



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍCH LÁTEK Z PÓROVITÉHO
MATERIÁLU NA BÁZI POLY(3-HYDROXYBUTYRÁTU)**

RELEASE OF ACTIVE SUBSTANCES FROM POROUS STRUCTURES BASED ON POLY(3-HYDROXYBUTYRATE)

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Nicole Černeková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1375/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Nicole Černeková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název bakalářské práce:

Uvolňování aktivních látek z pórovitého materiálu na bázi poly(3-hydroxybutyrátu) (PHB)

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma.
2. Příprava nanovláken na bázi PHB metodou elektrostatického zvlákňování a posouzení jejich morfologie metodou SEM.
3. Inkorporace aktivní látky do PHB nanovláken.
4. Studium vlivu uvolňování aktivní látky z připravených nanovláken v závislosti na vytvořené morfologii.
5. Stanovení aktivity inkorporované látky v nanovláčkách.
6. Vyhodnocení výsledků, diskuze a závěr.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Nicole Černeková
student(ka)

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

V Brně dne 31.1.2019

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca sa zaoberá štúdiom uvoľňovania aktívnych látok z pórovitých štruktúr na báze poly(3-hydroxybutyrátu) (P3HB). Teoretická časť popisuje základné charakteristiky polyhydroxyalkanoátov, ich účinky na organizmus a približuje metódu elektrostatického zvlákňovania.

V experimentálnej časti boli elektrospinningom vytvorené štruktúry z roztoku poly(3-hydroxybutyrátu) v zmesi rozpúšťadiel dichlórmetánu a chloroformu v troch rôznych pomeroch. Morfológia vytvorených vláknitých pórovitých štruktúr bola posúdená pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie, na základe ktorej bola do vhodných štruktúr inkorporovaná aktívna látka, antibiotikum Levofloxacín. Antimikrobiálna aktivita antibiotika uvoľňovaného z pripravených pórovitých štruktúr bola testovaná agarovou difúznou metódou proti gram-negatívnym baktériám *Escherichia coli* a *Serratia marcescens*, gram-pozitívnej baktérií *Micrococcus luteus*, a proti kvasinke *Candida glabrata*, pričom výsledky ukázali výrazný antimikrobiálny účinok pripravených vzoriek voči všetkým bakteriálnym kmeňom, v prípade kultúry kvasinky nedošlo k vzniku inhibičných zón pri žiadnej zo vzoriek. Tiež bol spektrofotometricky študovaný vplyv uvoľňovania aktívnej látky z pripravených vlákien v závislosti od vytvorenej morfologickej štruktúry. Bolo zistené, že antibiotikum bolo do týchto štruktúr úspešne inkorporované a jeho uvoľňovanie záviselo od morfológie vzorky.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

antimikrobiálna aktivita, uvoľňovanie liečiva, elektrospinning, poly(3-hydroxybutyrát), pórovité štruktúry

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the study of the release of active substances from porous structures based on poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB). The theoretical part describes the basic characteristics of polyhydroxyalkanoates, their effect on the organism and method of electrospinning.

In the experimental part, solutions of poly(3-hydroxybutyrate) in a solvent mixture of dichloromethane and chloroform were electrospun in three different ratios. The morphology of the formed fibrous porous structures was assessed by scanning electron microscopy, based on which the active substance, the antibiotic Levofloxacin, was incorporated into suitable structures. Antimicrobial activity of the antibiotic released from prepared porous structures was tested by the agar diffusion method against gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Serratia marcescens*, the gram-positive bacterium *Micrococcus luteus* and against the yeast *Candida glabrata*. The results showed a significant antimicrobial effect of the prepared samples against all bacterial cultures, in the case of the culture of yeasts, no zones of inhibition occurred. Next, the course of the active substance release from the prepared electrospun meshes was studied spectrophotometrically depending on the morphological structure. It was found that the active substance was successfully incorporated into electrospun fibers and the course of the drug release depended on the morphology of P3HB electrospun meshes.

KEYWORDS

antimicrobial activity, drug release, electrospinning, poly(3-hydroxybutyrate), porous structures

ČERNEKOVÁ, Nicole. *Uvolňování aktivních látek z pórovitého materiálu na bázi poly(3-hydroxybutyrátu) (PHB)*. Brno, 2019. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113502>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne, a že všetky použité literárne zdroje sú správne a úplne citované. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená projektom SoMoPro (projekt č. 6SA18032). Projekt získal finančné prostriedky z programu pre výskum a inovácie Horizont 2020 Európskej únie v rámci akcie Marie Sklodowska-Curie a je spolufinancovaný Juhomoravským krajom podľa grantovej dohody č. 665860. Poznámka: Tento materiál odráža iba postoj autora a EÚ nie je zodpovedná za akékoľvek použitie prezentovaných informácií.

Moje poďakovanie patrí doc. Ing. Adriáne Kovalčík, Ph.D. a Mgr. Vojtěchovi Kundrátovi za pomoc, cenné rady, ochotu a čas, ktorý mi obaja pri vypracovávaní tejto práce venovali.

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Teoretická časť	10
2.1	Polyhydroxyalkanoáty	10
2.1.1	Štruktúra a rozdelenie.....	10
2.1.2	Vlastnosti.....	10
2.1.3	Biosyntéza	11
2.1.4	Priemyselná výroba	12
2.1.5	Priemyselné využitie	12
2.2	Poly(3-hydroxybutyrát)	13
2.2.1	Štruktúra a charakteristika.....	13
2.2.2	Vlastnosti.....	14
2.2.3	Účinky na organizmus.....	14
2.2.3.1	Cytotoxicita.....	14
2.2.3.2	Karcinogenita.....	15
2.2.4	Medicínske aplikácie.....	15
2.3	Nosičové systémy liečiv	16
2.3.1	Pórovité štruktúry	17
2.3.2	Nanovlákná.....	18
2.3.2.1	Elektrospinning	18
2.3.2.2	Inkorporácia aktívnej látky do nanovláken.....	19
2.3.3	Pórovité nanovlákná	20
3	Ciele práce.....	22
4	Experimentálna časť	23
4.1	Použité mikroorganizmy, chemikálie, materiály a metódy	23
4.1.1	Použité mikroorganizmy	23
4.1.2	Chemikálie použité na kultiváciu mikroorganizmov	24
4.1.3	Ďalšie použité chemikálie a materiály	24
4.1.4	Použité metódy a pomôcky	24
4.2	Kultivácia mikroorganizmov	25
4.2.1	Príprava médií	25
4.3	Stanovenie antimikrobiálnej aktivity aktívnych látok	26
4.3.1	Príprava roztokov aktívnych látok	26

4.3.2	Jamková difúzna metóda	26
4.4	Zvlákňovanie P3HB na zhodnotenie morfológie	26
4.4.1	Príprava pracovných roztokov	26
4.4.2	Charakterizácia roztokov	27
4.4.3	Zvlákňovanie roztokov	27
4.4.4	Charakterizácia nanovláknenných štruktúr	28
4.5	Zvlákňovanie P3HB s prídavkom aktívnej látky	28
4.5.1	Príprava pracovných roztokov	28
4.5.2	Zvlákňovanie roztokov	28
4.5.3	Charakterizácia nanovláknenných štruktúr	28
4.6	Zhotovenie kalibračnej krivky pre štúdium uvoľňovania aktívnej látky z nanovláknenných štruktúr	28
4.6.1	Príprava zásobných roztokov	28
4.6.2	Príprava roztokov kalibračnej krivky	29
4.6.3	Zhotovenie kalibračnej krivky	29
4.7	Štúdium vplyvu uvoľňovania aktívnej látky z pripravených nanovláknenných štruktúr v závislosti od vytvorenej morfologickej štruktúry	29
4.7.1	Príprava vzoriek	29
4.7.2	Meranie uvoľňovania aktívnej látky a stanovenie účinnosti jej enkapsulácie do vzorky	30
4.8	Stanovenie antimikrobiálnej aktivity inkorporovanej látky v nanovláknach	30
4.8.1	Príprava vzoriek	30
4.8.2	Agarová difúzna metóda	30
5	Výsledky a diskusia	31
5.1	Stanovenie antimikrobiálnej aktivity aktívnych látok a výber aktívnej látky pre inkorporáciu do P3HB vlákien	31
5.2	Charakterizácia roztokov a pripravených P3HB nanovláken	33
5.2.1	Príprava pórovitých štruktúr	33
5.2.2	Dynamická viskozita pripravených roztokov	34
5.2.3	Charakterizácia pripravených nanovláknenných štruktúr metódou SEM	34
5.2.3.1	Nanovláknenné štruktúry P3HB v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:1	35
5.2.3.2	Nanovláknenné štruktúry P3HB v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:2	40
5.2.3.3	Nanovláknenné štruktúry P3HB v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:3	45
5.3	Charakterizácia pripravených štruktúr s prídavkom aktívnej látky	50

5.4	Štúdium uvoľňovania aktívnej látky z pripravených nanovlákných štruktúr	51
5.4.1	Kalibračná krivka antibiotika	51
5.4.2	Uvoľňovanie aktívnej látky z pripravených nanovlákných štruktúr	52
5.5	Stanovenie antimikrobiálnej aktivity inkorporovanej látky v nanovláknach	53
6	Záver.....	56
7	Zdroje	58
8	Zoznam skratiek	64

1 ÚVOD

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú biopolyméry patriace do skupiny biopolyesterov. Medzi PHA patria napríklad poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB), poly(4-hydroxybutyrát) (P4HB), kopolymér na báze P3HB a P4HB P3HB4HB, kopolyméry 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyhexanoátu (PHBHHx) a terpolyméry 3-hydroxybutyrátu, 3-hydroxyvalerátu a 3-hydroxyhexanoátu (PHBVHHx). Ich molekulová hmotnosť sa pohybuje v rozmedzí niekoľko desiatok tisíc až niekoľko miliónov daltonov. V závislosti od ich molekulovej hmotnosti, štruktúry (amorfnjej alebo semikryštalickej) a funkčných skupín sa menia ich fyzikálno-chemické vlastnosti. PHA sú biodegradovateľné a biokompatibilné biopolyméry produkované biotechnologickými metódami pomocou širokého spektra baktérií za podmienok limitného množstva nutrientov, napríklad dusíka a zároveň výrazného nadbytku zdroja uhlíka. Za posledných 20 rokov prebehlo množstvo výskumov zameraných na vývoj liečebných aplikácií s použitím PHA. Medzi príklady aplikácií *in vivo* patria zdravotnícke pomôcky, ako sú stehy, adhézne bariéry a ventily, regeneračné zariadenia tkanív, kardiovaskulárne náplasti, kĺbové opravné 'scaffoldy' (tzv. lešenia), náhrady kostného štepu, nervové vodiče či matrice nosičov lieku. Ich výhodou na rozdiel od nebiodegradovateľných polymérov je biokompatibilita a odbúrateľnosť v tele bez vzniku toxických látok [1,2].

PHA sú jediným typom polymérov vyrábaným čisto mikrobiálnou syntézou. Mechanické vlastnosti PHA je možné upraviť použitím rôznych monomérov a ich rôznych pomerov, aby sa splnili požiadavky na materiál implantátu. Zatiaľ boli vyvinuté rôzne technológie povrchovej modifikácie, vrátane modifikácie pomocou lipáz, kyslých alebo alkalických činidiel, chemické štiepenie, fyzikálne pripojenie ligandov (a/alebo receptorov), ako aj tvorba PHA nanovláken na zlepšenie ich účinkov pri procese regenerácie tkaniva [3,4].

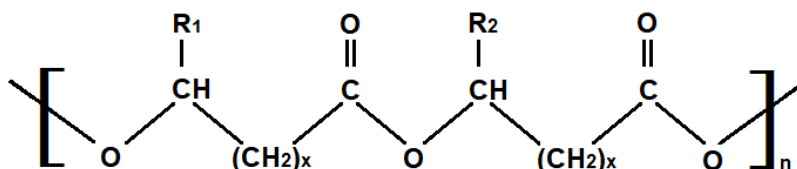
2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty sú lineárne polyestery skladajúce sa z monomérov na báze hydroxyalkánových kyselín. Hydroxylová skupina sa vyskytuje výhradne v R konfigurácii, čo je dané špecifitou enzýmov zapojených do syntézy PHA. Jedná sa o polyestery produkované intracelulárne celou radou mikroorganizmov, teda gram-negatívnymi a gram-pozitívnymi baktériami, ktoré si baktérie vytvárajú ako zásobný zdroj uhlíka a energie pre prípad zhoršenia životných podmienok prostredia, v ktorom žijú [3,5].

2.1.1 Štruktúra a rozdelenie

Základnú štruktúru polyhydroxyalkanoátov tvoria jednotlivé monomérmne jednotky (obrázok č. 1). Monomérmne podjednotky sa väčšinou vyskytujú vo forme 3-hydroxy-substituovaných mastných kyselín. Hydroxyskupina jednej kyseliny je esterifikovaná karboxylovou skupinou nasledujúcej kyseliny za vzniku lineárneho polyesteru [6].



Obrázok č. 1: Všeobecná štruktúra polyhydroxyalkanoátov [6]

Polyhydroxyalkanoáty (PHA), podľa počtu uhlíkových atómov v jednotlivých monoméroch, môžeme rozdeliť do troch základných skupín, na PHA s krátkym reťazcom (short-chain length PHA, scl-PHA) s dĺžkou 3–5 uhlíkov v monomérmnej jednotke, PHA so stredne dlhým reťazcom (medium-chain length PHA, mcl-PHA) s dĺžkou 6–14 uhlíkov a PHA s dlhým reťazcom (long-chain length PHA, lcl-PHA) s dĺžkou viac ako 15 uhlíkov. Do súčasnej doby bolo popísaných asi 150 jednotlivých monomérov, z ktorých sa môžu PHA skladať. Väčšinou sa jedná o 3-hydroxykyseliny, vzácnejšie 4,6-hydroxykyseliny nasýtené i nenasýtené, vetvené, prípadne s ďalšími funkčnými skupinami [7,8].

2.1.2 Vlastnosti

PHA sú biodegradovateľné semikryštalické termoplasty. Výrazná väčšina mikroorganizmov syntetizuje buď scl-PHA, obsahujúce predovšetkým jednotky 3HB alebo mcl-PHA obsahujúce 3-hydroxyoktanoát (3HO) a 3-hydroxydekanoát (3HD) ako hlavné monoméry, no medzi najviac prebádané patrí hlavne poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB). Termické a mechanické vlastnosti (hlavne pevnosť v ťahu) P3HB, sa podobajú vlastnostiam polypropylénu (PP). PP je nebiodegradovateľný, ale recyklovateľný termoplast, ktorý patrí do skupiny polyolefínov, vzniká polymerizáciou propylénu za pomoci katalyzátorov (napr. Ziegler-Nattové katalyzátory) a získava sa konverznými procesmi (tepelným krakovaním) z ropy. Nevýhodou P3HB oproti PP je jeho nižšia termická stabilita a nízke hodnoty predĺženia v ťahu ($E_b = 1-10\%$ pre P3HB a $E_b = 100-600\%$ pre PP). Hodnoty E_b sa dajú zvýšiť produkciou poly(3-hydroxybutyrátu-co-hydroxyvalerátu) (P3HBHV), pričom v závislosti od koncentrácie zabudovaného hydroxyvalerátu (HV) dosahuje hodnoty E_b 20 až 200%. Mcl-PHA a lcl-PHA kopolyméry

majú vďaka svojmu zloženiu a dĺžkam reťazcov mechanické vlastnosti podobné elastomérom. Konkrétny typ vznikajúceho PHA závisí hlavne na použitom mikrobiálnom kmeni, použitom substráte (zdroj uhlíka) a jeho koncentrácií, prípadne na prídavnom substráte (anglicky co-substrate). Mechanická pevnosť a termická stabilita PHA polymérov je ovplyvnená hlavne hodnotou ich molekulovej hmotnosti a stupňom kryštalinity [7,9].

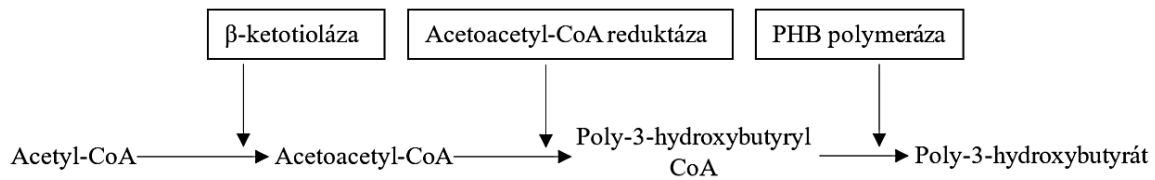
Dĺžka reťazca monomérov a ich molárny pomer má výrazný vplyv na fyzikálne a mechanické vlastnosti. Molekulová hmotnosť PHA sa líši podľa typu producenta, všeobecne sa však pohybuje v rozmedzí od 50 000 do 1 000 000 Da. Rozsah molekulovej hmotnosti polyméru alebo kopolyméru nepriamoúmerne ovplyvňuje hodnotu jeho rozmedzia teploty topenia. P3HB polymér má teploty topenia (T_m) okolo 170 až 180 °C a teplotou skelného prechodu (T_g) okolo 60 °C. Molekulová hmotnosť PHA je tak dostatočne vysoká pre dosiahnutie mechanických vlastností, ktoré sa podobajú mechanickým vlastnostiam konvenčných termoplastov, ako je napr. polypropylén. Scl-PHA polyméry dosahujú stupeň kryštalinity okolo 40–60 %. U PHA so strednou dĺžkou reťazca dochádza ku zníženiu stupňa kryštalinity, zníženiu teploty topenia a zníženiu teploty skelného prechodu v porovnaní s PHA s krátkym bočným reťazcom. Tieto polyméry sa stávajú mäkkšími, pružnejšími a majú odlišný rozsah aplikácií v porovnaní s scl-PHA. Mechanické vlastnosti polymérov závisia na skladbe monomérnych jednotiek. Napríklad poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB) je úplne stereoregulárny, vysoko kryštalický, pomerne tvrdý a krehký s bodom topenia okolo 180 °C, pričom teplotná degradácia začína okolo teploty 190 až 200 °C. Zaujímavé je, že P3HB izolovaný z baktérií vykazuje stupeň kryštalinity okolo 55–80 %, zatiaľ čo molekuly vo vnútri baktérií sú amorfné a existujú ako vo vode nerozpustné súčasti. Kopolyméry P3HB môžu taktiež viesť k vzniku polymérov, ktoré obsahujú monoméry 3-hydroxyvalerátu (3HV) alebo 4-hydroxybutyrátu (4HB), ktoré sú potom oproti samotnému P3HB mäkkšie a elastickejšie [6,7,9,10].

2.1.3 Biosyntéza

Biosyntéza alebo tzv. mikrobiologická produkcia PHA je podporená v mikroorganizmoch, ako napríklad *Rhizobium melitoli* či *Escherichia coli*, stresovými podmienkami prostredia, ktoré vyvoláva nedostatok dusíka, pričom ale musí byť zabezpečený nadbytok uhlíka. P3HB je primárnym produktom asimilácie uhlíka a je produkovaný ako zásobná forma energie, ktorá môže byť využitá v prípade, keď nie sú k dispozícii iné energetické zdroje. To znamená, že ak baktériám dôjde substrát, začnú rozkladať PHA, ktoré vyprodukovali. Ako zdroj uhlíka pre syntézu PHA môže poslúžiť aj celá rada substrátov, ako sú cukry (napr. glukóza a fruktóza), škrob, celulóza, triacylglyceroly, fosílné zdroje (metán, minerálny olej, hnedé alebo čierne uhlie), vedľajšie priemyslové produkty (melasa, srvátka, glycerol), organické kyseliny (kyselina propiónová a 4-hydroxymaslová) alebo oxid uhličitý. K hromadeniu P3HB dochádza v okamihu, kedy je k dispozícii nadbytok zdroja uhlíka a zároveň je vyčerpaná niektorá z ostatných živín, čo má za následok nevyvážený rast. Limitujúcou živinou môže byť nielen zdroj dusíka, ale aj síry, fosforu, železa, horčíka alebo draslíka. Hromadenie PHA je u väčšiny aeróbných baktérií indukované nedostatkom kyslíka [2,4,11,12].

V prírode bolo vyvinutých niekoľko možných spôsobov vzniku PHA. Každý z týchto spôsobov je závislý na životných podmienkach daného mikroorganizmu v ekosystéme. U väčšiny PHA

produkujúcich mikroorganizmov sa metabolická dráha biosyntézy P3HB (obrázok č. 2) skladá z troch na seba nadväzujúcich reakcií katalyzovaných tromi rôznymi enzýmami, a to β -ketoacyl-CoA tiolázou (phbA), acetoacyl-CoA reduktázou (phbB) a PHB polymerázou (phbC) [4,13].



Obrázok č. 2: Metabolická dráha biosyntézy poly(3-hydroxybutyrátu) [6]

V prvej reakcii pôsobením enzýmu β -ketoacyl-CoA tiolázy dochádza ku kondenzácii dvoch molekúl acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA. V druhej reakcii je acetoacetyl-CoA redukovaný na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA pomocou NADPH-dependentnej acetoacetyl-CoA dehydrogenázy. Následne pôsobením enzýmu PHB polymerázy dochádza k polymerizácii (R)-3-hydroxybutyryl-CoA na P3HB [4,13].

2.1.4 Priemyselná výroba

Podstatnou výhodou polyhydroxyalkanoátov je to, že ich výroba je možná aj z biomasy namiesto z neobnoviteľných zdrojov. V súčasnosti je biosyntéza PHA omnoho drahšia ako výroba známych polymérov, ktorá je založená na spracovaní ropy. Predpokladá sa, že cena substrátu ovplyvňuje približne 50 % výslednej ceny PHA [7,8].

Tradičným zdrojom uhlíka pre produkciu PHA sú predovšetkým sacharidy, surovinou tak môžu byť odpady z poľnohospodárskej výroby (škrabové plodiny – zemiaky, ryža, melasa a i.) a sacharóza získavaná hydrolýzou celulózy. Okrem uvedených zdrojov pre výrobu založenú na baktériách existujú aj iné spôsoby získavania PHA z obnoviteľných zdrojov, ako napríklad s využitím geneticky modifikovaných plodín (sója, kukurica, a i.). Ďalšími zdrojmi sú odpady z výroby biodieselu (glycerol, odpadný olej), odpadné priemyslové vody obsahujúce organické látky (papierne), metán atď. Avšak každý mikroorganizmus rastie na inom zdroji uhlíka. V tomto smere treba určite vyzdvihnúť dôležitosť výroby degradovateľných biokompatibilných plastov z prírodných zdrojov, ktoré nie sú zdrojom znečistenia našej planéty [7,11].

Výroba PHA sa skladá z dvoch základných častí: upstreamu, teda kultivačnej časti a downstreamu, teda izolácie a purifikácie produktu. Dôležitými faktormi, ktoré rozhodujú o úspešnej výrobe, sú použitý kmeň baktérií (najmä *Cupriavidus necator* alebo *Alcaligenes latus*), pomer uhlíkatej suroviny k zdroju dusíka, optimalizované množstvo stopových prvkov, pH, stratégia dávkovania živiny, odvodu produktov (napr. batch kultivácia, fed-batch kultivácia), a ďalšie [7,8].

2.1.5 Priemyselné využitie

Ako už bolo spomínané, polyhydroxyalkanoáty sa svojimi fyzikálne-chemickými vlastnosťami podobajú petrochemickým plastom. Ale aj napriek svojim výhodám zatiaľ nedokážu naplno konkurovať syntetickým polymérom. V prvom rade je to spôsobené vysokou cenou výroby PHA, proti výrobnej cene syntetických polymérov. Náklady na produkciu sa pripisujú

predovšetkým vysokej cene použitého zdroja uhlíka, ktorým je glukóza alebo sacharóza. V súčasnosti je snaha tieto pomerne drahé substráty nahradiť lacnejšími odpadovými materiálmi alebo vedľajšími produktmi poľnohospodárskej a potravinárskej výroby, ktoré by zvýšili konkurencieschopnosť PHA. Ďalším problémom biotechnologickej produkcie PHA je nedostatok rýchlych a spoľahlivých analytických nástrojov, ktoré by umožnili rýchle a citlivé stanovenie PHA vo vnútri buniek v priebehu biotechnologického procesu. V poslednom rade je veľkoobjemová produkcia PHA skomplikovaná špeciálnymi rastovými podmienkami, ktoré sú produkčnými mikroorganizmami vyžadované, a tiež netreba zabudnúť na komplikovanú izoláciu PHA zvyčajne chloroformom, ktorý je toxickým rozpúšťadlom [7].

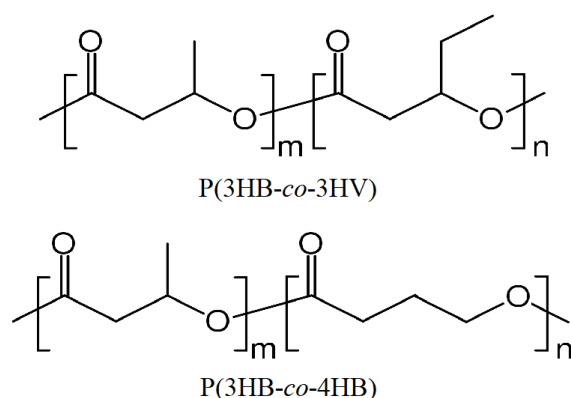
Najprv boli PHA navrhnuté a využívané výhradne pre výrobu plastových fliaš, vlákien, obalov, latexu a produktov pre poľnohospodárske alebo komerčné využitie, neskôr sa tieto polyestery začali využívať aj pre medicínske a farmaceutické aplikácie. Podľa existujúcich výskumov môžeme považovať za preukázané, že tieto polyestery vykazujú mnohé známky netoxicity pre ľudský organizmus a vďaka svojim štrukturálnym, fyzikálnym a chemickým vlastnostiam sa stali ideálnymi kandidátmi na využitie práve v odbore medicínskych technológií [7].

2.2 Poly(3-hydroxybutyrát)

Už v dvadsiatych rokoch dvadsiateho storočia Lemoigne prvý krát izoloval poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB) z bakteriálneho kmeňa *Bacillus megaterium* a popísal ho, no až od roku 1958 bola tejto problematike venovaná väčšia pozornosť po tom, čo bolo zistené, že polyhydroxyalkanoáty môžu byť produkované baktériami vo významných množstvách [7].

2.2.1 Štruktúra a charakteristika

Najznámejším a najbežnejším zástupcom scl-polyhydroxyalkanoátov, teda polyhydroxyalkanoátov s krátkym reťazcom, je poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB), okrem ktorého existujú ešte poly(4-hydroxybutyráty) (P4HB), polyestery 3-hydroxypropionátu (3HP), 4-hydroxybutyrátu (4HB), 5-hydroxyvalerátu a kopolyméry, napr. poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) – P(3HB-co-3HV), skrátene P(3HB-3HV), ktorých štruktúry sú zobrazené na obrázku č. 3 [5,14].



Obrázok č. 3: Štruktúra P(3HB-co-3HV) a P(3HB-co-4HB) [14]

2.2.2 Vlastnosti

Poly(3-hydroxybutyrát) sa považuje za polymér, ktorý má vysoký potenciál ako biodegradovateľný materiál používaný na výrobu implantátov. Polymér je dobre preskúmaný termoplastický polyester s mikrobiálnym pôvodom, ktorý vykazuje vynikajúcu biologickú kompatibilitu v kontakte s ľudským i zvieracím tkanivom a krvou. Prírodná prítomnosť nízkomolekulového P3HB a produktu degradácie polyméru, kyseliny 3-hydroxymaslovej v tele, je ďalším dôkazom netoxicity. Okrem nevyhnutnej biologickej kompatibility P3HB, vyžaduje použitie materiálu na výrobu implantátov degradáciu počas časového obdobia, ktoré je relevantné pre príslušnú aplikáciu. P3HB je vysoko kryštalický, teda jeho štruktúra spomaľuje vniknutie vody do polymérnej matrice a zabraňuje tak následnému štiepeniu reťazcov. Vďaka tejto vlastnosti je jeho degradácia *in vivo* pomalšia [15,16].

2.2.3 Účinky na organizmus

Boli skúmané možné účinky P3HB a P(3HB-3HV) na imunitný systém, ktoré ukázali, že oba tieto polyméry na úrovni bunkovej odpovede neovplyvňujú systém homeostázy. Avšak, majú tendenciu spúšťať systém koagulácie a reakciu komplementu. Za tento účinok sú pravdepodobne zodpovedné bakteriálne lipopolysacharidy, ktoré prichádzajú spolu s polymérom. Preto na zdravotné účely musí byť stratégia výroby a purifikácie PHA prísna a musí sa zabezpečiť vysoká čistota [3,17,18].

2.2.3.1 Cytotoxicita

Z výskumov účinkov monomérnych jednotiek PHA na celkový tvar, fyziológiu, rast a cytotoxicitu cieľových a okolitých buniek bolo preukázané, že rôzne monoméry 3HB, 3HB-co-4HB, 3HB-co-3HHx a 3HHx neovplyvnili bunky fibroblastu, ak sú prítomné v koncentrácii nižšej ako 20 mg/l. Avšak, keď sa koncentrácia zdvojnásobila, tieto monoméry spomaľovali rast buniek a spôsobili následnú apoptózu, zatiaľ čo cytotoxicita oligomérov klesla nepriamo s dĺžkou bočného reťazca. Napriek tomu by cytotoxicita mohla byť považovaná za zanedbateľnú, pretože zdravá ľudská krv vždy obsahuje hladinu 3HB 3 až 10 mg/100 ml a niektoré monoméry, ako napríklad 4HB, sú tiež prítomné v rôznych orgánoch, v svalových tkanivách, ako aj v mozgu. V skutočnosti sa 4HB používa v dennej intravenózne dávke na dlhodobú anestéziu [17,18].

Vzhľadom na to, že vlastnosti PHA sa môžu meniť pri vytváraní zmesí a kompozitov s rôznymi aditívami (organickými alebo anorganickými), takéto modifikácie sa môžu tiež použiť na prispôbenie rýchlosti degradácie polyméru. Anhydrid kyseliny maleínovej ako doplnok k materiálu a modifikácia ultrafialovým žiarením urýchľujú rozpad PHA. Vo výskumoch doktorky Basnettovej a jej skupiny bolo preukázané, že nová kombinácia kompozitu P3HO/P3HB vykázala väčší potenciál z hľadiska zvýšenej biologickej kompatibility a zníženej cytotoxicity, v porovnaní s homopolymérom P3HO na ľudské mikrovaskulárne endoteliálne bunky. Táto výhoda bola hlavne prisudzovaná vysokej termodynamike, pevnosti a relatívne rýchlejšej redukcii PHA. Je zrejmé, že PHA monoméry (3HB, 4HB a 3HV) sa ukázali byť menej nebezpečné v porovnaní s bežne používanými polymérmi PLA (z kyseliny polymliečnej) a PGA (z kyseliny polyglykolovej), kvôli ich nižšej kyslosti a zníženej bioaktivite. Zdá sa, že terpolymér P(3HB-co-3HP-co-5HV) a ďalší 5HV obsahujúci kopolymér, by mali vykazovať

ešte nižšiu toxicitu pre živé bunky. Podobne P(3HB-co-3HHx), s vyššou pevnosťou v ťahu a pružnosťou ako P3HB a P(3HB-3HV), ukázal dobrú hemokompatibilitu, čo je výhodnejšie pre aplikácie medicínskych stehov. Niektoré zmeny fyzikálnych vlastností PHA, ktoré sa spájajú s niektorými ďalšími funkčnými skupinami, by mohli byť užitočné pri konštrukcii takmer netoxických PHA „scaffoldov“. Na základe týchto informácií možno dospieť k záveru, že cytotoxicita PHA môže byť znížená na minimálnu úroveň, alebo že úplná necytotoxicita by sa mohla dosiahnuť pri lekárskech implantáciách, ak je vhodná kombinácia monomérov zameraná na určité typy živočíšnych buniek [3,18-20].

2.2.3.2 Karcinogenita

Najdôležitejším aspektom využívania PHA v lekárskech aplikáciách je ich nekarcinogenita. Doterajšie štúdie testovania *in vivo* preukázali, že P3HB, P(3HB-3HV), P(3HB-co-3HHx), P(3HB-co-4HB), a P(3HBVco-3HHx) neovplyvnili rakovinovú proliferáciu primárnych osteoblastov. *In vitro* experimenty s filmom P(3HB-3HV), zamerané na retinálne pigmentové epitelové bunky dokazujú zdravú bunkovú proliferáciu pri riadenej rýchlosti rastu [18].

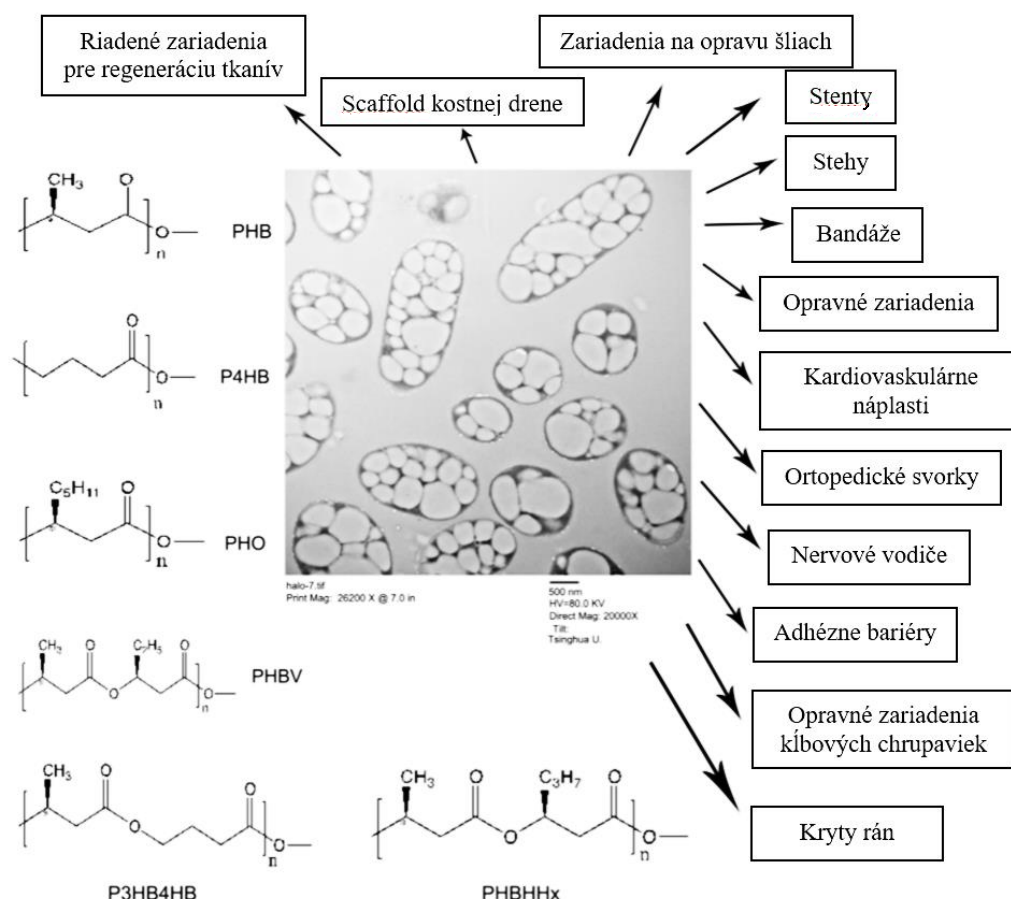
Biokompatibilita PHA bola podrobená rôznym štúdiám, stále však neexistujú jasné dôkazy o úplnej nekarcinogenite na všetky bunkové línie. Pri každom procese novej indukcie rakovinových buniek je dôležité zvážiť potenciálne zmeny jadrového tvaru a poškodenie DNA spôsobené PHA implantátmi, pretože akékoľvek narušenie normálnej regulácie bunkového cyklu týmito materiálmi môže spôsobiť karcinogézu [18].

2.2.4 Medicínske aplikácie

Biologicky rozložiteľné polyméry dosahujú významné aplikácie v oblasti medicíny, čo vyplýva aj z obrázku č. 4. Pri tkanivovom inžinierstve sa často používajú polyhydroxyalkanoáty najmä v podobe P3HB, P(3HB-3HV), P4HB, P3HO a P(3HB-3HHx). Používajú sa ako kostné pletivá, osteosyntetické materiály, chirurgické stehy, a tiež sú vhodné pre koncept pomalého uvoľňovania liekov a hormónov [17].

Použitie P3HB v takýchto aplikáciách je z časti obmedzené svojou rýchlosťou biodegradácie a vysokou odolnosťou voči hydrolýze v sterilných tkanivách. Riešením je začlenenie hydroxyapatitových (HA) častíc do P3HB, čím vzniká bioaktívny a biologicky odbúrateľný kompozit, ktorý sa môže použiť pri tvorbe tkanív. Príkladom môže byť kombinácia hydroxyapatitu s P3HB alebo P(3HB-3HV), za vzniku kompozitov s podobnými mechanickými vlastnosťami, akými disponujú ľudské kosti [17].

Najväčší príspevok PHA do medicíny sa vyskytol v kardiovaskulárnej oblasti, v podobe perikardiálnych náplastí, arteriálnych augmentov, kardiologických stentov, cievnych štepov, srdcových chlopní, implantátov a tabliet, stehov a obvazov a nosičov s mikročasticami aktívnych látok. PHA vlákna sa tiež v súčasnej dobe využívajú na výrobu tampónov a obvazových materiálov [17].



Obrázok č. 4: Mikrobiálne intracelulárne polyhydroxyalkanoáty, štruktúry PHA dostupné v dostatočnom množstve pre biomedicínsky výskum a ich použitie v medicíne [1]

V závislosti od funkcie materiálu a jeho použitia sa menia aj požiadavky na vhodné štruktúry, napríklad biologicky odbúrateľný implantát môže byť hustý a neporézny alebo na druhej strane porézny s nízkou hustotou. Husté materiály sú využiteľné ako nervové vodičky a porézne materiály sa využívajú na výrobu tzv. lešení alebo „scaffoldov“ pre tkanivové inžinierstvo [21,22].

2.3 Nosičové systémy liečiv

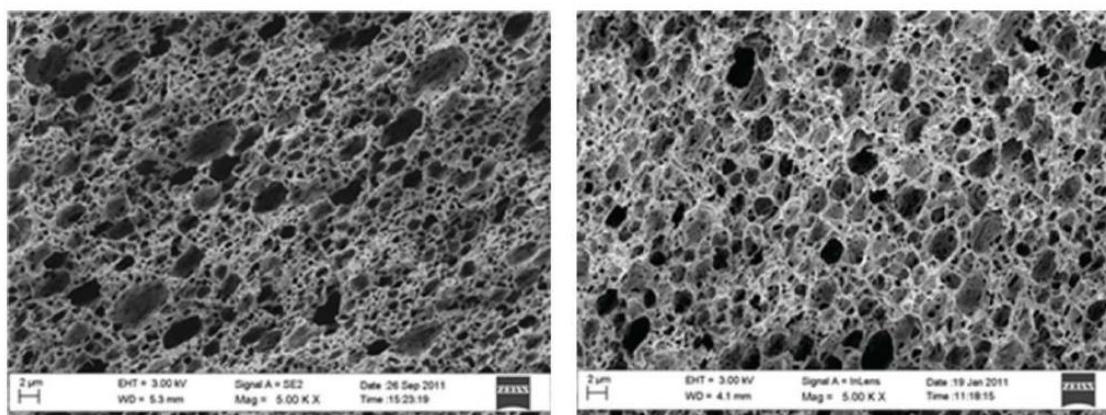
Nosičové systémy (NS) liečiv sú multifunkčné zariadenia, ktoré poskytujú uvoľňovanie aktívnych látok alebo liečiv, napríklad antibiotík v požadovaných koncentráciách, vyššiu biologickú dostupnosť liečiva, znižujú výskyt vedľajších účinkov liečiv, minimalizujú možnosť degradácie aktívnej látky, umožňujú zníženie dávkovania a dávkovacích frekvencií. Majú teda za cieľ zvýšiť biologickú dostupnosť aktívnej látky, ako aj jej kontrolované uvoľňovanie s ohľadom na čas a priestor. Biopolyestery, medzi ktoré patria aj PHA, sa vďaka biokompatibilite a biologickej odbúrateľnosti stali obrovskou skupinou potenciálnych kandidátov pre polymérnu maticu, používanú ako základ pre NS [23-25].

Povaha aktívnej látky použitej v NS a jej uvoľňovanie závisí od konkrétnej liečby a aplikácie. Vďaka možnosti výroby pórovitých materiálov z polyhydroxyalkanoátov, a tým pádom aj jednoduchším zakomponovaním molekúl aktívnych látok do týchto štruktúr, môžu byť v NS využité antibiotiká na liečbu alebo prevenciu infekcie, avšak tieto materiály nie sú obmedzené iba na jeden druh liečiva. Liečivom môže byť proteín, peptid, polysacharid, molekula nukleovej

kyseliny, syntetická látka alebo prírodné organické zlúčeniny. Percentuálne zaťaženie liečiva tiež závisí od liečby a požadovanej kinetiky uvoľňovania. Polyméry sú vhodné pre dávky liečiva na najmenej 33 %, aby sa zachovala ich pružnosť a dobré mechanické vlastnosti. Dĺžka uvoľňovania lieku môže byť riadená výberom liečiva, pričom sa mení dávka liečiva, tvar a konfigurácia materiálu NS [26].

2.3.1 Pórovité štruktúry

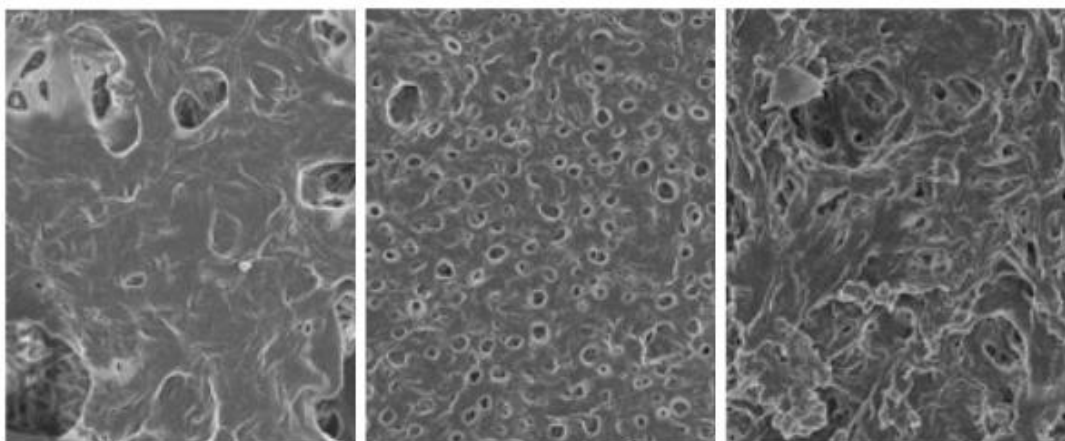
Výroba vysoko poréznych materiálov (obrázok č. 5) so vzájomne prepojenými pórami sa stretáva s veľkým záujmom v spojení s NS, pretože umožňujú prechod tekutiny a transport malých molekúl, ako sú živiny, liečiva alebo bioaktívne molekuly, do mäkkých tkanív a buniek. Ak sa materiál vytvorí makroporézne, bunky môžu prenikať cez štruktúry pórov. Ak sa materiál vyrába mikroporézne (s veľkosťou pórov niekoľko mikrometrov a menej), má potenciál slúžiť ako biokompatibilná dočasná bariéra zabraňujúca bunkovému rastu a napomáhajúca preprave látok do príľahlých mäkkých tkanív a buniek [12,15].



Obrázok č. 5: Pórovité štruktúry polyhydroxyalkanoátov [15]

V súčasnosti existuje niekoľko rôznych techník ako je vysolovanie, fázová separácia a iné štruktúrne techniky, na výrobu vysoko poréznych biologicky odbúrateľných materiálov. Veľkosť pórov sa môže meniť, ale vo všeobecnosti tieto techniky vedú k materiálom s makroporéznymi štruktúrami s veľkosťou od 10 do 500 µm [15,27].

Ďalšími technikami na výrobu pórovitých materiálov sú extrúzia pomocou napeňovacích aditív, ktoré indukujú pórovitosť, kompresné lisovanie s následným vylúhovaním častíc, lyofilizácia, technológia superkritických kvapalín s využitím oxidu uhličitého a ďalšie. Pri technikách výroby pórovitých materiálov v podobe filmov sa stretávame napríklad s procesom odlievania rozpúšťadla, pričom je možno týmto spôsobom vytvoriť štruktúru pripomínajúcu špongiu pri rýchlym odparení rozpúšťadla (obrázok č. 6), a naopak, pri pomalom odparení vytvoriť spomínaný pórovitý film [28,29].



Obrázok č. 6: Pórovité filmy PHA vyrobené metódou odlievania s rýchlym odparením rozpúšťadla [30]

2.3.2 Nanovlákná

Nosičové systémy liečiv využívajúce elektrospinningom vyrobené nanovlákná, boli vyvinuté v poslednom desaťročí 20. storočia najmä na aplikáciu v mnohých medicínskych oblastiach, ako sú tkanivové ‚scaffolds‘, antibakteriálne náplasti a protinádorová terapia. Scl-PHA vďaka svojej kryštalickosti a hydrofobite tvoria na svojom povrchu mnohé póry, ktoré vedú umožniť uvoľňovanie aktívnych látok zo svojich štruktúr bez akejkoľvek degradácie materiálu [22].

Najväčšou výhodou nanovláken je relatívne veľký merný povrch, vďaka čomu majú veľký styk, a tým aj veľkú reaktivitu s prostredím. V závislosti na materiáli, z ktorého sú vyrobené, vedú dobre prijímať vodu, nie sú iné látky na svojom povrchu, pri procese zvlákňovania sa dá upraviť ich pórovitosť, a tým môžu fungovať aj ako polopriepustné membrány a kryty otvorených rán. Do nanovláken je možné v priebehu zvlákňovacieho procesu alebo už na hotové nanovlákná inkorporovať liečivá, ktoré zlepšujú vlastnosti nanovláknenných vrstiev, a teda ich liečivý účinok [31,32].

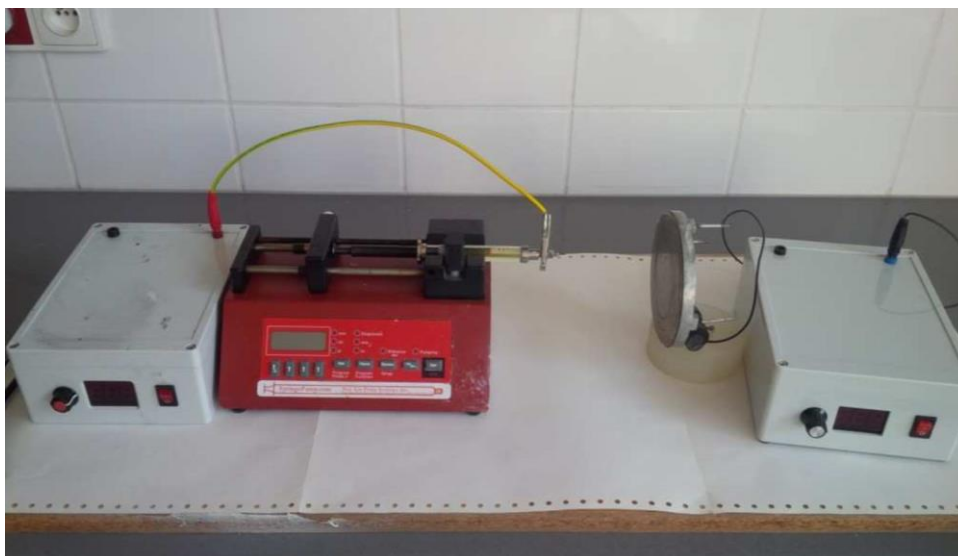
Výroba nanovláken môže prebiehať metódou založenou na tzv. samozoskupovaní malých častíc do nanovláken, fázovou separáciou, medzifázovou polymerizáciou, rýchlo iniciovanou polymerizáciou, metódou rastu vlákien podľa predlohy, metódou rastu vlákien z *g-l-g* fázy, a mnohými ďalšími, no v súčasnej dobe je najvyužívanejšou technikou na výrobu nanovláken elektrospinning – elektrostatické zvlákňovanie, aj vďaka svojej jednoduchosti a nízkym nákladom [33,34].

2.3.2.1 Elektrospinning

Elektrospinning je metóda, ktorá využíva na tvorbu polymérnych filamentov elektrostatickú silu, teda vytvára nanovlákná prostredníctvom elektricky nabitého prúdu polymérneho roztoku alebo polymérnej taveniny [35].

Proces elektrostatického zvlákňovania v najjednoduchšej podobe pozostáva zo striekačky obsahujúcej zvlákňovací polymérny roztok, z dvoch elektród a zdroja jednosmerného napätia. Na polymérnu kvapalinu sa aplikuje vysoké napätie, dôsledkom čoho sa v nej indukuje náboj, z kvapôčky na konci striekačky sa vytvára Taylorov kužeľ, z ktorého po prekročení kritického napätia začne vytekať prúd tekutiny. Tento prúd, teda vlákno, smeruje do oblasti s nižším

potenciálom a dopadá ako sieť vlákien na záporne nabitý alebo uzemnený terč (kolektor). Snímku zvlákňovacej sústavy zobrazuje obrázok č. 7 [35-37].



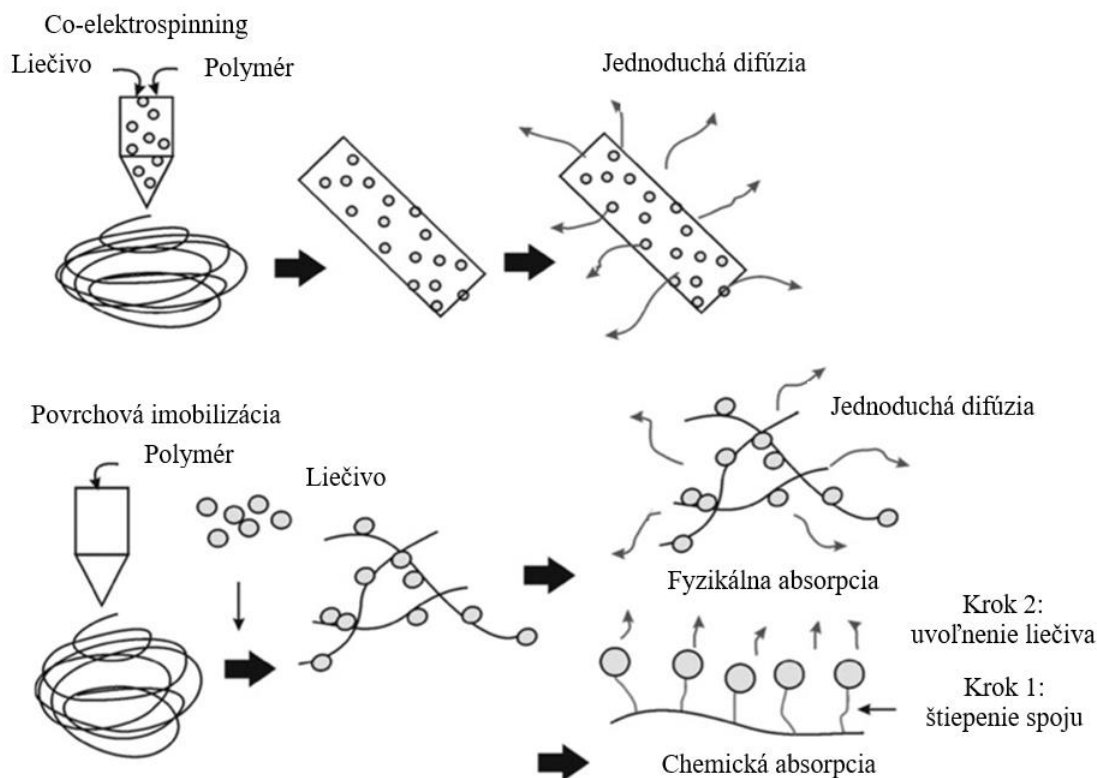
Obrázok č. 7: Stolný elektrostatický zvlákňovač (vlastný obrázok sústavy použitej pri bakalárskej práci)

Pri procese zvlákňovania treba dbať na niekoľko dôležitých zásad. Na rozpúšťanie polyméru by malo byť vybrané vhodné rozpúšťadlo, ktoré sa pri zvlákňovaní odparuje vhodnou rýchlosťou tak, aby si vzniknuté vlákna udržali celistvosť pri kontakte s kolektorom, no nevytvrдили sa skôr, než dosiahnu požadovaný rozsah rozmerov. Výsledný roztok polyméru a rozpúšťadla musí byť stabilný. Vo všeobecnosti platí, že pri veľmi nízkych koncentráciách polyméru v roztoku a nízkych hodnotách viskozity výsledného zvlákňovaného roztoku bude miesto elektrospinningu prebiehať elektrospraying. Viskozita a povrchové napätie daného rozpúšťadla nesmú byť príliš veľké, s čím súvisí aj napájanie sústavy, ktoré musí byť vhodné na prekonanie viskozity a povrchového napätia roztoku polyméru a udržanie prúdu zo striekačky. A tiež medzera medzi hrotom striekačky a uzemneným kolektorom by nemala byť príliš malá, pretože by mohlo dôjsť k iskreniu medzi oboma elektródami, no dostatočne veľká na odparenie rozpúšťadla v čase, kým nevzniknú vlákna [35-38].

Morfológia výsledných vlákien sa dá meniť množstvom parametrov, ktoré môžu byť rozdelené na parametre roztoku polyméru (viskozita, povrchové napätie, molekulová hmotnosť), procesné podmienky (aplikované napätie, teplota, vzdialenosť medzi hrotom a kolektorom) a okolité podmienky (vlhkosť, tlak) [35].

2.3.2.2 Inkorporácia aktívnej látky do nanovláken

Podľa typu začleneného liečiva, ako sú malé molekuly liekov, proteíny a gény sa líši aj prístup zavádzania aktívnej látky do nanovláken. Liečivá môžu byť zmiešané s roztokom polyméru, fyzikálne alebo chemicky povrchovo imobilizované, alebo nepriamo nanosené na nanovlátko. Spomínané techniky sú ilustrované na obrázku č. 8. Podľa typu začleňovania liečiva na nanovlátkna sa líši aj uvoľňovanie aktívnych látok z týchto štruktúr [39].



Obrázok č. 8: Schematický diagram jednoduchej metódy nanášania lieku do alebo na povrch nanovlákn a jeho kinetiky uvoľňovania [39]

Najjednoduchšia metóda inkorporácie lieku do nanovákna je rozpustenie lieku a polyméru v rovnakom rozpúšťadle a následný co-elektrospinning. Rozpustnosť liečiva v roztoku polyméru je jedným z hlavných faktorov rozhodujúcich o spôsobe nakladania NS s liekom [39,40].

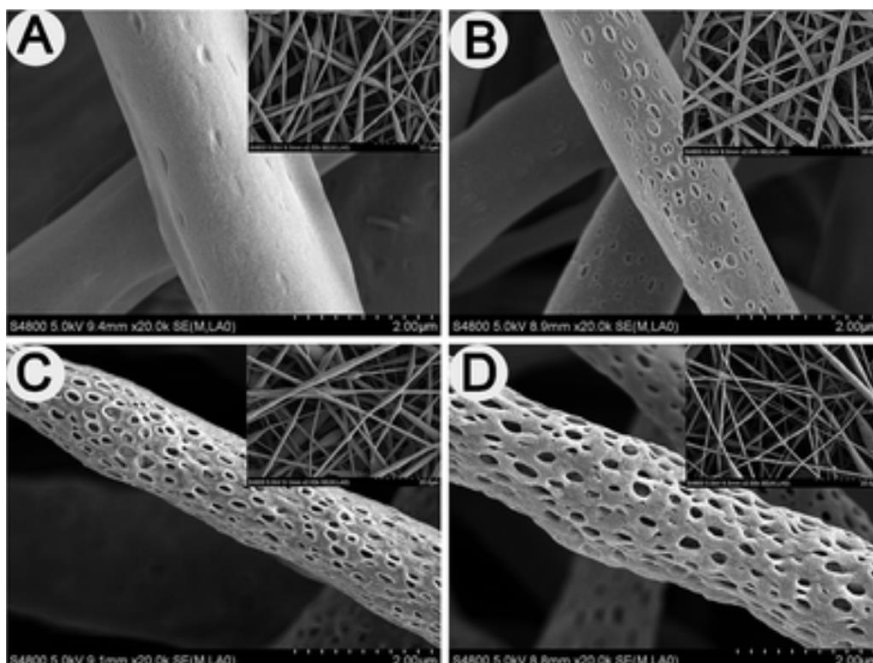
Fyzikálna a chemická povrchová imobilizácia liekov môže zabrániť denaturácii liečiv spôsobenému vysokým napätím alebo organickými rozpúšťadlami, pričom sa využije unikátneho charakteru vysokého pomeru povrchu k objemu nanovlákn. Táto metóda tiež umožňuje kontrolu množstva imobilizovaného liečiva riadením pomeru jeho dávkovania. Pri fyzikálnej absorpcii sú hlavnými silami, ktoré zachovávajú aktívne látky na nanovláknach elektrostatické interakcie, hydrofóbne interakcie, vodíkové väzby a van der Waalsove interakcie. Chemická modifikácia nanovláknenného povrchu amínovými, karboxylovými, hydroxylovými alebo tiolovými skupinami je ďalšou metódou imobilizácie liekov [39,40].

2.3.3 Pórovité nanovlákná

Pri tvorbe pórovitých nanovláknenných štruktúr procesom elektrospinningu (obrázok č. 9) okrem vlhkosti prostredia zohráva veľkú úlohu aj výber polyméru, rozpúšťadla a elektrospinningových podmienok. Existujú 3 typy pórovitosti nanovlákn vyrobených metódou elektrostatického zvlákňovania, a to povrchová, vnútorná a kombinovaná pórovitosť. Na vytvorenie povrchovej porozity sa využíva rozpúšťadlo s vysokým tlakom pár, kedy v dôsledku ochladzovania povrchu prúdu zvlákňovaného roztoku vodná para zo vzduchu na tomto povrchu kondenzuje a vytvára póry. Počet a veľkosť vytvorených pórov je redukovateľná zmenou vlhkosti pri procese zvlákňovania. Pri vysokej vlhkosti preniká vodná para do prúdu zvlákňovaného roztoku a spôsobuje fázové oddelenie, vytvára sa fáza bohatá na

polymér a fáza bohatá na rozpúšťadlo. Tento jav je ľahko dosiahnuteľný aj použitím zmesi dvoch rozpúšťadiel s rozličnou, ale vysokou výparnosťou. Zatiaľ, čo koncentrovaná fáza bohatá na polymér tuhne krátko po oddelení fáz a tvorí vlákno, fáza s nedostatkom polyméru vytvára póry. Tento typ fázovej separácie sa nazýva separácia fáz indukovaná parou (VIPS). Okrem tohto typu je možné použiť na výrobu pórovitých nanovláken metódu separácie fáz s nesolventnou indukciou (NIPS) alebo metódu tepelne indukovanej separácie fáz (TIPS). NIPS spočíva vo výmene rozpúšťadla s látkou, v ktorej sa polymér nerozpúšťa, v tomto prípade vlákna tuhnú súčasne, a teda obe látky (rozpúšťadlo a „nerozpúšťadlo“) musia byť úplne miesiteľné. TIPS nastáva, keď sa teplota roztoku polyméru rýchlo znižuje, a následne sa vytvárajú dve fázy – bohatá na polymér a bohatá na rozpúšťadlo [35,41-43].

Existujú aj ďalšie viackrokové metódy prípravy založené na pridávaní častíc, napríklad soľ, mikročastice, nanočastice alebo iné polyméry, do polymérnych roztokov, ktoré sú následne zvláknené. Pridané zložky sa z vytvorených vláken odstránia a vzniká porézna štruktúra [41].



Obrázok č. 9: Pórovité vlákna polypropylénkarbonátu (PPC)/poly(3-kaprolaktónu) (PCL) vytvorené metódou elektrospinningu obsahujúce: A 0, B 5, C 10, D 20 hm. % PCL [42]

3 CIELE PRÁCE

Cieľom tejto bakalárskej práce je príprava nanovlákných pórovitých morfológií na báze poly(3-hydroxybutyrátu) s prídavkom aktívnej látky a následné štúdium jej uvoľňovania. V rámci tejto práce boli plnené nasledovné úlohy:

1. Literárna rešerš na zadanú tému.
2. Príprava nanovláken na báze PHB metódou elektrostatického zvlákňovania a posúdenie ich morfológie metódou SEM.
3. Inkorporácia aktívnej látky do PHB nanovláken.
4. Štúdium vplyvu uvoľňovania aktívnej látky z pripravených nanovláken v závislosti na vytvorenej morfológií.
5. Stanovenie aktivity inkorporovanej látky v nanovláknach.
6. Vyhodnotenie výsledkov, diskusia a záver.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité mikroorganizmy, chemikálie, materiály a metódy

4.1.1 Použité mikroorganizmy

Za účelom stanovenia antimikrobiálnej aktivity samotnej aktívnej látky a neskôr aj pórovitých štruktúr s obsahom aktívnej boli na testovanie vybrané dva druhy baktérií zo skupiny gram-negatívnych baktérií, *Serratia marcescens* (CCM 8587) a *Escherichia coli* (CCM 7395), jeden druh gram-pozitívnych baktérií, *Micrococcus luteus* (CCM 1569), a jeden typ kvasiniek, *Candida glabrata* (CCM 8270). Všetky využité mikrobiálne kultúry pochádzajú z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne.

Serratia marcescens

Serratia marcescens je fakultatívne anaeróbna chemotrofná pohyblivá baktéria s krátkym tyčinkovitým tvarom z rodu *Enterobacteriaceae*. Patrí do skupiny gram-negatívnych nesporulujúcich baktérií, ktoré majú respiračný aj kvasný charakter. Vyskytuje sa prevažne vo vode a pôde, vytvára charakteristické červené kolónie a je rezistentná k niekoľkým antibiotikám, čo je spôsobené prítomnosťou R-faktorov [45,46].

U ľudí môže spôsobovať infekcie močových a dýchacích ciest, zriedkavejšie zápal vnútornej strany srdca, zápal pľúc, sepsu či infekciu kostí najmä u ľudí užívajúcich drogy intravenózne, a tiež u nemocničných pacientov s oslabenou imunitou [47].

Escherichia coli

Escherichia coli je fakultatívne anaeróbna baktéria tyčinkovitého tvaru z rodu enterobaktérií. Radí sa do skupiny gram-negatívnych baktérií, je jedným z najdôležitejších zástupcov črevnej mikroflóry a jej prítomnosť je potrebná pre správny priebeh tráviacich procesov v črevách. Pre hostiteľa je vďaka svojej produkcii vitamínu K prospešná, no jej prítomnosť vo vode je indikátorom fekálneho znečistenia [45,46].

Niektoré kmene tejto baktérie sú za určitých podmienok patogénne a môžu produkovať toxíny, ktoré spôsobujú hnačku či infekcie močového traktu [47].

Micrococcus luteus

Micrococcus luteus je striktne aeróbna gram-pozitívna nesporulujúca nepohyblivá koková baktéria guľovitého tvaru patriaca do rodu *Micrococcaceae*. Vyskytuje sa v zhlukoch alebo pároch a nemá bičíky. Je fyziologickou súčasťou mikroflóry cicavcov, dá sa nájsť na koži človeka, a tiež je bohato rozšírená vo vode, pôde a vo vzduchu [45,46].

Táto baktéria u človeka v mnohých prípadoch kolonizuje sliznice ústnej dutiny a horných dýchacích ciest, považuje sa za neškodnú, no v prípade zníženej imunity môže vyvolať infekcie alebo iné ochorenia ako je pneumónia, meningitída či endokarditída [49].

Candida glabrata

Candida glabrata patrí medzi kvasinky rodu *Candida*, ktoré sa v nízkych počtoch prirodzene nachádzajú v ústnej dutine, na koži alebo ako súčasť črevnej mikroflóry človeka. Bunky tejto

kvasinky majú prevažne oválny až pretiahnutý tvar a z dôvodu jej mnohopočetnej liekovej rezistencie je považovaná za patogén [46].

Je považovaná za pôvodcu pľúcnych hubových infekcií, často sa nachádza v urogenitálnom trakte a u pacientov s oslabeným imunitným systémom môže spôsobovať kandidózy, kandidémiu či problémy so zubnými protézami [50].

4.1.2 Chemikálie použité na kultiváciu mikroorganizmov

Nutrient Broth s 1% preptónom – HiMedia, India

Yeast Extract Powder – HiMedia, India

Monohydrát glukózy – p.a., Lach-Ner, Česká republika

Peptone – HiMedia, India

Agar Powder – HiMedia, India

LB Broth – Sigma, Česká republika

4.1.3 Ďalšie použité chemikálie a materiály

Destilovaná voda

Poly(3-hydroxybutyrát) – Nafigate Corporation a.s. ($M_w = 600$ kDa, $M_n \approx 400$ kDa), Česká republika

Chloroform stabilizovaný amylénom – p.a., Lach-Ner, Česká republika

Dichlórmetán – čistý, Penta, Česká republika

Levofloxacín – $\geq 98,0$ %, Sigma, Česká republika

Hydroxid sodný mikroperly – p.a., Lach-Ner, Česká republika

Dihydrogénfosforečnan draselný – p.a., Lach-Ner, Česká republika

Polyfenoly 1 – Fakulta chemická VUT, Česká republika

Polyfenoly 2 – Fakulta chemická VUT, Česká republika

Hliníková fólia

4.1.4 Použité metódy a pomôcky

Laminárny box Airstream – ESCO, Singapur

Laboratórne váhy SAS 50 – Scaltec, Veľká Británia

Analytické váhy HR-120 – Helago, Česká republika

Elektrostatický zvlákňovač

Viskozimeter Alpha H – Fungilab s.a., Španielsko

Elektrónový mikroskop Versa 3D – FEI, USA

Plazmový pokovovací prístroj Pt 5 nm

Temperovaná trepačka ES-20 – Biosan, Lotyšsko

UV-VIS Spektrofotometer S-220 – Boeco, Nemecko

Mikropipety

Laboratórne sklo

4.2 Kultivácia mikroorganizmov

Na kultiváciu bol použitý bakteriálny kmeň *Micrococcus luteus* zo skupiny gram-pozitívnych baktérií, bakteriálny kmeň *Serratia marcescens* a *Escherichia coli* patriace do skupiny gram-negatívnych baktérií a kvasinka *Candida glabrata*. Práca s týmito mikroorganizmami prebiehala v sterilnom boxe a kultúry boli očkované na tuhé a kvapalné médiá. Pred kultiváciou mikroorganizmov boli médiá vždy vysterilizované v tlakovom hrnci pri teplote 120 °C po dobu 30 minút. Kvapalné médiá v Erlenmeyerových bankách s objemom 50 ml boli zaočkované pred každým testom, prenesením jedného očka daného mikroorganizmu vykultivovaného na tuhom médiu. Takto zaočkované tuhé a kvapalné médiá boli premiestnené na temperovanú trepačku, kde pri 30 °C a po dobu 24 hodín prebiehala inkubácia.

4.2.1 Príprava médií

Na prípravu kvapalného média gram-negatívnej baktérie *Escherichia coli* bolo použité živné médium Luria Bertani (LB) Broth, so zložením:

Tryptone	10 g/l
Yeast Extract	5 g/l
NaCl	5 g/l

Príprava prebiehala podľa pokynov výrobcu. Na prípravu 100 ml kvapalného média boli navážené 2 g prášku, ktorý bol rozpustený v 100 ml destilovanej vody.

Pri príprave tuhého média bol navyše k navážke LB média pridaný agar. Na prípravu 100 ml tuhého média boli navážené 2 g prášku a 2 g agaru. Po sterilizácii bol horúci roztok ihneď vyliaty do Petriho misiek, kde sa nechal 20 minút tuhnúť.

Na prípravu kvapalného média gram-pozitívnej baktérie *Micrococcus luteus* a gram-negatívnej baktérie *Serratia marcescens* bolo použité živné médium Nutrient broth (NB) with 1% Peptone, so zložením:

Peptone	10 g/l
Beef extract	10 g/l
NaCl	5 g/l

Príprava prebiehala podľa pokynov výrobcu. Na prípravu 100 ml kvapalného média bolo navážených 2,5 g prášku, ktorý bol rozpustený v 100 ml destilovanej vody.

Pri príprave tuhého média bol navyše k navážke NB média pridaný agar. Na prípravu 100 ml tuhého média bolo navážených 2,5 g prášku a 2 g agaru. Po sterilizácii bol horúci roztok ihneď vyliaty do Petriho misiek, kde sa nechal 20 minút tuhnúť.

Na prípravu kvapalného média kvasinky *Candida glabrata* bolo použité Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD) médium, so zložením:

Yeast extract	10 g/l
Peptone	20 g/l
Glucose	20 g/l

Na prípravu 100 ml kvapalného média bol navážený 1 g extraktu z kvasníc, 2 g peptónu a 2 g glukózy, ktoré boli rozpustené v 100 ml destilovanej vody.

Pri príprave tuhého média bol navyše k navážke YPD média pridaný agar. Na prípravu 100 ml tuhého média bolo navážených 2,5 g prášku a 2 g agaru. Po sterilizácii bol horúci roztok ihneď vyliaty do Petriho misiek, kde sa nechal 20 minút tuhnúť.

4.3 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity aktívnych látok

Stanovenie antimikrobiálnej aktivity aktívnych látok prebiehalo formou jamkovej difúznej metódy na tuhom agarovom živnom médiu. Na základe výsledkov tejto metódy bola neskôr vybraná vhodná aktívna látka na jej inkorporáciu do vlákien.

4.3.1 Príprava roztokov aktívnych látok

Fosfátový tlmivý roztok s pH 7.4 bol pripravený nasledovne: do 250 ml odmernej banky bolo odmeraných 28 ml 0,2 M roztoku hydroxidu sodného, ktorý bol pripravený navážením hydroxidu sodného (0,8 g) a rozpustením v destilovanej vode (100 ml), 62,5 ml 0,2 M roztoku dihydrogénfosforečnanu draselného, ktorý bol pripravený navážením dihydrogénfosforečnanu draselného (2,721 8 g) a rozpustením v destilovanej vode (100 ml). Objem bol doplnený destilovanou vodou (159,5 ml) po risku. Takto pripravený tlmivý roztok bol spolu s destilovanou vodou sterilizovaný v tlakovom hrnci pri 120 °C po dobu 30 minút [51].

Štandardný roztok aktívnej látky – Levofloxacínu s koncentráciou 1 g/l bol pripravený navážením Levofloxacínu (0,05 g) a rozpustením vo fosfátovom tlmivom roztoku (50 ml). Tento roztok bol ďalej riedený za vzniku roztoku s koncentráciou 0,8 g/l.

Vzorky polyfenolov boli pripravené navážením a rozpustením príslušného množstva vzorky v 1 ml vysterilizovanej destilovanej vody. V prípade vzorky polyfenoly 1 bola navážka 0,104 2 g, pri vzorke polyfenoly 2 bola navážka 0,118 9 g.

4.3.2 Jamková difúzna metóda

Na Petriho misky s tuhým médiom bola naočkovaná 24 hodinová kultúra mikrobiálnych buniek. Na agarovú platničku bolo napipetovaných vždy 100 µl tekutého média s obsahom danej mikrobiálnej kultúry, ktoré boli rozotreté sterilnou hokejkou po povrchu. Misky boli následne ponechané asi 20 minút stáť. Do takto pripravených Petriho misiek bolo sterilným skleneným korkovrtom vyhlbených 6 jamiek. Do štyroch jamiek bolo napipetovaných 100 µl z každej vzorky aktívnej látky a do jednej jamky bolo napipetovaných 100 µl čistého rozpúšťadla bez prídavku aktívnej látky. Postup bol pre každú mikrobiálnu kultúru zopakovaný dvakrát. Petriho misky boli následne inkubované po dobu 24 hodín pri teplote 37 °C. Nakoniec bola zmeraná veľkosť inhibičných zón a zhotovená fotodokumentácia jednotlivých Petriho misiek.

4.4 Zvlákňovanie P3HB na zhodnotenie morfológie

4.4.1 Príprava pracovných roztokov

Poly(3-hydroxybutyrát) (5 g) bol navážený a rozpustený v zmesi dichlórmetánu a chloroformu v pomere 1:1, 1:2 a 1:3 (45 g), čím bol vytvorený 10% roztok. Príprava prebiehala v uzavretej hrubostennej sklenej fľaši s tlakovým uzáverom, ktorá bola so zmiešanými látkami vložená do

vyhriatej laboratórnej sušiarne na 80 °C. Počas zhruba hodiny zahrievania vznikol viskózný roztok, ktorý bol ďalej riedený na požadované koncentrácie. Toto riedenie zahŕňa tabuľka č. 1.

Tabuľka č. 1: Riedenie 10% roztoku P3HB

Koncentrácia roztoku (hm. %)	Hmotnosť 10% roztoku (g)	Hmotnosť rozpúšťadla (g)
8	4,0	1,0
5	2,5	2,5
4	2,0	3,0
2	1,0	4,0
1	0,5	4,5

4.4.2 Charakterizácia roztokov

Pripravené roztoky boli charakterizované zmeraním dynamickej viskozity pri teplote 20 °C a následne boli zvláknené.

4.4.3 Zvlákňovanie roztokov

Zvlákňovanie prebiehalo na stolnom elektrostatickom zvlákňovači (sústava zariadení na elektrospinning). Táto sústava obsahuje kladný zdroj jednosmerného vysokého napätia, ktorý umožňuje prácu v rozpätí 0 až 25 kV, a zdroj záporného jednosmerného vysokého napätia, ktorý umožňuje prácu v rozmedzí 0 až -15 kV. Kladné napätie je napojené na ihlu injekčnej striekačky nachádzajúcej sa na lineárnom dávkovači, ktorý umožňuje kontinuálny prietok zvlákňovaného roztoku. Záporné napätie je zavedené na kovový kolektor – kovový terč s priemerom 10 cm. Tento kolektor je pokrytý podporným materiálom, hliníkovou fóliou, na ktorej sa zachytáva vzniknutý zvláknený materiál.

Do injekčnej striekačky s veľkosťou 10 ml boli nabrané 2 ml roztoku a striekačka bola uchytená na lineárny dávkovač. Bola upravená vzdialenosť od konca ihly, ktorá slúžila ako zvlákňovacia elektróda, po kolektor na 20 cm. K obom elektródam, ihla a kovový terč, boli pripevnené svorky s elektrickým napätím. Na ihlu bolo privádzané kladné napätie 15 kV, na kovový kolektor bolo privádzané záporné napätie -5 kV. Zapojenie zvlákňovacej sústavy bolo skontrolované, bolo zapnuté dávkovanie a po vytvorení prvej kvapôčky zvlákňovaného roztoku na konci ihly boli zapnuté zdroje napätia. Nastavenia procesu sa pri jednotlivých zvlákňovaniach nemenili a sú uvedené v tabuľke č. 2.

Tabuľka č. 2: Parametre laboratórnej prípravy vlákien

Elektródová vzdialenosť (cm)	Priemer striekačky (cm)	Priemer ihly (mm)	Napätie (kV)	Prietok (µl/min)	Materiál kolektoru
20,0 ± 0,1	1,8	1,0	20,0 ± 0,1	100	hliníková fólia

Po vyčerpaní zvlákňovaného roztoku bolo vypnuté napätie a dávkovač, bola premytá striekačka s ihlou, bola odobraná hliníková fólia so zvlákneným materiálom, ktorá bola uchovaná na ďalšie úkony a zvlákňovacia sústava bola pripravená na zvláknenie ďalších roztokov.

4.4.4 Charakterizácia nanovlákných štruktúr

Morfológia výsledných štruktúr vzniknutých zvláknením bola charakterizovaná a vyhodnotená. Všetky vzorky boli pozorované elektrónovou mikroskopiou, boli vytvorené snímky, z ktorých boli pomocou softwaru ImageJ získané distribúcie priemeru vláken a pórov, a priemerné hrúbky vláken a priemery pórov. Po vyhodnotení boli vybrané vhodné štruktúry, ktoré boli použité na inkorporáciu aktívnej látky.

4.5 Zvláknovanie P3HB s prídavkom aktívnej látky

4.5.1 Príprava pracovných roztokov

Príslušné množstvá poly(3-hydroxybutyrátu) boli navážené a rozpustené v zmesi rozpúšťadiel dichlórmetánu a chloroformu v pomere 1:1 a 1:2, a boli vytvorené tri roztoky s rôznou koncentráciou podľa tabuľky č. 3. Príprava prebiehala podobne ako je uvedené v odseku 4.4.1. Po dostatočnom ochladení vzniknutých viskózných roztokov bolo do každého z nich pridané príslušné množstvo aktívnej látky na koncentráciu 1 hm. %.

Tabuľka č. 3: Príprava roztokov s prídavkom aktívnej látky

Koncentrácia roztoku (hm. %)	Pomer rozpúšťadiel (DCM:CHCl ₃)	Hmotnosť P3HB (g)	Hmotnosť zmesi rozpúšťadla (g)
5	1:1	5	95
1	1:1	1	99
4	1:2	4	96

4.5.2 Zvláknovanie roztokov

Zvláknovanie prebiehalo na elektrostatickom zvláknovači, ako kolektor bol použitý kovový terč s priemerom 10 cm, ktorý bol pokrytý hliníkovou fóliou. Do injekčnej striekačky bolo nabraňých 10 ml zvláknovaného roztoku P3HB s prídavkom antibiotika a ďalší postup bol rovnaký ako v časti 4.4.3, pričom bolo zvláknovanie každého roztoku prevedené dvakrát.

4.5.3 Charakterizácia nanovlákných štruktúr

Morfológia výsledných štruktúr vzniknutých zvláknením roztoku P3HB s prídavkom antibiotika bola charakterizovaná elektrónovou mikroskopiou, pomocou ktorej boli vytvorené snímky týchto štruktúr.

4.6 Zhotovenie kalibračnej krivky pre štúdium uvoľňovania aktívnej látky z nanovlákných štruktúr

4.6.1 Príprava zásobných roztokov

Bol pripravený roztok hydroxidu sodného s koncentráciou 0,2 M navážením hydroxidu sodného (0,8 g) a rozpustením v destilovanej vode (100 ml), a roztok dihydrogénfosforečnanu draselného s koncentráciou 0,2 M navážením dihydrogénfosforečnanu draselného (2,721 8 g) a rozpustením v destilovanej vode (100 ml) [51].

Na štúdium uvoľňovania aktívnej látky z pórovitých štruktúr bol využívaný fosfátový tlmivý roztok s pH 7,4, ktorý bol pripravený nasledovne: do 250 ml odmernej banky bolo odmeraných

28 ml 0,2 M roztoku hydroxidu sodného, 62,5 ml 0,2 M roztoku dihydrogénfosforečnanu draselného a objem bol doplnený destilovanou vodou (159,5 ml) po risku [51].

Štandardný roztok aktívnej látky – Levofloxacínu s koncentráciou 1 g/l bol pripravený navážením Levofloxacínu (0,05 g) a rozpustením vo fosfátovom tlmivom roztoku (50 ml). Z tohto roztoku bol odobraný 1 ml a do 100 ml odmernej banky bol doplnený po risku fosfátovým tlmivým roztokom, za vzniku druhého štandardného roztoku Levofloxacínu s koncentráciou 10 µg/ml [51].

4.6.2 Príprava roztokov kalibračnej krivky

Boli vytvorené roztoky kalibračnej rady Levofloxacínu v desiatich rôznych koncentráciách nasledovne: druhý štandardný roztok Levofloxacínu s koncentráciou 10 µg/ml bol zriedený na požadované koncentrácie (riedenie zobrazuje tabuľka č. 4) za vzniku desiatich roztokov s koncentraciami 1 až 10 µg/ml.

Tabuľka č. 4: Riedenie roztoku Levofloxacínu

č. roztoku	Objem roztoku Levofloxacínu (ml)	Objem fosfátového pufru (ml)	Výsledná koncentrácia (µg/ml)
1	0,1	0,9	1
2	0,2	0,8	2
3	0,3	0,7	3
4	0,4	0,6	4
5	0,5	0,5	5
6	0,6	0,4	6
7	0,7	0,3	7
8	0,8	0,2	8
9	0,9	0,1	9
10	1,0	0	10

4.6.3 Zhotovenie kalibračnej krivky

Kalibračné roztoky boli podrobené UV-VIS spektrofotometrií. Absorbancie týchto roztokov boli zmerané proti slepej vzorke, ktorou bol fosfátový tlmivý roztok, pri 292 nm. Pre každý roztok bolo meranie opakované 3-krát a zo získaných údajov bol urobený priemer, štandardná odchýlka a kalibračná krivka v programe Excel. Pre meranie bola použitá kremenná kyveta s dĺžkou optickej dráhy 1 cm a vonkajšími rozmermi 12,5 x 12,5 x 45 mm [51].

4.7 Štúdium vplyvu uvoľňovania aktívnej látky z pripravených nanovláknenných štruktúr v závislosti od vytvorenej morfolologickej štruktúry

4.7.1 Príprava vzoriek

Z vytvorených vláknitých štruktúr s prídavkom antibiotika boli vystrihnuté vzorky v tvare štvorca s rozmermi 1 x 1 cm, ktorých hmotnosť bola odvážená na analytických váhach a zapísaná. Odvážené vzorky boli umiestnené do sklenených vialiek a zaliate 1,5 ml fosfátového tlmivého roztoku. Pre každú koncentráciu zvláknovaného roztoku bol postup

prevádzaný trikrát. Takto pripravené vzorky boli neskôr použité na meranie uvoľňovania antibiotika z vláknitých štruktúr do fosfátového tlmivého roztoku.

4.7.2 Meranie uvoľňovania aktívnej látky a stanovenie účinnosti jej enkapsulácie do vzorky

Boli odoberané vzorky fosfátového tlmivého roztoku vo vopred určených časových intervaloch, ktoré boli premeriavané na UV-VIS spektrofotometri pri 292 nm, ako slepá vzorka bol použitý čistý fosfátový tlmivý roztok. Na meranie bola používaná kremenná kyveta s dĺžkou optickej dráhy 1 cm a vonkajšími rozmermi 12,5 x 12,5 x 45 mm. Po každom meraní boli vzorky ponechané na temperovanej trepačke pri 37 °C a 180 rpm [51].

Účinnosť enkapsulácie antibiotika bola stanovená spektrofotometricky zo vzoriek abiotickou hydrolýzou vo fosfátovom pufri pri teplote 85 °C po dobu 21 dní.

4.8 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity inkorporovanej látky v nanovláknach

Stanovenie antimikrobiálnej aktivity prebiehalo agarovou difúznou metódou.

4.8.1 Príprava vzoriek

Z pripravených vrstiev vláken s prídavkom antibiotika s koncentráciou P3HB a pomerom rozpúšťadiel 1 % 1:1, 4 % 1:2 a 5 % 1:1 boli vystrihnuté krúžky s priemerom 13 mm.

4.8.2 Agarová difúzna metóda

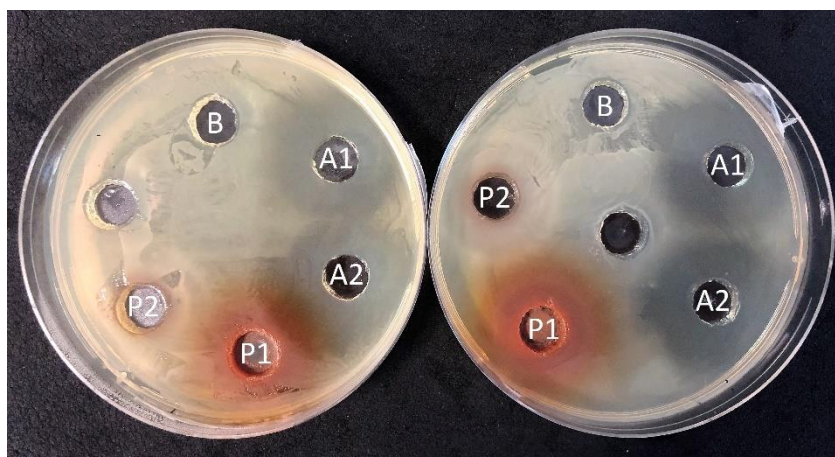
Na Petriho misky s tuhým médiom bola naočkovaná 24 hodinová kultúra mikrobiálnych buniek napipetovaním vždy 100 µl tekutého média s obsahom danej mikrobiálnej kultúry, ktoré boli rozotreté sterilnou hokejkou po povrchu. Misky boli následne ponechané asi 20 minút stáť. Na takto pripravené Petriho misky boli pokladané vystrihnuté vzorky vláken tak, aby každá obsahovala tri vzorky vláken z 1% a 4% roztoku P3HB a jednu vzorku z 5% roztoku P3HB. Následne boli všetky vzorky popritláčané, aby mohla prebehnúť difúzia. Tento postup bol zopakovaný pre každú mikrobiálnu kultúru. Petriho misky boli následne inkubované po dobu 24 hodín pri teplote 37 °C. Nakoniec bola zmeraná veľkosť inhibičných zón a zhotovená fotodokumentácia jednotlivých Petriho misiek.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity aktívnych látok a výber aktívnej látky pre inkorporáciu do P3HB vláken

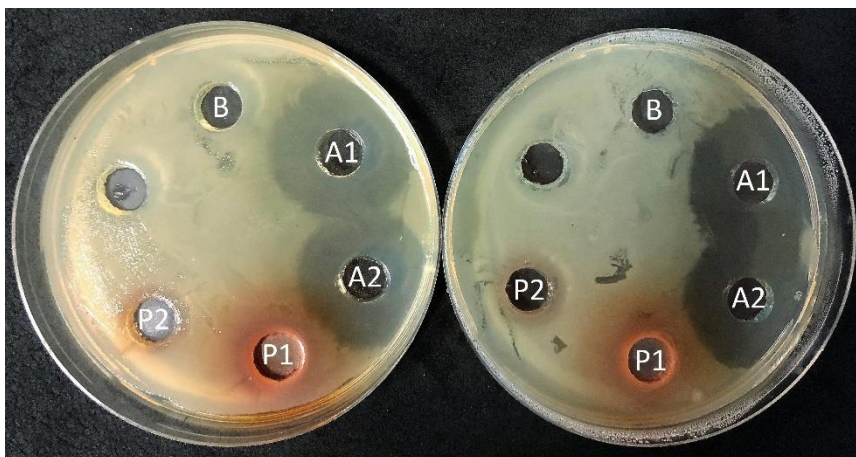
Boli testované 3 aktívne látky: polyfenoly 1, polyfenoly 2 a Levofloxacín. Na stanovenie antimikrobiálnej aktivity týchto látok bola využitá jamková difúzna metóda a pre každý mikroorganizmus (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*, *Candida glabrata*) bola metóda opakovaná dvakrát. Boli odmerané veľkosti utvorených inhibičných zón, urobené fotografie jednotlivých pokusov a údaje zo všetkých pokusov boli spracované do tabuľky č. 5.

Na obrázku č. 10 je ukážka sledovania antimikrobiálnej aktivity aktívnych látok voči bakteriálnemu kmeňu *Escherichia coli*. Je viditeľné, že v prípade tejto gram-negatívnej baktérie vykazuje silný antimikrobiálny účinok antibiotikum v oboch koncentráciách, s veľkosťou inhibičných zón 9 ± 1 mm a 7 ± 1 mm. Slabší, ale viditeľný účinok, bol taktiež pozorovaný pri vzorke polyfenoly 2 s veľkosťou inhibičnej zóny 1 ± 1 mm.



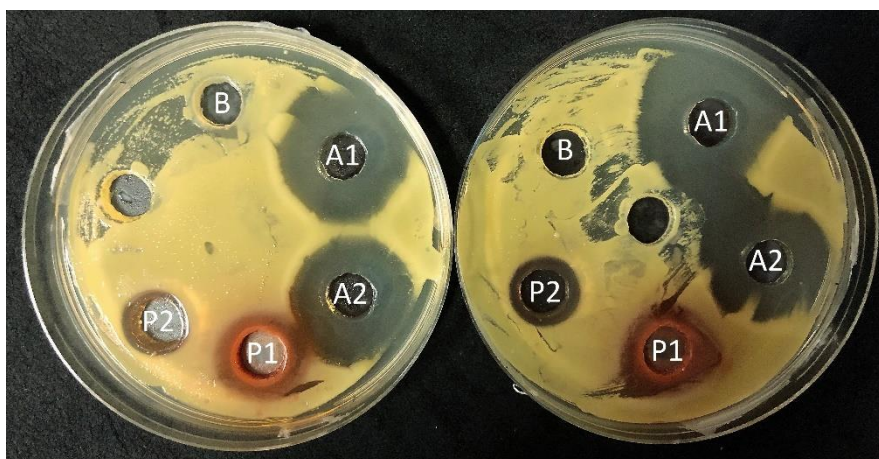
Obrázok č. 10: Ukážka sledovania antimikrobiálnej aktivity voči bakteriálnemu kmeňu *Escherichia coli*: B – slepá vzorka, A1 – Levofloxacín s koncentráciou 1 g/l, A2 – Levofloxacín s koncentráciou 0,8 g/l, P1 – polyfenoly 1, P2 – polyfenoly 2.

Obrázok č. 11 zobrazuje sledovanie antimikrobiálnej aktivity aktívnych látok voči gram-negatívnej baktérii *Serratia marcescens*, na ktorú má inhibičný účinok rovnako ako u predošlej gram-negatívnej baktérie, *Escherichia coli*, antibiotikum v oboch koncentráciách s veľkosťou inhibičných zón 10 ± 1 mm a 9 ± 1 mm. Antimikrobiálna aktivita v tomto teste nebola pozorovaná pri žiadnej vzorke polyfenolov.



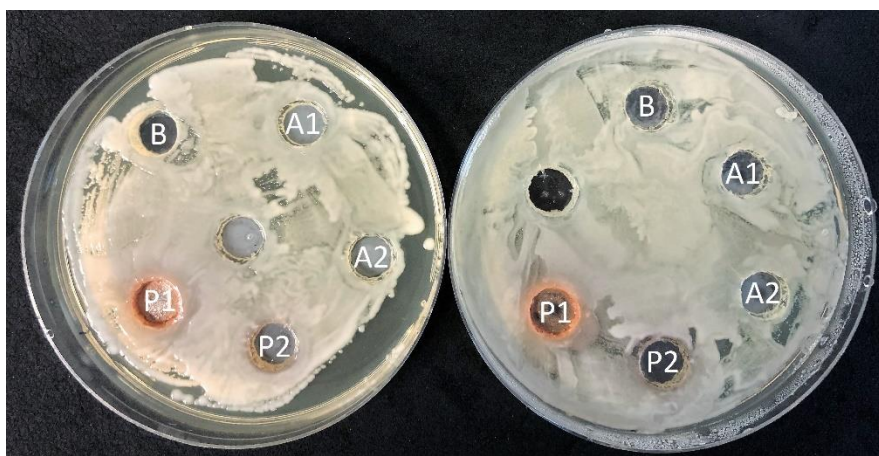
Obrázok č. 11: Ukážka sledovania antimikrobiálnej aktivity voči bakteriálnemu kmeňu *Serratia marcescens*: B – slepá vzorka, A1 – Levofloxacín s koncentráciou 1 g/l, A2 – Levofloxacín s koncentráciou 0,8 g/l, P1 – polyfenoly 1, P2 – polyfenoly 2.

Obrázok č. 12 zobrazuje ukážku sledovania antimikrobiálnej aktivity aktívnych látok voči bakteriálnemu kmeňu *Micrococcus luteus*, ktorý patrí medzi gram-pozitívne baktérie. V tomto prípade mali inhibičný účinok všetky testované aktívne látky, pričom najväčší účinok má práve Levofloxacín v oboch koncentráciách s veľkosťou inhibičných zón 9 ± 1 mm a 7 ± 1 mm. Pri vzorkách polyfenolov bola veľkosť inhibičných zón zhodná, a to 2 ± 1 mm.



Obrázok č. 12: Ukážka sledovania antimikrobiálnej aktivity voči bakteriálnemu kmeňu *Micrococcus luteus*: B – slepá vzorka, A1 – Levofloxacín s koncentráciou 1 g/l, A2 – Levofloxacín s koncentráciou 0,8 g/l, P1 – polyfenoly 1, P2 – polyfenoly 2

Sledovanie antimikrobiálnej aktivity aktívnych látok voči kvasinke *Candida glabrata* zobrazuje obrázok č. 13. Z tejto snímky je zjavné, že na kvasinku nepôsobí antibiotikum ani polyfenoly 1, no v prípade vzorky polyfenoly 2 bola pozorovaná inhibičná zóna s veľkosťou 1 ± 1 mm.



Obrázok č. 13: Ukážka sledovania antimikrobiálnej aktivity voči kvasinke *Candida glabrata*: B – slepá vzorka, A1 – Levofloxacín s koncentráciou 1 g/l, A2 – Levofloxacín s koncentráciou 0,8 g/l, P1 – polyfenoly 1, P2 – polyfenoly 2

Tabuľka č. 5: Zhrnutie veľkosti inhibičných zón u jednotlivých mikroorganizmov, 0 – žiadna inhibičná zóna; rozmery sú udávané v mm

vzorka	<i>E. coli</i>			<i>S. marcescens</i>		
	1	2	priemer	1	2	priemer
A1	9	9	9 ± 1	10	10	10 ± 1
A2	7	7	7 ± 1	9	9	9 ± 1
P1	0	0	0	0	0	0
P2	1	1	1 ± 1	0	0	0
	<i>M. luteus</i>			<i>C. glabrata</i>		
A1	9	9	9 ± 1	0	0	0
A2	7	7	7 ± 1	0	0	0
P1	2	2	2 ± 1	0	0	0
P2	2	2	2 ± 1	1	1	1 ± 1

Výsledkom týchto experimentov bol výber vhodnej aktívnej látky na inkorporáciu do P3HB vlákien, ktorou je antibiotikum, vďaka svojim účinkom na jednotlivé bakteriálne kultúry. Tiež bola vybraná aj vhodná koncentrácia Levofloxacínu, a to 1 g/l, na základe výskumu skupiny doktora C. V. Nachiyara, v ktorom bolo sledované uvoľňovanie Levofloxacínu s koncentráciou práve 1 g/l z nanočastíc poly(3-hydroxybutyrátu) [52].

5.2 Charakterizácia roztokov a pripravených P3HB nanovláken

5.2.1 Príprava pórovitých štruktúr

Na získanie pórovitých štruktúr metódou elektrostatického zvlákňovania bola použitá zmes rozpúšťadiel, a to chloroformu a dichlórmetánu, kvôli ich rozličnej výparnosti, vďaka čomu je možné vytvoriť rôzne morfológie zvlákneného materiálu. Princiálne sa pri tvorbe vlákna prednostne odparuje chloroform a vzniká vlákno s obsahom dichlórmetánu. Následne pred dopadom vytvoreného vlákna na kolektor sa postupne vyparuje aj dichlórmetán a vo vlákne po sebe zanechá rôznu pórovitú štruktúru v závislosti od pomeru rozpúšťadiel.

5.2.2 Dynamická viskozita pripravených roztokov

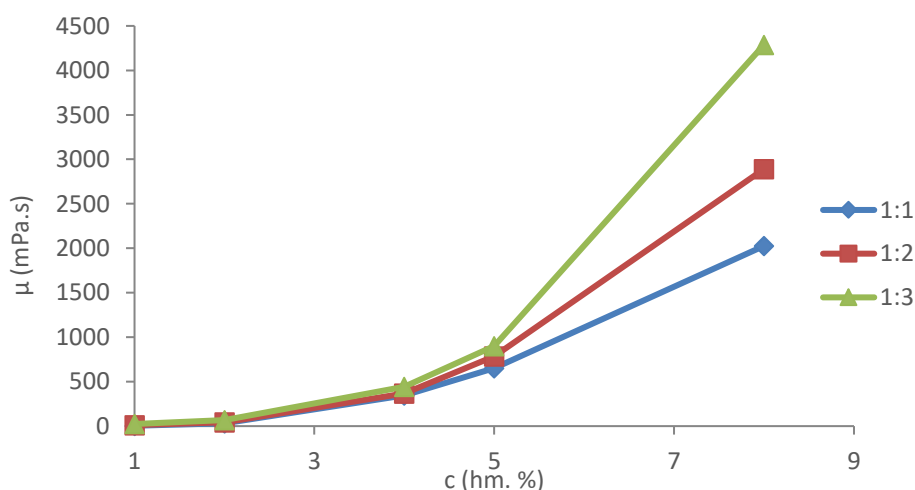
Pripravené roztoky poly(3-hydroxybutyrátu) boli charakterizované zmeraním viskozity, ktorej hodnoty pre jednotlivé roztoky sú uvedené v tabuľke č. 6. Z týchto hodnôt bola vytvorená grafická závislosť viskozity na koncentrácií (obrázok č. 14) pre všetky zriedené roztoky.

Z grafu závislosti dynamickej viskozity na koncentrácií roztokov vyplýva, že so zvyšovaním objemu chloroformu v zmesi rozpúšťadiel sa zvyšovala aj dynamická viskozita roztokov, čo je spôsobené vyššou hodnotou dynamickej viskozity čistého chloroformu, ktorá je pri teplote 20 °C udávaná ako 0,57 mPa·s. Dynamická viskozita dichlórmetánu je pri 20 °C udávaná ako 0,43 mPa·s [53,54].

Pri meraní bolo taktiež zistené, že so stúpajúcou viskozitou a koncentráciou polyméru v roztoku narastal nielen priemer vlákien a pórov, ale tiež samotné zvlákňovanie bolo pri koncentráciách 5 a 8 hm. % zložitejšie z dôvodu hromadenia a tuhnutia roztoku už na hrote ihly injekčnej striekačky, a nie na kolektore. Pri roztokoch s vysokými koncentráciami, a teda aj s vysokými hodnotami dynamickej viskozity nedochádzalo k tvorbe Taylorovho kužeľa.

Tabuľka č. 6: Hodnoty viskozity zriedených roztokov

Pomer zmesi rozpúšťadiel	1:1	1:2	1:3
c (hm. %)	μ (mPa·s)	μ (mPa·s)	μ (mPa·s)
1	4	11	24
2	32	44	67
4	346	368	443
5	652	785	898
8	2026	2891	4288



Obrázok č. 14: Graf závislosti viskozity na koncentrácií roztokov

5.2.3 Charakterizácia pripravených nanovláknenných štruktúr metódou SEM

Pripravené vláknité pórovité štruktúry boli charakterizované metódou SEM, pomocou ktorej boli vytvorené snímky. Podľa týchto snímok boli vzniknuté štruktúry rozdelené podľa prevládajúcich javov na póry a vlákna, a boli zmerané hodnoty ich priemerov. Zo zmeraných

údajov boli vytvorené distribúcie priemerov pórov a distribúcie priemerov vláken v jednotlivých štruktúrach. Tieto údaje spolu so SEM snímkami štruktúr meraných vzoriek sú pri zodpovedajúcich kapitolách zhrnuté na obrázkoch č. 15 až 54.

So stúpajúcou viskozitou sa zväčšoval aj priemer vláken a pórov, ktorých veľkosti boli v ráde submikrónov až mikrónov. V tejto súvislosti bola tiež pozorovaná aj tvorba odlišných pórovitých štruktúr naprieč rôznymi koncentraciami vzoriek, no aj v rámci daných koncentrácií v rôznych pomeroch rozpúšťadiel, ktoré boli medzi sebou porovnávané. Pri 1% a 2% roztokoch P3HB vznikali prevažne pórovité kompaktné štruktúry, v ktorých sa v rámci danej koncentrácie vo všetkých pomeroch rozpúšťadiel so stúpajúcou viskozitou objavovali aj vlákna. Pri 4% vzorkách bola situácia obdobná, no podiel pórovitých štruktúr a vláken bol v rámci všetkých pomerov rozpúšťadiel tejto koncentračnej skupiny na pohľad porovnateľný. V prípade zvláknených 5% roztokov bol vo vzorkách prítomný väčší počet vláken ako súvislých pórovitých vrstiev a pri 8% roztokoch P3HB s najvyššími hodnotami viskozít prevládala tvorba prevažne vláken s najväčšími priermi zo všetkých zvláknených materiálov, pričom bola tiež pozorovaná tvorba pórovitých vláken.

V rámci porovnania veľkostí priemerov pórov a vláken jednotlivých rodín tvorených rovnakým pomerom zmesi rozpúšťadiel (t. j. 1:1, 1:2, 1:3), v ktorých boli rôzne koncentrácie P3HB rozpustené môžeme povedať, že až na malé odchýlky spôsobené nejednotnými podmienkami pri meraní v programe ImageJ, vznikali so zvyšujúcim sa objemom chloroformu aj väčšie priemery sledovaných objektov.

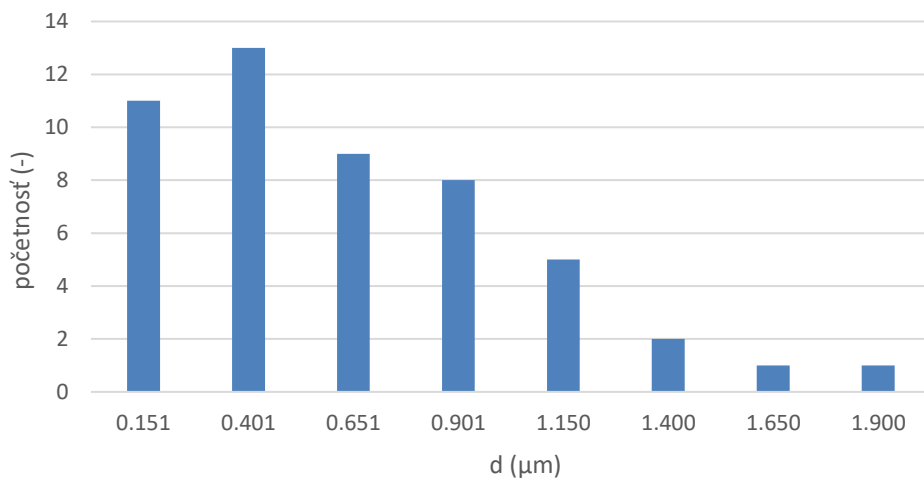
Cieľom týchto experimentov bolo nájsť najvhodnejšie štruktúry pre inkorporáciu aktívnej látky podľa predpokladu, že výskyt pórov umožní lepšie fyzikálne uchytenie tejto látky, a tým aj odliši uvoľňovanie z vybraných štruktúr.

5.2.3.1 Nanovláknenné štruktúry P3HB v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:1

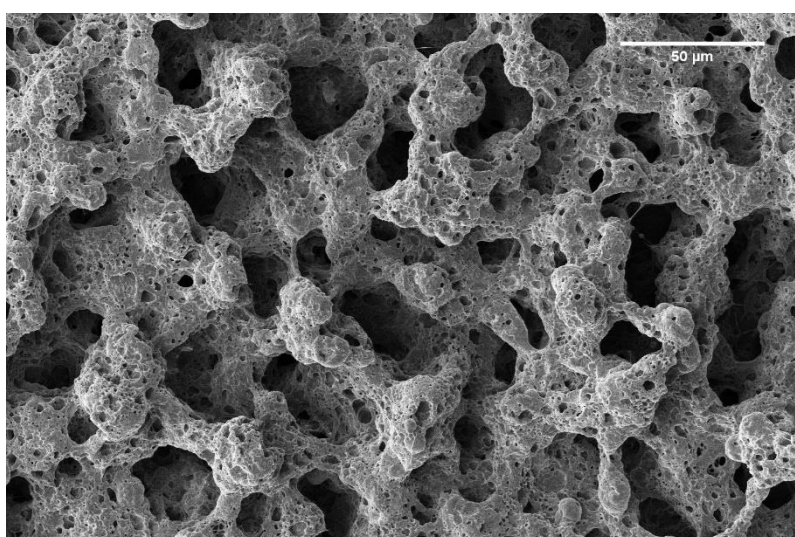
V prípade zvláknovania P3HB v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:1 vznikali pórovité štruktúry z roztoku s koncentraciou 1, 2 a 4 hm. %. Pri 1% roztoku bol pozorovaný vznik kompaktnej pórovitej vrstvy pripomínajúcej hubku, bez prítomnosti vláken. Z 2% roztoku vznikla pórovitá štruktúra s vláknami, ktoré mali najmenšie stredné hodnoty priemerov a rovnako aj pri 4% roztoku. So zvyšujúcou sa koncentraciou sa nevyskytovali póry ale vznikali vlákna, ktorých priemery sa zvyšovali so zvyšujúcou sa koncentraciou a viskozitou roztokov. Stredné hodnoty priemerov pórov aj vláken sú uvedené v tabuľke č. 7.

Tabuľka č. 7: Stredné hodnoty priemerov pórov a vláken

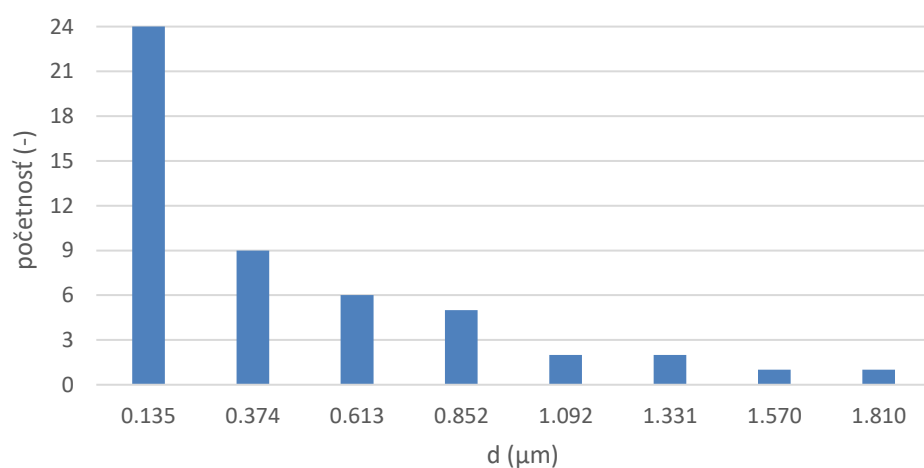
c (hm. %)	Stredná hodnota priemeru pórov (μm)	Stredná hodnota priemeru vláken (μm)
1	$0,766 \pm 0,446$	
2	$0,573 \pm 0,428$	$0,346 \pm 0,206$
4	$0,747 \pm 0,225$	$1,477 \pm 0,541$
5		$1,416 \pm 0,158$
8		$4,186 \pm 0,354$



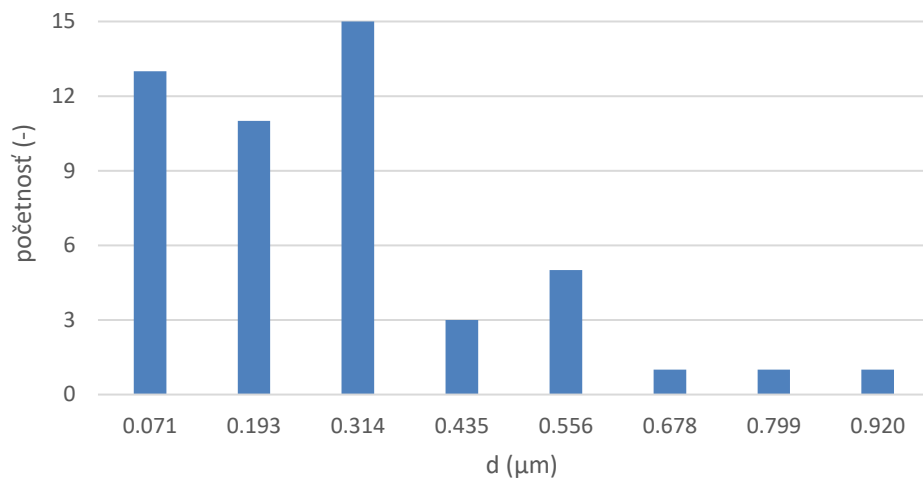
Obrázok č. 15: Distribúcia priemerov pórov materiálov zvláknených z 1% roztoku P3HB



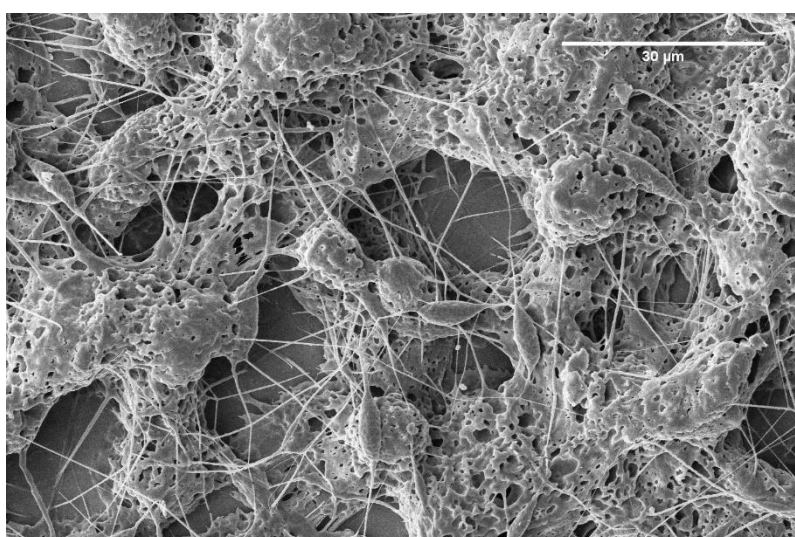
Obrázok č. 16: SEM snímka 1% roztoku P3HB (zväčšené 1500-krát)



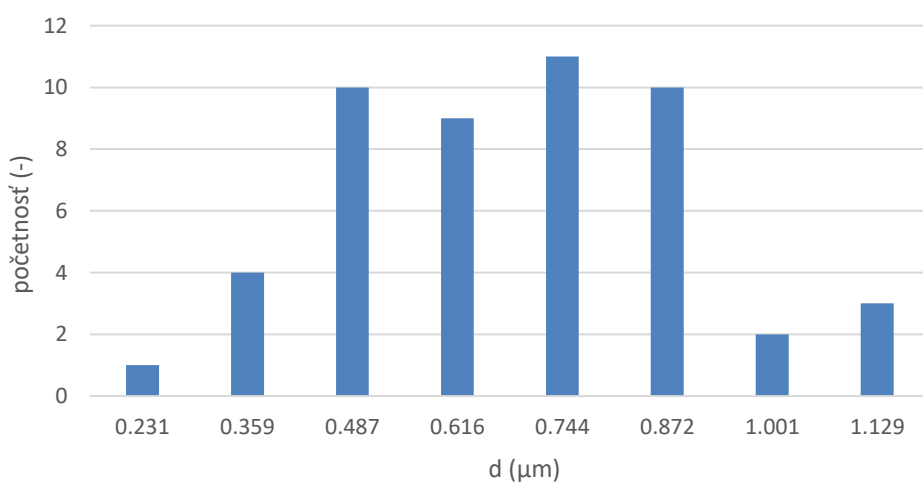
Obrázok č. 17: Distribúcia priemerov pórov materiálov zvláknených z 2% roztoku P3HB



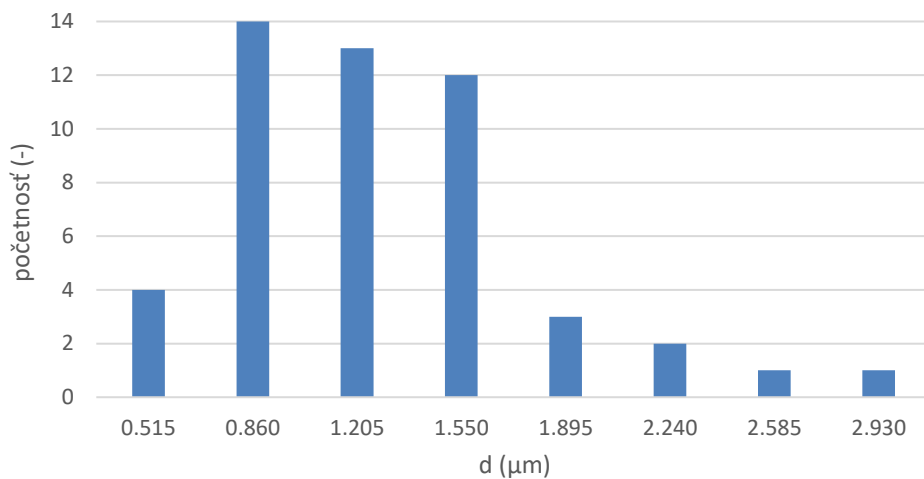
Obrázok č. 18: Distribúcia priemerov vlákien zvláknených z 2% roztoku P3HB



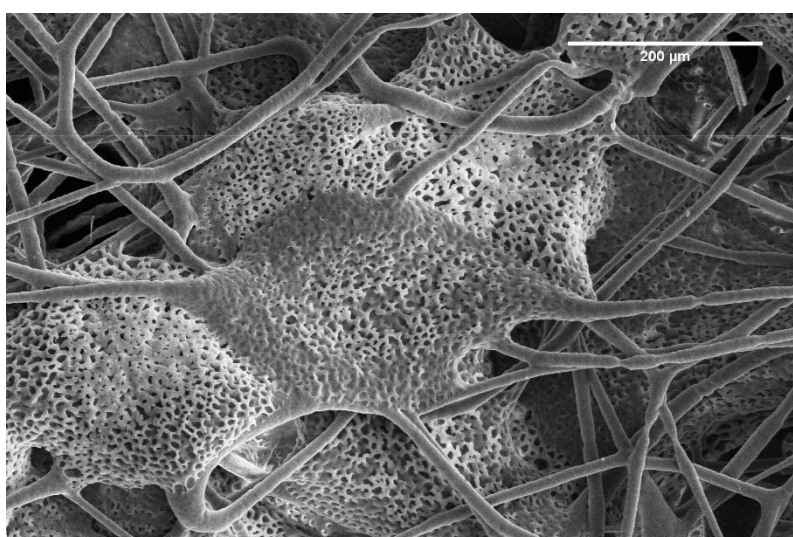
Obrázok č. 19: SEM snímka 2% roztoku P3HB (zväčšené 3500-krát)



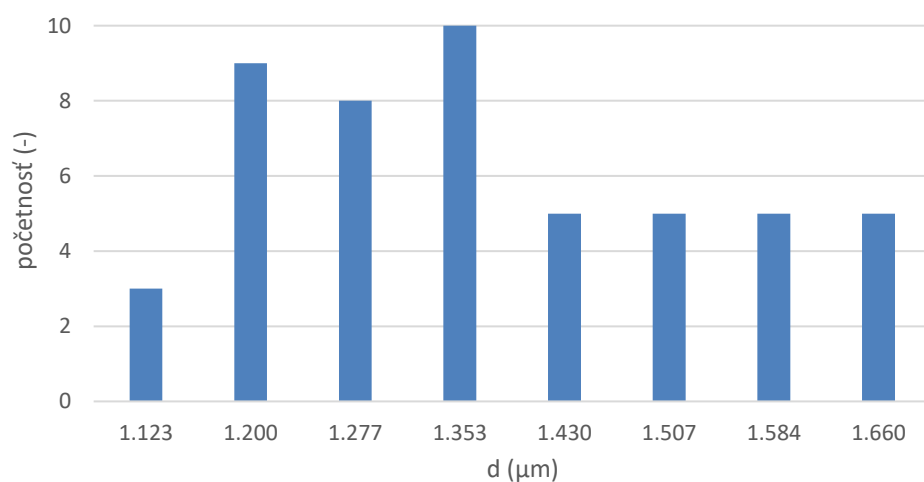
Obrázok č. 20: Distribúcia priemerov pórov materiálov zvláknených zo 4% roztoku P3HB



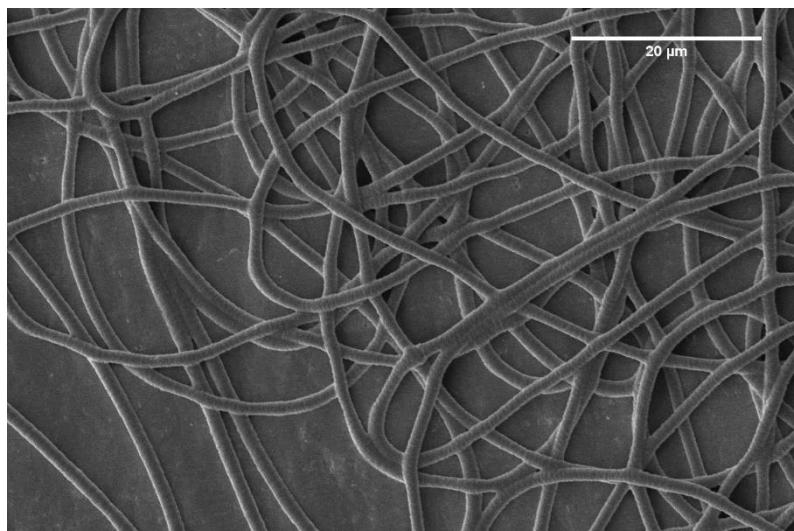
Obrázok č. 21: Distribúcia priemerov vlákien zvláknených zo 4% roztoku P3HB



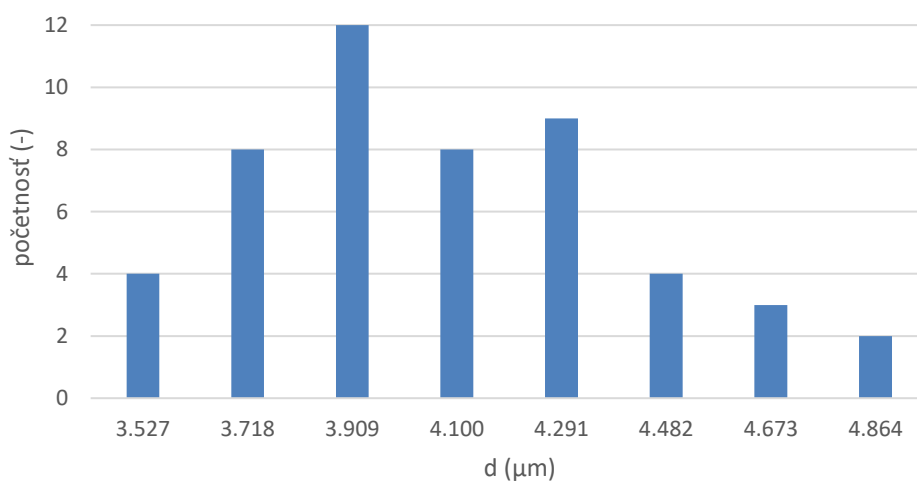
Obrázok č. 22: SEM snímka 4% roztoku P3HB (zväčšené 5000-krát)



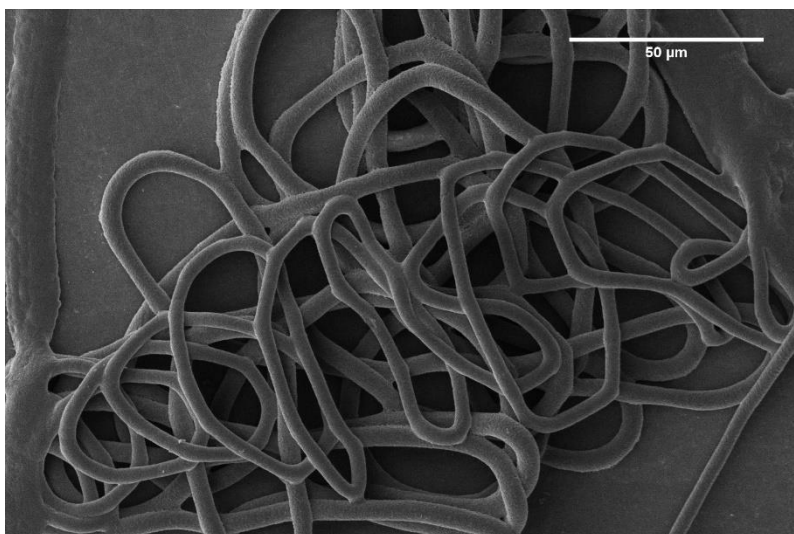
Obrázok č. 23: Distribúcia priemerov vlákien zvláknených z 5% roztoku P3HB



Obrázok č. 24: SEM snímka 5% roztoku P3HB (zvážšené 5000-krát)



Obrázok č. 25: Distribúcia priemerov vlákien zvlákněných z 8% roztoku P3HB



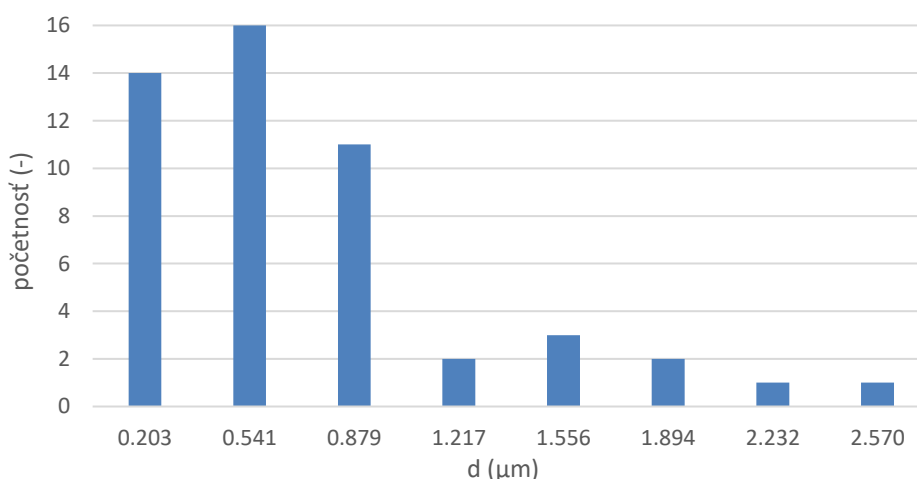
Obrázok č. 26: SEM snímka vlákien 8% roztoku P3HB (zvážšené 2000-krát)

5.2.3.2 Nanovláknenné štruktúry P3HB v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:2

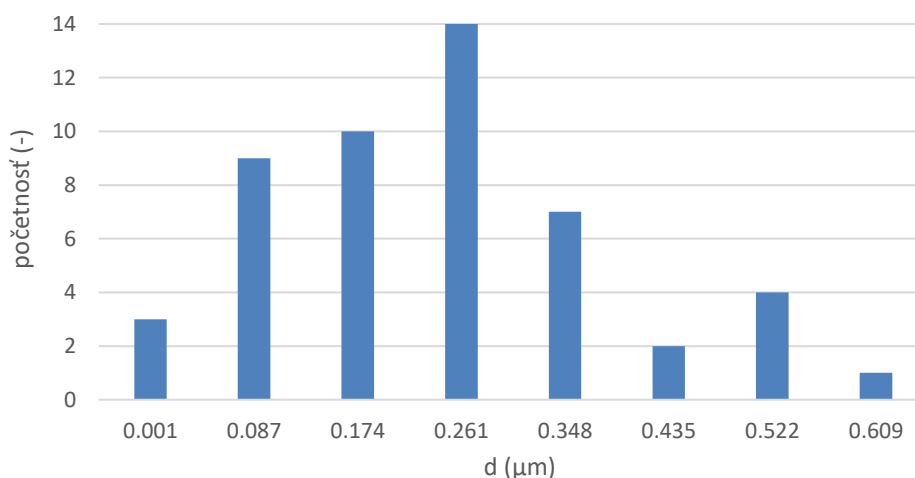
V prípade zvlákňovania P3HB v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:2 boli vo vzniknutých štruktúrach prítomné póry aj vlákna vo všetkých koncentráciách roztokov. So zvyšujúcou sa koncentraciou rástli aj priemery pórov a vlákien. Pri koncentrácií 1 a 2 hm. % vznikali vo vyššej miere pórovité štruktúry s menším množstvom vlákien, pri zvyšných koncentráciách vznikali viac vlákna akoby pospájané menším počtom pórovitých štruktúr. Stredné hodnoty týchto objektov sú uvedené v tabuľke č. 8.

Tabuľka č. 8: Stredné hodnoty priemerov pórov a vlákien

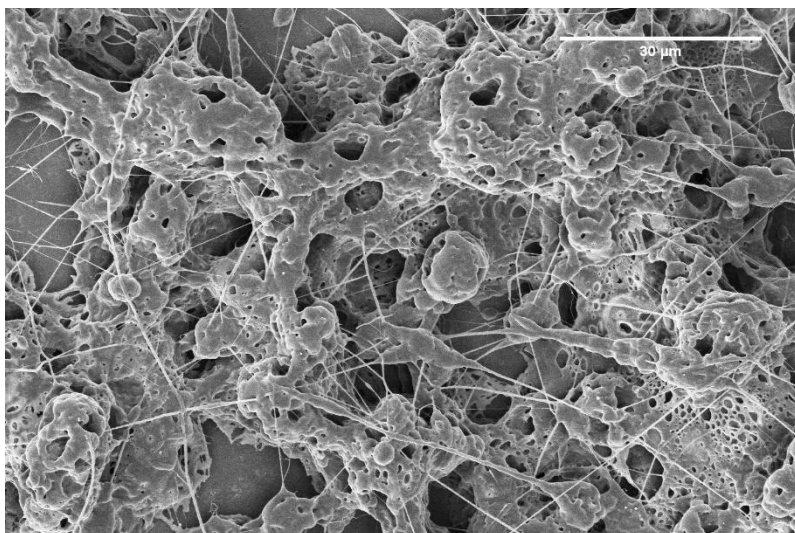
c (hm. %)	Stredná hodnota priemeru pórov (μm)	Stredná hodnota priemeru vlákien (μm)
1	$0,889 \pm 0,556$	$0,281 \pm 0,153$
2	$0,923 \pm 0,747$	$0,532 \pm 0,235$
4	$1,292 \pm 0,564$	$1,221 \pm 0,374$
5	$1,110 \pm 0,595$	$2,276 \pm 0,502$
8	$1,602 \pm 1,387$	$7,687 \pm 3,264$



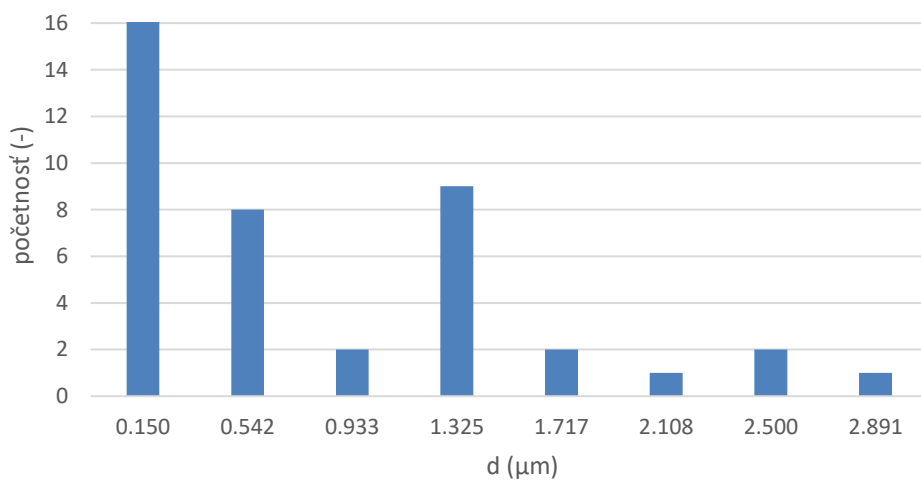
Obrázok č. 27: Distribúcia priemerov pórov materiálov zvláknených z 1% roztoku P3HB



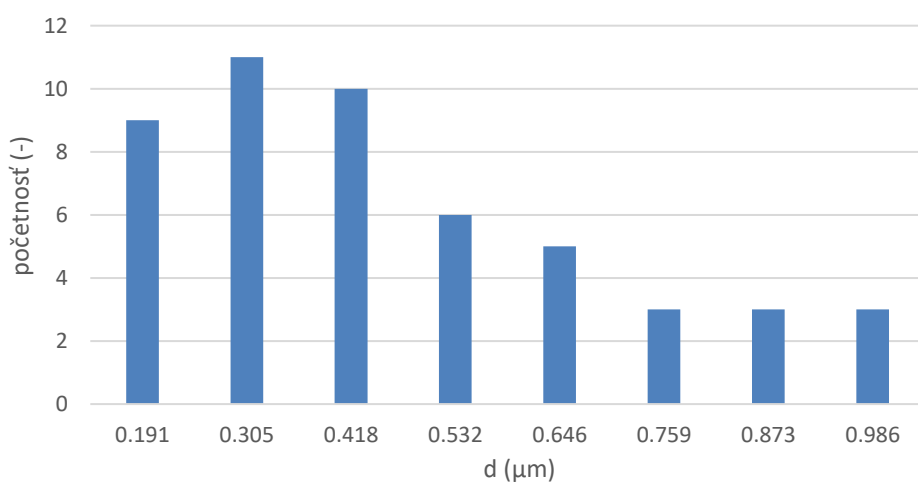
Obrázok č. 28: Distribúcia priemerov vlákien zvláknených z 1% roztoku P3HB



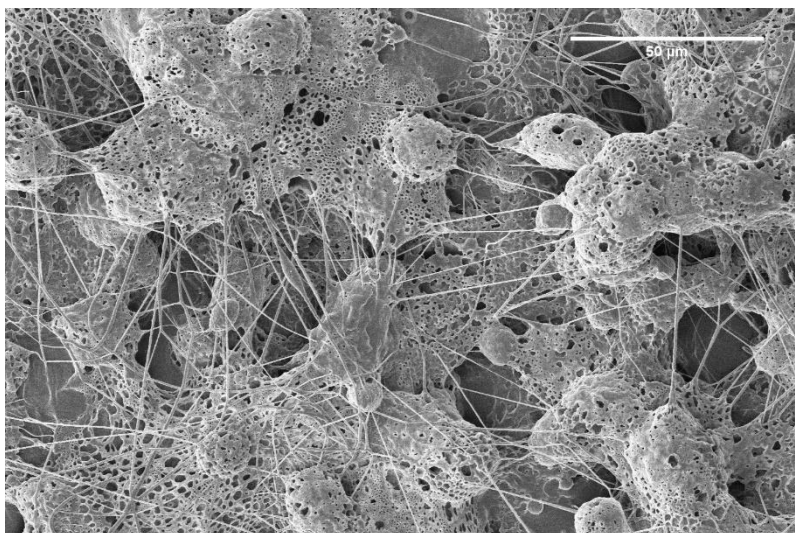
Obrázok č. 29: SEM snímka 1% roztoku P3HB (zväčšené 3500-krát)



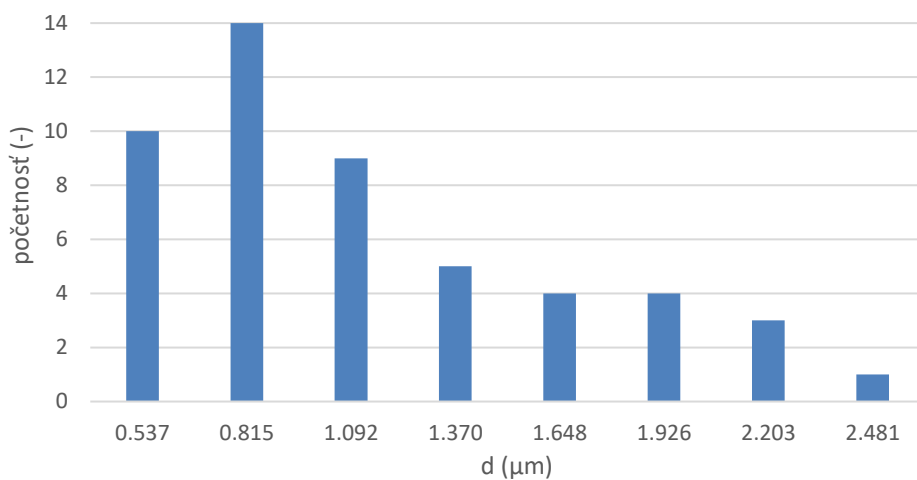
Obrázok č. 30: Distribúcia priemerov pórov materiálov zvláknených z 2% roztoku P3HB



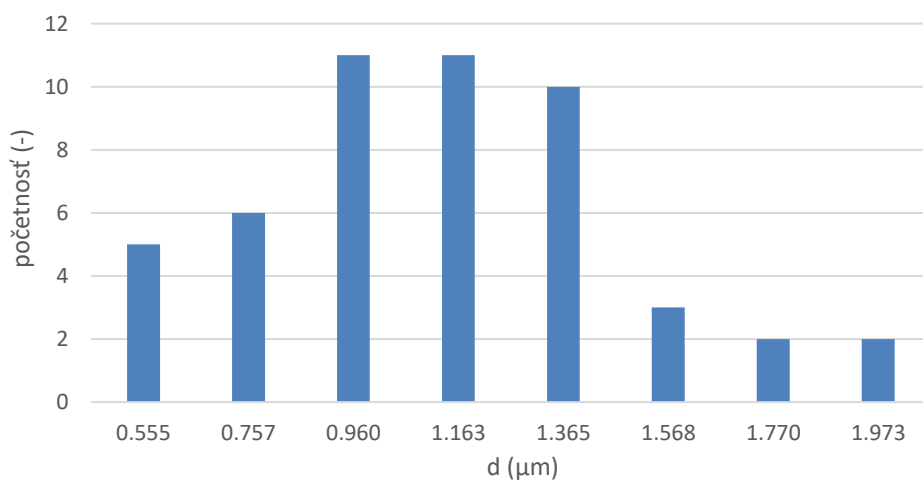
Obrázok č. 31: Distribúcia priemerov vlákien zvláknených z 2% roztoku P3HB



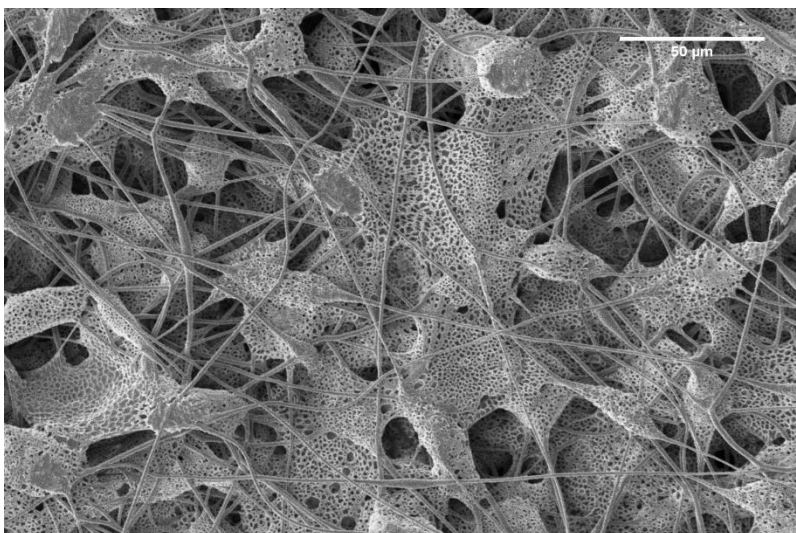
Obrázok č. 32: SEM snímka 2% roztoku P3HB (zväčšené 3500-krát)



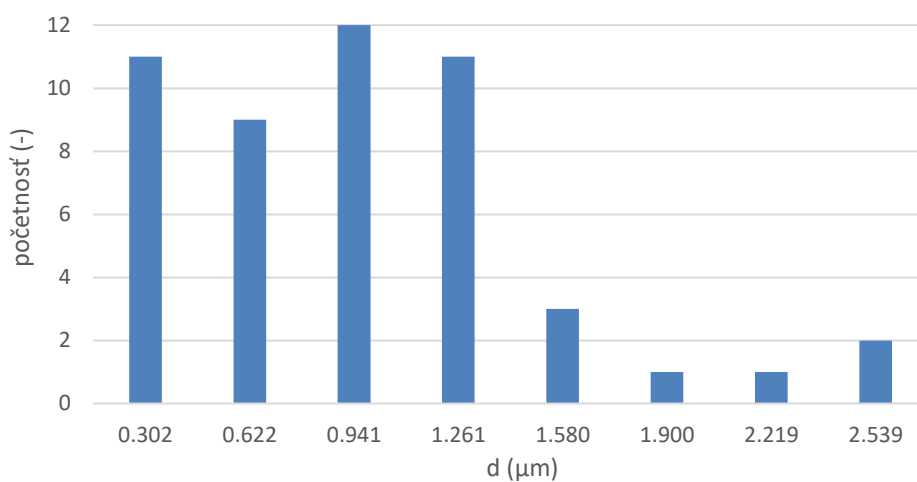
Obrázok č. 33: Distribúcia priemerov pórov materiálov zvláknených z 4% roztoku P3HB



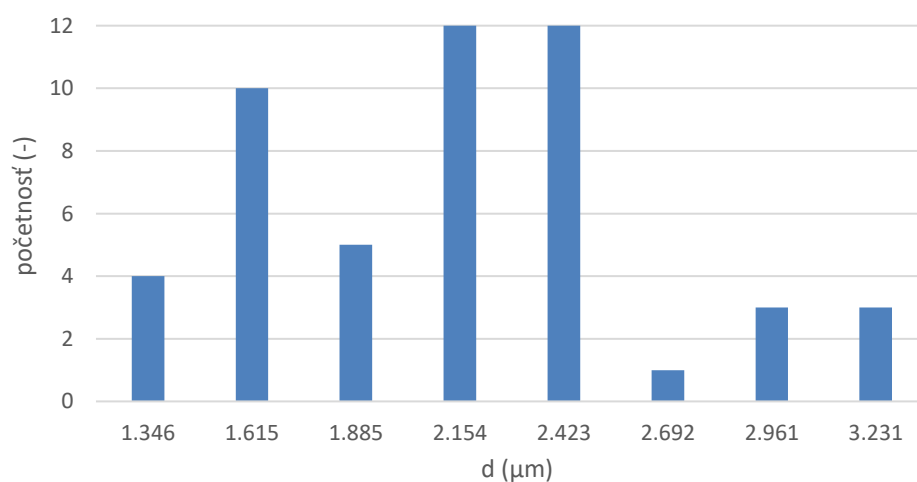
Obrázok č. 34: Distribúcia priemerov vlákien zvláknených zo 4% roztoku P3HB



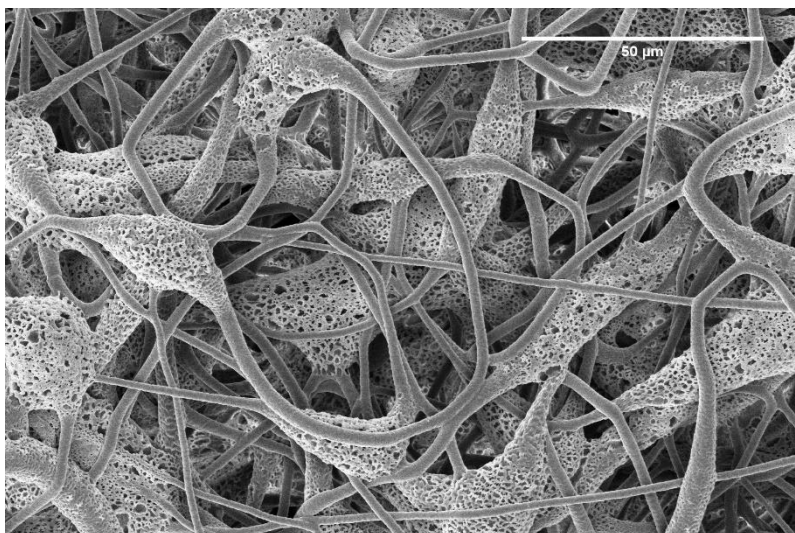
Obrázok č. 35: SEM snímka 4% roztoku P3HB (zväčšené 1500-krát)



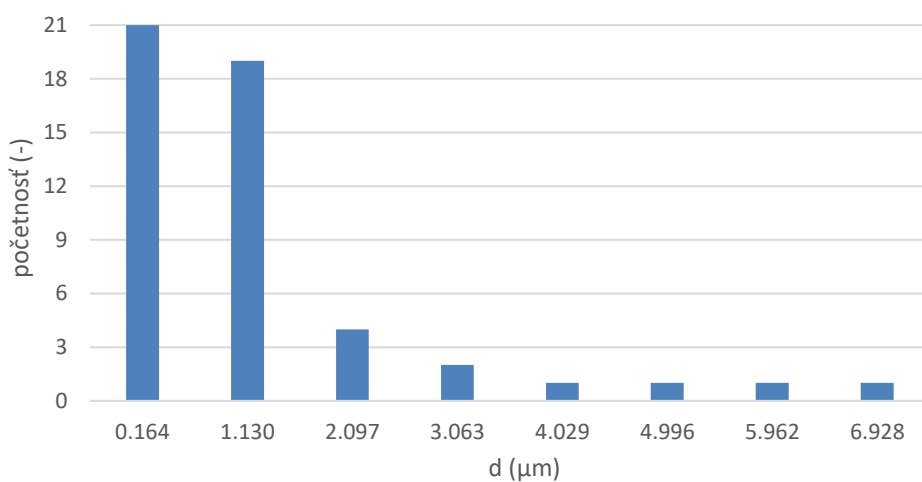
Obrázok č. 36: Distribúcia priemerov pórov materiálov zvláknených z 5% roztoku P3HB



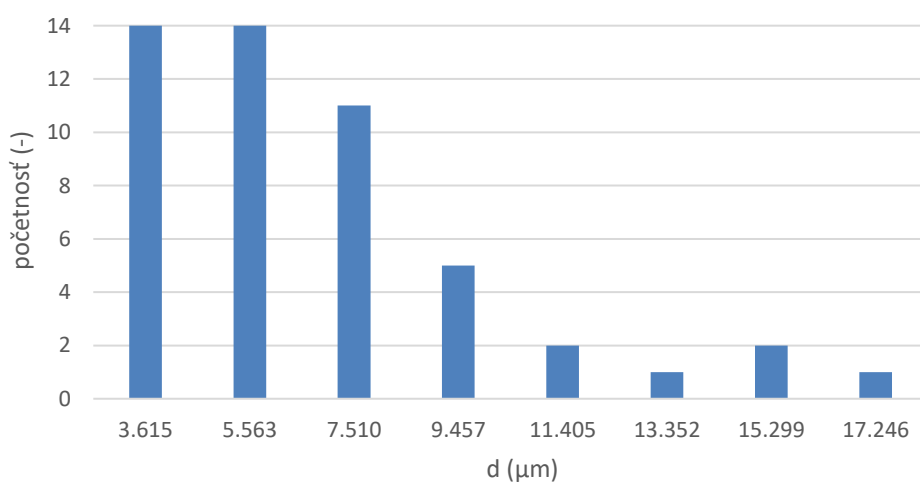
Obrázok č. 37: Distribúcia priemerov vlákien zvláknených z 5% roztoku P3HB



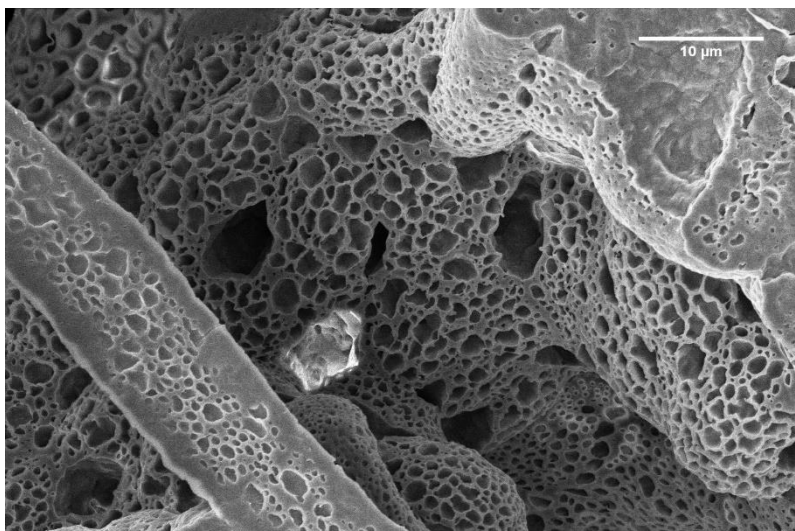
Obrázok č. 38: SEM snímka 5% roztoku P3HB (zväčšené 2500-krát)



Obrázok č. 39: Distribúcia priemerov pórov materiálov zvláknených z 8% roztoku P3HB



Obrázok č. 40: Distribúcia priemerov vlákien zvláknených z 8% roztoku P3HB



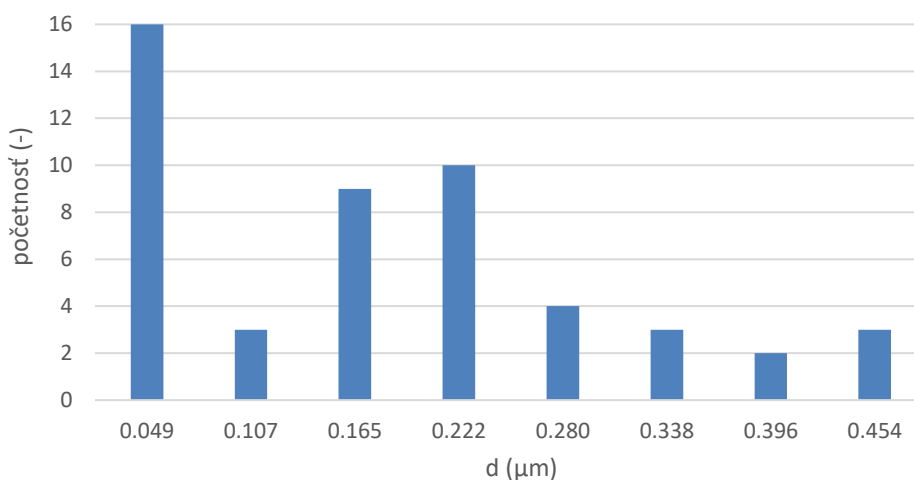
Obrázok č. 41: SEM snímka 8% roztoku P3HB (zväčšené 6500-krát)

5.2.3.3 Nanovláknenné štruktúry P3HB v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:3

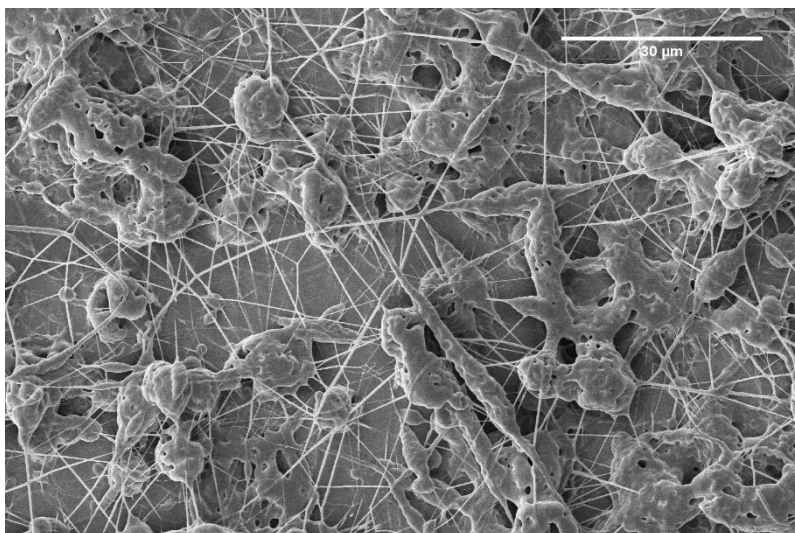
V prípade zvlákňovania P3HB v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:3 boli vo vzniknutých štruktúrach prítomné póry pri roztokoch s koncentráciou 2, 4 a 5 hm. %. Podobne ako v predošlých prípadoch, pri 1 a 2 % roztoku vznikali vo vyššej miere hubkovité vrstvy a menej vlákna. Vlákna vznikali vo všetkých koncentráciách roztokov a ich priemery sa so stúpajúcou koncentráciou opäť zvyšovali. Tieto hodnoty sú uvedené v tabuľke č. 9.

Tabuľka č. 9: Stredné hodnoty priemerov pórov a vlákien

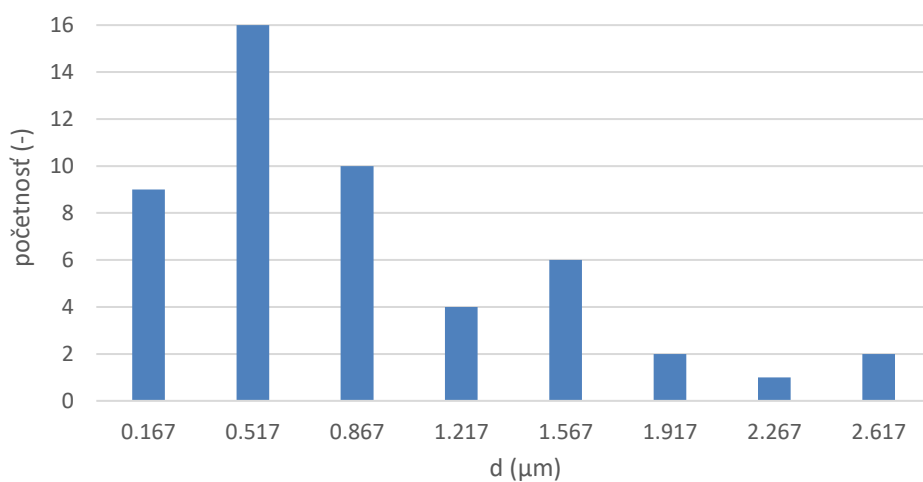
c (hm. %)	Stredná hodnota priemeru pórov (μm)	Stredná hodnota priemeru vlákien (μm)
1		$0,212 \pm 0,125$
2	$1,057 \pm 0,655$	$0,746 \pm 0,367$
4	$1,102 \pm 0,405$	$1,353 \pm 0,632$
5	$1,326 \pm 0,589$	$1,690 \pm 0,530$
8		$3,818 \pm 1,269$



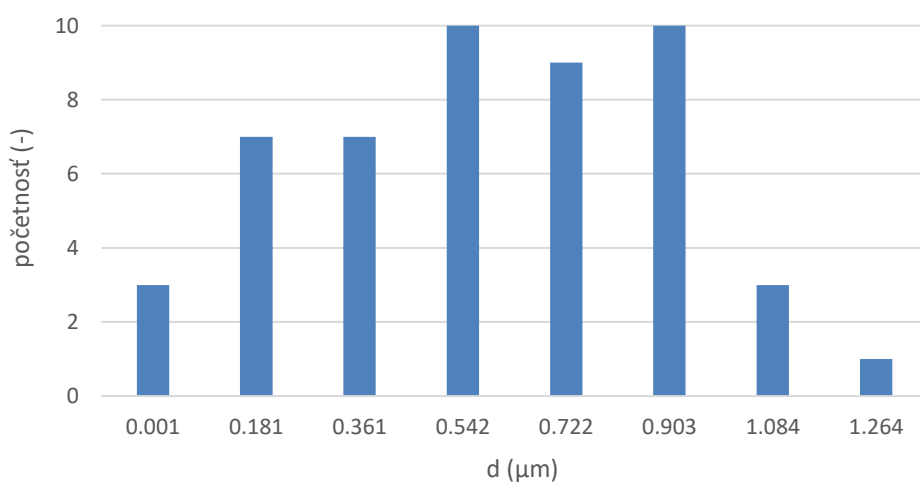
Obrázok č. 42: Distribúcia priemerov vlákien zvláknených z 1% roztoku P3HB



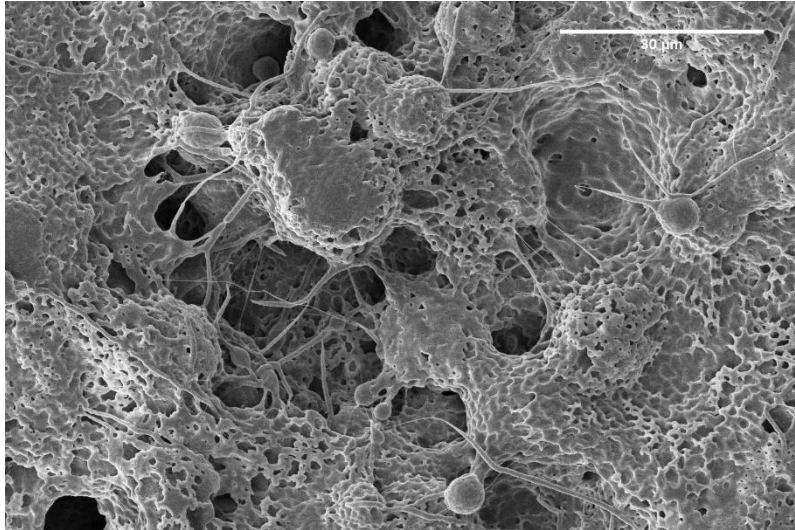
Obrázok č. 43: SEM snímka 1% roztoku P3HB (zväčšené 3500-krát)



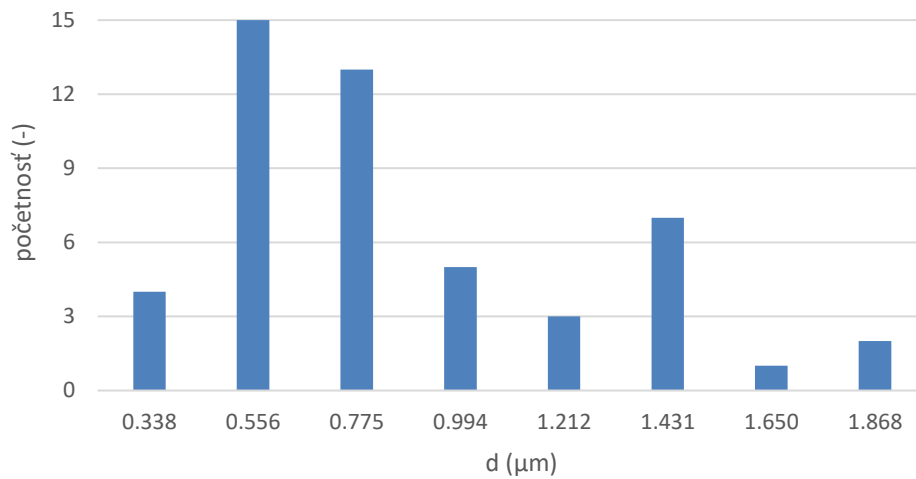
Obrázok č. 44: Distribúcia priemerov pórov materiálov zvláknených z 2% roztoku P3HB



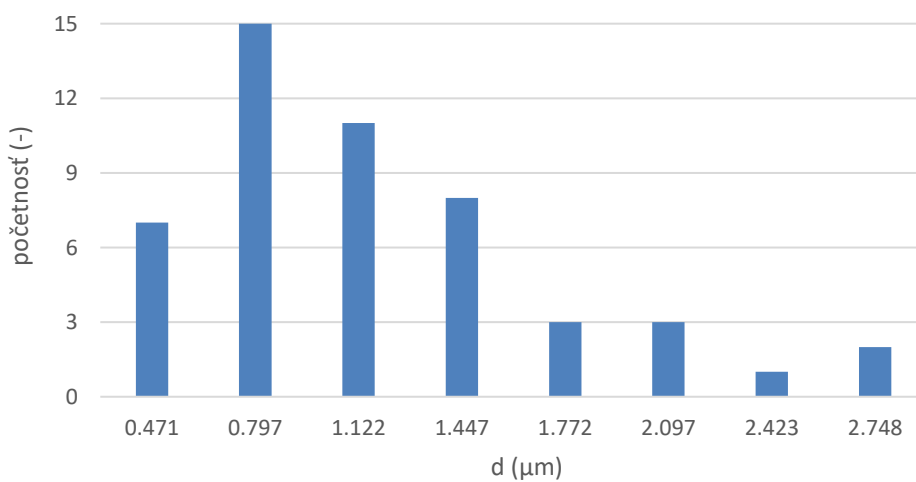
Obrázok č. 45: Distribúcia priemerov vlákien zvláknených z 2% roztoku P3HB



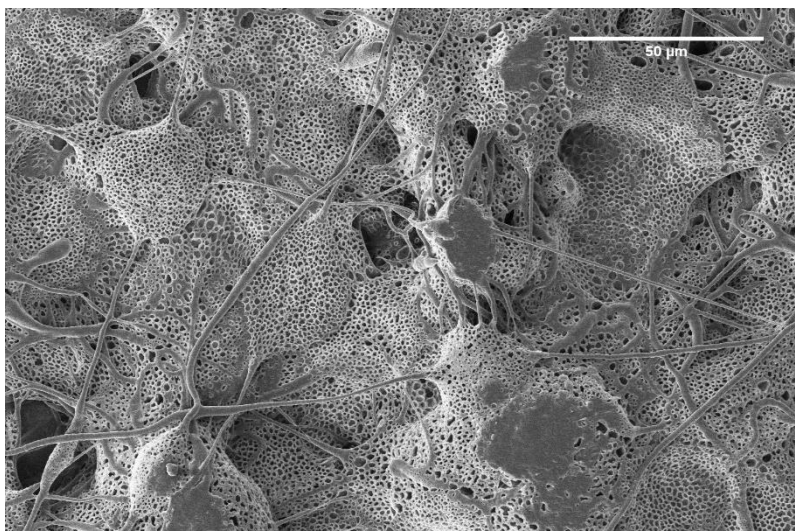
Obrázok č. 46: SEM snímka 2% roztoku P3HB (zväčšené 3500-krát)



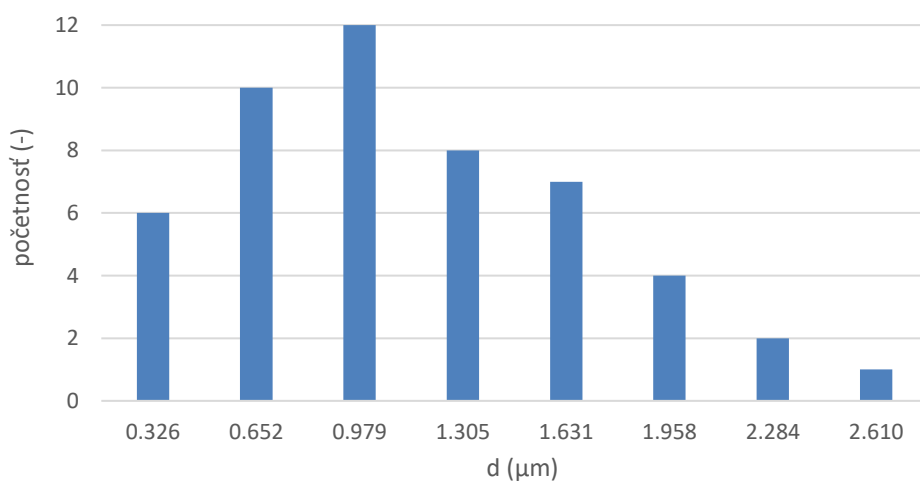
Obrázok č. 47: Distribúcia priemerov pórov materiálov zvláknených z 4% roztoku P3HB



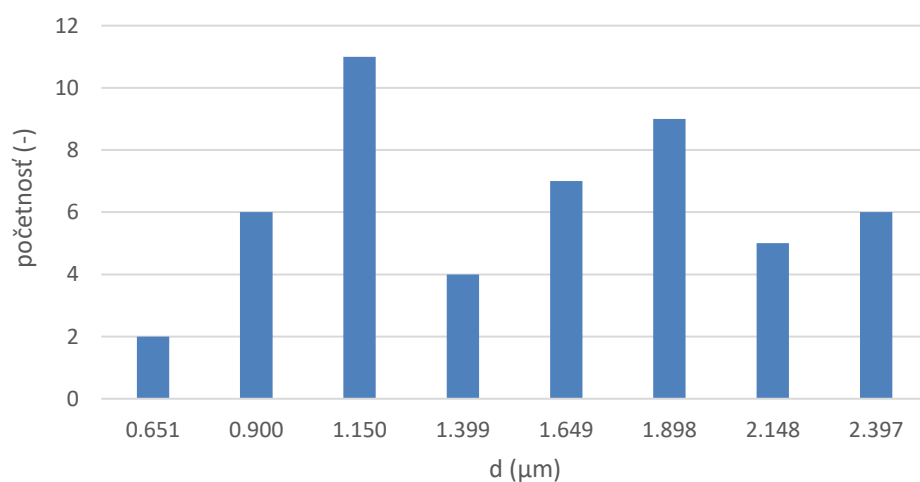
Obrázok č. 48: Distribúcia priemerov vlákien zvláknených z 4% roztoku P3HB



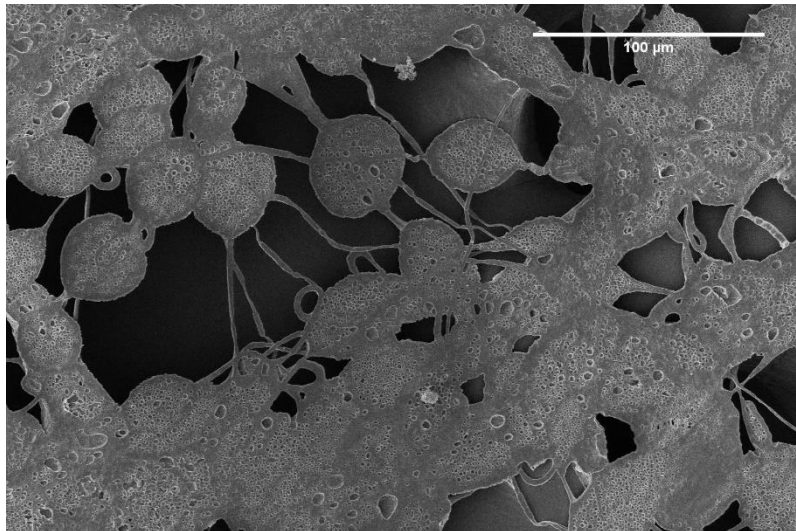
Obrázok č. 49: SEM snímka 4% roztoku P3HB (zväčšené 2000-krát)



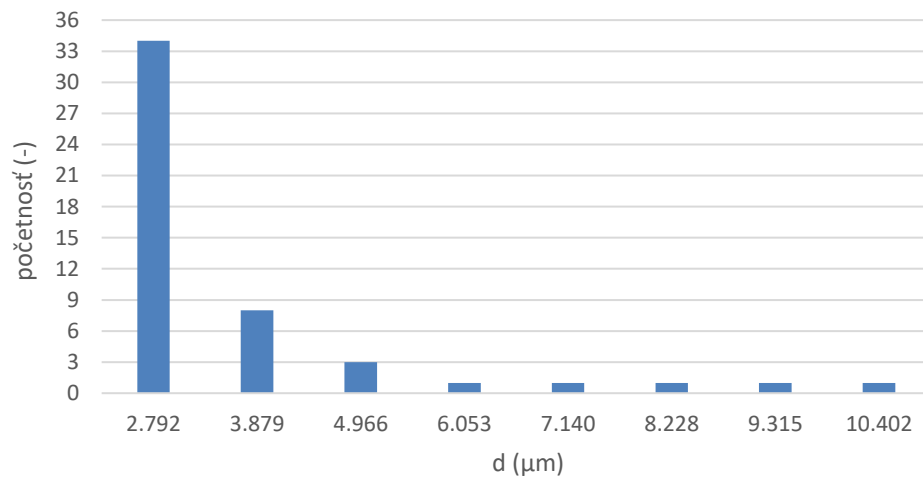
Obrázok č. 50: Distribúcia priemerov pórov materiálov zvláknených z 5% roztoku P3HB



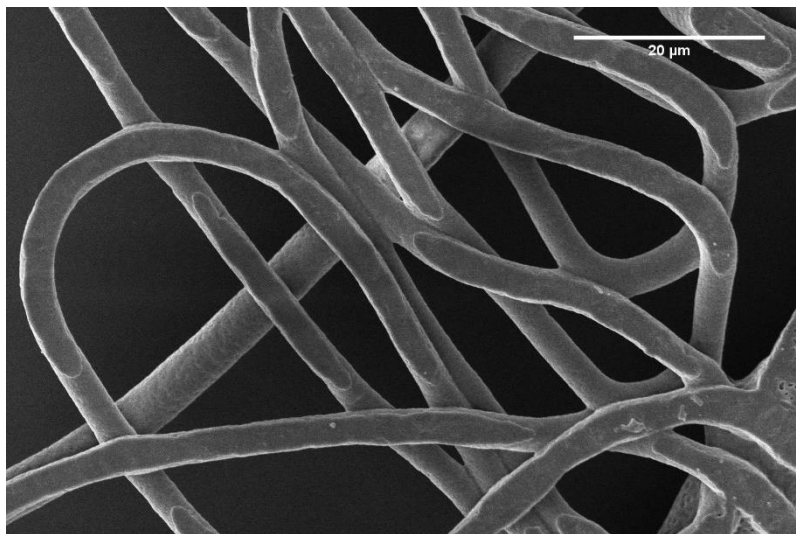
Obrázok č. 51: Distribúcia priemerov vlákien zvláknených z 5% roztoku P3HB



Obrázok č. 52: SEM snímka 5% roztoku P3HB (zväčšené 1200-krát)



Obrázok č. 53: Distribúcia priemerov vlákien zvláknených z 8% roztoku P3HB

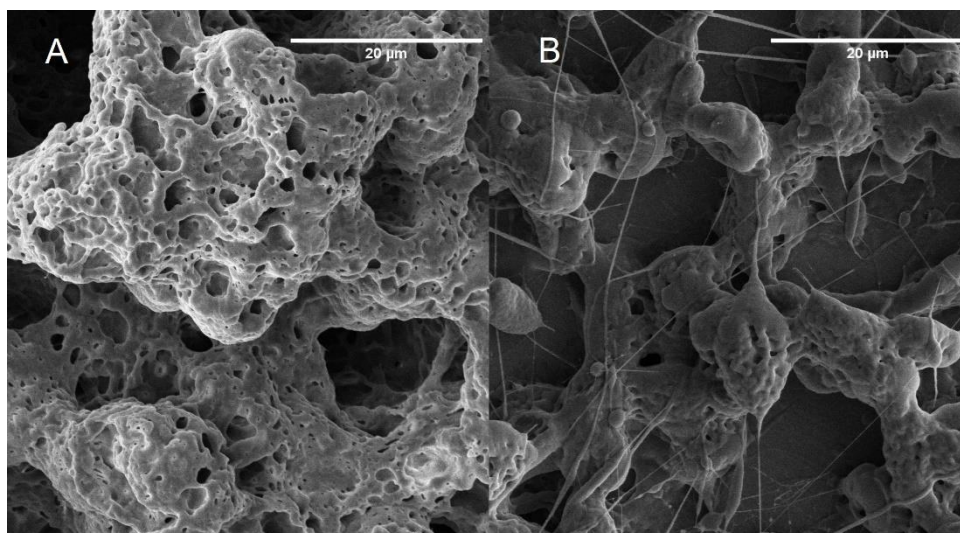


Obrázok č. 54: SEM snímka 8% roztoku P3HB (zväčšené 5000-krát)

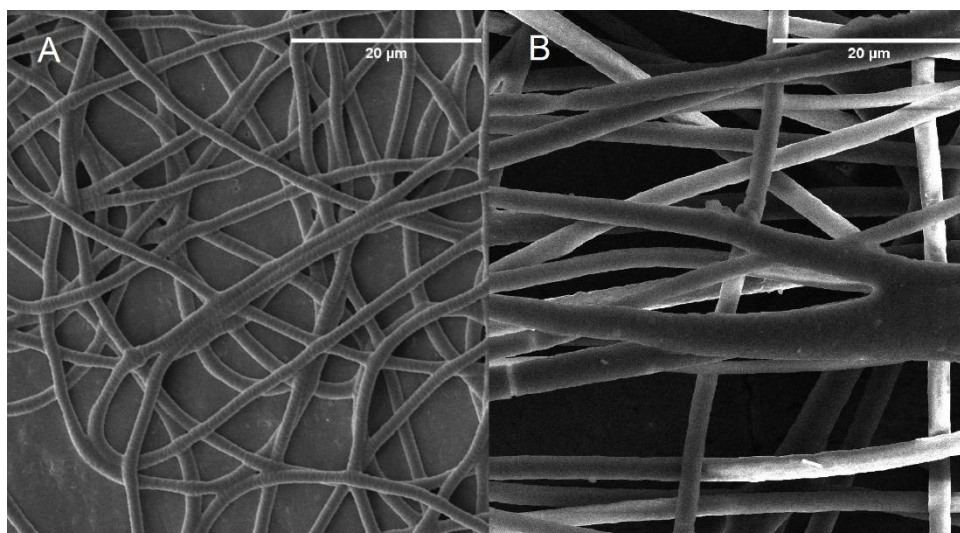
5.3 Charakterizácia pripravených štruktúr s prídavkom aktívnej látky

Na základe charakteristiky vzniknutých štruktúr pomocou SEM, boli pre prípravu vláknitých vrstiev s prídavkom antibiotika vybrané tri rôzne koncentrácie roztokov tak, aby bolo možné štúdium vplyvu uvoľňovania aktívnej látky v závislosti na vytvorených morfológiách. Bol vybraný roztok s koncentráciou 1 hm. % P3HB v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:1, pretože vzniknutý reliéf sa najviac podobal prvotnej predstave pórovitej štruktúry pripomínajúcej hubku, ďalej roztok s koncentráciou 4 hm. % P3HB v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:2, ktorého morfológia je vhodná na porovnanie uvoľňovanie aktívnej látky v závislosti od vytvorenej štruktúry, vďaka obsahu vlákien aj na pohľad pravidelných pórov vo svojej morfológii a roztok s koncentráciou 5 hm. % P3HB v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:1, pretože zo všetkých variant roztokov, z ktorých vznikali iba vlákna, bol tento najlepší zvlákňovateľný, čo dokazuje aj vplyv viskozity na proces elektrostatického zvlákňovania.

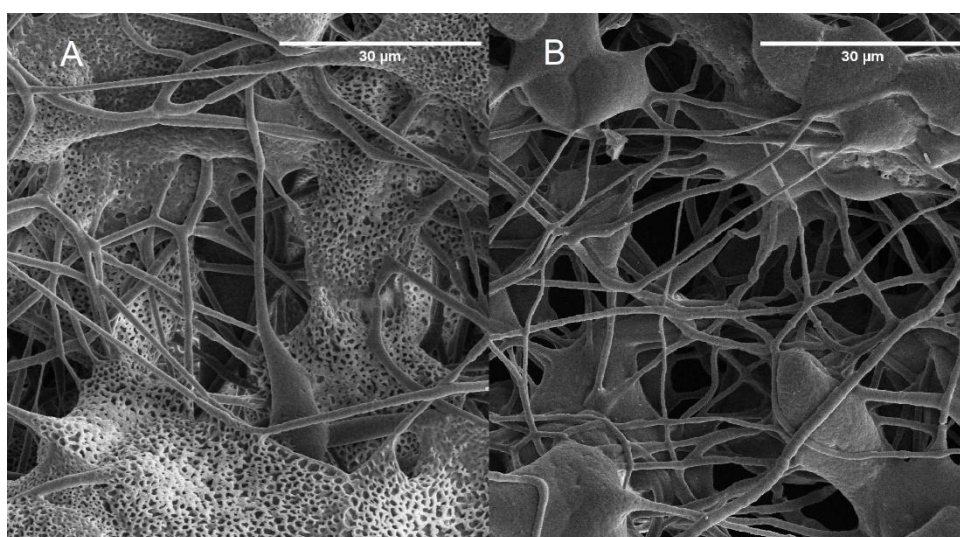
Výsledky zvlákňovania boli taktiež charakterizované elektrónovou mikroskopiou a boli porovnané so SEM snímkami príslušných štruktúr bez prídavku antibiotika a sú zobrazené na obrázkoch č. 55 až 57. Na snímkach je viditeľné, že antibiotikum bolo inkorporované do pórov týchto pórovitých vrstiev a póry sú ním vyplnené.



Obrázok č. 55: Porovnanie SEM snímok štruktúr vzniknutých zvláknením 1% roztoku P3HB v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:1 bez prídavku (A) a s prídavkom antibiotika (B) (zväčšené 5000-krát)



Obrázok č. 56: Porovnanie SEM snímok štruktúr vzniknutých zvláknením 5% roztoku P3HB v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:1 bez prídavku (A) a s prídavkom antibiotika (B) (zväčšené 5000-krát)



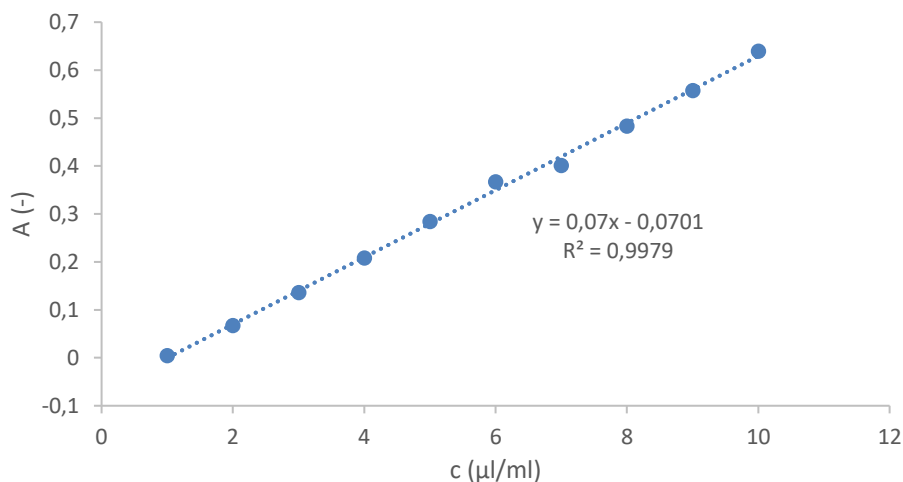
Obrázok č. 57: Porovnanie SEM snímok štruktúr vzniknutých zvláknením 4% roztoku P3HB v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:2 bez prídavku (A) a s prídavkom antibiotika (B) (zväčšené 3500-krát)

Výsledky zvlákňovania sa na pohľad voľným okom proti predošlým zvlákňovaným vrstvám bez prídavku aktívnej látky nemenili, no v prípade 5% roztoku P3HB došlo k vzniku nehomogénnej vrstvy s mnohými kopčekmi a veľmi zatuhnutými miestami, pripomínajúcimi zrazeniny, čo v predošlom prípade zvlákňovania príslušného roztoku nebolo pozorované.

5.4 Štúdium uvoľňovania aktívnej látky z pripravených nanovláknenných štruktúr

5.4.1 Kalibračná krivka antibiotika

Kalibračná krivka bola vyhotovená z hodnôt absorbancie roztokov Levofloxacínu vo fosfátovom tlmivom roztoku s rôznymi koncentraciami. Táto závislosť je zobrazená na obrázku č. 58. Rovnica kalibračnej krivky je $y = 0,07x - 0,070$ a regresný koeficient $R^2 = 0,9979$.



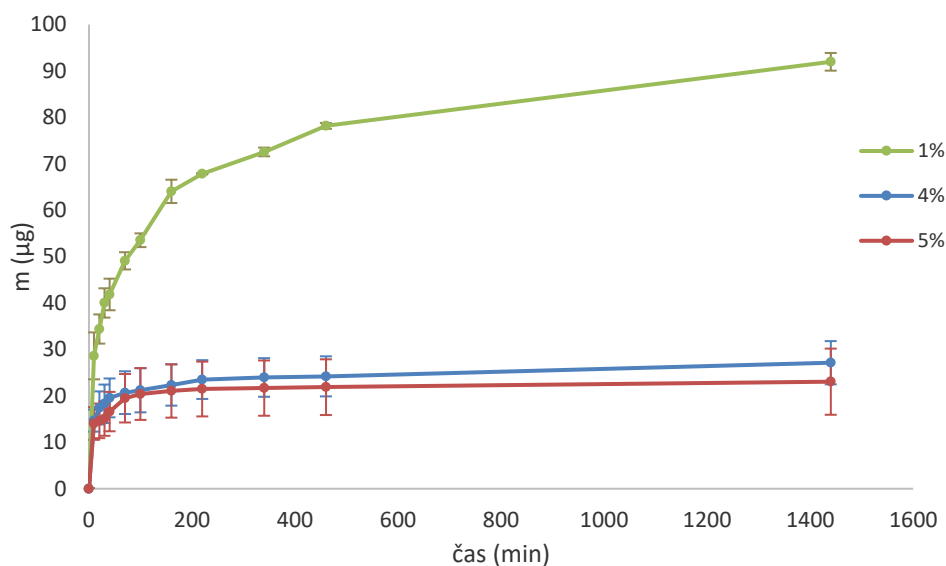
Obrázok č. 58: Kalibračná krivka Levofloxacínu vo fosfátovom tlmivom roztoku

5.4.2 Uvoľňovanie aktívnej látky z pripravených nanovláknenných štruktúr

Vystrihnuté vzorky v tvare štvorca s veľkosťou 1 x 1 cm boli odvážené a hodnoty boli zapísané do tabuľky č. 10. Meranie absorbančie fosfátového tlmivého roztoku prebiehalo v časových intervaloch 10, 30, 60 a 120 minút po dobu 7 hodín a 40 minút, posledné meranie prebehlo 24 hodín od prvého merania. Po každom meraní bol tlmivý roztok vliaty naspäť do vialky s príslušnou vláknitou vzorkou. Hodnoty absorbančie boli spracované v programe Excel, kde boli urobené prepočty uvoľneného antibiotika zo vzorky vzťahujúce na 100 mg vlákien, a taktiež bola vytvorená závislosť množstva uvoľneného antibiotika vzťahujúceho na 100 mg na čase pre všetky koncentrácie. Túto závislosť zobrazuje obrázok č. 59.

Tabuľka č. 10: Parametre vzoriek vláknitých štruktúr

Pomer zmesi rozpúšťadiel (DCM:CHCl ₃)	Koncentrácia P3HB v roztoku (hm. %)	č. vzorky	Hmotnosť (mg)
1:1	5	1	8,4 ± 0,1
		2	16,0 ± 0,1
		3	10,8 ± 0,1
1:1	1	1	7,8 ± 0,1
		2	8,2 ± 0,1
		3	7,3 ± 0,1
1:2	4	1	18,5 ± 0,1
		2	13,0 ± 0,1
		3	8,8 ± 0,1



Obrázok č. 59: Graf závislosti množstva uvoľneného antibiotika vzťahnutého na 100 mg na čase

Z obrázka č. 59 vyplýva, že najviac aktívnej látky sa uvoľnilo zo vzorky pripomínajúcej hubku, ktorá bola pripravená zvláknením 1% roztoku P3HB v zmesi rozpúšťadiel dichlórmetánu a chloroformu v pomere 1:1, kedy sa väčšina (73,8 %) uvoľneného antibiotika uvoľnila v priebehu prvých 3 hodín a 40 minút, a to v prepočte na 100 mg vláken $67,86 \pm 0,15 \mu\text{g}$ z celkových $91,97 \pm 1,90 \mu\text{g}$ antibiotika. Uvoľňovanie zo vzoriek pripravených zo 4% a 5% roztoku P3HB má podobný priebeh, kedy sa väčšina uvoľnenej aktívnej látky uvoľnila už po 1 hodine a 40 minútach. Pri prepočte na 100 mg vláken sa za tento čas uvoľnilo zo 4% vzorky $21,21 \pm 4,75 \mu\text{g}$, čo predstavuje 78,1 % z celkových uvoľnených $27,15 \pm 4,66 \mu\text{g}$ antibiotika a z 5% vzorky $20,41 \pm 5,58 \mu\text{g}$, čo je 88,5 % z celkových uvoľnených $23,06 \pm 7,13 \mu\text{g}$ antibiotika.

Z tohto merania tiež vyplýva, že celkovo sa najviac Levofloxacínu uvoľnilo z 1% vzorky s morfológiou homogénnej pórovitej hubkovitej vrstvy nasledovanej 4%, ktorej štruktúra obsahovala pórovitú časť aj vlákna a nakoniec 5% vzorkou P3HB, ktorá bola tvorená iba vláknami. Môžeme teda tvrdiť, že morfológia nami pripravených vláknitých pórovitých štruktúr uvoľňovanie aktívnej látky výrazne ovplyvňuje.

Treba tiež podotknúť, že sa celkovo uvoľnilo menej aktívnej látky zo vzoriek pripravených zo 4 a 5% roztoku P3HB, a to z dôvodu menšieho množstva antibiotika vo vzorke. Síce bola pridaná vždy rovnaká koncentrácia antibiotika do roztokov P3HB, ale množstvo antibiotika reálne prítomného bolo odlišné a záviselo ako od viskozity roztoku, tak aj od vzniknutej morfológie.

Stanovená účinnosť tzv. enkapsulácie antibiotika do vláken bola nasledovná: 1% roztok P3HB = 40,9 %, 4% roztok P3HB = 11,3 %, 5% roztok P3HB = 7,2 %.

5.5 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity inkorporovanej látky v nanovláknach

Na stanovenie antimikrobiálnej aktivity vláken s prídavkom antibiotika bola využitá agarová difúzna metóda, pri ktorej boli na naočkované tuhé médium pokladané a mierne pritláčané vzorky vláken vystrihnuté do kruhu s priemerom 13 mm. Na každý mikroorganizmus boli

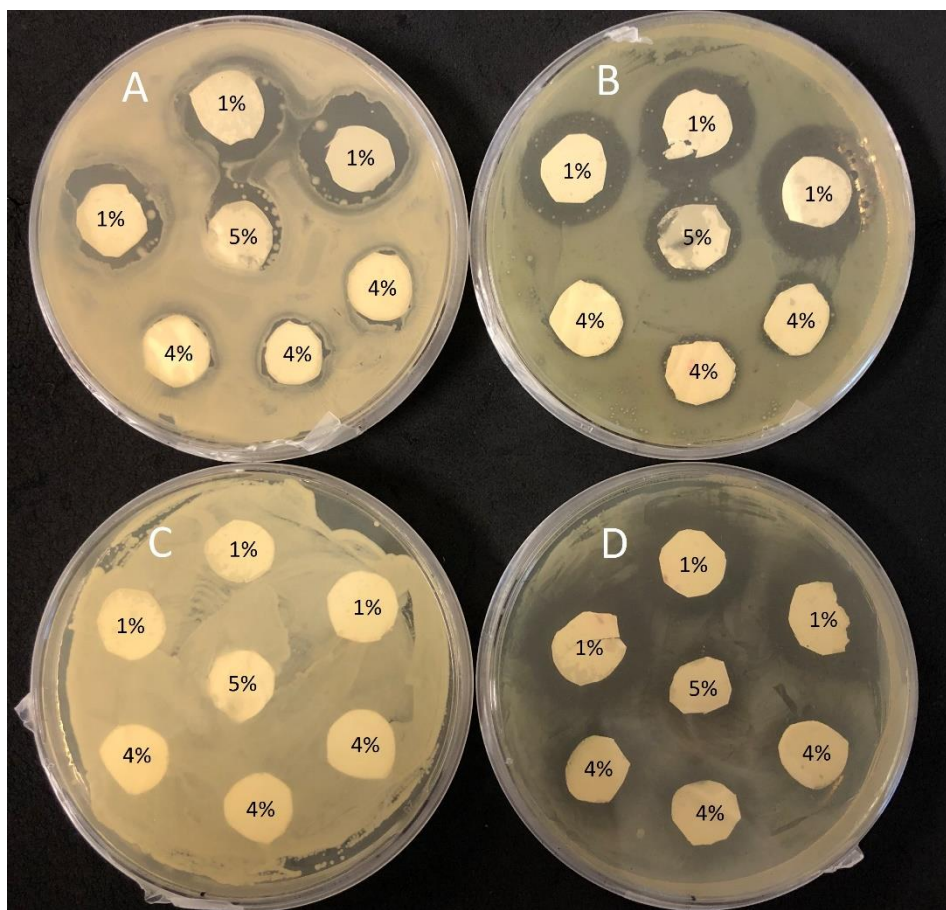
využitú vždy tri vzorky vláknitých štruktúr z každej koncentrácie, v prípade vlákien z 5% roztoku bola využitá vždy iba jedna vzorka, z dôvodu nehomogénosti materiálu, ktorá spôsobovala zlú manipuláciu s vláknitou vrstvou. Po 24 h inkubácie pri 37 °C boli odmerané veľkosti utvorených inhibičných zón, urobené fotografie jednotlivých pokusov a údaje zo všetkých pokusov boli spracované do tabuľky č. 11. Ukážku sledovania antimikrobiálnej aktivity zobrazuje obrázok č. 60.

Tabuľka č. 11: Veľkosti jednotlivých inhibičných zón, v prípade kvasinky *C. glabrata* inhibičné zóny nevznikali

Mikrobiálna kultúra	Vzorka	č. vzorky	Zóna (mm)	Zóna σ (mm)	
<i>E. coli</i>	1%	1	5	5 \pm 1	
		2	5		
		3	5		
	4%	1	2	2 \pm 1	
		2	2		
		3	2		
	5%	1	3	3 \pm 1	
	<i>S. marcescens</i>	1%	1	4	4 \pm 1
			2	4	
3			4		
4%		1	1	1 \pm 1	
		2	1		
		3	1		
5%		1	2	2 \pm 1	
<i>M. luteus</i>		1%	1	3,5	3,7 \pm 1,0
			2	3,5	
	3		4		
	4%	1	1	0,8 \pm 1,0	
		2	1		
		3	0,5		
	5%	1	2	2 \pm 1	

K vzniku najväčších inhibičných zón dochádzalo v prípade vlákien P3HB s koncentráciou zvláknovaného roztoku 1 hm. %, nasledoval roztok s koncentráciou 5 hm. % a nakoniec, najmenšie inhibičné zóny vznikali pri vláknach s koncentráciou P3HB 4 hm. %. Tento jav mohol byť spôsobený dvomi javmi. Po prvé, hrúbkou použitých vzoriek, pričom vzorky 1% vlákien boli najtenšie, tým pádom sa dali ľahšie pritlačiť na agar, aby mohla prebiehať difúzia, no pri 4% vláknach bola vzniknutá vrstva príliš hrubá na to, aby sa prispôbila povrchu agaru (čo je viditeľné aj na obrázku č. 60, v prípade bakteriálneho kmeňa *M. luteus*.). Alebo po druhé, vzniknutá morfológia mohla mať tiež vplyv na lepšiu inkorporáciu a následné uvoľňovanie antibiotika. V prípade 5% vlákien bola vzniknutá vrstva veľmi nehomogénna, ale na testy antimikrobiálnej aktivity boli vybrané najtenšie vzorky, a preto sú aj veľkosti inhibičných zón

väčšie ako pri 4% vláknach. V prípade vzoriek vzniknutých z 1% roztoku boli najväčšie inhibičné zóny s priemernou veľkosťou 5 ± 1 mm namerané u *E. coli*, s priemernou veľkosťou 4 ± 1 mm nasledovala kultúra *S. marcescens* a napokon *M. luteus* s priemernou veľkosťou $3,6 \pm 1,0$ mm. Priemerné veľkosti inhibičných zón 4% vzoriek boli namerané nasledovne: *E. coli* 2 ± 1 mm, *S. marcescens* 1 ± 1 mm, *M. luteus* $0,8 \pm 1,0$ mm, a pri 5% vzorkách: *E. coli* 3 ± 1 mm, *S. marcescens* 2 ± 1 mm, *M. luteus* 2 ± 1 mm. V prípade mikrobiálnej kultúry *C. glabrata*, rovnako ako v predošlých antimikrobiálnych testoch antibiotika, k tvorbe inhibičných zón nedošlo.



Obrázok č. 60: Ukážka sledovania antimikrobiálnej aktivity voči mikrobiálnym kmeňom: A – *M. luteus*, B – *S. marcescens*, C – *C. glabrata*, D – *E. coli*. Číslo poukazuje na typ vzorky: 1 %, 4 % a 5 % rozpusteného P3HB.

6 ZÁVER

Táto bakalárska práca bola zameraná na uvoľňovanie aktívnych látok z pórovitých štruktúr na báze P3HB. Boli vykonané testy na stanovenie antimikrobiálnej aktivity troch rôznych aktívnych látok: antibiotika – Levofloxacín, a vzoriek polyfenoly 1 a 2 voči vybraných mikroorganizmom – *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* a *Candida glabrata*. Na základe výsledkov týchto testov bola vybraná vhodná aktívna látka na inkorporáciu do vláknitých štruktúr P3HB, a to antibiotikum, ktoré spôsobilo v koncentracii 1 g/l vznik inhibičných zón u všetkých bakteriálnych kmeňov s priemernou veľkosťou $9,5 \pm 1,0$ mm, s výnimkou kvasinky, a tiež kvôli rozpustnosti v chloroforme.

Metódou elektrostatického zvlákňovania boli pripravené pórovité štruktúry s obsahom vlákien zvláknením roztoku poly(3-hydroxybutyrátu) v koncentraciách 1, 2, 4, 5 a 8 hm. % zmesi rozpúšťadiel dichlórmetánu a chloroformu v troch rôznych pomeroch (1:1, 1:2, 1:3), a následne bola posúdená ich morfológia metódou SEM. Vznikali submikrovláknenné pórovité štruktúry, ktorých veľkosť pórov a vlákien bola zameraná pomocou programu ImageJ. Veľkosť vlákien sa zväčšovala so zvyšujúcou sa koncentráciou a viskozitou roztokov, veľkosť pórov sa zväčšovala so zvyšujúcim sa objemom chloroformu v zmesi rozpúšťadiel, teda najväčšie póry vznikali v prípade zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:3. Následne boli na základe týchto informácií vybrané vhodné štruktúry na inkorporáciu antibiotika tak, aby mohlo byť študované uvoľňovanie aktívnej látky v závislosti na vytvorenej morfológii. Na toto štúdium a zvlákňovanie s prídavkom aktívnej látky bol vybraných roztok P3HB s koncentráciou 1 hm. % v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:1, ktorého zvláknením vznikla hubkovitá homogénna morfológia bez prítomnosti vlákien, ďalej roztok s koncentráciou 4 hm. % v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:2, ktorého zvláknením vznikla pórovitá štruktúra s obsahom pórov aj vlákien a roztok P3HB s koncentráciou 5 hm. % v zmesi rozpúšťadiel v pomere 1:1, ktorého zvláknením vznikali iba vlákna. Tento roztok bol vybraný aj s ohľadom na jeho viskozitu, ktorá bola s pomedzi koncentracií pri ktorých vznikali iba vlákna najnižšia, a tým pádom bolo predpokladané aj najľahšie zvlákňovanie daného roztoku.

Vybrané roztoky s prídavkom antibiotika boli zvláknené, ich morfológia a štruktúra sa v prípade 1 a 4% roztokov na pohľad voľným okom nelíšila od vláknitých vrstiev bez aktívnej látky, no pri zvlákňovaní 5% roztoku došlo k veľkému zasychaniu roztoku na konci zvlákňovacej elektródy a k celkovo ťažšiemu zvlákňovaniu, čoho výsledkom bol vznik veľmi nehomogénnej vláknitej vrstvy, a aj ďalšia manipulácia s touto vzorkou bola ovplyvnená negatívne.

Testovanie uvoľňovania inkorporovanej aktívnej látky do daných štruktúr ukázalo, že najvyššie množstvo antibiotika sa uvoľnilo pri 1% vzorke P3HB s hubkovitou štruktúrou, kedy sa z tejto vzorky uvoľnilo najviac antibiotika a v priebehu 3 hodín a 40 minút uvoľnené množstvo predstavovalo takmer 74 % z celkového uvoľneného množstva aktívnej látky. V prípade ostatných vzoriek bolo celkovo uvoľneného antibiotika asi o 77 % menej, čo ale súvisí s odlišnou účinnosťou enkapsulácie antibiotika do vlákien.

Všetky testované vláknité vzorky s inkorporovaným antibiotikom (Levofloxacínom) prejavili antimikrobiálnu aktivitu voči testovaným gram-pozitívnym a gram-negatívnym baktériám, no

väčšie inhibičné zóny boli pozorované u vzorky s koncentráciou P3HB 1 hm. %, ktorá mala hubkovitú štruktúru a pojala viac antibiotika, t. j. účinnosť enkapsulácie bola spomedzi porovnávaných vzoriek najvyššia. Práve túto vzorku treba vyzdvihnúť hlavne vďaka jednoduchosti prípravy, s čím súvisí aj vhodná hodnota dynamickej viskozity na proces elektrospinningu, a takisto aj kvôli mechanickej stabilite a pružnosti.

7 ZDROJE

- [1] ZHANG, Junyu, Ekaterina I. SHISHATSKAYA, Tatiana G. VOLOVA, Luiziana Ferreira DA SILVA a Guo-Qiang CHEN. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2018, **86**, 144-150 [cit. 2018-04-09]. DOI: 10.1016/j.msec.2017.12.035. ISSN 0928-4931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493117333325>
- [2] WIJEYEKOON, Suren, Carlo R. CARERE, Mark WEST, Shresta NATH a Daniel GAPES. Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis from nutrient rich wet oxidation liquors. *Water Research* [online]. 2018, **140**, 1-11 [cit. 2018-04-25]. DOI: 10.1016/j.watres.2018.04.017. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135418303014>
- [3] CHEN, Guo-qiang a Yang WANG. Medical applications of biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Chinese Journal of Polymer Science* [online]. 2013, **31**(5), 719-736 [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1007/s10118-013-1280-1. ISSN 0256-7679. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10118-013-1280-1>
- [4] KADOURI, Daniel, Edouard JURKEVITCH, Yaacov OKON a Susana CASTRO-SOWINSKI. Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 2008, **31**(2), 55-67 [cit. 2018-04-09]. DOI: 10.1080/10408410590899228. ISSN 1040-841X. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408410590899228>
- [5] HORI, Katsutoshi, Kazuo SOGA a Yoshimaru DOI. Effects of culture conditions on molecular weights of poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas putida* from octanoate. *Biotechnology letters* [online]. 1994, **16**(7), 709-714 [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00136476.pdf>
- [6] MADISON, Lara L. a Gjalt W. HUSIMAN. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiol Mol Biol Rev.* [online] 1999, **63**(1), 21–53 [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98956/>
- [7] ZAPLETAL, Martin a Jiří TREJBAL. Izolace polyhydroxyalkanoátů z mikrobiální biomasy. *Chem. Listy* [online]. 2016, **110**(12), 860–867 [cit. 2018-04-09]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/120/120>
- [8] HAZER, Baki a Alexander STEINBÜCHEL. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*[online]. 2007, **74**(1), 1-12 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1007/s00253-006-0732-8. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0732-8>
- [9] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. 2003, **87**(2), 137-146 [cit. 2018-04-09]. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
- [10] SUDESH Kumar, Hideano ABE a Yoshimaru DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer*

- Science*. 2000, **25**, 1503-1504. Dostupné z: <https://www.infona.pl/resource/bwmetal.element.elsevier-a8018c7b-177d-31ab-80b4-f08edee62e5f>
- [11] CHEN, Guo-Qiang. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews* [online]. 2009, **38**(8), 2434- [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1039/b812677c. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b812677c>
- [12] SHAMALA, T. R., M. S. DIVYASHREE, Reeta DAVIS, K. S. Latha KUMARI, S. V. N. VIJAYENDRA a Baldev RAJ. Production and characterization of bacterial polyhydroxyalkanoate copolymers and evaluation of their blends by fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. *Indian Journal of Microbiology* [online]. 2009, **49**(3), 251-258 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1007/s12088-009-0031-z. ISSN 0046-8991. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12088-009-0031-z>
- [13] VERLINDEN, R.A.J., D.J. HILL, M.A. KENWARD, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2007, **102**(6), 1437-1449 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>
- [14] BAYARI, Sevgi a Feride SEVERCAN. FTIR study of biodegradable biopolymers: P(3HB), P(3HB-co-4HB) and P(3HB-co-3HV). *Journal of Molecular Structure*[online]. 2005, 744-747, 529-534 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/j.molstruc.2004.12.029. ISSN 00222860. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022286004010257>
- [15] BERGSTRAND, Anna, Sanna UPPSTRÖM a Anette LARSSON. Permeability of Porous Poly(3-hydroxybutyrate) Barriers of Single and Bilayer Type for Implant Applications. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2014, 2014, 1-8 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1155/2014/958975. ISSN 1687-9422. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijps/2014/958975/>
- [16] ALPER, R., D. G. LUNDGREN, R. H. MARCHESSAULT a W. A. COTE. Properties of poly- β -hydroxybutyrate. I. General considerations concerning the naturally occurring polymer. *Biopolymers* [online]. 1963, **1**(6), 545-556 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1002/bip.360010605. ISSN 0006-3525. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.360010605>
- [17] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 2007, 82(3), 233-247 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1002/jctb.1667. ISSN 02682575. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1667>
- [18] ALI, Iftikhar a Nazia JAMIL. Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field. *Frontiers in Biology* [online]. 2016, 11(1), 19-27 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1007/s11515-016-1389-z. ISSN 1674-7984. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11515-016-1389-z>

- [19] ZAKY, S.H., K.W. LEE, J. GAO, A. JENSEN, K. VERDELIS, Y. WANG, A.J. ALMARZA a C. SFEIR. Poly (glycerol sebacate) elastomer supports bone regeneration by its mechanical properties being closer to osteoid tissue rather than to mature bone. *Acta Biomaterialia* [online]. 2017, **54**, 95-106 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.01.053. ISSN 17427061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706117300624>
- [20] BASNETT, P., K.Y. CHING, M. STOLZ, et al. Novel Poly(3-hydroxyoctanoate)/Poly(3-hydroxybutyrate) blends for medical applications. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2013, **73**(10), 1340-1348 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2013.03.019. ISSN 13815148. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381514813000795>
- [21] BERGSTRAND, Anna, Helene ANDERSSON, Johanna CRAMBY, Kristin SOTT a Anette LARSSON. Preparation of Porous Poly(3-Hydroxybutyrate) Films by Water-Droplet Templating. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* [online]. 2012, **03**(04), 431-439 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.4236/jbnb.2012.34043. ISSN 2158-7027. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/jbnb.2012.34043>
- [22] UEDA, Hiroki a Yasuhiko TABATA. Polyhydroxyalkanonate derivatives in current clinical applications and trials. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2003, **55**(4), 501-518 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1016/S0169-409X(03)00037-1. ISSN 0169409X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X03000371>
- [23] NIGMATULLIN, Rinat, Peter THOMAS, Barbara LUKASIEWICZ, Hima PUTHUSSERY a Ipsita ROY. Polyhydroxyalkanoates, a family of natural polymers, and their applications in drug delivery. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 2015, **90**(7), 1209-1221 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1002/jctb.4685. ISSN 02682575. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.4685>
- [24] MICHALAK, Michał, Piotr KURCOK a Minna HAKKARAINEN. Polyhydroxyalkanoate-based drug delivery systems. *Polymer International* [online]. 2017, **66**(5), 617-622 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1002/pi.5282. ISSN 09598103. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pi.5282>
- [25] NACHIYAR, V., A. B. NEVI, S. KARTHICK, S. K. R. NAMASIVAYAM a A. M. REBEL. Levofloxacin Loaded Polyhydroxybutyrate Nanodrug Conjugate for In-Vitro Controlled Drug Release. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* [online]. 2015, **6**(3), [cit. 2019-03-04]. ISSN 0975-8585. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/281091683_Levofloxacin_Loaded_Polyhydroxybutyrate_Nanodrug_Conjugate_for_In-Vitro_Controlled_Drug_Release/stats
- [26] VASIF, Harisci a Keskin DILEK. *Poly-4-hydroxybutyrate matrices for sustained drug delivery*. USA. WO 2005/007195 A1. Udelené 08.07.2004

- [27] ANSARI, Nor Faezah, M. Suffian M. ANNUAR a Belinda Pinguan MURPHY. A porous medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates)/hydroxyapatite composite as scaffold for bone tissue engineering. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2017, **17**(4), 420-429 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1002/elsc.201600084. ISSN 16180240. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.201600084>
- [28] DUCHEYNE, Paul, Kevin HEALY, Dietmar W. HUTMACHER, David W. GRAINGER, C. James KIRKPATRICK. *Comprehensive Biomaterials*. Elsevier Science, 2011, 197-198 [cit. 2018-04-09]. ISBN 978-0-08-055302-3
- [29] ANBUKARASU, Preetam, Dominic SAUVAGEAU a Anastasia ELIAS. Tuning the properties of polyhydroxybutyrate films using acetic acid via solvent casting. *Scientific Reports* [online]. 2016, **5**(1), - [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1038/srep17884. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep17884>
- [30] VOLOVA, Tatiana G., Olga N. VINOGRADOVA, Natalia O. ZHILA, Ivan V. PETERSON, Evgeniy G. KISELEV, Alexander D. VASILIEV, Aleksey G. SUKOVATIY a Ekaterina I. SHISHATSKAYA. Properties of a novel quaterpolymer P(3HB/4HB/3HV/3HHx). *Polymer* [online]. 2016, **101**, 67-74 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/j.polymer.2016.08.048. ISSN 00323861. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386116307145>
- [31] NAGY, Zsombor K., Attila BALOGH, Balázs VAJNA, Attila FARKAS, Gergő PATYI, Áron KRAMARICS a György MAROSI. Comparison of Electrospun and Extruded Soluplus®-Based Solid Dosage Forms of Improved Dissolution. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2012, **101**(1), 322-332 [cit. 2018-04-07]. DOI: 10.1002/jps.22731. ISSN 00223549. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915317524>
- [32] NGUYEN, Luong T. H., Shilin CHEN, Naveen K. ELUMALAI, Molamma P. PRABHAKARAN, Yun ZONG, Chellappan VIJILA, Suleyman I. ALLAKHVERDIEV a Seeram RAMAKRISHNA. Biological, Chemical, and Electronic Applications of Nanofibers. *Macromolecular Materials and Engineering* [online]. 2013, **298**(8), 822-867 [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1002/mame.201200143. ISSN 14387492. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mame.201200143>
- [33] PEPRAH, Benjamin A., Juliana A. RAMSAY a Bruce A. RAMSAY. Dense stable suspensions of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) nanoparticles. *European Polymer Journal* [online]. 2016, **84**, 137-146 [cit. 2018-04-09]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2016.09.015. ISSN 00143057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305716306875>
- [34] CHEN, Huizhi, Yan PENG, Shucheng WU a Lay TAN. Electrospun 3D Fibrous Scaffolds for Chronic Wound Repair. *Materials* [online]. 2016, **9**(4), 272- [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.3390/ma9040272. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/9/4/272>

- [35] RAMAKRISHNA, Seeram. *An introduction to electrospinning and nanofibers*. Hackensack, NJ: World Scientific, 2005. ISBN 981-256-415-2. Dostupné z: <https://epdf.tips/an-introduction-to-electrospinning-and-nanofibers.html>
- [36] GRANDE, Daniel, Julien RAMIER, Davy Louis VERSACE, Estelle RENARD a Valérie LANGLOIS. Design of functionalized biodegradable PHA-based electrospun scaffolds meant for tissue engineering applications. *New Biotechnology* [online]. 2017, **37**, 129-137 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.05.006. ISSN 18716784. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678416300309>
- [37] BRETCANU, Oana, Superb K. MISRA, D. Mohammad YUNOS, Aldo R. BOCCACCINI, Ipsita ROY, Tomasz KOWALCZYK, Slawomir BLONSKI a Tomasz A. KOWALEWSKI. Electrospun nanofibrous biodegradable polyester coatings on Bioglass®-based glass-ceramics for tissue engineering. *Materials Chemistry and Physics* [online]. 2009, **118**(2-3), 420-426 [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2009.08.011. ISSN 02540584. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S025405840900491X>
- [38] FONG, H, I CHUN a D.H RENEKER. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* [online]. 1999, **40**(16), 4585-4592 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/S0032-3861(99)00068-3. ISSN 00323861. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386199000683>
- [39] SON, Young Ju, Woo Jin KIM a Hyuk Sang YOO. Therapeutic applications of electrospun nanofibers for drug delivery systems. *Archives of Pharmacal Research* [online]. 2014, **37**(1), 69-78 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1007/s12272-013-0284-2. ISSN 0253-6269. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12272-013-0284-2>
- [40] NALWA, Hari Singh. *Polymeric nanostructures and their applications*. Stevenson Ranch, Calif.: American Scientific Publishers, 2007, 416-444 [cit. 2018-04-26]. ISBN 1-58883-070-5
- [41] MOBASHERI, Mina, Afsaneh VALIPOURI a Seyed Abdolkarim HOSSEINI RAVANDI. Developing porous fibers by electrocentrifuge spinning system. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2019, **136**(19) [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.1002/app.47513. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.47513>
- [42] WANG, YueLong, JiaoJiao DENG, RangRang FAN, et al. Novel nanoscale topography on poly(propylene carbonate)/poly(ϵ -caprolactone) electrospun nanofibers modifies osteogenic capacity of ADCs. *RSC Advances* [online]. 2015, **5**(101), 82834-82844 [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.1039/C5RA15841A. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA15841A>
- [43] JUNG, Jun Tae, Jeong F. KIM, Ho Hyun WANG, Emanuele DI NICOLO, Enrico DRIOLI a Young Moo LEE. Understanding the non-solvent induced phase separation (NIPS) effect during the fabrication of microporous PVDF membranes via thermally induced phase separation (TIPS). *Journal of Membrane Science* [online]. 2016, **514**, 250-263 [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.1016/j.memsci.2016.04.069. ISSN

03767388. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037673881630309X>
- [44] KHARE, V, A GREENBERG a W KRANTZ. Vapor-induced phase separation—effect of the humid air exposure step on membrane morphology Part I. Insights from mathematical modeling. *Journal of Membrane Science* [online]. 2005, **258**(1-2), 140-156 [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.1016/j.memsci.2005.03.015. ISSN 03767388. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738805001961MOSIO>
- [45] MOSIO, Petra. *Atlas bakterií*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012 [cit. 2019-02-28]. ISBN 978-80-7395-467-3
- [46] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2006 [cit. 2019-02-28]. ISBN 80-210-4207-9
- [47] HEJAZI, A. a F. R. FALKINER. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 1997, **46**(11), 903-912 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1099/00222615-46-11-903. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-46-11-903>
- [48] Facts about Escherichia coli. *European Centre for Disease Prevention and Control* [online]. Copyright © European Centre for Disease Prevention and Control [cit. 2019-03-04]. Dostupné z <https://ecdc.europa.eu/en/escherichia-coli-ecoli/facts>
- [49] Micrococcus: Pathogen safety data sheet - infectious substances. 2011. *Public health agency of Canada* [online]. [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: <http://www.phacaspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/micrococcus-eng.php>
- [50] FIDEL, Paul L., Jose A. VAZQUEZ a Jack D. SOBEL. *Candida glabrata*: Review od epidemiology, pathogenesis and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1999, **12**(1), 80-96 [cit. 2019-02-28]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9880475>
- [51] SHAHWAL, Vimal kumar, B. K. DUBEY a Mithun BHOUMICK. Preformulation study of Levofloxacin. *International Journal of Advances in Pharmaceutics* [online]. 2012, **1**(1), 1-8 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.7439/ijap.v1i1.1398. ISSN 2320-4923. Dostupné z: <https://ssjournals.com/index.php/ijap/article/view/1398>
- [52] NACHIYAR, Valli C., A Brinda DEVI, S. Karthick Raja NAMASIVAYAM a Arul Maximus RABEL. Levofloxacin Loaded Polyhydroxybutyrate Nanodrug Conjugate for In-Vitro Controlled Drug Release. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* [online]. 2015, **6**(3), 116 [cit. 2019-03-07]. ISSN 0975-8585. Dostupné z: [https://www.rjpbcs.com/pdf/2015_6\(3\)/\[15\].pdf](https://www.rjpbcs.com/pdf/2015_6(3)/[15].pdf)
- [53] Dynamická viskozita. *Ústav chemického inženýrství* [online]. [cit. 2019-03-07]. Dostupné z: <http://uchi.vscht.cz/uploads/etabulky/dynviskap.html>
- [54] Bezpečnostní list: Dichlormethan. *Carl ROTH* [online]. 2016 [cit. 2019-03-07]. Dostupné z: https://www.carlroth.com/downloads/sdb/cs/A/SDB_AE03_CZ_CS.pdf

8 ZOZNAM SKRATIEK

PHA	polyhydroxyalkanoát
P3HB	polyhydroxybutyrát
lcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s dlhým reťazcom
scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkym reťazcom
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty so stredne dlhým reťazcom
HV	hydroxyvalerát
HB	hydroxybutyrát
HO	hydroxyoktanoát
HD	hydroxydekanoát
PP	polypropylén
P(3HB-3HV)	polyhydroxybutyrát-co-hydroxyvalerát
E _b	pevnosť ťahu
T _m	teplota topenia
T _g	teplota skelného prechodu
phbA	β-ketoacyl-CoA tioláza
phbB	acetoacyl-CoA reduktáza
phbC	PHB polymeráza
HP	hydroxypropionát
HA	hydroxyapatit
DMF	dimetylformamid
TFE	trifluoretanol
CHCl ₃	chloroform
NS	nosičový systém
VIPS	separácia fáz indukovaná parou
NIPS	separácia fáz indukovaná nerozpúšťadlom
TIPS	separácia fáz indukovaná teplom
PPC	polypropylénkarbonát
PCL	poly(3-kaprolaktón)
DCM	dichlórmetán
LB	Luria Bertani broth
NB	Nutrient broth
YPD	Yeast Extract-Peptone-Dextrose