezinfekční prostředky, deodoranty, zubní pasty, ústní vody [10] apod. Chlorhexidin samotný má mnoho obchodních názvů, mezi něž patří např. Betasept, Hibistat nebo ChloroPrep [11].

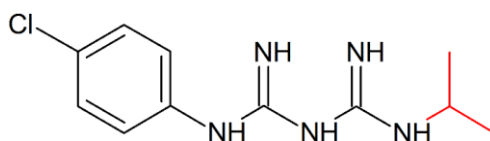
2.2 Chemická struktura

Chlorhexidin je zástupcem tzv. bisbiguanidů, což je skupina chemických látek, které obsahují dvě biguanidové funkční skupiny. Bisbiguanidy se obecně vyznačují svými baktericidními účinky, kromě chlorhexidinu sem patří například také antimikrobiotika alexidin a oktenidin [12] [13]. Chlorhexidin je z nich však nejdéle používaný a nejrozšířenější.

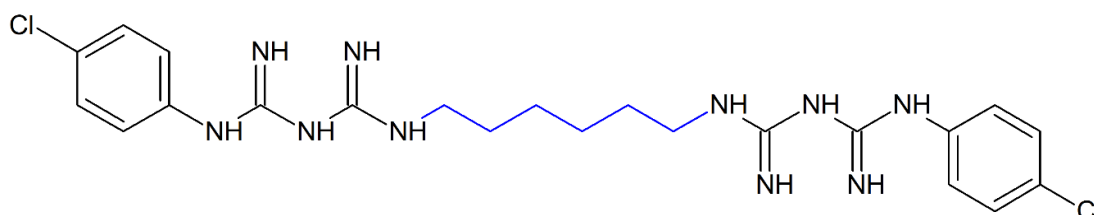


Obrázek 1: Chemická struktura biguanidu. Bisbiguanidy obsahují dvě tyto struktury, navázané přes koncové $-NH_2$ skupiny.

Struktura samotného chlorhexidinu vychází ze dvou jednotek velmi podobných chlorguanidu neboli proguanilu (látka, která slouží k léčbě malárie [14]), které jsou spojeny hexamethylenovým „můstkem“, viz schémata:



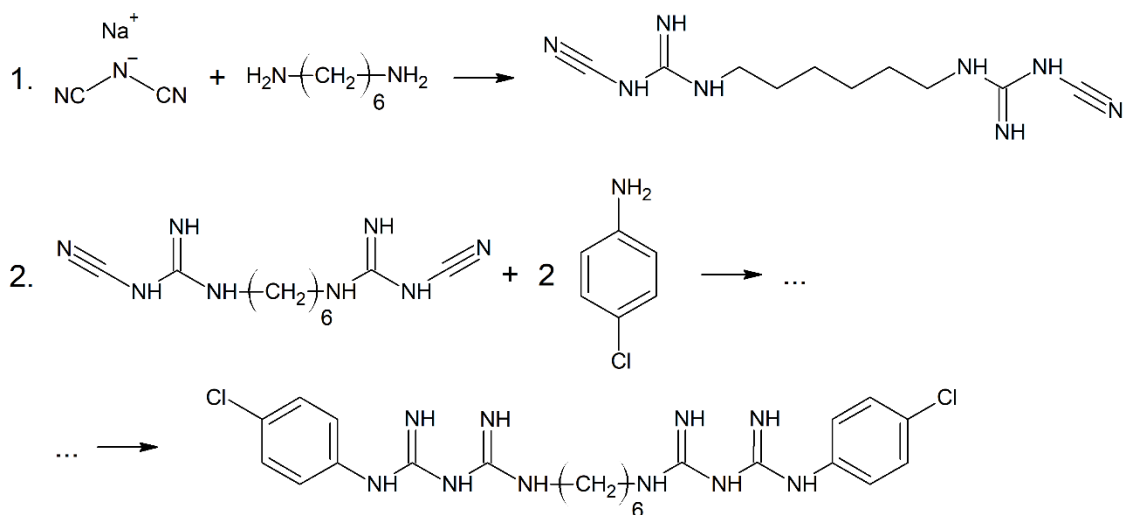
Obrázek 2: Chemická struktura proguanilu. Místo červeně vyznačené izopropylové funkční skup. se na aminoskupinu váže hexamethylenový můstek, spojující dvě tyto struktury dohromady.



Obrázek 3: Chemická struktura chlorhexidinu. Hexamethylenový můstek je vyznačen modře.

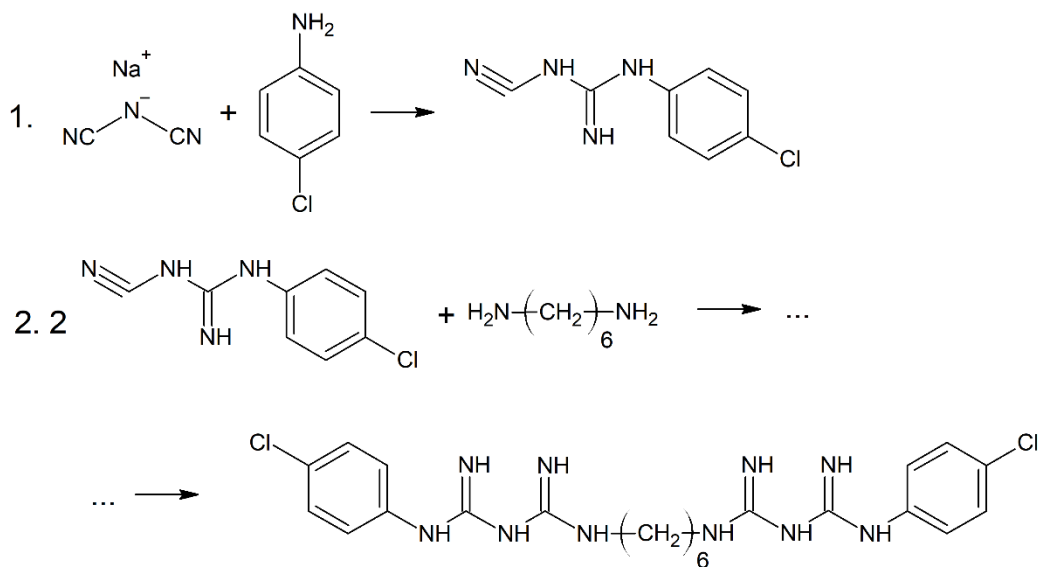
2.3 Syntéza

Standardní postup syntézy chlorhexidinu byl patentován v USA v roce 1954 jako patent US2684924 [15]. Patent zahrnuje dva způsoby syntézy, které se liší pořadím kroků. Při prvním mechanismu nejprve reaguje dikyanoazanidový anion s hexamethyldiaminem za vzniku 1,1'-(1,6-hexandiyl)bis(3-kyanoguanidinu). Tato sloučenina poté reaguje se dvěma molekulami 4-chloranilinu za vzniku chlorhexidinu. Reakční schéma je znázorněno níže:



Obrázek 4: První způsob syntézy chlorhexidinu. Vytvořeno podle zdroje [15].

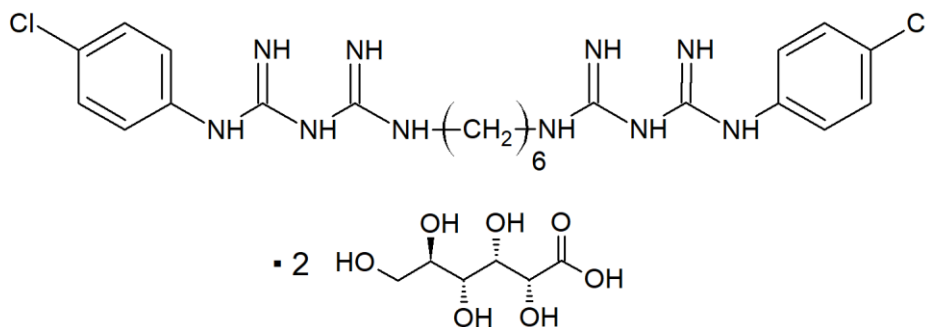
Druhá varianta syntézy obnáší záměnu prvního a druhého kroku. Nejprve se váže 4-chloranilin na dikyanoazanid za vzniku 3-(4-chlorfenyl)-1-kyanoguanidinu a dvě tyto struktury jsou spojeny pomocí hexamethyldiaminu na jednu molekulu chlorhexidinu:



Obrázek 5: Druhý způsob syntézy chlorhexidinu. Vytvořeno podle zdroje [15].

Reakce probíhají za teploty přibližně 150 °C.

Místo čistého chlorhexidinu bývá často používán glukonát (resp. diglukonát) chlorhexidinu, který se označuje zkratkou CHG. Formálně se jedná o sůl kyseliny glukonové, která vzniká z glukózy oxidací jedné z koncových hydroxylových funkčních skupin na karboxylovou. Chemická struktura CHG vypadá následovně [16] (lze se setkat i se vzorcem, ve kterém je glukonát navázaný přímo na chlorhexidin přes =NH skupinu v biguanidu):



Obrázek 6: Běžně uváděná struktura diglukonátu chlorhexidinu [16].

2.4 Mechanismus účinku

Mechanismus účinku lze stručně shrnout tak, že chlorhexidin je díky svému kladnému náboji přitahován k buněčné stěně bakterií, která je obvykle záporně nabitá, a způsobuje její narušení, což má za následek vylití obsahu buňky a její smrt [17]. Kromě bakterií vykazuje CHX aktivitu i proti buňkám plísní i jiných mikroorganismů, a dokonce i proti virům, i když v daleko menší míře.

Účinek chlorhexidinu je silně závislý na pH prostředí, přičemž chlorhexidin samotný je silně zásaditý. Aby se účinek vůbec projevil, musí pH dosahovat hodnoty alespoň 3,5. Při překročení této hodnoty se chlorhexidin vyskytuje ve formě dikationtu se dvěma kladnými náboji na koncích jeho centrálního hexamethylenového můstku. Nejvyššího účinku je dosaženo při pH v rozmezí 5,5 – 7, což odpovídá pH běžně přítomnému v lidském těle. Na celém rozmezí účinného pH se chlorhexidin vyskytuje téměř výhradně ve formě kationtu či dikationtu, pH tedy neovlivňuje ani tak chlorhexidin samotný, ale spíše buněčné stěny cílových mikroorganismů, na kterých se se stoupajícím pH nachází čím dál více záporně nabitých funkčních skupin a iontové interakce s chlorhexidinem jsou tak silnější.

Účinek také výrazně závisí na cílovém mikroorganismu a na koncentraci chlorhexidinu, obecně však probíhá následujícím mechanismem [17]:

1. Kladně nabitá molekula chlorhexidinu je rapidně přitahována k povrchu bakterie, který nese záporný náboj.
2. Dochází k silné adsorpci na složky buněčné stěny, obsahující fosfáty.
3. Díky efektu pasivní difúze dochází k proniknutí chlorhexidinu skrze buněčnou stěnu.

4. Chlorhexidin je přitahován na cytoplazmatickou membránu, která je tvořena dvojrstvou fosfolipidů, obsahuje tedy opět negativně nabitě fosfátové skupiny. Dochází k průniku chlorhexidinu membránou, což vede k jejímu protržení.
5. Trhliny v cytoplazmatické membráně jsou dostatečně velké na to, aby došlo k odchodu některých nízkomolekulárních látek z nitra bakterie. Jedná se především o draselné (K^+) ionty, jejichž koncentrace v cytoplazmě bakterie a mimo ni může být za normálních okolností vyrovnávána pouze osmózou. Poškození membrány rovněž vede k inhibici (potlačení) aktivity některých enzymů, jejichž funkce s cytoplazmatickou membránou souvisí.
6. Chlorhexidin způsobí srážení cytoplazmy, protože vytváří komplexy s fosforylovanými sloučeninami, jako je ATP (adenosintrifosfát) či nukleové kyseliny (RNA a DNA). Transportní funkce cytoplazmy je tímto narušena a vysrážené částice se nedostávají na místa, kde jsou potřeba. To vede k závažnému narušení funkce jednotlivých bakteriálních organel (ATP slouží jako zdroj energie díky štěpitelným makroergním vazbám a nukleové kyseliny zastávají nezastupitelnou roli v syntéze bílkovin – základních stavebních složek všech buněk, včetně bakterií), které vede ke smrti bakterie.

Působením kladně nabitého chlorhexidinu se původně negativně nabitá buněčná stěna bakterií rychle stává neutrální a tím se snižuje síla interakce a tím i míra navazování dalších molekul chlorhexidinu. Z tohoto důvodu také chlorhexidin funguje daleko lépe proti Gram-pozitivním bakteriím, jejichž buněčná stěna má výrazně větší záporný náboj, než u Gram-negativních bakterií.

V závislosti na použité koncentraci je účinek na patogenní kmeny buď bakteriostatický (způsobuje pouze inhibici neboli zastavení množení), nebo baktericidní, tedy vedoucí ke smrti mikroorganismů. Obvykle stačí koncentrace cca 10 $\mu\text{g/ml}$ na inhibici Gram-pozitivních bakterií (např. u kmenu *Streptococcus mutans* je minimální inhibiční dávka (MIC) dokonce pouze cca 1 $\mu\text{g/ml}$), nejnižší předepisovaná koncentrace však bývá daleko vyšší, okolo 200 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace potřebná k inhibici Gram-negativních bakterií je obecně vyšší a daleko více závisí na konkrétním bakteriálním kmenu a druhu, většinou však nepřekračuje 50 $\mu\text{g/ml}$. Při inhibiční koncentraci nedochází ke srážení cytoplazmy popsané v bodě 6, pouze k poškození buněčné stěny a vyplavení iontů. Tímto způsobem může bakterie ztratit až 50 % svých K^+ iontů. Dochází rovněž k uvolňování divalentních iontů, zejména vápenatých (Ca^{2+}). Předpokládá se, že tyto ionty pocházejí z buněčné stěny a jsou uvolňovány, když se chlorhexidin naváže na záporně nabitě peptidoglykany. Účinek lze zvrátit odstraněním chlorhexidinu z prostředí, ve kterém se bakterie nacházejí.

Při vyšší koncentraci chlorhexidinu dosahuje poškození buněčné stěny takové míry, že umožňuje i průchod větších molekul (např. nukleotidů) z cytoplazmy do okolního prostředí. Ztráta více než 15 % nukleotidů vede k nevratnému poškození bakterie. Míra poškození buněčné stěny stoupá s koncentrací, dokud není rovna 100-500 mg/l, poté dochází ke srážení cytoplazmy a vzniku vypukliny tvořené sraženinou na povrchu bakterie v místě působení, která ucpe trhliny v cytoplazmě. Rychlost absorpce chlorhexidinu také postupně klesá, protože vhodná cílová plocha na povrchu bakterie se postupně zmenšuje.

Stejným způsobem jako na bakterie působí chlorhexidin i na plísně. Buňky plísní rychle vychytávají molekuly chlorhexidinu, což vede k narušení jejich buněčné stěny i cytoplazmatické membrány (buněčná lýze) a úniku obsahu buňky do okolí, čímž buňka umírá. Při zlikvidování dostatečného počtu buněk umírá celé mycelium plísně.

Složitější situace nastává u biofilmů, mezi něž patří např. zubní plak. Biofilmy jsou různorodé shluky (agregáty) mikroorganismů rostoucí na pevném podkladu (substrátu). Uvnitř biofilmu dochází k celé škále interakcí mezi různými organismy, které ho tvoří a na jeho povrchu vznikají polymerní struktury, které chrání jeho vnitřní struktury. Z tohoto důvodu je pro většinu antimikrobiálních látek složitější účinně likvidovat mikroorganismy uvnitř biofilmu. Výjimkou není ani chlorhexidin, jehož efektivita vůči již vytvořenému biofilmu je také nižší, dokáže však ztížit mikroorganismům ulpívání na substrátu, proto ho lze využít jako prevenci vzniku a vývoje biofilmů.

Na rozdíl od většiny antimikrobiálních látek se u chlorhexidinu prokázaly jisté účinky i proti jiným formám mikroorganismů. Sem patří např. bakteriální spory (latentní stav, kdy se bakterie „zapouzdří“ do odolné schránky v reakci na nepříznivé vnější podmínky) či prvoci (jednobuněčné eukaryotní organismy, které mohou vystupovat jako parazité a způsobovat různé závažné choroby – příkladem může být *Plasmodia* neboli zimnička, která je přenášena komáry rodu *Anopheles* a u člověka způsobuje malárii). *In vitro* byla dokonce pozorována aktivita vůči tzv. obaleným virům (skupina virů s fosfolipidickou membránou, kam patří např. *herpes simplex*, který způsobuje jednoduchý opar, virus HIV nebo koronaviry, způsobující např. nemoci SARS a Covid-19). Míra účinnosti však není dost vysoká na to, aby se chlorhexidin dal využívat jako spolehlivé antivirotikum či přípravek proti prvokům.

Významný vliv na vysokou účinnost chlorhexidinu coby dezinfekce má jeho unikátní schopnost vázat se na proteiny přítomné v lidských tkáních, např. na kůži nebo sliznice. Pouze nízký podíl chlorhexidinu je vstřebán do těla, zbytek zůstane vázaný na proteiny a postupně se uvolňuje, což prodlužuje dobu účinnosti. Tento jev se označuje jako substantivita. Bylo prokázáno, že chlorhexidin aplikovaný na kůži má antibakteriální účinky po dobu

minimálně 48 hodin. Na rozdíl od jiných dezinfekcí využívaných v lékařství, např. jodovanému povidonu, není chlorhexidin ovlivněn přítomností tělních tekutin (např. krve).

Při aplikaci v dentální medicíně a hygieně se chlorhexidin dokáže navázat a postupně uvolňovat nejen na tkáň a sliznice ústní dutiny, ale dokonce i na povrch zubů, což značně zvyšuje jeho efektivitu při prevenci vzniku zubního plaku [17].

2.5 Toxicita a vedlejší účinky

Ke značnému rozšíření chlorhexidinu jako antibiotika a antiseptika přispěla skutečnost, že u většiny pacientů nejsou pozorovány žádné závažné vedlejší účinky. Byly však popsány případy alergických reakcí a podráždění kůže, způsobené přípravky obsahujícími chlorhexidin [18]. Použití v dentální medicíně a v ústních vodách může vést ke změně barvy zubů, tento efekt je však méně drastický u novějších ústních vod obsahujících kromě CHX také chelátovaný zinek [19]. Chlorhexidin je ototoxický (způsobuje poškození vnitřních částí ucha, zejména sluchově rovnovážného nervu (*nervus vestibulocochlearis*) a hlemýžďe (*cochlea*)), proto ho nelze využít při operacích ucha. Při vniknutí do vnitřního ucha (za ušní bubínek) může způsobit až ztrátu sluchu [20].

V současné době se také vedou diskuse o možné karcinogenitě chlorhexidinu při dlouhodobém pravidelném užívání, ta však dosud nebyla prokázána. FDA přesto doporučuje nepoužívat ústní vody s chlorhexidinem po dobu delší než 6 měsíců [21].

Byl zaznamenán případ, kdy vysoká koncentrace chlorhexidinu v plicích vedla ke vzniku syndromu akutní respirační tísně (ARDS – Acute Respiratory Distress Syndrome), což způsobilo smrt zasažené osoby. Obětí byla osmdesátiletá seniorka trpící demencí, která nedopatřením požřela 200 ml přípravku Maskin, který obsahuje 5 % glukonátu chlorhexidinu. Při následném dávení/zvracení nejspíše došlo ke vniknutí obsahu žaludku do dýchacího ústrojí, odkud se chlorhexidin vstřebává do těla mnohem snadněji než z trávicího traktu [22]. Jedná se však o ojedinělý incident, díky špatnému vstřebávání obvykle požití chlorhexidinu nevede k závažným komplikacím.

Jedním ze závažných a nedávno potvrzených problémů je však spojitost chlorhexidinu s anafylaktickým šokem při jeho použití v chirurgii [23]. Anafylaktický šok je akutní forma alergické reakce, která se projevuje svědivou vyrážkou, otoky (které mohou vést až k zablokování dýchacích cest a udušení) a nebezpečným snížením krevního tlaku. Obvykle bývá vyvolán potravinami nebo hmyzím štípnutím, mohou ho však způsobit i léky. V současnosti je anafylaktický šok nejčastější příčinou komplikací a úmrtnosti, spojených se samotným průběhem operace. V roce 2019 byly publikovány závěry 6. národního auditu (NAP6)

provedeného britskou lékařskou odbornou organizací The Royal College of Anaesthetists, které prokázaly, že ve Velké Británii je chlorhexidinu během operativního zákroku vystaveno až 73,5 % pacientů [23]. Alarmující je skutečnost, že chlorhexidin se ukázal být třetí nejčastější příčinou perioperativního (objevujícího se přímo během operace) anafylaktického šoku, přičemž jen ve velmi malém procentu případů lékaři dokázali správně identifikovat chlorhexidin jako příčinu komplikací. Průzkum provedený během auditu, kterého se zúčastnilo 34 anesteziologů s různou mírou profesních zkušeností, prokázal, že přes 20 % respondentů považuje chlorhexidin za vzácnou příčinu perioperativního anafylaktického šoku a pouze 6 % z nich dokázalo správně identifikovat příznaky zvýšené citlivosti pacienta na chlorhexidin. Povědomí o spektru lékařských přípravků obsahujících chlorhexidin také nebylo uspokojivé, přestože jich audit na lékařských pracovištích identifikoval celou řadu. Závěry auditu byly použity k proškolení lékařských pracovníků o rizicích spojených s chlorhexidinem a byl sestaven seznam lékařských přípravků, které je bezpečné použít pro pacienty se zvýšenou citlivostí na tuto látku.

Poznámka autora: Závěry tohoto výzkumu potvrdily význam přesně cílených nosičů chlorhexidinu na bázi nanočástic a nanovláken, jelikož při jejich použití je možné výrazně snížit nepotřebný kontakt této látky s organismem a tím i riziko vzniku alergické reakce.

2.6 Tradiční způsoby využití

Tato kapitola zahrnuje aplikace chlorhexidinu známé a používané již delší dobu, při kterých navíc látka obvykle není vázaná na žádný speciální nosič (např. na nanočástice nebo nanovlákná) ale používá se ve formě roztoku, prášku nebo jako součást léčebného přípravku.

Chlorhexidin je tradičně využíván zejména k ošetření kůže pacienta před operací, k dezinfekci rukou lékaře provádějícího zákrok nebo ke sterilizaci lékařských nástrojů [24]. Speciické využití má chlorhexidin v zubní medicíně, kde slouží k ošetření otevřených ran v dutině ústní (např. po extrakci zubu) a někdy se také využívá k prevenci vzniku zubního plaku a k léčbě kvasinkových infekcí v ústech [25]. Kromě toho lze prostřednictvím chlorhexidinu (někdy využívajícího nanomateriálové nosiče) zabránit infekci při zavádění katetru do močové trubice při proceduře zvané cévkování (anglicky *urinary catheterization*) a udržovat ho průchozí [26].

Chlorhexidin je používán i ve veterinární medicíně. Zde slouží například k léčbě kožních onemocnění. U psů se používá jednak při onemocnění dásní a také k periodickému čištění ušní dutiny u plemen, která mají dlouhé svěšené ušní boltce. Důvodem je, že tento tvar omezuje cirkulaci vzduchu okolo ušního otvoru a činí vnitřek ucha vlhkým, temným prostorem, ideálním k množení bakterií [27].

Chlorhexidin měl význam i při epidemii ptačí chřipky v prvním desetiletí 21. století, způsobované virem H5N1. Klinické studie společnosti Skinvisible prokázaly, že dezinfekce na ruce s touto látkou dokáže deaktivovat či přímo zlikvidovat virus H5N1 po významně delší dobu po aplikaci než jiné dezinfekční prostředky, např. na bázi alkoholu [28]. Chlorhexidin byl také zmíněn jako možný přípravek pro ošetření drůbeže s cílem zamezit šíření této nákazy [27].

V posledních letech roste význam chlorhexidinu v rozvojových zemích se špatnou zdravotní péčí. V Nepálu se v jako první zemi na světě začal chlorhexidin využívat k ošetřování ran po přerušení pupeční šňůry u novorozeneckých dětí. Posouzení provedené v roce 2015 britskou organizací Cochrane prokázalo, že tato praktika vedla ke snížení výskytu novorozenecké omfalitidy (zánětu pahýlu po pupeční šňůře) o 50 % a celkově se zasloužila o snížení úmrtnosti nepálských novorozenců o 12 % [29].

2.7 Současný výzkum a příklady konkrétních aplikací

Tato kapitola obsahuje příklady využití chlorhexidinu, která jsou předmětem aktuálního nebo nedávného výzkumu a většina informací je přebraná z článků z vědeckých časopisů. Obvykle je využíváno speciálních nosičů, nejrůzněji na bázi nanotechnologií, která umožňují přípravek efektivně dopravit do cílového místa a omezit kontakt s okolní tkání a možné nežádoucí účinky s ním spojené nebo ho průběžně uvolňovat a tím zajistit dlouhotrvající antibakteriální efekt, např. během hojení pooperačních ran.

2.7.1 Využití cyklodextrinů k imobilizaci CHX

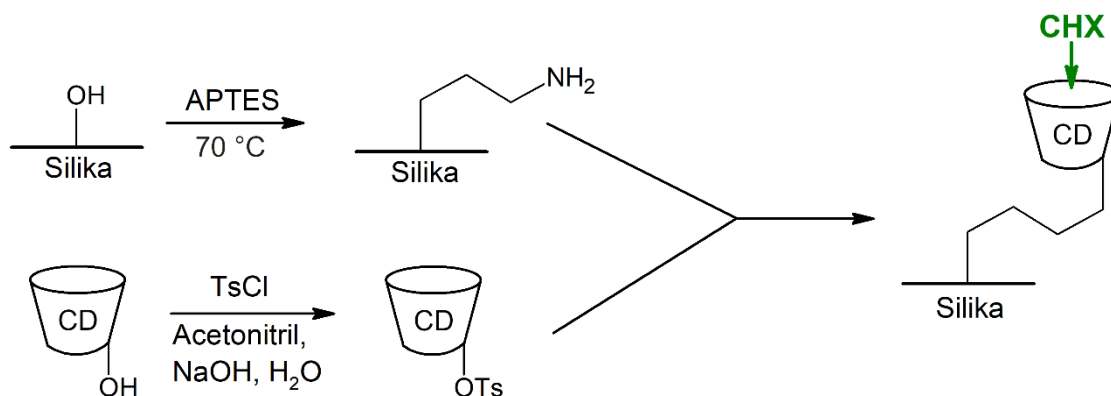
V roce 2016 tým pod vedením doktora Markuse J. Kettela z německého Leibniz Institute for Interactive Materials e. V. and Textile and Macromolecular Chemistry připravil nanogel na bázi PMMA (polymethylmethakrylátu) obsahující chlorhexidin, který může sloužit jako antimikrobiální povlak k ošetření povrchů [30]. K imobilizaci chlorhexidinu byl použit cyklodextrin, což je cyklický oligosacharid, sestávající z různého počtu (obvykle 6-8) glukózových jednotek. α -, β - a γ -cyklodextrin (o počtu 6,7 a 8 glukózových jednotek) byl převeden na cyklodextrin-methakrylát (CD-MA) reakcí cyklodextrinu s methakryloylchloridem v dusíkové atmosféře s využitím takzvané Schlenkovy aparatury, která umožňuje provádět reakce sloučenin citlivých na vzdušnou vlhkost [31]. Vzniklý CD-MA posloužil spolu s methylmethakrylátem (MMA) a N,N-methylen-bisakrylamidem, (který sloužil jako cross-linker) k přípravě nanogelu. Byla využita heterogenní polymerizace, produkt byl tedy nerozpustný v roztoku monomerů a během polymerizace se srážel v reakční směsi. Jako iniciátor posloužil azobisisobutyronitril (AIBN). Připraveno bylo několik vzorků, které se lišily typem a zastoupením navázaného cyklodextrinu. K připravenému nanogelu byl přidán

roztok chlorhexidinu v acetonu o hmotnostní koncentraci 2,08 g/l. Směs byla promíchávána 24 hodin, během kterých došlo k odpaření rozpouštědla. Po vysrážení a odfiltrování neza-komplexovaného CHX bylo množství imobilizovaného chlorhexidinu vyhodnoceno spektro-fotometricky. Následovaly testy uvolňování chlorhexidinu z nanogelu. Pro tyto účely byl gel nanesen na skleněné destičky o ploše 225 mm². Testováno bylo uvolňování do destilované vody a do izotonického roztoku pufru o pH 7,4, který simuloval podmínky panující v krev-ním řečišti. V intervalu 30 minut byla koncentrace uvolněného CHX vyhodnocována foto-metricky. Stejně vzorky na skleněném podkladu byly také umístěny do Petriho misek s koloniemi zlatého stafylokoka (*Staphylococcus aureus*) pro otestování antibakteriální ak-tivity nanogelu.

Výsledky ukázaly, že nejlépe komplexovat chlorhexidin dokáže nanogel nesoucí β -cyklode-xtrin (7 glukózových jednotek). Ve vodném prostředí bylo uvolňování rychlejší než v roz-toku pufru a do 240 minut se ze všech vzorků uvolnilo téměř 100 % původního množství. V roztoku pufru bylo uvolňování pomalejší, do 240 minut se uvolnilo pouze okolo 60 % na-vázaného CHX z gelu s β -cyklodextrinem, okolo 40 % z gelu s α -cyklodextrinem a méně než 30 % z gelu s γ -cyklodextrinem a uvolňování v čase dále poměrně stabilně pokračovalo v řádu jednotek mikrogramů CHX na 1 ml kapaliny během 30 minut. Všechny tři typy vzorků byly také schopné potlačit růst bakteriálních kolonií zlatého stafylokoka, čímž byla proká-zána jejich antibakteriální účinnost. Experiment prokázal, že imobilizace chlorhexidinu po-mocí cyklodextrinu může být dobrou cestou k přípravě materiálů s kontrolovaným dlouhodobým uvolňováním tohoto antibiotika [30].

Pozitivem použití cyklodextrinů je skutečnost, že jsou kompatibilní se širokou škálou cross-linkerů a je tak možné je připojit na mnoho různých nosičů. Jednou z možností je i využití křemičitých nanovláken, která mají tu výhodu, že jsou biokompatibilní a v organismu se ča-sem vstřebávají (podrobněji viz kapitola 3 – Křemičitá nanovlákná). K připojení cyklodex-trinu na křemičitá nanovlákná je nutné ho nejprve modifikovat pomocí *p*-toluensulfonylchloridu (také známého pod názvem tosylchlorid). Tato sloučenina může reagovat s hydroxylovou skupinou na cyklodextrinu a za odštěpení HCl se na něj nava-zat. Tosylát je dobře odstupující funkční skupina a k připojení takto modifikovaného cyklodex-trinu na nosič lze tak využít substituci nukleofilní [32]. Vhodným cross-linkerem pro tuto funkcionalizaci je tzv. APTES neboli (3-aminopropyl)triethoxysilan. Ten je svou strukturou podobný tetraethylorthosilikátu (TEOS) který se využívá k syntéze křemičitých nanostruk-tur, jedna z ethoxylových skupin je však nahrazena propylenovým řetězcem nesoucím na svém konci -NH₂ skupinu. Díky své podobnosti s TEOS lze APTES zakomponovat do struk-tury křemičitých nanočástic nebo nanovláken, čímž na jejich povrch zaneseme uhlíkaté

řetězce zakončené aminoskupinou. K optimalizaci vznikající povrchové struktury je vhodné reakci křemičitého povrchu s APTES provádět při teplotě okolo 70 °C [33]. Substituční reakcí, ve které aminoskupina vystupuje jako nukleofil, lze poté připojit cyklodextrin modifikovaný tosylátem na konec těchto uhlíkových řetězců. Popsaný proces znázorňuje schéma níže:

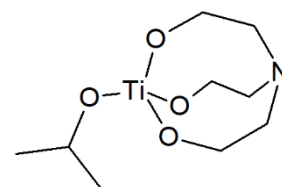


Obrázek 7: Schéma postupu připojení cyklodextrinu (CD) na křemičité nanostruktury („Silika“ značí křemičitý nanomateriál, který je funkcionalizován). Vytvořeno podle zdrojů [30], [32], [33].

2.7.2 Napojení CHX na nanovlákná pomocí organokovového cross-linkeru

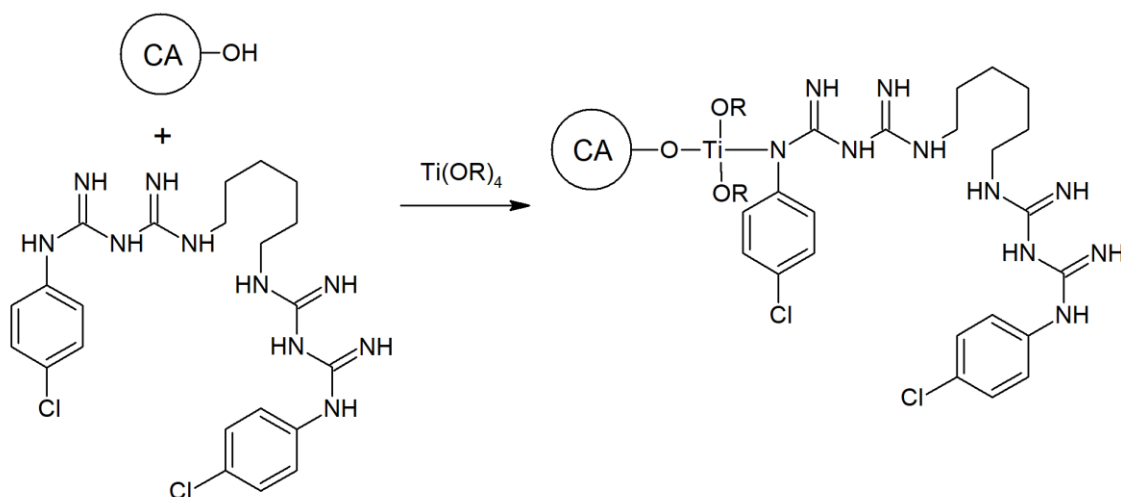
Vědci z Massachusetts Institute of Technology (MIT) vyrobili metodou elektrostatického zvláknování vlákna o tloušťce v řádu desítek až stovek nm, která na sobě nesou navázaný CHX připojený pomocí cross-linkeru [34]. Jako rozpouštědlo pro zvláknovaný roztok byl zvolen dimethylformamid (DMF), protože dokáže dobře rozpouštět jak acetát celulózy, tak práškový CHX. Roztok CA v DMF obvykle postrádá elasticitu potřebnou ke zformování stejnoměrných vláken a pokus o elektrostatické zvláknění v takovém případě místo toho vede ke vzniku kapek. Tento problém byl vyřešen na základě výzkumu jiného vědeckého týmu, který přišel na to, že přidání malého množství vysokomolekulárního polyethylenoxidu (PEO) vede k výraznému zvýšení elasticity a umožňuje správné zformování vláken během zvláknování [35]. Bylo připraveno několik roztoků o různé koncentraci PEO a jejich vlastnosti byly otestovány reometrem k nalezení možných souvislostí mezi vlastnostmi roztoků a z nich vzniklých vláken.

K připojení CHX k CA vláknům byl použit cross-linker Tyzor® TE, což je organický triethanolamintitanát (TTE), který se obvykle používá při výrobě pojiv, ropných produktů a textilu [36]. Roztok TTE byl smíchán s práškovým CHX ve hmotnostním poměru 8:1, výsledkem byla nažloutlá homogenní suspenze.



Obrázek 8: Struktura cross-linkeru TTE. Vytvořeno podle zdroje [34].

Přidáním malého množství vody a ohřevem směsi na 70 °C bylo urychleno vázání CHX na TTE, což se navenek projevilo změnou barvy nejprve na čirou a poté na narůžovělou spolu s výrazným nárůstem viskozity – produkt měl pastovitou konzistenci. Formálně se jedná o transesterifikační reakci mezi jednou z aminoskupin na CHX a TTE. Za podobných podmínek je možné připojit TTE na jednu z hydroxylových skupin, nacházejících se na povrchu acetátu celulózy. Pomocí TTE lze tedy vytvořit kovalentní spoj mezi strukturálními jednotkami obsahujícími hydroxylové skupiny a molekulou chlorhexidinu. To je možné provést před zvlákněním, nebo lze tímto způsobem ošetřit již připravená CA vlákna.



Obrázek 9: Schéma připojení CHX na CA vlákna pomocí TTE. CA v kroužku znázorňuje průřez polymerního vlákna, $Ti(OR)_4$ je TTE. Vytvořeno podle zdroje [34].

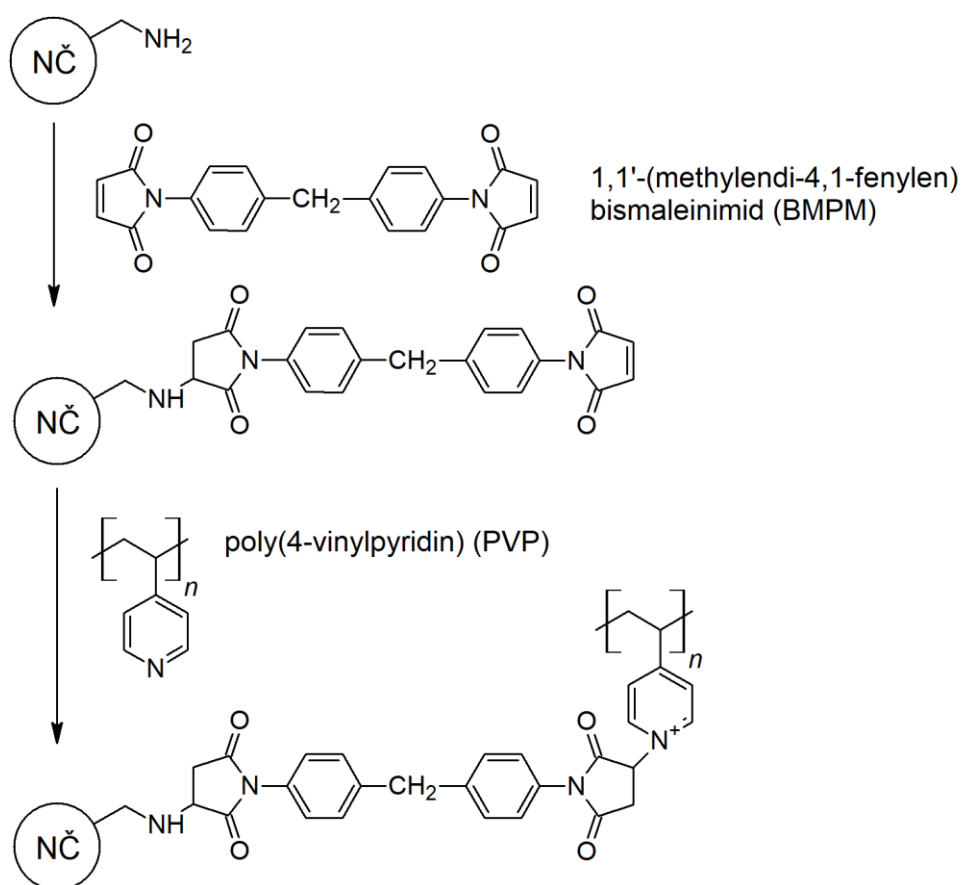
Následné testy na bakteriálních koloniích kultivovaných na agaru (použity byly bakteriální kmeny *Escherichia coli* a *Staphylococcus epidermidis*) ukázaly, že pokud nejsou vlákna před použitím promyta vodou, obsahují nezanedbatelné množství nenavázaného CHX, který se díky difúzi uvolní a způsobí vznik inhibiční zóny (prstenec, ve kterém je díky antibiotiku zamezen růst bakteriální kolonie) okolo vzorku. Pokud je volný CHX odstraněn, vznik inhibiční zóny není pozorován, bakterie v přímém kontaktu se vzorkem jsou však usmrceny CHX navázaným přes cross-linker. Vzorky obsahující 8,1 hm. % navázaného CHX dokázaly za 1 hodinu usmrtit 99,1 % bakterií *E. coli* a až 99,9 % bakterií *S. epidermidis*, které s nimi přišly do kontaktu. Z toho plyne, že CA vlákna s navázaným CHX mají baktericidní účinky, které mohou přetrvávat i dlouho po uvolnění nenavázaného CHX z jejich struktury [34].

Postup použitý v tomto experimentu by teoreticky mělo být možné opakovat i s jinými nanovláknými nesoucími na svém povrchu hydroxylové (-OH) funkční skupiny, včetně křemičitých nanovláken.

2.7.3 Nanoporézní křemičitany schopné pH-responzivního uvolňování CHX

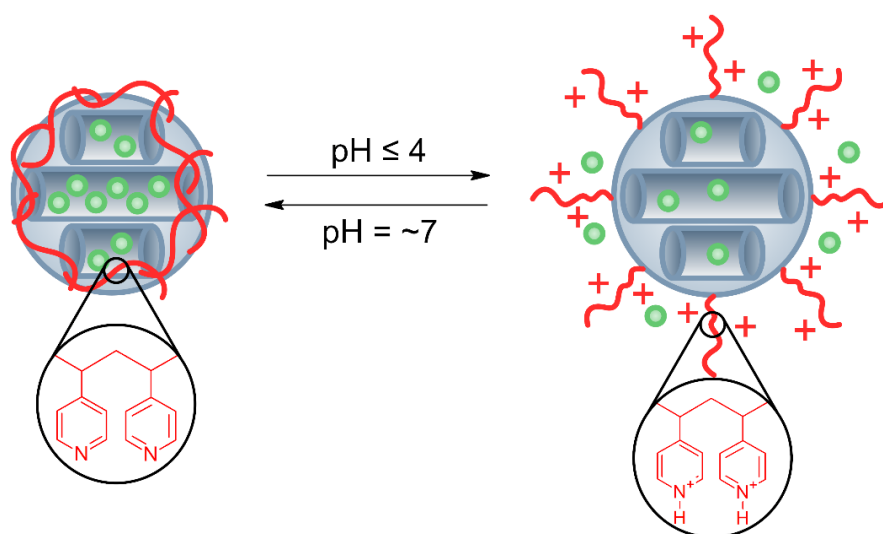
Vědecký tým sestávající z pracovníků dvou různých univerzit v Hannoveru vytvořil pH-responzivní systém uvolňování chlorhexidinu z křemičitých nanoporézních nanočástic pro aplikaci ve stomatologii. Myšlenka spočívá v tom, že bakterie v počínajícím zánětu produkují metabolity, které snižují pH prostředí a pH-responzivní systém by tak uvolnil antibiotikum pouze, je-li to skutečně potřeba [37].

Postupem založeným na proceduře navržené A. Neumannem a jeho spolupracovníky byly syntetizovány nanoporézní křemičité nanočástice s nízkou polydisperzitou se středním průměrem cca 40 nm [38]. Průměr pórů dosahoval velikosti přibližně 3,6 nm a celkový objem pórů byl 1,1 cm³ na 1 g nanočástic. Již ze syntézy na povrchu tyto nanočástice nesly aminopropylové skupiny, na které byl následně navázán bismaleinimidový cross-linker BMPM. Přes druhý konec cross-linkeru byl připojen poly(4-vinylpyridin) (PVP), což je polymer citlivý na pH prostředí.



Obrázek 10: Modifikace nanoporézních částic (NČ) pomocí cross-linkeru BMPM a pH-senzitivního polymeru PVP. Vytvořeno podle zdroje [37].

Takto modifikované nanočástice byly umístěny do vody a do zředěné kyseliny chlorovodíkové, aby byla otestována reakce na různé hodnoty pH. V neutrálním vodném prostředí byl naměřen průměr modifikovaných nanočástic cca 100 nm s lehce zvýšenou polydisperzitou v porovnání s nemodifikovanými částicemi. Ve zředěné kyselině chlorovodíkové (prostředí s $\text{pH} \approx 4$) byl pozorován výrazný nárůst velikosti, průměr částic dosahoval až 250 nm. Tento jev byl připisán napřímení řetězců PVP díky naprotonování jejich pyridinových jednotek (těch, které nebyly vázány cross-linkerem k nanočástici) způsobenému kyselým prostředím a elektrostatickému odpuzování, díky kterému se zároveň snížila míra shlukování (aglomerace) částic. Napřímení polymerních řetězců také znamená otevření pórů v nanočástici, což umožňuje uvolnění léčiva v nich neseného, což byl v tomto případě právě chlorhexidin.



Obrázek 11: Schéma mechanismu pH-responzivního uvolňování CHX z funkcionalizovaných nanočástic. Šedomodře je znázorněna nanoporézní částice, zeleně molekuly CHX a červeně povrchové řetězce PVP. Vytvořeno podle zdroje [37].

Ke vpravení chlorhexidinu do nanoporézních částic posloužil vysoce koncentrovaný roztok diglukonátu chlorhexidinu ($c = 118 \text{ mmol/l}$), který je dobře rozpustný ve vodě. Aby byl umožněn přechod chlorhexidinu z roztoku do pórů, bylo nutné je otevřít snížením pH. K tomu posloužil přídavek kyseliny D-glukonové, pomocí které bylo pH upraveno na hodnotu 3. Částice byly v roztoku ponechány 3 dny. Termogravimetrickou analýzou (TGA) bylo poté určeno, že částice obsahují 24 hm. % CHX. Stejný proces byl vyzkoušen s dichloridem chlorhexidinu, ovšem s daleko méně uspokojivými výsledky (přesné hodnoty autoři neuvádějí).

Při testování kinetiky uvolňování při $\text{pH} = 7,4$ (hodnota přibližně odpovídající pH krve) se během prvních pár hodin uvolnilo cca 220 μg CHX na mg částic (tzv. burst release) a poté se uvolňování téměř zastavilo. V kyselém pH (okolo hodnoty 4,0) bylo skokově uvolněné

počáteční množství zvýšeno na přibližně 260 μg CHX na mg částic, ale celkový průběh uvolňování byl plynulejší a malé množství antibiotika bylo z částic uvolňováno i po několika dnech. Skokově vyšší uvolňování na počátku experimentu bylo připsáno uvolnění molekul CHX, které nebyly zachyceny uvnitř pórů, ale adsorbovány na povrchu částic a polymerního obalu. Před dalšími experimenty proto byly částice důkladně promývány.

Celkově se tedy ukázalo, že uvolňování antibiotika za fyziologického pH je velmi pomalé, ovšem rychlost výrazně narůstá při snížení pH, které může být jedním z důsledků bakteriální infekce. Další experiment prokázal, že pokud se později pH vrátí zpátky na hodnotu okolo 7,4, rychlost uvolňování se opět výrazně sníží, proces je tedy reverzibilní a po odstranění infekce tak není organismus zatěžován zbytečným uvolňování dalšího chlorhexidinu.

Další test se zabýval cytokompatibilitou vytvořeného drug-delivery systému. Bylo zjištěno, že samotné křemičité nanočástice nijak výrazně neomezují metabolickou aktivitu buněk (konkrétně byl testován efekt na gingivální fibroblasty, tedy buňky tvořící tkáň dásní), ovšem nanočástice obsahující chlorhexidin (avšak bez povrchové polymerní úpravy) aktivitu výrazně omezují (což značí poškození buněk) při koncentraci vyšší než 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Částice s pH-senzitivní polymerní úpravou, které navíc byly týden promývány v roztoku pufru o pH 7,4 výrazně nepoškozovaly buňky až do koncentrace 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Při zkrácení doby promývání na 8 hodin byla maximální akceptovatelná koncentrace 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Pro test antibakteriální aktivity byly vybrány kmeny *Streptococcus mutans* (který způsobuje zubní kaz a je acidogenní, tedy jeho metabolismus produkuje kyseliny snižující pH prostředí) a *Staphylococcus aureus* (který často způsobuje infekce po náhradě zubu implantátem, ale oproti *S. mutans* není výrazně acidogenní). Ukázalo se, že nanoporézní částice s polymerní úpravou nesoucí CHX dokážou již při koncentraci 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ téměř dokonale inhibovat bakterie v tvořícím se biofilmu (proti plně vyvrážděnému biofilmu však byly neúčinné, což se dalo očekávat, jelikož vyvinuté biofilmy jsou velmi odolné vůči antiseptickým látkám), snižující jejich metabolickou aktivitu až o 95 %. Po promytí k odstranění CHX adsorbovaného na povrchu sice znatelně klesla účinnost při koncentracích 5–10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, při koncentraci 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a vyšší však zůstala téměř nezměněna a tyto hodnoty jsou stále hluboko pod maximální koncentrací snesitelnou buňkami dásně (viz výše). K inhibici však při všech testech docházelo u obou bakteriálních kmenů, přestože *S. aureus* není acidogenní a pH prostředí při experimentu nekleslo pod hodnotu 6. Toto zjištění naznačuje, že CHX se z nanočástic pravděpodobně do značné míry uvolňuje i když jsou póry „zavřené“ (možným zdrojem jsou i molekuly adsorbované na povrchu polymeru) a strukturu polymerního obalu je tak potřeba zdokonalit. Dalším potenciálním problémem může být skutečnost, že efektivita chlorhexidinu se snižuje s klesajícím pH (viz Mechanismus účinku), což by mohlo vést

k nutnosti použít vyšších koncentrací k dosažení požadovaného účinku. Základní princip tohoto drug-delivery systému je však funkční a použité materiály a metody jsou snadno dostupné, proto je očekáván další výzkum v této oblasti [37].

2.7.4 Imobilizace CHX na zlaté nanočástice

Doposud zmíněné metody imobilizace chlorhexidinu většinou využívaly jako nosič nějakou formu polymeru nebo křemičitany. Zcela jiným materiálem, který rovněž může posloužit jako nosič chlorhexidinu, jsou zlaté nanočástice. Mezinárodní tým amerických, malajských a pákistánských vědců prozkoumal potenciál nanočástic kovů konjugovaných s chlorhexidinem jako možný prostředek pro léčbu keratitidy (zánětu rohovky) způsobené měňavkovitým prvokem rodu *Acanthamoeba* [39]. Tato nemoc bývá spojena s nevhodným používáním kontaktních čoček (nedostatečně častá výměna, špatná hygiena apod.) a může vést až k oslepnutí. Glukonát chlorhexidinu se ukázal být vhodným prostředkem pro léčbu tohoto onemocnění, jeho aplikace běžným způsobem však vyžaduje použití koncentrací potenciálně fatálních i pro buňky, na kterých měňavka parazituje [40]. Vědci se proto obrátili na zlaté nanočástice jako na vhodný nosič léčiva, zvyšující jeho účinnost.

K syntéze zlatých nanočástic byl využit roztok chloridu zlatitého (AuCl_3), který byl smíchán s roztokem chlorhexidinu o stejné koncentraci a umístěn na třepačku. Po 10 minutách byl přidán tetrahydridoboritan sodný (NaBH_4), čímž došlo k vyredukování zlata z chloridu. Reakce se projevila změnou barvy roztoku na sytě červenou, což obvykle značí vznik zlatých nanočástic o průměru několika desítek nm. Roztok byl další 2 hodiny promícháván.

Pomocí UV-viditelné spektrofotometrie (UV-Vis) bylo potvrzeno, že produktem syntézy jsou skutečně nanočástice zlata. Dále byla využita hmotnostní spektrometrie využívající desorpce iniciovanou laserovým paprskem (MALDI-MS) která identifikovala produkt jako komplex chlorhexidinu konjugovaného se zlatem. Pomocí mikroskopie atomových sil (AFM) byla změřena velikost nanočástic tohoto komplexu, která se pohybovala v rozmezí 20 až 100 nm.

K otestování amébicidního účinku byly využity měňavky druhu *Acanthamoeba castellanii*. Několik vzorků 0,5 ml roztoku, z nichž každý obsahoval přibližně 10^6 měňavek, bylo inkubováno s různou koncentrací zlatých nanočástic konjugovaných s CHX (koncentrace se pohybovala od $1 \mu\text{M}$ až po $20 \mu\text{M}$). Pro porovnání byla jedna kultura inkubována také s čistým nekonjugovaným chlorhexidinem. Poslední vzorek byl kontrolní a neobsahoval žádné nanočástice ani antibiotikum. Inkubace probíhala při teplotě 37°C (přibližně teplota lidského těla) po dobu 48 hodin. Množství měňavek v jednotlivých vzorcích bylo poté určeno pomocí hemocytometru.

Podobná sada testů zopakována s kulturou lidských mozkových mikrovaskulárních endotelních buněk (HBMEC), naočkovaných měňavkami stejného druhu jako v předchozím testu. Inkubace tentokrát probíhala po dobu 18 hodin při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % oxidu uhličitého. Negativní kontrolní vzorek obsahoval pouze kulturu HBMEC, kontrolní vzorek představující 100% buněčnou smrt byl vytvořen pomocí přípravku Triton X-100, kterým byla provedena buněčná lýze. Cílem tohoto testu bylo porovnat, jak velký podíl buněčné populace měňavky zlikvidují svými cytotoxickými účinky bez aplikace antibiotika, při aplikaci nekonjugovaného CHX a při aplikaci zlatých NČ s konjugovaným CHX.

Testy prokázaly, že zlaté částice nesoucí CHX mají poměrně silné amébocidní účinky. Koncentrace 5 μM stačila k inhibici růstu a množení měňavek a značně zredukovala jejich množství – po 48hodinové inkubaci se ve vzorku nacházelo již pouze 40 % původního množství. Nekonjugovaný chlorhexidin o stejné koncentraci neměl tento inhibiční účinek a po 48 hodinách ve vzorku přežilo celých 60 % původního množství měňavek, o 20 % více než u zlatých nanočástic konjugovaných s CHX. Koncentrace 7,5 μM nanočástic stačila ke snížení populace měňavek na pouhých 10 %, zatímco samotný CHX o stejné koncentraci ji zredukoval pouze na 25 %. Ukázalo se také, že při aplikaci nanočástic s CHX přežije po 18 hodinách okolo 80 % buněk vystavených měňavkám, ale pouze 40 % buněk ošetřených samotným chlorhexidinem (pro porovnání: bez jakéhokoliv ošetření přežilo po stejné době pouze 10 % buněk).

Na základě výsledků testů lze říct, že amébocidní účinky chlorhexidinu stoupnou, pokud je konjugovaný se zlatými nanočásticemi. To vede k účinnějšímu potlačení populace měňavek, což umožňuje přežít daleko většímu podílu hostitelských buněk. Zlaté nanočástice jsou v moderní době slibným kandidátem pro využití jako nosiče léčiv, což je dané jejich nízkou cytotoxicitou a schopností zvýšit účinnost jimi nesených látek, ať již díky jejich přesnějšímu zacílení, nebo jejich chemické stabilizaci, která jim umožní zůstat déle aktivní.

2.7.5 Využití želatiny k imobilizaci CHG

Jinou možností k vytvoření systému kontrolovaného uvolňování chlorhexidinu je využití želatiny, kterou tvoří zejména hydrolyzovaný kolagen (fibrilární bílkovina). Touto metodou se zabýval jihoamerický tým pod vedením N. Ricarda a F. G. de Souzy, složený ze zástupců tří brazilských univerzit. Imobilizace diglukonátu chlorhexidinu na želatinu byl první krok v návrhu drug-release systému založeného na hydrofobním nosiči, který by mohl umožnit pomalejší a dlouhodobější uvolňování chlorhexidinu než běžně využívané hydrofilní nosiče. Systém by mohl usnadnit léčbu periodontitidy, pokročilého zánětu dásní bakteriálního původu, který může vést až ke ztrátě zubů a ústupu gingivální (dásňové) tkáně. Proti

podobným zánětlivým onemocněním se chlorhexidin již řadu let využívá, forma jeho aplikace a zajištění dlouhodobého postupného uvolňování však stále zůstávají problematickými, obzvláště v ústní dutině, kde je antimikrobiotikum neustále vystaveno působení slin a díky polykacímu reflexu, konzumaci potravin a mluvení může rychle docházet k rapidnímu poklesu jeho koncentrace [41].

Na trhu již existují prostředky využívající želatinové hmoty k imobilizaci chlorhexidinu a jeho lokálnímu uvolňování. Jedním z nich je PerioChip®, biodegradabilní přípravek vkládaný na postižené místo, který obsahuje 2,5 mg chlorhexidinu zakomponovaného do želatinového nosiče. Tento přípravek však není bez svých nedostatků. Jedním z nich je skutečnost, že okolo 40 % neseného chlorhexidinu, který není pevněji navázán v želatinové hmotě, je uvolněno během prvních 48 hodin po aplikaci (tzv. burst release, tento jev byl již zmíněn v kapitole 2.7.2) [42]. Potenciál ke zlepšení této technologie nabízejí polyestery, které v organismu podléhají pomalé biodegradaci, vykazují vysokou permeabilitu pro mnoho léčiv a nízkou toxicitu. Proběhlo již několik pokusů k zapouzdření chlorhexidinu do podobných polymerních nosičů s využitím emulze, problém však vyvstává s nekompatibilitou velmi hydrofilního chlorhexidinu se spíše hydrofobními polyestery [43] [44]. Popisovaná metoda brazilského týmu navrhuje využít želatinu k imobilizaci chlorhexidinu a získaný želatinovo-chlorhexidinový prášek zakomponovat do jiného polymerního (např. polyesterového) nosiče prostým vmícháním do taveniny (tzv. *melt blending* či *melt mixing*). To by představovalo poměrně levný a jednoduchý způsob výroby systému schopného pomalého uvolňování chlorhexidinu po delší časový interval než při využití samotné želatiny.

K testování byly připraveny tři vzorky s různým obsahem CHG. Základ každého z nich tvořilo 10 g želatinového prášku, který byl rozpuštěn ve vodě a doplněn na 50 ml. Do prvního vzorku bylo přidáno 15 ml roztoku 20% CHG (přibližně odpovídá 3 gramům čistého CHX a 23,1 obj. % vzniklého roztoku), do druhého bylo přidáno 25 ml roztoku CHG (5 g CHX, 33,3 obj. %) a do třetího 50 ml roztoku CHG (10 g CHX, 50 obj. %). Roztoky byly umístěny na 24 hodin do lednice, poté prošly lázní s tekutým dusíkem, a nakonec byly lyofilizovány k odstranění přebytečné vody (doba lyofilizace závisela na obsahu CHX ve vzorku – 30 h pro vzorek s 3 gramy CHX, 24 h pro vzorek s 5 g CHX a 18 h pro vzorek s 10 g CHX). Výsledný materiál byl rozdrcen a prosíván sítím o průměru oka 100 µm, čímž byl získán jemný prášek želatiny s imobilizovaným CHX.

Pomocí TGA bylo následně zjištěno, že želatinový prášek s imobilizovaným CHX je stabilní až do teploty přibližně 130 °C. Tato informace je důležitá pro případnou inkorporaci do jiného polymeru pomocí *melt blending* metody (pro porovnání, čistý CHX je stabilní do teploty cca 160 °C). Pomocí FTIR (Infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací)

bylo také dokázáno, že vzorky skutečně obsahují navázaný chlorhexidin pomocí charakteristické transmitance N-H vazby.

Následně byly se všemi třemi vzorky provedeny antibakteriální testy na bakteriálních koloniích na agaru. K testům byly vybrány bakterie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a *Porphyromonas gingivalis*, které patří mezi nejčastější původce periodontických onemocnění. Všechny tři vzorky způsobily formaci inhibiční zóny, což značí antibakteriální aktivitu, přičemž účinnější byly přípravky proti bakterii *P. gingivalis*. Experiment dokázal, že želatinu lze použít jako prostředek schopný imobilizovat a následně uvolňovat CHX a lze očekávat další výzkum, který se bude zabývat zakomponováním vytvořeného želatinového prášku do jiného polymeru a studiem kinetiky uvolňování CHX z takto vytvořeného systému.

Vyzkoušená imobilizace CHX na želatinu je poměrně levná a snadno proveditelná metoda, která navíc nevyžaduje využití organických rozpouštědel, jejichž rezidua by se mohly z materiálu uvolňovat a působit nepříznivě na organismus.

Poznámka:

Informace uvedené v této kapitole a jejích podkapitolách představují pouze průřez současným výzkumem, který se zabývá imobilizací chlorhexidinu na různé nanomateriálové nosiče a využitím takto funkcionalizovaných materiálů k různým medicínským aplikacím. Vybírány byly přednostně metody navzájem se co nejvíce lišící povahou nosiče nebo způsobem imobilizace CHX a bylo bráno v potaz i to, zda by je bylo možné modifikovat k využití křemičitých nanovláken nebo jiných křemičitých materiálů jako nosiče.

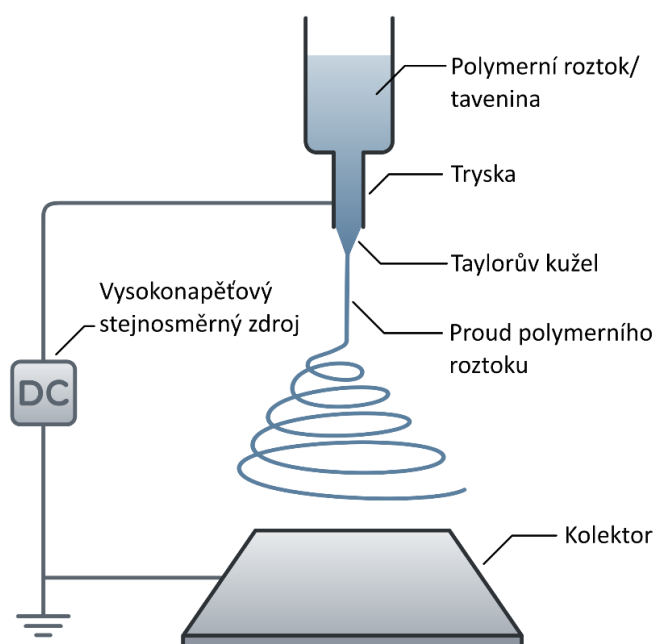
3 Křemičitá nanovlákna

Křemičitá nanovlákna (anglicky *silica nanofibers*, kde termín *silica* obecně označuje chemické struktury a minerály založené na oxidu křemičitém (SiO_2) s minimálním obsahem vody [45]) jsou jednodimenzionální nanostruktury (mají jeden makroskopický rozměr, ostatní jsou v řádu nanometrů), které mají širokou škálu potenciálních využití, zejména v medicíně a tkáňovém inženýrství. K tomu je předurčuje jejich biokompatibilita a schopnost degradace v organismu bez vzniku zdraví škodlivých produktů [46]. Tyto výhodné vlastnosti také vedly k výběru křemičitých nanovláken jako vhodného nosiče chlorhexidinu pro tuto práci.

3.1 Syntéza křemičitých nanovláken

3.1.1 Princip elektrostatického zvlákňování

Nejběžnější metodou syntézy křemičitých nanovláken je tzv. elektrostatické zvlákňování (v angličtině známé jako *electrospinning*). Jedná se o metodu, při které vznikají vlákna z proudu polymerního roztoku usměrňovaného elektrickým polem. Jako výchozí materiál běžně slouží roztok nebo tavenina polymeru. Princip elektrostatického zvlákňování je poměrně jednoduchý, přesto se jedná o metodu umožňující vyprodukovat velmi jemná vlákna (mikro- nebo nanovlákna) s velkým specifickým povrchem a různou velikostí pórů [46] [47].



Obrázek 12: Schéma typické aparatury pro elektrostatické zvlákňování. Vytvořeno na základě zdroje [48].

Roztok nebo tavenina zvlákňovaného polymeru je vytlačován(a) skrze trysku, na jejímž konci se vlivem elektrického pole z kapaliny vytváří tzv. Taylorův kužel. Při překročení určitého (prahového, nebo také kritického) napětí z jeho špičky vytryskne proud nabitého materiálu, který je dále elektrickým polem usměrňován na kolektor. Během letu prostorem polymer tuhne a elektrický náboj se hromadí na jeho povrchu. V drobných záhybech a nestabilitách proudu materiálu je poté vlivem elektrostatického odpuzování iniciován proces prodloužení neboli „bičování“ (anglicky *whipping*), při kterém dochází k prodlužování a ztenčování vznikajícího vlákna, které je nakonec zachyceno na uzemněný kolektor [49].

V praxi lze zařízení na elektrostatické zvlákňování realizovat různými způsoby. Taylorův kužel nemusí vznikat pouze na vrcholu kapiláry/trysky, ale i z tenké vrstvy roztoku polymeru. Toho využívá zařízení Nanospider, jehož novější generace využívá pohyblivé hlavičky, natírající polymerním roztokem kovovou strunu, která slouží jako jedna z elektrod. Z vrstvy polymeru na struně vznikají mnohačetná ohniska Taylorových kuželů a vznikající vlákna jsou zachytávána na podklad (např. vrstvu spunbondové textilie nebo folii), která prochází zařízením v prostoru mezi elektrodou a protielektrodou a postupně se pohybuje [50]. Zařízení Nanospider využívá k syntéze křemičitých nanovláken i Technická univerzita v Liberci.

3.1.2 Parametry zvlákňovacího procesu a jejich vliv na vyprodukovaný materiál

Morfologii vznikajících nanovláken či to, zda elektrostatické zvlákňování vůbec úspěšně započne lze ovlivnit celou řadou parametrů. Jedním z nejdůležitějších faktorů je viskozita roztoku. Roztok o příliš nízké viskozitě není schopný dostatečné soudržnosti (kohezní síly jsou příliš malé) a proud polymerního roztoku se tak rozpadá na kapky – místo zvlákňování dochází k takzvanému electro sprayingu, jehož produktem jsou částice namísto vláken. Naproti tomu příliš vysoká viskozita vede ke vzniku tlustších vláken (někdy až v řádu mikrometrů) a zvyšuje riziko vzniku defektů. Extrémně vysoká viskozita zcela zabrání vzniku Taylorových kuželů a proces zvlákňování tak nemůže ani začít. Viskozitu lze ovlivnit koncentrací roztoku (tedy poměrem zvlákňovaného polymeru a rozpouštědla), přidávkem tzv. pomocného (*auxiliary*) polymeru, např. PVA [51], a také závisí na teplotě, při které zvlákňování probíhá. Roli hraje také povrchové napětí roztoku, které nesmí být příliš vysoké, což by opět bránilo vzniku Taylorových kuželů. Pro zvlákňování jsou obecně vhodnější delší molekuly (s vyšší molekulovou hmotností), nesmí být však příliš rozvětvené [52].

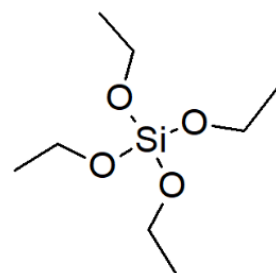
Elektrostatická povaha procesu je příčinou toho, že dalším důležitým parametrem je vodivost roztoku. Vodivost je primárně ovlivněna typem zvlákňovaného polymeru a použitého rozpouštědla, lze ji však také ovlivnit přidávkem iontů soli. Vyšší hodnoty vodivosti napomáhají ke vzniku homogenních vláken a omezují riziko vzniku defektů [53].

Použité rozpouštědlo se nesmí vypařovat příliš rychle, záleží tedy na jeho teplotě varu. K vypařování dochází během dloužení vláken při procesu „bičování“ a pokud je příliš rychlé, vznikají ve vláknech póry a trhliny [52].

Kromě fyzikálně-chemických parametrů použitých látek záleží také na parametrech samotného procesu, které je možno nastavit na zvlákňovacím zařízení. Napětí mezi elektrodami musí být vyšší než prahové napětí, aby docházelo ke vzniku Taylorových kuželů, ale nesmí být příliš vysoké, protože proces by poté přecházel v electro spraying. Používané napětí obvykle dosahuje řádově desítek kV. Lze nastavit také vzdálenost elektrod a rychlost navíjení podkladu, která určuje tloušťku vznikajícího materiálu a také rychlost jeho produkce. Důležitá je také teplota ve zvlákňovací komoře a vlhkost vzduchu, která může ovlivnit tloušťku vláken a jejich stejnorodost a vznik defektů [53]. Zařízení pro elektrostatické zvlákňování má obvykle vlastní klimatizační jednotku, která umožňuje regulovat parametry vzduchu uvnitř zvlákňovací komory a udržovat je stabilní po celou dobu zvlákňování. U zařízení Nanospider lze také regulovat rychlost pojezdu hlavice, která natírá strunu roztokem polymeru a hlavice mohou být osazeny průvlaky o různém průměru [50]. Tyto dva faktory ovlivňují množství polymerního roztoku, které bude při každém přejezdu hlavice nanášeno na strunu. Množství by mělo být takové, aby nedošlo k jeho spotřebování výrazně dříve, než dojde k dalšímu přejezdu hlavice, ale nemělo by být příliš velké, protože poté hrozí riziko vzniku kapek, které znehodnotí výslednou nanovláknennou vrstvu.

3.1.3 Příprava solu pro syntézu křemičitých nanovláken

Jako výchozí materiál pro elektrostatické zvlákňování slouží při syntéze křemičitých nanovláken sol (koloidní suspenze) připravený metodou sol-gel. Běžně využívaným postupem přípravy solu je řízená hydrolýza tetraethylorthosilikátu (TEOS) a jeho následná polykondenzace v roztoku ethanolu nebo izopropylalkoholu (sloužícího zde jako rozpouštědlo) za katalýzy kyselinou chlorovodíkovou. Pro zlepšení vodivosti, která je klíčovým parametrem při elektrostatickém zvlákňování, může být následně do solu přidán cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) spolu s hydrogenperoxosíranem draselným (MPS), sloužícím jako oxidační činidlo. Poté je sol zahříván na 60 °C a míchán po dobu 60 minut. Jak již bylo zmíněno, někdy je také před samotným zvlákňováním do solu přidáván takzvaný pomocný (auxiliary) polymer, například polyvinylalkohol (PVA), který ovlivní mimo jiné viskozitu roztoku ke zvlákňování.



Obrázek 13: Struktura tetraethylorthosilikátu.

Výše uvedené informace pocházejí z patentovaného postupu, kterým jsou připravována křemičitá nanovlákná na Technické univerzitě v Liberci [51] [54].

3.2 Vlastnosti křemičitých nanovláken

Křemičitá nanovlákná jsou jedním z mála známých materiálů, které splňují vysoce specifické požadavky pro možné využití v biomedicíně. Mezi ně patří vysoká porozita a velký specifický povrch umožňující imobilizaci různých typů biomolekul, včetně antibiotik a jiných léčiv, enzymů, peptidů a jiných. Křemičitá nanovlákná je možné připravit bez využití stabilizujících aditiv, která by se z nich mohla uvolňovat a představovat zdravotní riziko pro organismus.

Pokud je přeci jen potřeba dosáhnout zvýšené stability nanovláken (např. ke zpomalení jejich biodegradace, která přímo ovlivňuje rychlost uvolňování neseného léčiva), stabilizují se nanovlákná ještě před jejich funkcionalizací působením vysoké teploty (např. vystavením teplotě 180 °C po dobu dvou hodin, pokud je potřeba dosáhnout vyšší stability, je však možné využít i vyšší teploty, až okolo 500 °C [55]). Zvýšená teplota způsobí uvolnění zbytkových reziduí látek použitých při syntéze (např. izopropylalkoholu), odpaření vody, která je nasorbovaná na povrchu vláken, ale také vede k odstranění vody vázané v podobě hydroxylových skupin na povrchu nanovláken [54] [56]. Při teplotách okolo 800 °C dochází k téměř dokonalému odstranění -OH skupin a výsledný materiál poté připomíná křemičitá skelná vlákna. Při takto vysokých teplotách také může docházet k částečné karbonizaci nanovláken, čehož lze využít k přípravě hybridních uhlíkovo-křemičitých nanovláken s hladkou morfologií [57].

Křemičitá nanovlákná na svém povrchu nesou vazby Si-OH, která umožňují imobilizaci biomolekul a jejich pozdější uvolňování v prostředí tělních tekutin. Primární metody imobilizace spočívají ve vytvoření kovalentních vazeb mezi biomolekulou a povrchem nanovláken, lze však také využít nekovalentních vazeb nebo adsorpce.

Schopnost postupného uvolňování je klíčový faktor ve zvyšování efektivity léčiv a omezení rizika vedlejších účinků, způsobených vystavením organismu příliš velké dávce léčiva v krátkém časovém intervalu. Při vystavení nanovláken prostředí tělních tekutin dochází nejprve k uvolnění látek navázaných nekovalentními vazbami či naadsorbovaných na povrchu, později k rozrušení kovalentních vazeb a tím k uvolnění zbytku biomolekul.

Zároveň dochází k postupné degradaci (rozpuštění) nanovláken a jejich vstřebávání organismem. Produktem degradace je oxid křemičitý (SiO₂). Tato látka může v určitých formách představovat zdravotní riziko, např. dlouhodobé vdechování jemného křemičitého prachu

může vést k chronickému zánětlivému onemocnění plic – silikóze – či dokonce k rakovině plic. Křemičité materiály se však již řadu let využívají v medicíně např. k přípravě zubních výplní nebo jako součást kostních náhrad a při těchto aplikacích jsou považovány za zdravotně nezávadné. Velmi tedy záleží na konkrétní formě látky, na místě a době působení, na její koncentraci a podobně. Při využití křemičitých nanomateriálů v biomedicíně hraje v tomto ohledu velkou roli jejich biopersistence, tedy doba, po kterou v organismu setrvávají, než dojde k jejich kompletní degradaci. Podle Hesterbergovy a Hartovy práce zabývající se zdravotními riziky křemičitých látek lze tyto látky považovat za zdravotně nezávadné, pokud je jejich poločas rozkladu v prostředí odpovídajícímu plicní tekutině při pH 7,4 kratší než 20 dnů a křemičitý materiál by měl v organismu setrávat méně než 40 dnů [58]. Tato studie však nebyla primárně zaměřena na křemičité nanomateriály, jejichž mechanismy degradace a její kinetiku je ještě třeba důkladně prozkoumat.

3.3 Biodegradace křemičitých nanovláken a její testování

Již bylo zmíněno, že důležitou vlastností křemičitých nanovláken, která je předurčuje k využití v biomedicíně, je jejich schopnost biodegradace v organismu. Vědecká studie Institutu pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace Technické univerzity v Liberci, jejíž výsledky byly publikovány na konferenci NART (Nanofibers, Applications and Related Technologies) v roce 2017 se zabývala problematikou biodegradace křemičitých nanovláken v simulovaném prostředí tělních tekutin [56]. K testování rychlosti biodegradace bylo využito dvou metod – statické a dynamické. Testována byla křemičitá nanovláknina připravena elektrostatickým zvlákněním solů, připraveného s využitím tetraethylorthosilikátu, izopropylalkoholu a kyseliny chlorovodíkové bez přídavku pomocného polymeru. Připravená nanovláknina měla průměr převážně v rozmezí 150-400 nm (s občasným výskytem tlustších mikrovláken, která pozitivně ovlivňovala mechanické vlastnosti materiálu) a specifický povrch 9,9 m²/g. Část vzorků připravených nanovláken byla tepelně stabilizována při teplotě 180 °C po dobu dvou hodin, část byla po stejnou dobu stabilizována při teplotě 550 °C.

Při statickém testu byly vzorky nanovláken umístěny do polyethylenových láhví, které obsahovaly roztok simulující prostředí tělních tekutin, předehřátý na teplotu 37 °C. Láhve se vzorky byly umístěny do vodní lázně rovněž o teplotě 37 °C a pomocí třepačky byly udržovány během experimentu v mírném pohybu. V pravidelných intervalech byly z láhví odebrány vzorky 10 ml roztoku a filtrovány přes nylonový filtr s póry o průměru 450 nm. K určení množství křemičitého materiálu ve vzorcích byla používána emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES), pomocí které byl stanovován obsah křemíku.

K dynamickému testu byla využita speciálně připravená aparatura sestávající z průtokového článku (*flow cell*), ve kterém byly umístěny vzorky nanovláken a pomocí peristaltické pumpy jím byl proháněn roztok simulující tělní tekutinu. Aparatura byla temperována na 37 °C ve vodní lázni a ke stanovení obsahu křemíku v tekutině která prošla průtokovým článkem byla opět využita metoda ICP-AES.

Testy byly prováděny s několika typy roztoků, které simulovaly různé tělní tekutiny, s fyziologickým roztokem (0,9% vodný roztok NaCl) a kontrolní test byl proveden v destilované vodě. Výsledky byly prezentovány v tabulce udávající poločas rozkladu $t_{1/2}$ (doba, za kterou je rozpuštěna polovina hmotnosti materiálu) jednotlivých vzorků a rychlost rozpouštění r v dané tekutině v ng na cm² za hodinu. Data z originální tabulky, uspořádaná a přeložená do češtiny, jsou uvedena níže:

Teplota stabilizace	180 °C				550 °C	
Metoda	Statická		Dynamická		Statická	
Simulovaná tekutina	$t_{1/2}$ [dny]	r [ng/(cm ² · hod)]	$t_{1/2}$ [dny]	r [ng/(cm ² · hod)]	$t_{1/2}$ [dny]	r [ng/(cm ² · hod)]
Krevní plazma	0,24	1054	0,19	1381	1,3	182
Tekutina tlustého střeva	0,30	862	-	-	1,8	134
Extracelulární plicní tekutina (pH = 7,4)	0,26	918	0,10	2250	0,88	269
Intracelulární plicní tekutina (pH = 4,5)	78	3,02	-	-	313	0,765
Pot (pH = 4,5)	8,8	29,2	-	-	207	1,16
Pot (pH = 5,4)	7,4	35,4	-	-	351	0,676
Moč	5,0	52,5	-	-	12	21,5
Fyziologický roztok	1,7	175	-	-	42	5,75
Destilovaná voda	295	0,799	-	-	778	0,303

Tabulka 1: Výsledky testů biodegradability křemičitých nanovláken. Data pocházejí ze zdroje [56].

V kapitole 3.2 již bylo zmíněno, že poločas degradace v plicní tekutině při pH 7,4 by neměl přesáhnout 20 dnů, aby se dal křemičitý materiál považovat za zdravotně nezávadný [58]. Z tabulky výše je patrné, že oba typy vzorků křemičitých nanovláken se rozkládají daleko rychleji, za méně než jeden den, lze tedy říct, že jsou pro lidský organismus bezpečné.

Testy prokázaly, že křemičitá nanovlákná jsou schopná degradace v celé řadě tělních tekutin, avšak rychlost degradace silně závisí na konkrétním prostředí. Křemičitá nanovlákná stabilizovaná při 550 °C vykazují výrazně pomalejší degradaci, než ta stabilizovaná při 180 °C. Rychlost degradace roste s rostoucí iontovou silou prostředí, se zvyšujícím se obsahem organické hmoty a se zvyšujícím se pH. Produktem degradace je oxid křemičitý (SiO_2), jehož zvyšující se obsah v prostředí zpomaluje rychlost další degradace nanovláken. Proces degradace bývá někdy doprovázen vysrážením koloidních částic SiO_2 , nebo produktů jeho chemických reakcí s jinými látkami v prostředí.

Ukázalo se, že statická metoda testování je snazší na realizaci, rychlejší a umožňuje paralelní testování několika vzorků najednou. Dynamická metoda vyžaduje složitější aparaturu a k její prvotní optimalizaci bylo potřeba využít data ze statické metody, poskytuje však realističtější výsledky. Dostatečně silný tok tělní tekutiny totiž dokáže omezit efekt nasycení částicemi oxidu křemičitého a jejich vysrážení. Tyto efekty způsobují u statické metody postupné zpomalování degradace vláken, avšak při použití v organismu by pravděpodobně k toku tělní tekutiny docházelo, zejména při působení např. v krevním řečišti.

Z výzkumu je také patrné, že je potřeba pečlivě zvážit, k jakému účelu budou křemičitá nanovlákná využita a v jaké části lidského těla budou působit. Některé aplikace vyžadují rychlé rozpuštění během několika hodin, u jiných je žádoucí pomalá degradace po dobu několika týdnů. Způsob tepelné stabilizace dokáže rychlost degradace ovlivnit, přesto však existují prostředí, ve kterých bez ohledu na stabilizaci rozpad probíhá relativně rychle, nebo naopak poměrně pomalu, a ne vždy tak může být možné tento materiál využít s ohledem na požadovanou rychlost degradace a uvolňování nesené látky.

3.3 Využití křemičitých nanovláken

3.3.1 Drug-delivery systémy

Díky svým unikátním vlastnostem mají křemičitá nanovlákná (ale i jiné nanostruktury s analogickou chemickou strukturou, např. křemičité nanočástice) velký potenciál k využití jako nosiče v tzv. drug delivery systémech. Tento pojem označuje látky, postupy či zařízení umožňující cílené vpravování léčivých látek do těla a kontrolu nad dobou, intenzitou a místem jejich uvolňování. Současný výzkum přisuzuje těmto systémům velký význam, neboť umožňují, díky lepšímu zacílení, využití menšího množství léčiva k dosažení stejného účinku, zajišťují dlouhodobý a postupný účinek a omezují riziko nechtěných reakcí organismu způsobených vystavením příliš velkým dávkám léčiva, nebo jeho působením na jiné než zamýšlené biologické systémy a tkáně. Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, křemičité

nanostруктуры umožňují postupné uvolňování biomolekul v organismu, kterým jsou zároveň vstřebávány. Díky tomu nevystává problém s jejich odstraněním z organismu po uvolnění nesené látky. S drug-delivery systémy se počítá jako s vhodnými nástroji na léčbu např. cukrovky nebo nádorových onemocnění [59]. Je známo, že současné metody nádorové chemoterapie jsou pro organismus velice zatěžující, protože neumožňují přesné zacílení cytostatika, které tak působí na všechny typy buněk, nejen ty nádorové. Přesně cílený drug-delivery systém by umožnil dopravit cytostatika přímo do nádorových buněk, aniž by nějak ovlivnil ty zdravé, a tak odstranil mnoho nežádoucích následků chemoterapie [60].

3.3.2 Biologické scaffoldy pro tkáňové inženýrství

Další možnou aplikací křemičitých nanovláken, která je předmětem moderní vědy, jsou tzv. biologické scaffoldy. Jedná se o podpůrné struktury umožňující na svém povrchu růst a vývoj buněk. Tyto materiály jsou klíčové pro tkáňové inženýrství, bouřlivě se rozvíjející obor biomedicíny, který se v současnosti zabývá zejména opravami a náhradou tkání, ať již se jedná o kosti, chrupavky, svalové tkáně a jiné. Do budoucna se počítá s tím, že tkáňové inženýrství umožní dokonce nahradit celé tělní orgány nebo opravit poškozené nervové spoje a umožnit tím pohyb osobám ochrnutým např. v důsledku poškození míchy [61]. Pro správný vývoj uměle vytvořené tkáně je potřeba vhodného „lešení“, které musí být schopné vytvářet trojrozměrnou podpůrnou síť a zároveň simulovat prostředí podobné mezibuněčnému prostoru, což umožní buňkám správně provádět všechny biologické procesy potřebné k jejich vývoji, růstu a dělení. Zároveň by tyto scaffoldy měly být biodegradabilní, aby se předešlo nutnosti je později vyjmout chirurgicky a tím znovu narušit nově vytvořenou tkáň. Křemičitá nanovlákná (a některé jiné nanomateriály) tyto vlastnosti splňují podstatně lépe než většina běžných biokompatibilních materiálů a hovoří se o nich jako o vhodných scaffoldech pro regeneraci tvrdých (např. kostních) i měkkých tkání [62]. U běžných materiálů se vědci obvykle potýkají s problémy bránícími jejich efektivnímu využití. Např. v biomedicině široce používaná kyselina polylaktónová (PLA) je sice biodegradabilní, ale hydrofobní. Modifikace zvyšující hydrofilitu tohoto materiálu mají zase nepříznivé účinky na jeho pevnost [63]. Proto se v poslední době pozornost soustředí spíše na biokompozity se základem z nanomateriálů, jako vhodný základ biologických scaffoldů, a křemičitá nanovlákná jsou jedním z horkých kandidátů pro toto využití.

3.3.3 Krycí materiály pro léčbu chronických a jiných ran

Křemičitá nanovlákná s imobilizovanými antibiotiky jsou také ideálním krycím materiálem na chronické rány a je schopný podporovat jejich hojení. Nanovláknenný materiál dokáže přesně kopírovat povrch rány, aniž by vytvářel bubliny a uvolňované antibiotikum

dlouhodobě působí na bakteriální mikroflóru v ráně. Koncentrace antibiotika v ráně zůstává nízká, ale působí dlouhodobě. Samotná nanovlákná jsou schopna se přímo v ráně rozpouštět [51].

Aplikace není omezena na běžné chronické rány (např. bércové vředy), ale může usnadnit proces hojení jakéhokoliv typu ran. Konkrétně křemičitá nanovlákná s chlorhexidinem, které jsou předmětem této práce, by mohla nalézt uplatnění např. ve stomatologii k ošetření ran po extrakci (vytržení) zubů. Ústní dutina je místo se zvýšeným výskytem bakterií, které se zde živí zbytky jídla, a kromě zubního kazu mohou způsobit zánětlivá (někdy i velmi vážná) onemocnění. Byla dokonce odhalena možná spojitost mezi těmito infekcemi a systémovými onemocněními, jako jsou např. různá kardiovaskulární onemocnění [64]. Rány po stomatologických zákrocích je proto potřeba udržovat sterilní, aby se předešlo možným komplikacím. Křemičitá nanovlákná postupně uvolňující chlorhexidin by mohla být pro tento účel ideální.

4 Závěr

Rozsáhlá rešerše týkající se chlorhexidinu, jeho vlastností, využití a možností imobilizace na různé nosiče ukázala široké spektrum možností, jak přistoupit k přípravě systémů kontrolované dopravy a uvolňování léčiv (drug delivery/release systems). Zvláštní pozornost byla věnována využití křemičitých nanovláken (popř. jiných nanokřemičitých nosičů), se kterými má Technická univerzita v Liberci již zkušenosti, a dokonce na její půdě vznikl patentovaný postup jejich výroby. Proto byly navrženy tři možné způsoby imobilizace CHX na křemičité nosiče:

První způsob využívá nekovalentní vazbu chlorhexidinu do kavity cyklodextrinů. Cyklodextriny je možné připojit na křemičitá nanovláčka přes APTES (3-aminopropyltriethoxysilan), který je nejprve zakomponován do povrchové struktury nanovláken a následně je přes jeho konec nesoucí aminoskupinu pomocí substituce nukleofilní napojen cyklodextrin s tosylátovou funkční skupinou. Více podrobností je uvedeno na konci kapitoly 2.7.1.

Druhý způsob využívá kovalentních vazeb k připojení chlorhexidinu na povrch nanovláken přes cross-linker. Tím je v tomto případě organokovová sloučenina triethanolamintitanát (TTE). Ten dokáže reagovat s -OH skupinou na povrchu křemičitých nanovláken a s -NH₂ skupinou přítomnou v chlorhexidinu a vytvořit mezi nimi spojku s kovalentními vazbami. Výsledný materiál má potenciál dlouhodobého kontaktního antibakteriálního účinku. Více podrobností je uvedeno v kapitole 2.7.2.

Třetí způsob využívá nanoporézního křemičitého materiálu, do jehož pórů jsou molekuly CHX „nachytány“ a následně jsou ústí otvorů zapečetěna pomocí polyvinylpyridinu (PVP) navázaného přes cross-linker BMPM. V kyselém pH dojde k naprotonování pyridinových skupin v PVP, což vlivem elektrostatického odpuzování způsobí otevření pórů a uvolnění CHX. Materiál lze využít k přípravě pH-responzivního drug release systému, který uvolní chlorhexidin v reakci na snížení pH prostředí, způsobenému metabolickými produkty acidogenních bakterií. Tímto způsobem imobilizace se zabývá kapitola 2.7.3.

Prozkoumány byly i jiné způsoby imobilizace, využívající jako nosiče jiné polymery, zlaté nanočástice nebo želatinu. V diplomové práci navazující na tuto bakalářskou práci budou navržené způsoby imobilizace realizovány v laboratorních podmínkách a antibakteriální aktivita vyprodukovaných materiálů (včetně kinetiky uvolňování) bude otestována a vzájemně porovnána. Tyto materiály mají řadu potenciálních využití v medicíně, kde mohou sloužit k léčbě zánětlivých onemocnění bakteriálního původu či usnadnit hojení komplikovaných ran a jejich výzkum může vyústit k novým možnostem jejich aplikace nebo ke zlepšení těch již navržených či vyvíjených.

Reference

- [1] EMING, S. A., T. KRIEG a J. M. DAVIDSON, 2007. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. **127**(3), 514–525 [cit. 04.11.2019]. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1038/sj.jid.5700701
- [2] LISTER, J., 1967. Antiseptic principle in the practice of surgery. *BMJ* [online]. **2**(5543), 9–12. ISSN 0959-8138, 1468-5833 [cit. 04.11.2019]. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.2.5543.9
- [3] PITT, D. a J.-M. AUBIN, 2012. Joseph Lister: father of modern surgery. *Canadian Journal of Surgery* [online]. **55**(5), E8–E9 [cit. 04.11.2019]. ISSN 0008428X. Dostupné z: doi:10.1503/cjs.007112
- [4] History of Chlorhexidine. *Chlorhexidine Facts* [online]. The Chlorhexidine Partners Network, 2012 [cit. 04.11.2019]. Dostupné z: <https://chlorhexidinefacts.com/history-of-chlorhexidine.html>
- [5] *World Health Organization Model List of Essential Medicines, 21st List*, 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [6] LIM, K.-S. a P. C. A. KAM, 2008. Chlorhexidine – Pharmacology and Clinical Applications. *Anaesthesia and Intensive Care* [online]. **36**(4), 502–512. ISSN 0310-057X, 1448-0271 [cit. 08.11.2019]. Dostupné z: doi:10.1177/0310057X0803600404
- [7] DAVIES, G. E., J. FRANCIS, A. R. MARTIN, F. L. ROSE a G. SWAIN, 1954. 1:6-di-4'-chlorophenyldiguanidohexane ("Hibitane"). Laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* [online]. **9**(2), 192–196 [cit. 08.11.2019]. ISSN 03660826. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.1954.tb00840.x
- [8] PUIG SILLA, M., J. M. MONTIEL COMPANYY a J. M. ALMERICH SILLA, 2008. Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. *Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal*. **13**(4), E257-260. ISSN 1698-6946.
- [9] WEINSTEIN, R. A., A. M. MILSTONE, C. L. PASSARETTI a T. M. PERL, 2008. Chlorhexidine: Expanding the Armamentarium for Infection Control and Prevention. *Clinical Infectious Diseases* [online]. **46**(2), 274–281 [cit. 09.11.2019]. ISSN 1058-4838, 1537-6591. Dostupné z: doi:10.1086/524736
- [10] Plaque Removal: Chlorhexidine Mouthwash. *GSK Health Partner* [online]. © 2020 GSK group of companies or its licensor. All rights reserved. [cit. 09.11.2019]. Dostupné z: <https://www.gskhealthpartner.com/en-gb/oral-health/brands/corsodyl/science/chlorhexidine-digluconate/>
- [11] MANCANO, M. A. a J. C. GALLAGHER, ed., 2014. *Frequently prescribed medications: drugs you need to know*. 2nd ed. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning. ISBN 978-1-4496-9884-3.
- [12] TANZER, J. M., A. M. SLEE a B. A. KAMAY, 1977. Structural Requirements of Guanide, Biguanide, and Bisbiguanide Agents for Antiplatelet Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. **12**(6), 721–729 [cit. 14.11.2019]. ISSN 0066-4804, 1098-6596. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.12.6.721

- [13] Octenidine, CID=51167. *PubChem* [online]. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database [cit. 14.11.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Octenidine>
- [14] World Health Organization, ed., 2009. *WHO model formulary 2008: based on the 15th Model List of Essential Medicines 2007*. Geneva: WHO. ISBN 978-92-4-154765-9.
- [15] ROSE, F. L. a G. SWAIN: N-Chlorophenyldiguanidino compounds. Spojené státy americké. Patent US 2684924. 27.06.1954
- [16] Chlorhexidine digluconate, CID=9552081. *PubChem* [online]. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database [cit. 15.11.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9552081>
- [17] ŁUKOMSKA-SZYMAŃSKA, M., J. SOKOŁOWSKI a B. ŁAPIŃSKA, 2017. Chlorhexidine – mechanism of action and its application to dentistry. *Journal of Stomatology* [online]. **70**(4), 405–417 [cit. 15.11.2019]. ISSN 0011-4553. Dostupné z: doi:10.5604/01.3001.0010.5698
- [18] Joint Formulary Committee, 2015. *BNF 69: British national formulary*. 69th Revised edition. Pharmaceutical Press. ISBN 978-0-85711-156-2.
- [19] BERNARDI, F., Mr PINCELLI, S. CARLONI, Mr GATTO a L. MONTEBUGNOLI, 2004. Chlorhexidine with an Anti Discoloration System. A comparative study. *International Journal of Dental Hygiene* [online]. **2**(3), 122–126 [cit. 25.11.2019]. ISSN 1601-5029, 1601-5037. Dostupné z: doi:10.1111/j.1601-5037.2004.00083.x
- [20] LAI, P., C. COULSON, D. D. POTHIER a J. RUTKA, 2011. Chlorhexidine ototoxicity in ear surgery, part 1: review of the literature. *Journal of Otolaryngology – Head & Neck Surgery = Le Journal D'oto-Rhino-Laryngologie Et De Chirurgie Cervico-Faciale*. **40**(6), 437–440. ISSN 1916-0216.
- [21] BELOW, H., O. ASSADIAN, R. BAGUHL, U. HILDEBRANDT, B. JÄGER, K. MEISSNER, D.J. LEAPER a A. KRAMER, 2017. Measurements of chlorhexidine, p-chloroaniline, and p-chloronitrobenzene in saliva after mouth wash before and after operation with 0.2% chlorhexidine digluconate in maxillofacial surgery: a randomised controlled trial. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* [online]. **55**(2), 150–155 [cit. 20.11.2019]. ISSN 02664356. Dostupné z: doi:10.1016/j.bjoms.2016.10.007
- [22] HIRATA, K. a A. KUROKAWA, 2002. Chlorhexidine gluconate ingestion resulting in fatal respiratory distress syndrome. *Veterinary and Human Toxicology*. **44**(2), 89–91. ISSN 0145-6296.
- [23] SMYTH, H., R. MCMULLAN a P. MCCONAGHY, 2019. Chlorhexidine and peri-operative anaphylaxis: an institute's approach to improving patient safety. *Anaesthesia*. **74**, 73–73. ISSN 0003-2409.
- [24] WILEY-VCH VERLAG GMBH & CO. KGAA, ed., 2000. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 1. vyd. B.m.: Wiley. ISBN 978-3-527-30385-4.
- [25] JAMES, H., H. V. WORTHINGTON, C. PARNELL, M. HARDING, T. LAMONT, A. CHEUNG, H. WHELTON a P. RILEY, 2017. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* [online]. **3**, CD008676. ISSN 1469-493X [cit. 28.11.2019]. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD008676.pub2

- [26] SRISANG, S., N. WONGSUWAN, A. P. BOONGIRD, M. UNGSURUNGSIE, P. WANASAWAS a N. NASONGKLA, 2019. Multilayer nanocoating of Foley urinary catheter by chlorhexidine-loaded nanoparticles for prolonged release and anti-infection of urinary tract. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* [online]. **2019**, 1–9 [cit. 28.11.2019]. ISSN 0091-4037. Dostupné z doi: 10.1080/00914037.2019.1655752
- [27] Chlorhexidine: Controlling Infection in Humans and Animals. *Chlorine Chemistry Division – American Chemistry Council* [online]. Copyright ©2005 [cit. 28.11.2019]. Dostupné z: <https://chlorine.americanchemistry.com/Science-Center/Chlorine-Compound-of-the-Month-Library/Chlorhexidine-Controlling-Infection-in-Humans-and-Animals/>
- [28] Patented Antimicrobial Hand Sanitizer Provides Greater Than 99 Percent Kill Against Influenza A in Lab Studies. *Infection Control Today* [online]. Copyright © UBM [cit. 28.11.2019]. Dostupné z: <https://www.infectioncontrolday.com/influenza/patented-antimicrobial-hand-sanitizer-provides-greater-99-percent-kill-against-influenza>
- [29] SINHA, A., S. SAZAWAL, A. PRADHAN, S. RAMJI a N. OPIYO, 2015. Chlorhexidine skin or cord care for prevention of mortality and infections in neonates. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [online]. [cit. 30.11.2020]. ISSN 14651858. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD007835.pub2
- [30] KETTEL, M. J., E. HEINE, K. SCHAEFER a M. MOELLER, 2017. Chlorhexidine Loaded Cyclodextrin Containing PMMA Nanogels as Antimicrobial Coating and Delivery Systems. *Macromolecular Bioscience* [online]. **17**(2), 1600230 [cit. 13.12.2019]. ISSN 16165187. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.201600230
- [31] KETTEL, M. J., K. SCHAEFER, A. PICH a M. MOELLER, 2016. Functional PMMA nanogels by cross-linking with cyclodextrin methacrylate. *Polymer* [online]. **86**, 176–188 [cit. 13.12.2019]. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2016.01.063
- [32] POPR, M., S. HYBELBAUEROVÁ a J. JINDŘICH, 2014. A complete series of 6-deoxy-mono-substituted tetraalkylammonium derivatives of α -, β -, and γ -cyclodextrin with 1, 2, and 3 permanent positive charges. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* [online]. **10**, 1390–1396 [cit. 10.03.2020]. ISSN 1860-5397. Dostupné z: doi:10.3762/bjoc.10.142
- [33] PASTERNAK, R. M., S. RIVILLON AMY a Y. J. CHABAL, 2008. Attachment of 3-(Aminopropyl)triethoxysilane on Silicon Oxide Surfaces: Dependence on Solution Temperature. *Langmuir* [online]. **24**(22), 12963–12971 [cit. 15.05.2020]. ISSN 0743-7463, 1520-5827. Dostupné z: doi:10.1021/la8024827
- [34] CHEN, L., L. BROMBERG, T. A. HATTON a G. C. RUTLEDGE, 2008. Electrospun cellulose acetate fibers containing chlorhexidine as a bactericide. *Polymer* [online]. **49**(5), 1266–1275 [cit. 15.02.2020]. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2008.01.003
- [35] YU, J. H., S. V. FRIDRIKH a G. C. RUTLEDGE, 2006. The role of elasticity in the formation of electrospun fibers. *Polymer* [online]. **47**(13), 4789–4797 [cit. 15.05.2020]. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2006.04.050
- [36] DuPont™ Tyzor® Organic Titanates General Brochure [online]. [cit. 16.05.2020]. Dostupné z: <https://docplayer.net/48910552-Dupont-tyzor-organic-titanates-general-brochure.html>

- [37] FULLRIEDE, H., P. ABENDROTH, N. EHLERT, K. DOLL, J. SCHÄSKE, A. WINKEL, S. N. STUMPP, M. STIESCH a P. BEHRENS, 2016. pH-responsive release of chlorhexidine from modified nanoporous silica nanoparticles for dental applications. *BioNanoMaterials* [online]. **17**(1–2) [cit. 18.02.2020]. ISSN 2193-066X, 2193-0651. Dostupné z: doi:10.1515/bnm-2016-0003
- [38] QIAO, Z., L. ZHANG, M. GUO, Y. LIU a Q. HUO, 2009. Synthesis of Mesoporous Silica Nanoparticles via Controlled Hydrolysis and Condensation of Silicon Alkoxide. *Chemistry of Materials* [online]. **21**(16), 3823–3829 [cit. 18.02.2020]. ISSN 0897-4756, 1520-5002. Dostupné z: doi:10.1021/cm901335k
- [39] AQEEL, Y., R. SIDDIQUI, A. ANWAR, M. R. SHAH a N. A. KHAN, 2016. Gold Nanoparticle Conjugation Enhances the Antiacanthamoebic Effects of Chlorhexidine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. **60**(3), 1283–1288 [cit. 09.05.2020]. ISSN 0066-4804, 1098-6596. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.01123-15
- [40] EHLERS, N. a J. HJORTDAL, 2004. Are cataract and iris atrophy toxic complications of medical treatment of acanthamoeba keratitis? *Acta Ophthalmologica Scandinavica* [online]. **82**(2), 228–231 [cit. 09.05.2020]. ISSN 13953907. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0420.2004.00237.x
- [41] DE SOUZA, F. G., 2017. Gelatin as a Chlorhexidine Digluconate Immobilizing Agent. *MOJ Polymer Science* [online]. **1**(5) [cit. 19.05.2020]. ISSN 2574-9773. Dostupné z: doi:10.15406/mojps.2017.01.00029
- [42] PURI, K., V. DODWAD, K. BHAT a N. PURI, 2013. Effect of controlled-release Periochip™ on clinical and microbiological parameters in patients of chronic periodontitis. *Journal of Indian Society of Periodontology* [online]. **17**(5), 605 [cit. 19.05.2020]. ISSN 0972-124X. Dostupné z: doi:10.4103/0972-124X.119299
- [43] BARRIOS, R., C. M. FERRER-LUQUE, M. T. ARIAS-MOLIZ, M. RUIZ-LINARES, M. BRAVO a P. BACA, 2013. Antimicrobial Substantivity of Alexidine and Chlorhexidine in Dentin. *Journal of Endodontics* [online]. **39**(11), 1413–1415 [cit. 19.05.2020]. ISSN 00992399. Dostupné z: doi:10.1016/j.joen.2013.07.038
- [44] ZHOU, Y., K. HU, Z. GUO, K. FANG, X. WANG, F. YANG a N. GU, 2017. PLLA microcapsules combined with silver nanoparticles and chlorhexidine acetate showing improved antibacterial effect. *Materials Science and Engineering: C* [online]. **78**, 349–353 [cit. 19.05.2020]. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.04.100
- [45] The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2019. *Silica*. Encyclopædia Britannica [online]. Encyclopædia Britannica, inc. [cit. 05.05.2020]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/silica>
- [46] SHAHHOSSEININIA, M., S. BAZGIR a M. D. JOUPARI, 2018. Fabrication and investigation of silica nanofibers via electrospinning. *Materials Science and Engineering: C* [online]. **91**, 502–511 [cit. 05.05.2020]. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2018.05.068
- [47] TALEBIAN, S., A. M. AFIFI, M. HATAMI, S. BAZGIR a H. M. KHANLOU, 2014. Preparation and characterisation of electrospun silica nanofibres. *Materials Research Innovations* [online]. **18**(sup6), S6-510-S6-514 [cit. 06.05.2020]. ISSN 1432-8917, 1433-075X. Dostupné z: doi:10.1179/1432891714Z.0000000001034

- [48] GHORANI, B. a N. TUCKER, 2015. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids* [online]. **51**, 227–240 [cit. 15.05.2020]. ISSN 0268-005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2015.05.024
- [49] BHARDWAJ, N. a S. C. KUNDU, 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* [online]. **28**(3), 325–347 [cit. 08.05.2020]. ISSN 0734-9750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004
- [50] NS Technologie, Elmarco CZ [online]. [cit. 08.05.2020]. Dostupné z: <https://www.elmarco.cz/ns-technologie/>.
- [51] ŠLAMBOROVÁ, I., ZAJÍCOVÁ, V., EXNAR, P., STUDNIČKOVÁ, J.: Nanovláknenná struktura s imobilizovaným organickým agens a způsob její výroby. CZ 303 911, 14.8.2012, 9.5.2013; Nanofiber structure with immobilized organic agens and the method of its preparation. WO 2014026656. Uděleno 20.2.2014.
- [52] BOCK, N., T.R. DARGAVILLE a M.A. WOODRUFF, 2012. Electrospinning of polymers with therapeutic molecules: State of the art. *Progress in Polymer Science* [online]. **37**(11), 1510–1551 [cit. 09.05.2020]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2012.03.002
- [53] LI, Z. a C. WANG, 2013. Effects of Working Parameters on Electrospinning. In: Zhenyu LI a Ce WANG *One-Dimensional nanostructures* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, SpringerBriefs in Materials, s. 15–28 [cit. 09.05.2020]. ISBN 978-3-642-36426-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-36427-3_2
- [54] EXNAR, P. a I. LOVĚTINSKÁ-ŠLAMBOROVÁ, 2015. Silica nanofibers, their preparation and properties. *Nanofibers, Applications and Related Technologies*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, **2015**. 197–203. ISBN 978-80-7494-265-5.
- [55] LOVĚTINSKÁ-ŠLAMBOROVÁ, I., 2015. Medical and Biochemical Applicability of Silica Nanofibers. *Nanofibers, Applications and Related Technologies*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, **2015**. 263–269. ISBN 978-80-7494-265-5.
- [56] EXNAR, P., I. LOVĚTINSKÁ-ŠLAMBOROVÁ a M. PAPRČKOVÁ, 2017. Solubility tests of silica nanofibers in body fluids as the default information for their application in medicine. *Nanofibers, Applications and Related Technologies*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, **2017**. 121–128. ISBN 978-80-7494-393-5.
- [57] PIRZADA, T., S. A. ARVIDSON, C. D. SAQUING, S. S. SHAH a S. A. KHAN, 2014. Hybrid Carbon Silica Nanofibers through Sol–Gel Electrospinning. *Langmuir* [online]. **30**(51), 15504–15513 [cit. 09.05.2020]. ISSN 0743-7463, 1520-5827. Dostupné z: doi:10.1021/la503290n
- [58] HESTERBERG, T. W. a G. A. HART, 1999. Health and safety aspects of fiber glass. In: *Fifteenth Annual Battery Conference on Applications and Advances (Cat. No.00TH8490)* [online]. Long Beach, CA, USA: IEEE, s. 135–140 [vid. 09.05.2020]. ISBN 978-0-7803-5924-6. Dostupné z: doi:10.1109/BCAA.2000.838394
- [59] FU, C., T. LIU, L. LI, H. LIU, D. CHEN a F. TANG, 2013. The absorption, distribution, excretion and toxicity of mesoporous silica nanoparticles in mice following different exposure routes. *Biomaterials* [online]. **34**(10), 2565–2575 [cit. 15.05.2020]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2012.12.043

- [60] NURGALI, K., R. T. JAGOE a R. ABALO, 2018. Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? *Frontiers in Pharmacology* [online]. **9**, 245 [cit. 09.05.2020]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2018.00245
- [61] LANGER, R a J. VACANTI, 1993. Tissue engineering. *Science* [online]. **260**(5110), 920–926 [cit. 10.05.2020]. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.8493529
- [62] WANG, Q. a Royal Society of Chemistry (Great Britain), ed., 2017. *Smart materials for tissue engineering: fundamental principles*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry. Smart materials series, 24. ISBN 978-1-78262-464-6.
- [63] WANG, J.-Y., K. WANG, X. GU a Y. LUO, 2016. Polymerization of Hydrogel Network on Microfiber Surface: Synthesis of Hybrid Water-Absorbing Matrices for Biomedical Applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering* [online]. **2**(6), 887–892 [cit. 15.05.2020]. ISSN 2373-9878, 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbiomaterials.6b00143
- [64] LI, X., K. M. KOLLTVEIT, L. TRONSTAD a I. OLSEN, 2000. Systemic Diseases Caused by Oral Infection. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **13**(4), 547–558 [cit. 10.05.2020]. ISSN 1098-6618, 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.13.4.547