



# 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

## VÝVOJ A PŘÍPRAVA ANTIMIKROBIÁLNÍCH NANOSTRUKTURNÍCH BIOMATERIÁLŮ

DEVELOPMENT AND PREPARATION OF ANTIMICROBIAL NANOSTRUCTURE BIOMATERIALS

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Nela Drabíková

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2021

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1491/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Nela Drabíková**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

### Název diplomové práce:

Vývoj a příprava antimikrobiálních nanostrukturních biomateriálů

### Zadání diplomové práce:

1. Přehled materiálů a postupů přípravy nanovláken a nanočástic
2. Optimalizace metod přípravy kombinovaných materiálů s aktivní antimikrobiální složkou
3. Stanovení antimikrobiálních vlastností a bezpečnosti nových materiálů s využitím různých typů buněk
3. Vyhodnocení a diskuse výsledků

### Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

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

-----  
Bc. Nela Drabíková  
student(ka)

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Předložená diplomová práce se zabývá optimalizací přípravy kombinovaných nanostrukturních antimikrobiálních biomateriálů a jejich charakterizací. V teoretické části byla vypracována rešerše zaměřená na materiály používané k přípravě nanočástic a nanovláken, dále na postupy přípravy těchto nanomateriálů. Dále byly popsány využívané antimikrobiální látky – kurkumin a ampicilin, a princip stanovení bezpečnosti všech používaných materiálů.

V praktické části je zpracován optimalizační proces přípravy nanočástic i nanovláken a následně také vlastních kombinovaných materiálů. Dále byla testována bezpečnost připravených materiálů a antimikrobiálních látek na buněčné linii HaCaT, kvůli jejich potenciálnímu využití v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Velká část práce je věnována testování očekávaných antimikrobiálních účinků připravených kombinovaných materiálů s použitím několika mikroorganismů z řad grampozitivních i gramnegativních bakterií a kvasinek. Dále byla sledována rychlost uvolňování aktivních látek z připravených biomateriálů do modelového prostředí pomocí spektrofotometru. Pomocí kapalinové chromatografie bylo detekováno také množství ampicilinu uvolněného z připravených biomateriálů.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Nanomateriály, nanovlákná, nanočástice, kožní kryty ran, polyhydroxybutyrát, antimikrobiální látka, cytotoxicita

## **ABSTRACT**

The presented diploma thesis deals with the optimisation of preparation and the preparation of combined nanostructured antimicrobial biomaterials itself. In the theoretical part, a review focused on used materials and consequently preparation of nanoparticles and nanofibers was elaborated. Furthermore, the used antimicrobial substances – curcumin and ampicillin, and the principle of cytotoxicity assay were described.

In practical part the optimisation process is described. Furthermore the safety of prepared materials and used antimicrobial substances on HaCaT cell line was tested, in order to confirm their possible further use in cosmetic and pharmaceutical industry. Great part of the thesis deals with evaluation of the antimicrobial activity of used substances and prepared combined nanomaterials on multiple microorganisms from grampositive bacteria, gramnegative bacteria and yeasts. Also the release speed of antimicrobial substances from prepared nanomaterials was determined by spectrophotometer. The amount of released ampicillin from prepared nanomaterials was determined by liquid chromatography.

## **KEYWORDS**

Nanomaterials, nanofibers, nanoparticles, skin wound dressings, polyhydroxybutyrate, antimicrobial substance, cytotoxicity

DRABÍKOVÁ, Nela. *Vývoj a příprava antimikrobiálních nanostrukturálních biomateriálů*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131823>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ivana Márová.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za možnost pracovat v jejím týmu, za její vstřícný přístup a ochotu. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Ing. Lucii Dzurické za cenné rady, velkou ochotu, podporu, odborný dohled a trpělivost při zpracovávání mé experimentální části.

## **OBSAH**

1	ÚVOD .....	10
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	11
2.1	Kůže a kožní rány .....	11
2.1.1	Složení kůže .....	11
2.1.2	Průchod látek lidskou kůží .....	12
2.1.3	Kožní rány .....	12
2.1.4	Kožní kryty .....	13
2.2	Nanomateriály .....	13
2.3	Nanovlákná .....	14
2.3.1	Materiály používané pro přípravu nanovláken .....	15
2.3.2	Příprava nanovláken pomocí elektrospinningu .....	16
2.3.3	Příprava nanovláken pomocí forcespinningu .....	17
2.3.4	Další možnosti přípravy nanovláken .....	18
2.3.5	Přístupy pro inkorporaci léčivých látek do nanovláken .....	19
2.3.5.1	Směsné elektrostatické zvlákňování .....	19
2.3.5.2	Emulzní elektrostatické zvlákňování .....	20
2.3.5.3	Koaxiální elektrostatické zvlákňování .....	20
2.3.5.4	Povrchová imobilizace .....	20
2.4	Nanočástice .....	20
2.4.1	Klasifikace nanočástic .....	21
2.4.2	Metody přípravy nanočástic .....	22
2.5	Antimikrobiální látky .....	23
2.5.1	Kurkumin .....	23
2.5.2	Ampicilin .....	25
2.6	Antimikrobiální testy .....	25
2.6.1	Diluční metody .....	26
2.6.2	Difuzní metody .....	26
2.6.3	Epsilon test .....	26
2.7	Testy bezpečnosti .....	26
2.7.1	Buněčné kultury .....	26
2.7.2	Testy cytotoxicity .....	27
2.7.2.1	MTT test .....	27
3	CÍLE PRÁCE .....	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	29
4.1	Použité chemikálie .....	29
4.1.1	Chemikálie pro přípravu lipozomů .....	29

4.1.2	Chemikálie pro přípravu PHB vláken .....	29
4.1.3	Chemikálie pro stanovení antioxidační aktivity.....	29
4.1.4	Chemikálie použité pro práci s buňkami.....	29
4.1.5	Chemikálie použité pro práci s mikroorganismy .....	29
4.1.6	Použité účinné látky .....	29
4.2	Použité přístroje a pomůcky .....	30
4.3	Použité mikroorganismy .....	30
4.4	Použité humánní buňky.....	30
4.5	Optimalizace přípravy kombinovaných materiálů s aktivní antimikrobiální složkou	30
4.5.1	Stanovení celkové antioxidační aktivity kurkuminu pomocí ABTS.....	30
4.5.2	Příprava roztoku PHB .....	31
4.5.3	Příprava lipozomů .....	31
4.5.3.1	Příprava lipozomů s kurkuminem.....	31
4.5.3.2	Příprava lipozomů s ampicilinem .....	32
4.5.4	Charakterizace lipozomů.....	32
4.5.4.1	Spektrofotometrické stanovení enkapsulační účinnosti.....	32
4.5.4.2	Stanovení velikosti lipozomů pomocí DLS .....	33
4.5.4.3	Stanovení stability lipozomů pomocí měření Zeta potenciálu.....	33
4.5.4.4	Stanovení dlouhodobé stability lipozomů.....	33
4.5.5	Uvolňování účinných látek z lipozomů.....	34
4.5.6	Příprava PHB vláken.....	34
4.5.7	Uvolňování účinných látek z PHB vláken .....	34
4.5.8	Uvolňování ampicilinu pomocí HPLC.....	35
4.5.9	Testování stability vláken.....	35
4.5.10	Příprava kombinovaných materiálů .....	35
4.5.11	Uvolňování účinných látek z kombinovaných materiálů.....	36
4.6	Stanovení antimikrobiálních vlastností .....	37
4.6.1	Příprava médií a kultivace mikroorganismů .....	37
4.6.1.1	Candida glabrata .....	37
4.6.2	Bujónová diluční metoda .....	37
4.6.2.1	Aktivní látky a lipozomy .....	37
4.6.2.2	Nanovláknenné kryty .....	38
4.6.3	Test na agarových plotnách.....	38
4.6.4	Resazurin test .....	38
4.7	Stanovení bezpečnosti materiálů s využitím humánních keratinocytů .....	38
4.7.1	Kultivace humánních keratinocytů linie HaCat .....	38

4.7.2	MTT test cytotoxicity .....	39
5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	41
5.1	Optimalizace přípravy kombinovaných materiálů s antimikrobiální složkou .....	41
5.1.1	Antioxidační aktivita kurkuminu .....	41
5.1.2	Charakterizace lipozomů.....	41
5.1.2.1	Spektrofotometrické stanovení enkapsulační účinnosti kurkuminu .....	41
5.1.2.2	Spektrofotometrické stanovení enkapsulační účinnosti ampicilinu.....	43
5.1.2.3	Stanovení velikosti a stability lipozomů .....	44
5.1.3	Uvolňování účinných látek z lipozomů.....	46
5.1.3.1	Ampicilin .....	46
5.1.3.2	Kurkumin .....	48
5.1.4	Optimalizace přípravy nanovláken.....	49
5.1.5	Uvolňování účinných látek z nanovláken .....	50
5.1.6	Uvolňování ampicilinu pomocí HPLC.....	51
5.1.6.1	PHB vlákna .....	52
5.1.6.2	Lipozomy .....	52
5.1.7	Testování stability vláken.....	54
5.2	Stanovení antimikrobiálních vlastností .....	55
5.2.1	Bujónová diluční metoda .....	55
5.2.1.1	Kurkumin a ampicilin .....	55
5.2.1.2	Lipozomy .....	56
5.2.2	Agarové plotny .....	58
5.2.3	Resazurin test .....	59
5.2.3.1	Ampicilin a kurkumin .....	59
5.2.3.2	Lipozomy .....	61
5.3	Stanovení cytotoxicity.....	62
5.3.1	MTT test.....	62
5.4	Kombinované materiály .....	65
5.4.1	Vazba lipozomů s přídatkem PHB na PHB vlákna.....	65
5.4.2	Uvolňování účinných látek z kombinovaných materiálů.....	65
5.4.3	Antimikrobiální testy.....	68
5.4.3.1	Bujónová diluční metoda .....	68
5.4.3.2	Resazurin test.....	69
5.4.4	MTT test.....	70
6	ZÁVĚR.....	71
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	73
8	SEZNAM PŘÍLOH.....	80

9	PŘÍLOHY.....	81
---	--------------	----

# 1 ÚVOD

Podávání léků přes kůži se v posledních desetiletích dokázalo vyvinout od jednoduché aplikace přímo do rány nebo přímo do místa infekce ke složitějším, komplexnějším systémům pro cílené doručování léčiv.

V poslední době dosahuje podávání léčiv kůží vyšší přesnosti v místě působení než dříve objevené a používané konvenční metody. Transport kůží nemusí být nutně spojován jen s podáváním léčiva za účelem odstranit projevy onemocnění, ale zahrnuje také podávání léčivých látek pro vylepšení kvality samotné kůže. Snižování velikosti nosičů léčiv se ukazuje jako klíčové možnost pro lepší propustnost skrze kůži. Nanovláknenné kryty potom poskytují výrazné operační výhody, jako je například vysoká pórovitost a vysoké hodnoty specifické povrchu. Z tohoto důvodu se velká pozornost upírá na využití nanomateriálů jako možné kryty ran ve farmaceutickém i kosmetickém průmyslu.

Za účelem podpory léčení kožních ran se nanovláknenné biodegradovatelné kryty jeví jako optimální řešení. Malá velikost jejich pórů chrání ránu před další možnou infekcí a přitom umožňují výměnu plynů. Díky jejich vlastnostem je možné do nich inkorporovat různé aktivní látky (antibiotika, enzymy, minerály), které se díky navázání na kožní kryt mohou postupně uvolňovat přímo v místě poranění a urychlovat tak proces zacelení a úplného zahojení rány.

Nanovláknenné kryty ran bývají ve styku s kůží po delší časové úseky, a proto jsou u těchto nanomateriálů velmi důležité jejich antimikrobiální vlastnosti. Jako antimikrobiální látky označujeme látky takové, které mají schopnost inhibovat růst mikroorganismů.

Tato práce se zaměřuje převážně na vývoj a přípravu nových kombinovaných antimikrobiálních biodegradovatelných nanomateriálů. Dále se zabývá sledováním antimikrobiálních vlastností těchto materiálů a jednotlivých látek, které jsou do těchto materiálů inkorporovány, vůči grampozitivním i gramnegativním bakteriálním kmenům a také vůči kvasinkám. Následně se zameřuje také na sledování možných účinků připravených kombinovaných materiálů na lidské kožní buňky.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

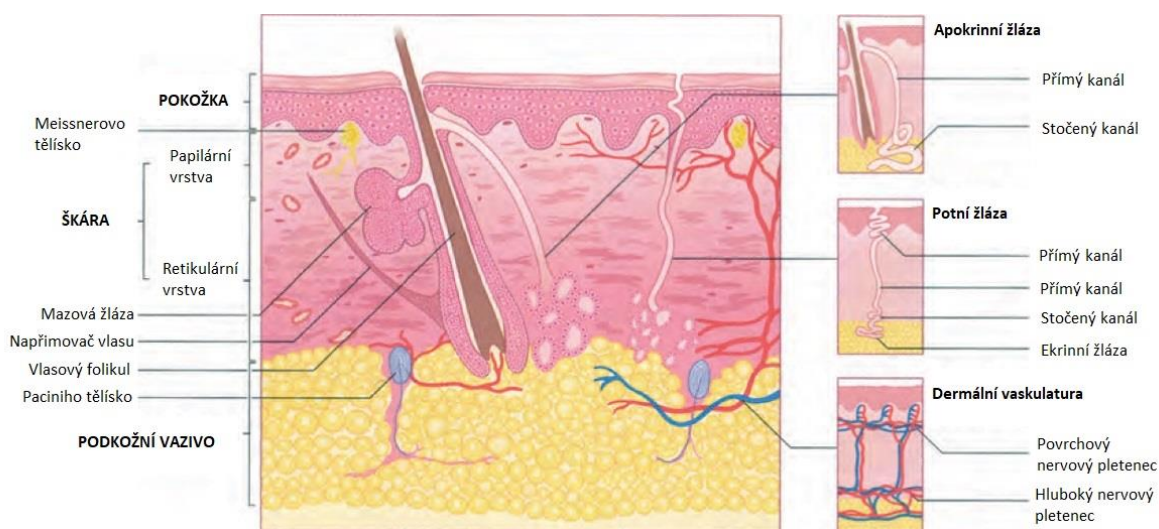
### 2.1 Kůže a kožní rány

Kůže je největším a nejtěžším orgánem lidského těla, tvoří 5–9 % tělesné hmotnosti člověka. Vytváří bariéru mezi organismem a vnějším prostředím a zároveň udržuje jeho integritu. U dospělého člověka se plocha kůže pohybuje mezi 1,2–2,3 m<sup>2</sup> a její tloušťka se pohybuje mezi 0,5–4 mm [1][2].

K hlavním funkcím kůže patří například: termoregulace a látková výměna, ochrana organismu před exogenními chemickými a fyzikálními faktory, smyslový vjem. Kůže je také první obrannou linií před patogenními mikroorganismy a podílí se na imunologických procesech, účastní se metabolických procesů a zabraňuje ztrátě vody z organismu [1][3].

Kůže je tvořena třemi hlavními částmi. Tyto části jsou *epidermis* (pokožka), *corium* (*dermis*, tedy škára) a *tela subcutanea* (*subcutis*, tedy podkožní vazivo) [4].

#### 2.1.1 Složení kůže



Obrázek 1: Schématické zobrazení složení lidské kůže [5]

V přiloženém obrázku (Obrázek 1) jsou vyznačeny hlavní části kůže a některé její útvary. Nejsvrchnější částí kůže je *epidermis*, která plní převážně bariérovou funkci. *Epidermis* je zrohovatělý vícevrstevný dlaždicový epitel tvořený převážně keratinocyty (její součástí jsou však také Langerhansovy buňky, Merkelovy buňky a melanocyty) a můžeme ji rozdělit do pěti základních vrstev podle odlišných vývojových stádií, ve kterých se buňky právě nacházejí. Tyto vrstvy jsou: bazální (*stratum basale*), spinocelulární (*stratum spinosum*), zrnitá (*stratum granulosum*), lesklá (*stratum lucidum*) a rohovitá (*stratum corneum*). Buňky *epidermis* se při obnově postupně oddělují od kmenových buněk lokalizovaných v hlubších částech kůže [2][5].

*Dermis* (*corium*) se skládá z kolagenních a elastických vláken propojených ve svazcích s mezodermálním původem. Tyto vlákna jsou zodpovědná za pružnost a pevnost kůže. Hlavní funkcí *dermis* je výživa *epidermis*. Můžeme ji rozdělit do dvou vrstev: *stratum papillare* a *stratum reticulare*. Povrchovou vrstvu (*s. papillare*) tvoří síť vláken a množství vazivových buněk. Tato vrstva je protkaná sítí kapilár, které společně s papilami ústí na povrchu kůže. Obsahuje mimo jiné také krevní i lymfatické cévy, nervy, vylučovací a sekreční žlázy. Hluboká

vrstva (*s. reticulare*) obsahuje menší množství jak buněk, tak i elastických a kolagenních vláken. V dermis se vyskytují termoreceptory, receptory bolesti i mechanoreceptory, díky kterým můžeme vnímat tlak, doteky a vibrace. V závislosti na místě lokalizace na lidském těle se množství daných receptorů liší [1][2][5].

Poslední vrstvou lidské kůže je *subcutis*, tedy podkožní vazivo. Funkcí této vrstvy je tlumení vnějších vlivů. V této vrstvě se nacházejí vlasové folikuly, krevní cévy a senzorycké neurony. *Subcutis* spojuje *dermis* s povrchoým *periostem* a *fascií*. Jsou zde lokalizované lipocyty a houbovitě tkanivo. Tuková tkaniva (*panniculus adiposus*) poskytují především energetickou zásobu a mají tepelně-izolační funkci, stejně tak jako mechanickou funkci. Podkožní vazivo je také považováno za endokrinní orgán, ve kterém se produkuje hormon leptin, který je zodpovědný za regulaci tělesné hmotnosti. Nejvyšší zastoupení těchto tukových tkaniv najdeme především na sedacích svalech, ve střední části stehen a na bříše. Nejméně zastoupené jsou tato tkaniva potom především na očních víčkách, ušních lalůčkách a na hřbetu nosu. V oblastech těla často vystavovaných mechanickému tlaku se v *subcutis* tvoří tíhové váčky naplněné tekutinou, která má svůj význam při tlumení nárazů [1][2][5].

### 2.1.2 Průchod látek lidskou kůží

Pro průchod látek skrze lidskou kůži používáme termín „dermální penetrace“. Je to proces, který můžeme rozdělit do tří na sebe navazujících kroků. Těmi jsou penetrace, permeace a resorpce. Jako penetraci označujeme vlastní vstup látky do konkrétní vrstvy kůže, jako permeaci pak přechod mezi jednotlivými vrstvami kůže. Resorpce je vstřebávání vstupujících látek do vaskulárního systému. Existují 3 potenciální cesty průchodu látek skrz lidskou kůži a jsou to: mezibuněčná cesta, vnitrobuněčná cesta a penetrace skrze vlasové folikuly [6][7].

*Stratum corneum* je lipofilní povahy a je považována za hlavní bariéru, skrze kterou většina sloučenin není schopná proniknout dovnitř organismu. Díky její lipofilní povaze mají lipofilní látky tendenci pronikat touto bariérou rychleji než látky hydrofilní. Následující vrstvy kůže jsou hydrofilního charakteru, a tudíž se zde lipofilní látky usazují a nepronikají do hlubších vrstev kůže, oproti tomu hydrofilní látky zde mohou pronikat až na úroveň krevního oběhu [6].

### 2.1.3 Kožní rány

Rány kůže bývají popisovány jako ztráta nebo porušení kožního krytu v důsledku fyzikálních, mechanických či termických poškození. Dalšími důsledky vedoucími k poranění kůže mohou být patofyziologické poruchy nebo také poškození fyziologických či anatomických funkcí dané tkáně. U každé rány sledujeme její lokalizaci, velikost, hloubku, tvar, směr a okraje. Tyto faktory jsou velmi důležité pro sledování procesu hojení ran a volbu optimálního způsobu léčby těchto ran [8][10].

Rány kůže můžeme dělit několika různými způsoby na základě různých faktorů. Jednoduché rány zasahují do pokožky, škály a tukového vaziva. Komplikované rány potom pronikají do hloubky a mohou poškodit důležité nervové i cévní svazky a vnitřní orgány. Při průniku rány až do tělní dutiny označujeme ránu za penetrující, bez průniku do tělní dutiny jako nepenetrující. Dalším dělením je dělení dle délky hojení na rány akutní a chronické. Akutní rány vznikají v důsledku chirurgického zákroku nebo úrazu a hojení probíhá v očekávaném časovém úseku v závislosti na jejich hloubce a rozsahu poškození. Oproti tomu chronické rány

mohou být důsledky popálení nebo vředů a nedají se léčit klasickým způsobem a léčení probíhá delší dobu [8][9].

Dále můžeme rány rozdělit na povrchové a hloubkové, kdy u povrchových jde pouze o poranění epidermální vrstvy a hojení probíhá v řádu několika dní. Hloubkové rány zasahují do hlubších vrstev kůže a léčí se po delší časový rámec.

Rány můžeme dělit také dle typu poškození na rány řezné, sečné, bodné a střelné, rány kousnutím, zhmožděním a rány tržné. Dle míry zanesení rány nečistotami rány dělíme také na rány čisté, mechanicky znečištěné, aseptické, infikované nebo otrávené (chemickými či zvířecími jedy) [10].

#### **2.1.4 Kožní kryty**

Po vzniku rány, ať už je povrchová nebo hloubková, akutní či chronická, je vždy důležité ránu správně vyhodnotit a zavést správnou variantu léčby. Tady přicházejí do povědomí kožní kryty jako důležitá součást léčby [11].

Typ používaného krytu vždy závisí na množství faktorů, včetně typu zranění, velikosti zranění, místě na těle a na jeho vážnosti. Níže jsou uvedeny typy krytů ran [12].

- Hydrokoloidní
- Hydrogelové
- Alginátové
- Kolagenové
- Pěnové
- Transparentní
- Tkané [12]

## **2.2 Nanomateriály**

Jako nanomateriály popisujeme materiály velmi malých rozměrů (alespoň v jedné dimenzi). Tyto rozměry se řádově pohybují mezi 1 až 150 nm. Materiály se strukturou v nanoměřítku mají velmi často jedinečné optické, elektrické, tepelné nebo mechanické vlastnosti. Obor zabývající se tvorbou a využitím nanomateriálů se nazývá nanotechnologie. Existují tři zdroje těchto materiálů, které jsou popsány v následujících odstavcích [13].

Funkční přírodní nanomateriály jsou často součástí biologických systémů. Jsou obsaženy ve struktuře virů (bílkoviny, kapsidy), v přírodních koloidech (mléko, krev), kostní dřeni, vlasech, nehtech a kůži. Přírodní anorganické nanomateriály se tvoří při růstu krystalů v různých podmínkách zemské kůry [14].

Dále mohou být nanomateriály záměrně připraveny lidmi tak, aby měly požadované vlastnosti (optické, tepelné, elektrické) [14].

Nanomateriály mohou být také náhodně vyrobeny jako vedlejší produkty různých průmyslových nebo mechanických procesů. Jako zdroje náhodných nanočástic považujeme například výfukové plyny, výpary ze svařování, vytápění tuhým palivem nebo opotřebení a korozi. Jako ultrajemné částice se potom označují náhodné atmosférické nanočástice, které se vytváří náhodně během různých procesů a mohou přispívat ke znečištění ovzduší [14].

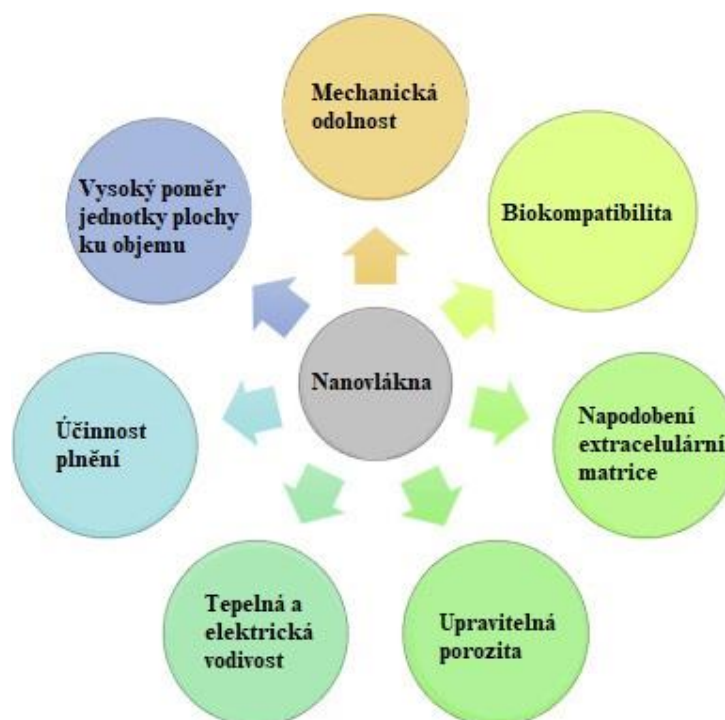
Nanomateriály se často dělí na základě toho, kolik jejich rozměrů zapadá do nanorozměrů. Jako nanočástice označujeme objekty, které mají všechny tři vnější rozměry v nanoměřítku, jako nanovlákná potom objekty se dvěma vnějšími rozměry v nanoměřítku. Dutá nanovlákná

označujeme jako nanotrubičky a pevná nanovlákna jako nanorody. Jeden vnější rozměr v nanorozměrech mají nanoplochy [14].

### 2.3 Nanovlákna

Nanovlákna se vyznačují především svým velkým povrchem k jednotce objemu. Platí zde, že plocha vytvořená nanovláknem je závislá na průměru vlákna. To znamená, že čím je průměr vlákna menší, tím větší plocha povrchu vznikne [15]. Poměr povrchu k objemu, vysoká porozita a velmi malé póry u nanovláken nabízejí příznivé podmínky pro adsorpci kapalin ve filtračním médiu, což zabraňuje prostupu bakterií a vylepšuje vlastnosti při hojení ran [16].

Díky biokompatibilitě, účinnosti navazování a schopnosti napodobit extracelulární matrix, poskytují některá nanovlákna skvělou platformu pro distribuci genů či léčiv a pro tkáňové inženýrství. Některé druhy nanovláken působí jako nanonosiče pro cílené dodávání různých tříd léčiv, jako jsou například protirakovinné, antimikrobiální, kardiovaskulární, některé druhy antibiotik, proteiny a peptidy (DNA a RNA), do specifického místa/orgánu v lidském těle [17][18].



Obrázek 2: Ideální vlastnosti nanovláken [16]

Nanovlákna lze také použít jako scaffoldy pro distribuci genů a pro náhradu a regeneraci poškozené tkáně a orgánů začleněním růstových faktorů, čímž se řadí mezi slibné vektory ve tkáňovém inženýrství. Scaffoldy jsou 3D struktury poskytující prostředí vhodné pro růst buněk a také svou stavbou a vlastnostmi napodobují extracelulární matrix. Implantabilní scaffoldy na bázi nanovláken potom mohou pomáhat při regeneraci kostí, nervů, zubů a hojení ran. Mezi ideální vlastnosti nanovláken (Obrázek 2) potom patří také tepelná a elektrická vodivost, což jsou jen další výhody těchto materiálů [16].

Mají výborné mechanické vlastnosti hlavně díky jejich ultratenkosti, a tvorbě vláknitých membrán. Díky jejich povrchovým vlastnostem mohou být využity v širokém spektru aplikací. Jedním z jejich velmi významných využití jsou kryty ran, které napomáhají rychlému a úplnému hojení popálenin a různých chronických ran [19].

### 2.3.1 Materiály používané pro přípravu nanovláken

Pokud jsou vlákna připravována za účelem jejich dalšího využití v biomedicíně či tkáňovém inženýrství, musí být nutně dodrženy tyto vlastnosti: biokompatibilita a biodegradabilita.

Biokompatibilita v tomto případě označuje vlastnost materiálu, díky které při styku tohoto materiálu se živým systémem nedochází k vzájemným negativním interakcím. Biokompatibilní materiál nesmí být cytotoxický a nesmí vyvolávat žádnou nebo jen velmi malou imunitní odpověď. Aby mohl být materiál označen za biokompatibilní, musí být také všechny jeho degradační produkty biokompatibilní [20]. V krajních případech, kdy vybraný polymer nemá ideální vlastnosti pro použití v požadované aplikaci, lze biokompatibilitu materiálu uměle zvýšit například úpravou hydrofobicity nebo biochemické afinity materiálu nanovláken k živým buňkám [21].

Jako biodegradabilita se označuje biologická rozložitelnost materiálu v životním prostředí. V lidském těle jsou biodegradabilní materiály postupně odbourávány biologickou cestou a v případě scaffoldů nahrazovány nově regenerovanou tkání [22].

Nanovlákna lze připravit jak z přírodních, tak i syntetických materiálů. Jako počáteční materiál pro jejich přípravu bereme syntetický nebo přírodní polymer, který je většinou ve formě polymerního roztoku nebo taveniny [22].

Pro přípravu nanovláken se tedy používají syntetické polymery jako například kyselina poly-mléčná (PLA), kyselina poly-glykolová (PGA), polyvinyl alkohol (PVA), polyuretan (PU) nebo poly(mléčná-co-glykolová) kyselina (PLGA). Mezi přírodní biopolymery, které se využívají pro přípravu nanovláken se potom řadí například chitosan, kolagen, želatina nebo celulóza. Tyto biopolymery se získávají z v přírodě se vyskytujících materiálů, jako jsou skořápky nebo dřevo, houby, bakterie, rostliny a zvířata [23]. Tyto polymery jsou na bázi polysacharidů nebo proteinů, což je zobrazeno v následující tabulce (Tabulka 1).

Tabulka 1: Příklad klasifikace biopolymerů dle složení [16]

Biopolymery na bázi polysacharidů	Biopolymery na bázi proteinů
Alginát	Sojový protein
Chitosan	Pšeničný protein
Kyselina hyaluronová	Zein - kukuřičný protein
Kefiran	
Pullulan	

Pro výrobu nanovláken použitelných dále v medicíně a kosmetice se využívají především biologicky rozložitelné polymery. Nanovlákna mají strukturu, do které můžeme pro tyto aplikace inkorporovat nejrůznější druhy chemických sloučenin, mezi které patří například antibiotika, proteiny, DNA i RNA nebo protinádorová léčiva [15].

Mezi přírodní biologicky rozložitelné polymery patří také polyhydroxyalkanoáty (PHA). Tyto polyestery organických hydroxykyselin se akumulují ve formě intracelulárních granulí řadou prokaryotických mikroorganismů. Různé typy těchto sloučenin slouží mikroorganismům jako zásobní polymer a zároveň také zvyšují robustnost mikroorganismů vůči řadě stresových faktorů. Tyto sloučeniny bývají často označovány jako bioplasty a mohou být využity jako elastomery nebo termoplasty [24][25].

Typickým zástupcem PHA je polyhydroxybutyrát (PHB). Tento biopolymer i produkty jeho degradace jsou obecně považovány za zcela netoxické. 3-hydroxybutyrát (monomerní jednotka) je přirozeným metabolitem, jak u živých organismů, tak i v lidském těle. Nekumuluje se v životním prostředí a je zcela degradovatelný uvnitř organismů, včetně lidského těla [27].

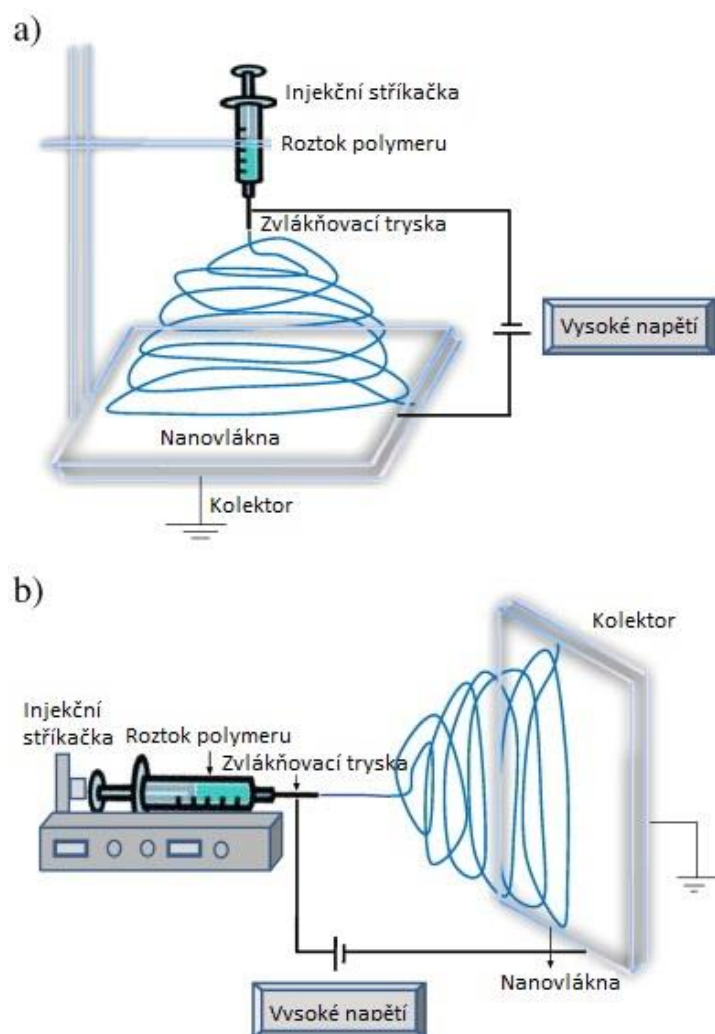
PHA jsou hojně využívány v zemědělství, medicíně, kosmetice i v textilním průmyslu. Konkrétněji v medicíně je PHB studován jako nosič aktivních látek a jako matrice ve tkáňovém inženýrství. Přináší také možnost využití při hojení ran a v použití nejrůznějších implantátů. Zabraňuje tvorbě biofilmů patogenních bakterií, a tedy může být vhodný pro povrchovou úpravu kloubních implantátů. Dále se PHB v dnešní době používá i pro rozložitelné stehy [27][28].

### **2.3.2 Příprava nanovláken pomocí elektrospinningu**

Proces elektrospinningu je znám už od roku 1902, kdy jej vymysleli Morton a Cooley. Jeho pravý význam však byl zjištěn až v roce 1995, kdy Doshi a Reneker pomocí skenovacího elektronového mikroskopu zjistili, že se ve skutečnosti jedná o jednu z metod přípravy nanovláken a navrhli jejich využití mimo jiné také v biomedicíně inženýrství [29].

Jako elektrospinning popisujeme proces výroby jemných polymerních vláken, které vznikají prostřednictvím elektrostatické síly z kapaliny (polymer, tavenina). Vznikají nám vlákna různých rozměrů (od vláken s průměrem několik desítek/stovek nanometrů až po vlákna s průměrem okolo pěti mikrometrů). Materiály používané pro zvlákňování můžeme rozdělit na organické polymery, biopolymery a anorganické materiály. To znamená, že touto technikou můžeme vyrábět vlákna z přírodních i syntetických polymerů [30].

Aparatura musí nutně obsahovat zdroj vysokého napětí, který zabezpečuje vysoký elektrický potenciál mezi hrotem jehly a uzemněným kolektorem, jehlu připojenou k injekční stříkačce a již zmíněný kovový kolektor. V důsledku povrchového napětí vzniká na špičce jehly kapička polymerního roztoku a po zapojení elektrického proudu se kapka začne prodlužovat a vzniká tzv. Taylorův kužel. Dalším zvyšováním potenciálu překonáváme povrchové napětí a ve směru kolektoru se tvoří polymerní vlákno. Po odpaření rozpouštědla dopadá na kolektor polymer ve své pevné formě. Aparatura může být sestavena vertikálně nebo horizontálně viz Obrázek 3. Díky tomu, že elektrospinning nevyžaduje pro tvorbu nanovláken působení tepla, může se tato metoda používat i pro vlákna, která jsou vyráběna z termolabilních látek. Navzdory této výhodě je elektrospinning citlivý na vlivy okolního prostředí jako je například vlhkost (vlákna nejsou dostatečně vysušená a lepí se) [30].



Obrázek 3: Schématické zobrazení aparatury elektrospinningu a) vertikální b) horizontální [30]

### 2.3.3 Příprava nanovláken pomocí forcespinningu

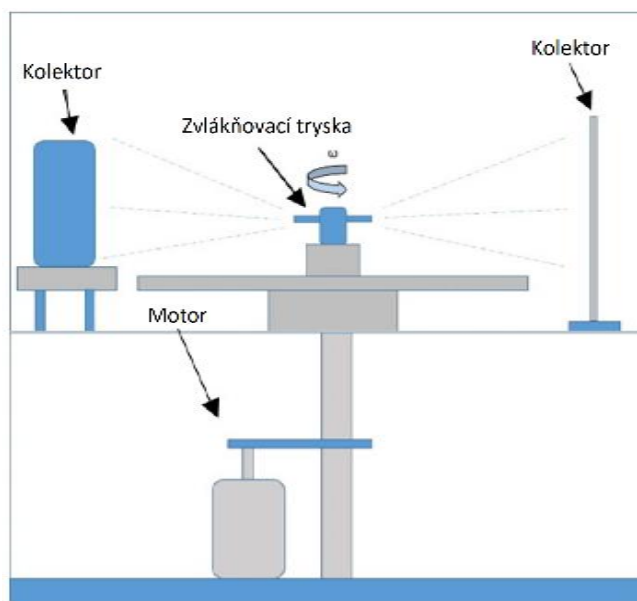
Přestože má elektrospinning spoustu výhod, bylo potřeba vyvinout efektivnější způsob přípravy nanovláken. Za účelem standardizace průměru vláken, ulehčení celkové výroby a zabránění tvorby bublin vyvinula společnost Lozano metodu zvanou forcespinning. Tato metoda je založená na odstředivých silách (na rozdíl od elektrospinningu, který využívá elektrostatických sil). Tato skutečnost výrazně zvyšuje selekci materiálů použitelných pro zvlákňování, a tedy mohou být zvlákňovány jak elektricky nevodivé tak i elektricky vodivé materiály. Mohou být použity taktéž pevné materiály bez přidaného rozpouštědla jejich roztavením a v tomto stavu být zvlákňovány. V případě potřeby lze zvlákňovací trysku zahřívat, pokud pracujeme s vysokoteplotními rozpouštědly [29][31].

Roztok polymeru je zahříván na teplotu tání a poté je přiváděn do zvlákňovací trysky, která obsahuje množství otvorů. Rychlost otáčení trysky dosahuje až 20 000 ot/min. Otáčením vzniká odstředivá síla, díky které je polymer vyháněn skrz otvory v trysce a v podobě již polymerních vláken dopadá na kolektor. Schéma metody je zobrazeno v Obrázek 4 [31].

Další možností je přivádění polymeru na rotující terč bez samotného zahřívání. Polymer je na tento terč přikapáván (například pomocí pipety), kde otáčením stejně jako v předchozím

případě vzniká odstředivá síla, díky které je polymer roztáhnut do stran a v podobě polymerních vláken dopadá na kolektor.

Vlastnosti vznikajících nanovláken je možné upravovat pomocí mnoha nejrůznějších faktorů, mezi které patří například rychlost otáčení trysky, již zmíněná teplota zvláknovací trysky a také teplota uvnitř fungujícího zařízení. Dalšími parametry pro úpravu vlastností vznikajících nanovláken jsou například vzdálenost trysky od kolektoru nebo i typ polymeru a jeho koncentrace. Mezi materiály, které se v praxi úspěšně využívají pro tvorbu nanovláken, patří například celulóza, polylaktid, polyethylen, PHA, PHB, PA, PTFE nebo PVDF [29][31].



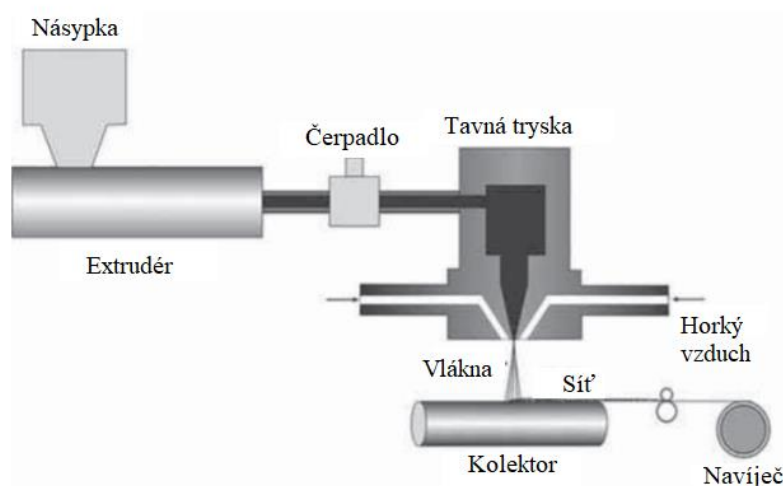
Obrázek 4: Schéma aparatury pro forcespinning [32]

#### 2.3.4 Další možnosti přípravy nanovláken

Již zmíněný elektrospinning a forcespinning jsou díky jednoduchosti jedny z nejoblíbenějších způsobů přípravy nanovláken. Existuje ale spousta dalších možností jejich přípravy, mezi které patří například: fázová separace, tažení, technologie tavného vyfukování nebo odstředivé zvláknování [16].

Při tažení jsou generována velmi dlouhá jednotlivá nanovláken. Tato metoda může být použita pouze pro viskoelastické materiály, které mohou dosahovat vysokého stupně deformací, ale současně zůstávají dostatečně pevné na to, aby vydržely tlak během tažení. Je zde potřeba mikropipeta a mikromanipulátor. Tato mikropipeta se ponoří do kapky blízko kontaktního místa přes mikromanipulátor. Mikropipeta se potom z kapaliny odtahuje rychlostí asi  $1 \cdot 10^{-4}$  m/s a současně se natahují nanovláken. Nevýhodou této metody je její nízká univerzálnost [33].

Při fázové separaci se nejdříve mísí polymer s rozpouštědlem a poté podléhá gelaci. Po přeměně na gel probíhá samotná fázová separace. Rozpouštědlo je odpařeno a po vysušení získáváme nanovláken. Dle typu polymeru, rozpouštědla a koncentrace roztoku se upravuje teplota vhodná k převodu polymeru v rozpouštědle na gel. *Ma a Zhang* popsali tuto metodu pro PLLA (kyselina poly(L-mléčná)) v pěti hlavních krocích a těmi jsou: rozpuštění polymeru, gelace, extrakce rozpouštědla, zamražení a sušení mrazem [33].



Obrázek 5: Schématické zobrazení technologie tavného vyfukování, [35]

Technologie tavného vyfukování spočívá v jednokrokové produkci nanovláken pomocí tavení polymeru a protlačení této taveniny tryskou. Schéma aparatury pro tuto metodu přípravy nanovláken je zobrazeno ve výše uvedeném obrázku (Obrázek 5). Výsledný produkt je zachycován ohřátým vzduchem, který proudí vysokou rychlostí. Touto metodou lze připravovat nanovlákná až v řádech stovek nanometrů [35].

### 2.3.5 Přístupy pro inkorporaci léčivých látek do nanovláken

Při určování vzoru uvolňování léčivých látek z nanovláken je jednou z velmi důležitých proměnných také technika inkorporace léčiv do daných nanovláken. Různé přístupy inkorporace léčivých látek mohou být použity na základě fyzikálně-chemických vlastností léčivé látky, jako jsou hydrofobicita, hydrofilita a molekulová hmotnost. Také záleží na druhu léčiva, a tedy jestli jde o molekulární léky, proteiny nebo geny. Mezi tyto přístupy patří například směsné elektrostatické zvlákňování, povrchová imobilizace, emulzní elektrostatické zvlákňování nebo koaxiální elektrostatické zvlákňování [36][37].

#### 2.3.5.1 Směsné elektrostatické zvlákňování

Směsné elektrostatické zvlákňování spočívá jednoduše v rozpuštění polymeru a léčiva v rozpouštědle a následném elektrospinningu. Směsný roztok polymeru je zodpovědný za modifikaci a návrh vzoru uvolňování léčiva a také za posílení fyzikálně-chemických a mechanických vlastností vznikajících nanovláken. Distribuce a kinetika uvolňování léčiva závisí na kompatibilitě polymeru s léčivem a rozpustnosti léčiva. Je to nejjednodušší jednokroková metoda pro inkorporaci léčiv do nanovláken [38][39].

Konstantního uvolňování léčiva zde můžeme dosáhnout v kombinacích hydrofobní léčivo/hydrofobní polymer nebo hydrofilní léčivo/hydrofilní polymer. Například hydrofilní léčiva jako doxorubicin nebo proteiny mohou být rozptýleny v hydrofilních polymerech, mezi které patří například PVA [40]. Podobně jako u doxorubicinu, hydrofobní léčiva jako paclitaxel mohou být rozptýleny v hydrofobních polymerech nebo organických rozpouštědlech [41].

### **2.3.5.2 Emulzní elektrostatické zvlákňování**

Emulzní elektrospinning je účinná, nákladově efektivní metoda pro inkorporaci léčiv do nanovláken a výrobu nanovláken typu jádro-plášť s vysokým potenciálem. Při této metodě je třeba dispergovat léčivo v organickém médiu a polymer dispergovat ve vodném médiu, zvlášť. Tyto dva roztoky se smísí a přidává se emulgátor. Roztok je dále vortexován až do vzniku emulze. Tato emulze je následně využívána k elektrospinningu [36]. Stabilita emulze a uvolňování léčiva jsou ovlivňovány třemi různými fázemi. Olejovou fází, vodní fází a emulgátorem používaným k formování samotné emulze. Zachycení bioaktivních molekul do struktury nanovláken potom závisí na stabilitě emulze [42].

V této metodě jsou léčivo i polymer rozpouštěny v různých rozpouštědlech, díky čemuž nejsme vázáni na jedno rozpouštědlo, jako je tomu u směsného elektrostatického zvlákňování. Další výhodou této metody je to, že kontakt léčiva a organického rozpouštědla je minimalizován a můžeme tak využít různých kombinací hydrofobního polymeru a hydrofilního léčiva [43].

### **2.3.5.3 Koaxiální elektrostatické zvlákňování**

Koaxiální elektrospinning je další metodou pro přípravu nanovláken typu jádro-plášť. V tomto případě se zvlákňovací tryska skládá ze dvou jehel, vnější jehly a vnitřní jehly, které oddělují dvě vzájemně nemísitelné roztoky. Tyto roztoky jsou zvlákňovány zároveň a léčiva jsou enkapsulována v jádro nanovláken, což umožňuje řízené uvolňování léčiva. Touto metodou mohou být enkapsulovány nejen léčiva, ale také růstové faktory, proteiny a geny [41][44].

Díky koaxiálnímu elektrospinningu můžeme vytvářet různé systémy pro řízené podávání léčiv. Enkapsulační účinnost při této metodě je vysoká a díky uzavření léčivé látky v jádru se předchází okamžitému uvolňování léčiva. Nejdříve jádro polymeru nabobtná a ve skořápce se vytvoří póry, což uvolní léčivo [41][45].

### **2.3.5.4 Povrchová imobilizace**

Povrchová imobilizace nebo jinak povrchová funkcionalizace je nejjednodušším způsobem, jak přichytit léčivo na povrch nanovláken pomocí chemických či fyzikálních prostředků. Díky vysokému poměru povrchu k objemu jsou přítomná různá místa pro adhezi lékových skupin na povrch nanovláken [46][47].

Fyzikálně je molekula léčiva držena na povrchu vlákna pomocí van der Waalsových sil, elektrostatických interakcí, vodíkových vazeb a hydrofobních reakcí. Například pro fyzikální imobilizaci růstových faktorů se používá heparin [48]. Další možností je chemická modifikace použitím karboxylu, aminu, thiolu nebo hydroxy skupin. Chemicky modifikovaná vlákna vykazují vzor pomalého uvolňování léčiv a snižují jejich okamžité uvolňování [49].

## **2.4 Nanočástice**

Jako nanočástice označujeme velmi malé částice o velikosti mezi 1 a 100 nanometry. Jsou pro lidské oko neviditelné, ale mohou vykazovat výrazně odlišné fyzikální a chemické vlastnosti, než větší částice ze stejného materiálu. Většina nanočástic se skládá pouze z několika stovek atomů [50].

Vlastnosti materiálů se mění s přibližováním se jejich velikostí k atomovému měřítku. To je způsobeno zvyšováním poměru plochy povrchu k objemu, a tedy povrchové atomy

materiálu zodpovídají za jeho vlastnosti. Nanočástice mají vzhledem ke své malé velikosti velkou plochu povrchu, na rozdíl od objemových materiálů jako například prášky nebo fólie. Díky této vlastnosti disponují nanočástice nečekanými optickými, fyzikálními a chemickými vlastnostmi, protože jsou dostatečně malé na to, aby mohly omezit své elektrony a produkovat kvantové efekty [50].

Navíc, když se částice velikostně blíží nanoměřítku s charakteristickou délkovou stupnicí blíží se nebo menší než je de Broglieho vlnová délka nosiče náboje (elektrony a díry) nebo vlnová délka světla, periodické hraniční podmínky krystalické částice jsou zničeny, nebo se změni atomová hustota na povrchu amorfních částic. Jak již bylo řečeno, díky této skutečnosti se mnoho fyzikálních vlastností nanočástic zcela liší od sypkých materiálů, což přináší širokou škálu nových v průmyslu využitelných aplikací [50][51].

Stabilita, tendence uspořádat se bez vnějších podnětů a vzájemné interakce nanočástic na rozhraní tekutin jsou velmi důležité pro mnoho koloidních aplikací. Excitace povrchových plazmonů v kovových nanočásticích způsobují speciální optické vlastnosti, které lze následně využít v medicíně, energetice nebo třeba technologiích pro ochranu životního prostředí. Z magnetických nanočástic se mohou stát nanočástice superparamagnetické, které velmi rychle reagují na vnější magnetické pole s téměř nulovou remanencí (zbytková magnetizace po ukončení působení vnějšího magnetického pole). Tyto vlastnosti jsou základem pro aplikace, jako jsou například biomedicínské zobrazovací a informační technologie. Díky některým základním funkcím nanočástic, jako je například katalýza elektrochemických reakcí nebo zvýšení přenosu elektronů, mohou být tyto částice velmi užitečné v procesech navrhování nových elektrochemických snímacích systémů [51].

### 2.4.1 Klasifikace nanočástic

Nanočástice můžeme rozdělit do několika kategorií v závislosti na jejich morfologii, velikosti a chemických vlastnostech.

První skupinou jsou nanočástice na bázi uhlíku. Mezi hlavní skupiny uhlíkových nanočástic patří fullereny a uhlíkové nanotrubic. Fullereny jsou alotropní formy uhlíku ve formě kulovitých dutých klecí. Díky své elektrické vodivosti, struktury, síly, elektronové afinity a všestrannosti vzbuzují všeobecný zájem v nejrůznějších odvětvích průmyslu. Jsou složené z pentagonálních a hexagonálních uhlíkových útvarů, přičemž každý uhlík podléhá hybridizaci  $sp^2$  [51].

Prodlouženou, trubicovou strukturu o průměru 1–2 nm potom mají uhlíkové nanotrubic. Jsou tvořeny rolováním uhlíkového listu. Vznikající struktura může být následně jednotěnná, dvoustěnná, případně mnohostěnná. Tyto materiály se díky jejich jedinečným fyzikálním, chemickým a mechanickým vlastnostem používají kromě původní podoby také v nanokompozitech pro komerční aplikace. Tyto aplikace zahrnují například plniva, účinné adsorbenty plynů pro životní prostředí nebo také nosná média pro anorganické i organické katalyzátory [51].

Další skupinou jsou kovové nanočástice, které bývají složeny čistě z kovových prekurzorů. Tyto nanočástice mají díky plazmonové rezonanci jedinečné optoelektrické vlastnosti. Nanočástice tvořené alkalickými a ušlechtilými kovy (Au, Ag, Cu) mají široký pás absorpce ve viditelné části elektromagnetického spektra. Díky jejich vynikajícím optickým vlastnostem jsou využitelné v mnoha odvětvích výzkumu. Například potahování zlatými nanočásticemi se

používá při vzorkování ve skenovací elektronové mikroskopii k zesílení toku elektronů. Díky tomu získáváme obrazy vysoké kvality [51].

Jako keramické nanočástice označujeme anorganické nekovové pevné částice, které jsou syntetizovány pomocí působení tepla a následného chlazení. Mohou tvořit různé struktury a těmi jsou amorfni, polykrystalické, porózní, duté a plné. Tyto částice vzbuzují zájem vědců hlavně díky jejich možným aplikacím v katalýze, fotokatalýze, fotodegradaci barev a v neposlední řadě také v zobrazovacích metodách [51].

Polovodičivé materiály mají vlastnosti na hranici mezi kovy a nekovy, a právě díky těmto vlastnostem mluví literatura o nejrůznějších aplikacích. Nanočástice na bázi polovodičů mají široká pásma, a proto vykazují významné změny jejich vlastností při ladění pásem. Díky tomuto faktu jsou velmi důležité stejně jako keramické nanočástice ve fotokatalýze a dále také ve fotooptice a konstrukci elektronických zařízení. Právě nanočástice z řady těchto polovodičových mají mimořádné účinky například v aplikacích rozdělování vody [51][52].

Další skupinou jsou nanočástice na bázi polymerů. Tyto nanočástice jsou běžně organického původu a jsou tvarovány jako nanosféry nebo nanokapsule. Nanosféry jsou matricové částice, jejichž celková hmotnost je pevná a ostatní molekuly jsou na vnější straně povrchu sféry. V případě nanokapsulí je veškerá pevná hmota uvnitř částice. Oba typy těchto částic snadno podléhají funkcionalizaci a nacházejí tak celou řadu aplikací [51].

Poslední skupinou jsou nanočástice na bázi lipidů. Radíme mezi ně i lipozomy. Tyto nanočástice obsahují lipidické skupiny a jsou velmi efektivně využívány především v biomedicínských aplikacích. Tyto částice jsou zpravidla kulovitého tvaru s průměrem mezi 10 a 1000 nm. Stejně jako nanočástice na bázi polymerů vlastní lipidické nanočástice pevné lipidové jádro a matici z rozpustných lipofilních molekul. Vnější jádro těchto částic může být stabilizováno pomocí emulgátorů nebo povrchově aktivních látek. Existuje speciální obor, lipidová nanotechnologie, který se zaměřuje především na navrhování a syntézu nanočástic na bázi lipidů pro nejrůznější aplikace, mezi které patří například nosiče léčiv a uvolňování RNA při léčbě rakoviny [51].

Lipozomy jsou malé sférické vezikuly, tvořené ve většině případů lipidovou dvojitou vrstvou a vnitřním prostředím, odděleným od vnějšího prostředí. Díky jejich biokompatibilitě, hydrofobním a hydrofilním vlastnostem (amfifilní charakter) a jejich velikosti jsou středem zájmu v systémech doručování léčiv do organismu. Bývají tvořeny zpravidla cholesterolem a netoxickými fosfolipidy. Na vnějším povrchu mohou být obohaceny o ligandy, které později slouží k rozpoznání a přijetí lipozomu danou tkání. Existují různé druhy lipozomů, například: mnoholamelární vezikuly (MLV), malé jednodamelární vezikuly (SUV) a velké jednodamelární vezikuly (LUV) [53].

#### **2.4.2 Metody přípravy nanočástic**

Syntézu nanočástic můžeme rozdělit do dvou hlavních přístupů, kterými jsou bottom-up a top-down. Tyto dva přístupy se poté dělí do mnoha dalších postupů podle provedení, mechanismu reakcí a protokolů.

Top-down syntéza využívá destruktivních postupů. Větší molekuly jsou rozloženy na menší části a tyto části jsou následně převedeny na požadované nanočástice. Patří zde například mletí, laserová fragmentace, sonifikace, chemická depozice z plynné fáze nebo fyzikální depozice z plynné fáze. Pomocí tohoto přístupu bylo syntetizováno například magnetitové nanočástice

v přítomnosti kyseliny olejové, koloidní uhlíkové nanočástice nebo také nanočástice oxidu kobaltnato-kobaltitého ( $\text{Co}_3\text{O}_4$ ) [51][54][55].

Bottom-up syntézy fungují v opačném směru. Nanočástice jsou postupně formovány z jednodušších částí. Spadají zde například sedimentační a redukční procesy zahrnující sol gel, zelenou syntézu, spřádání a biochemickou syntézu [56].

Uhlíkové nanotrubicе jsou často syntetizovány depozicí uhlíkových prekurzorů, zejména tedy atomů uhlíku, které jsou odpařovány z grafitu pomocí laseru nebo elektrického oblouku. V dnešní době jsou syntetizovány také technikou chemické depozice z plynné fáze.

V medicíně nejčastěji používané nanočástice zvané lipozomy, bývají připravovány z cholesterolu a přírodních netoxických lipidů narušením buněčné membrány pomocí ultrazvuku (sonifikace) [53].

## 2.5 Antimikrobiální látky

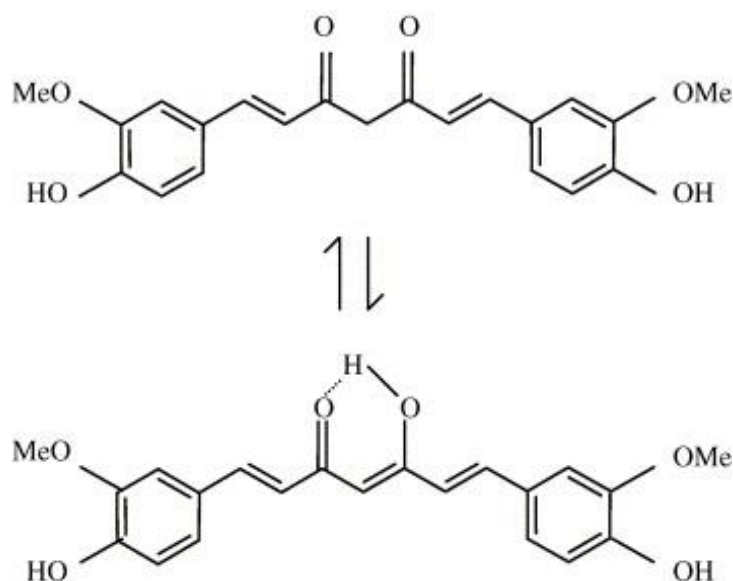
Jako antimikrobiální látky označujeme látky, které usmrcují mikroorganismy nebo zastavují jejich růst. Dle druhu mikroorganismu, proti kterému primárně účinkují, je můžeme dělit na antibiotika působící proti bakteriím a antimykotika působící proti houbám. Dále je můžeme dělit také podle jejich funkce na bakteriostatické (inhibují růst) a baktericidní (usmrcují mikroorganismy) [58].

Mezi hlavní třídy antimikrobiálních látek patří dezinfekční prostředky, antiseptika a antibiotika. Termín antibiotikum se původně používal pouze pro antimikrobiální látky získané ze žijících mikroorganismů. V současné době se mezi antibiotika řadí také chemoterapeutika, tedy syntetické antimikrobiální látky, jako jsou například sulfonamidy nebo fluorochinolony [57].

### 2.5.1 Kurkumin

Kurkumin (diferuloylmethane) je nízkomolekulární polyfenol, který byl poprvé chemicky charakterizován v roce 1910 a je označován za nejaktivnější složku kurkumy. Kurkumin patří mezi přírodní barviva a je zbarven do žluta/oranžova, přičemž při pH vyšším než 7 mění své zbarvení do červena [59].

Vyrábí se extrakcí z oddenků rostlinných druhů rodu kurkuma, především Kurkuma dlouhá (*Curcuma longa*) a Kurkuma zedoaria (*Curcuma zedoaria*). Má různé protizánětlivé a protirakovinné účinky při orálním nebo topickém podání. Mimo jeho silnou antioxidační kapacitu při neutrálním a kyselém pH zahrnují jeho mechanismy účinku také inhibici několika buněčných signálních drah na více úrovních. Dále má také účinky na buněčné enzymy, mezi které patří například cyklooxygenáza a glutathion S-transferázy, imunomodulaci a ovlivňuje také angiogenezi a adhezi buněk k ostatním buňkám. Předpokládá se, že schopnost kurkuminu ovlivňovat transkripci genů a indukovat apoptózu v preklinických modelech, bude mít v budoucnu pravděpodobně zvláštní význam v chemoterapii a chemoprevenci u pacientů s rakovinou [59][60].



Obrázek 6: Tautomerní přeměna curcuminu ve fyziologických podmínkách [59]

Je to bis- $\alpha,\beta$ -nenasycený  $\beta$ -diketon a existuje v rovnovážném množství se svým enol tautomerem (Obrázek 6). V kyselých a neutrálních vodných roztocích a buněčné membráně převažuje bis-keto forma. V rozmezí pH 3–7 se kurkumin chová jako neobyčejný donor vodíkových atomů [61]. To je způsobeno tím, že keto forma kurcuminu obsahuje heptadienonové spojení mezi dvěma methoxyfenolovými kruhy, které obsahují vysoce aktivovaný uhlíkový atom, přičemž C-H vazby na tomto uhlíku jsou velmi slabé díky delokalizaci nepárových elektronů na přilehlých kyslících [62][59].

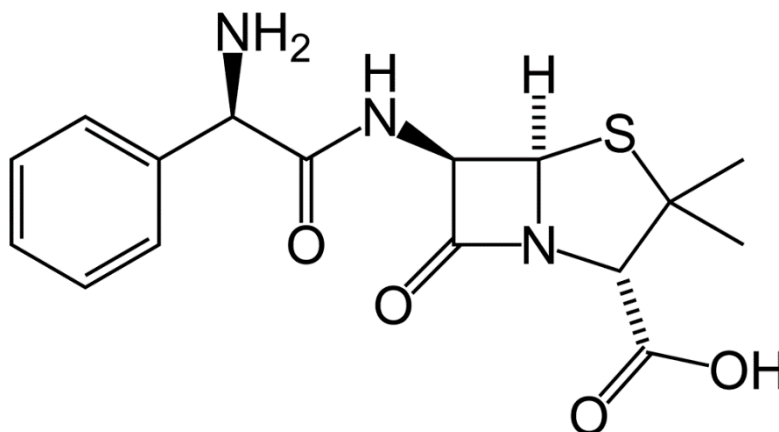
V zásaditém prostředí je kurkumin nestabilní a degraduje během asi 30 minut na tyto produkty: trans-6-(4'-hydroxy-3'-methoxyfenyl)-2,4-dioxo-5-hexanal, kyselina ferulová, feruloylmethan a vanilin [63]. Tato degradace může být blokována v kultivačních médiích nebo fosfátových pufrch s pH nad 7 pomocí fetálního bovinního séra, lidské krve nebo adicí antioxidantů, jako je například kyselina askorbová, N-acetylcystein nebo glutathion. V kyselém prostředí probíhá tato degradace mnohem pomaleji [61].

*Tonnensen* a *Karlsen* studovali fotochemickou stabilitu kurcuminu, což ústilo v první návrhy toho, že by kurkumin mohl potenciálně mít antimikrobiální aktivitu po fotosenzitizaci. Zjistili, že je kurkumin citlivý na světlo a díky tomu by měly být vzorky obsahující kurkumin chráněny před světlem [64].

Relativní molekulová hmotnost kurcuminu je 368,37 a jeho bod tání je 183 °C. Pro UV spektrofotometrické stanovení se maximální světelná absorpce u curcuminu pohybuje kolem 420 nm. Komerčně prodávaný kurkumin obsahuje kurkuminoidy demethoxykurkumin (10–20 %) a bisdesmethoxykurkumin (většinou méně než 5 %) [59]. Studie preklinických modelů karcinogeneze prokázaly, že komerční curcumin má stejné inhibiční účinky jako čistý kurkumin [65][66].

## 2.5.2 Ampicilin

Ampicilin se řadí mezi širokospektrální antibiotika ze skupiny aminopenicilinů a pyšní se mnoha antibakteriálními účinky vůči grampozitivním, gramnegativním a anaerobním bakteriím. Byl poprvé popsán v roce 1962 a jeho systematický název zní takto: (2S,5R,6R)-6-[(2R)-2-amino-2-fenylacetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo [3.2.0]heptan-2-karboxylová kyselina [67]. Struktura je zobrazena v následujícím obrázku (Obrázek 7).



Obrázek 7: Struktura ampicilinu [68]

Je to semisyntetický aminopenicilin, který není odolný vůči  $\beta$ -laktamázám. Mechanismus jeho účinku je založen na inhibici syntézy bakteriální stěny ve fázi růstu a to tak, že blokuje proteiny vázající penicilin (PBP), mezi které patří například transpeptidázy. Ampicilin je rozkládán penicilinázou a dalšími  $\beta$ -laktamázami bakterií, proto se v poslední době používá v kombinaci s inhibitory  $\beta$ -laktamáz (sulbaktam, tazobaktam) [69][70].

Molekulová hmotnost ampicilinu je 394,4 g/mol. Do organismu je možné jej podávat perorálně i parenterálně (intravenózně či intramuskulárně) a je vylučován převážně ledvinami. Používá se převážně při léčbě hemofilových a enterokokových infekcí a listeriózy [70].

## 2.6 Antimikrobiální testy

Antimikrobiální testy se používají ke zjištění mikrobiální aktivity ve studovaných vzorcích. V lidské kůži se za normálních okolností vyskytují mikroorganismy různých druhů, především pak rodu *Staphylococcus*. Kožní maz obsahuje vyšší koncentraci triglyceridů a právě v těchto místech se vyskytují bakterie se schopností produkovat lipázy, například lipofilní korynebakterie. Dále se na lidské kůži normálně vyskytují kvasinky, například z rodu *Candida* nebo *Pityrosporum* [71][72].

Před provedením antimikrobiálních testů je potřeba mikroorganismy kultivovat. K tomu aby mohly mikroorganismy řádně narůst jim musí být nutně poskytnuty veškeré živiny potřebné k jejich růstu a musí být zajištěny optimální fyzikální podmínky [71].

### **2.6.1 Diluční metody**

Pomocí dilučních metod zjišťujeme nejnižší koncentraci zkoumané látky, která viditelně inhibuje růst přítomného mikroorganismu (MIC). Mezi tyto metody řadíme bujónovou diluční metodu a agarovou diluční metodu. Přesné množství testované látky se přidává do kultivačního média a následně se sleduje pokles růstu mikroorganismů v médiu [73][74].

### **2.6.2 Difuzní metody**

U difuzních metod se sleduje klesající gradient koncentrace, který vzniká difuzí testované látky ze zdroje do okolí. Na rozdíl od dilučních metod se provádějí na pevných půdách, na jejichž povrchu jsou zaočkovány testovací mikroorganismy. Po provedení testu se hodnotí tzv. inhibiční zóny [73][74].

### **2.6.3 Epsilon test**

Tato metoda kombinuje obě výše uvedené metody, diluční i difuzní. Na agar se nanese testovací mikroorganismus a následně jsou aplikovány Epsilon testové proužky. Tyto testovací proužky mají na svých koncích koncentrační gradient testované látky. Ta dále proniká do média a ovlivňuje růst přítomných mikroorganismů. Po ukončení kultivace se tvoří elipsoidní inhibiční zóna, ze které se odečítá hodnota MIC tak, že se odečte v místě průniku okraje proužku s hranicí růstu testovaných mikroorganismů [75].

## **2.7 Testy bezpečnosti**

Spousta materiálů bývá využívána v medicíně, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Pro zajištění neškodnosti vůči lidskému organismu výsledných produktů je třeba provádět bezpečnostní testy.

### **2.7.1 Buněčné kultury**

Při testech bezpečnosti se využívají kultury lidských buněk. Tyto buněčné kultury můžeme rozdělit na primární linie, buněčné kmeny a buněčné linie.

Primární kultury se skládají z buněk, které jsou odebrány přímo z organismu. Tyto kultury mají velmi krátkou životnost. U primární kultury je životnost pouze několik dní a následně je třeba buňky převést do nového média. Tento převod nazýváme pasážování. Primární kultury slouží především k vyselektování buněk, které jsou vhodné ke kultivaci [76].

Buněčné kmeny potom vznikají z buněk, které už byly alespoň jednou pasážovány. Jsou to kultury normálních diploidních buněk, které vydrží většinou kolem 40–50 dělení a následně zanikají [76].

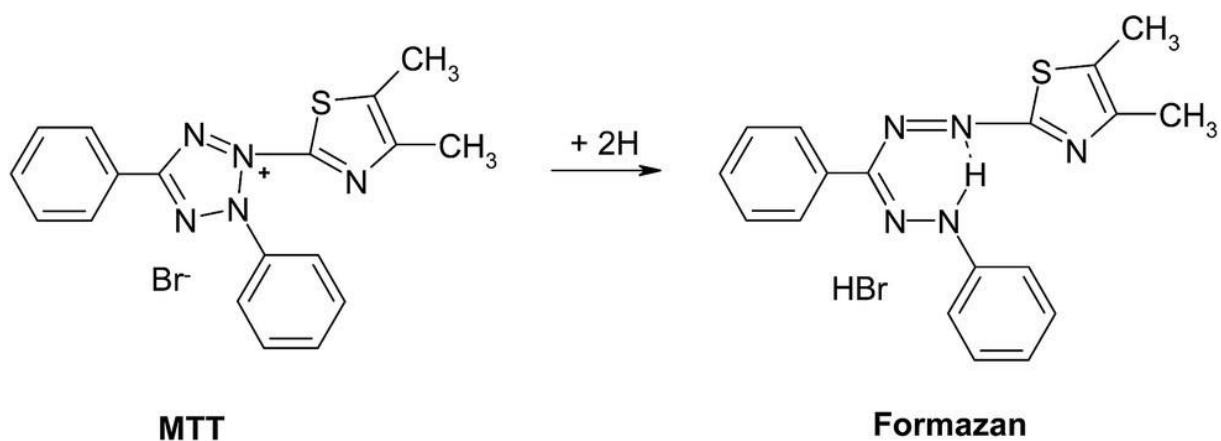
Buněčné linie jsou kultury, které mají prakticky neomezenou životnost a jsou schopné se neomezeně dělit, po určité době však může docházet k různým mutacím. Tyto kultury vznikají z buněčných kmenů na základě transformace, případně mohou být izolovány přímo z živé tkáně. Jako příklad můžeme použít HeLa buňky, které byly izolovány v 50. letech 20. století z karcinomu děložního hrdla Henrietty Lacksové [77].

## 2.7.2 Testy cytotoxicity

Všechny materiály, které mají být použity jako aktivní složky pro zlepšení fyziologických funkcí do lidského organismu, musí být nutně otestovány, a to na několik různých faktorů. Mezi tyto faktory patří toxicita pro buňky a tkáň, karcinogenita a vyvolání nežádoucích imunitních reakcí v případě jejich přítomnosti. Ke zjištění nezávadnosti materiálů potom slouží cytotoxické testy, díky kterým zjišťujeme, zda určité látky nejsou toxické pro buňky lidského organismu [78].

### 2.7.2.1 MTT test

MTT, tedy 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid, je žlutý prášek tetrazoliové soli. MTT test cytotoxicity je kolorimetrická metoda, při které je MTT redukován v živých buňkách mitochondriálními dehydrogenázami na fialově-modrý formazan. Před samotným měřením je však nutné vzniklé krystaly formazanu rozpustit a množství tohoto rozpuštěného formazanu je poté vyhodnocováno spektrofotometricky a ukazuje nám míru životaschopnosti buněk. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk, a tedy čím tmavší barva, tím více živých buněk je v médiu s daným vzorkem. Mezi nevýhody této metody testování cytotoxicity patří nedostatečná redukce MTT a jeho možné ovlivňování různými parametry, jako je například pH média [78].



Obrázek 8: Redukce MTT na formazan [79]

### **3 CÍLE PRÁCE**

Cílem této práce je vývoj a příprava antimikrobiálních nanostrukturních biomateriálů a testování jejich bezpečnosti. Součástí práce je řešení následujících dílčích úloh:

- Přehled materiálů a postupů přípravy nanovláken a nanočástic,
- optimalizace metod přípravy kombinovaných materiálů a aktivní antimikrobiální složkou,
- stanovení antimikrobiálních vlastností a bezpečnosti nových materiálů s využitím různých typů buněk,
- vyhodnocení a diskuse výsledků.

## **4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **4.1 Použité chemikálie**

#### **4.1.1 Chemikálie pro přípravu lipozomů**

- Cholesterol, Sigma-Aldrich (DEU)
- L- $\alpha$ -fosfatidylcholin, Sigma-Aldrich (DEU)
- Chloroform, Lach-Ner (CZE)

#### **4.1.2 Chemikálie pro přípravu PHB vláken**

- Chloroform, Lach-Ner (CZE)
- Polyhydroxybutyrát

#### **4.1.3 Chemikálie pro stanovení antioxidační aktivity**

- ABTS, Sigma-Aldrich (DEU)
- Peroxodisíran draselný, Sigma-Aldrich (DEU)
- Trolox, Sigma-Aldrich (DEU)

#### **4.1.4 Chemikálie použité pro práci s buňkami**

- 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid (MTT), Duchefa Biochemie (NLD)
- Dodecylsírán sodný, Serva (DEU)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM medium), Sigma-Aldrich (GBR)
- Fetální bovinní sérum, HyClone (USA)
- Trypsin, Versene EDTA, P-Lab (CZE)
- Chlorid sodný p.a., Vitrum-LachNer (CZE)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Vitrum-LachNer (CZE)
- Antibiotic-Antimycotic 100X (Biosera), Biotech (DEU)

#### **4.1.5 Chemikálie použité pro práci s mikroorganismy**

- Yeast Extract Powder, Himedia (IND)
- Pepton aus Casein, Himedia (IND)
- D-glukosa monohydrát, LachNer (CZE)
- Nutrient broth (NB), Himedia (IND)
- Lysogeny broth (LB broth)
- Brain Heart Infusion medium (BHI medium), Himedia (IND)
- Agar, Himedia (IND)
- Glycerol
- Ethanol p.a., LAchNer (CZE)
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Klotrimazol

#### **4.1.6 Použité účinné látky**

- Curcumin, Sigma-Aldrich (DEU)
- Ampicilin, Sigma-Aldrich (DEU)

## 4.2 Použité přístroje a pomůcky

- Analytické váhy, Boeco Germany (SRN)
- Vortex TK3S, Kartell spa (USA)
- Centrifuga, Sartorius Sigma (DEU)
- Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (DEU)
- Ultrazvukový homogenizátor Sonoplus HS 3200, Bandeline
- DLS analyzátor Zetasizer ZS, Malvern (UK)
- Rotační zvlákňovací přístroj
- Biochrom WPA Biowave II UV/Visible Spectrophotometer with Life Science Methods, WPA Biochrom (UK)
- CellCulture CO2 inkubátor, ESCO (DEU)
- Bihazard box, model Airstream třídy II – ESCO, Biotech (CZE)
- Inverzní biologický mikroskop i-101 LW Scientific, Laboserv (CZE)
- Automatické pipety v různém rozsahu objemu, Discovery (SRN) a Biohit (DEU)
- Kapalinový chromatograf, Thermo Fisher
- Magnetická míchačka s ohřevem, Lavat – Verkon (CZE)
- Spektrofotometr Helios  $\gamma$ , Unicam (GBR)

## 4.3 Použité mikroorganismy

Pro testování antimikrobiální aktivity byly použity mikroorganismy pocházející z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

- *Candida glabrata* (CCM 8270)
- *Escherichia coli* (CCM 7395)
- *Micrococcus luteus* (CCM 210)
- *Staphylococcus epidermidis* (CCM 4418)

## 4.4 Použité humánní buňky

Pro stanovení cytotoxicity byly v této práci použity humánní buňky linie HaCaT Human keratinocytes cell line, ze sbírky buněčných kultur Cell Lines Service, Eppelheim (DEU).

## 4.5 Optimalizace přípravy kombinovaných materiálů s aktivní antimikrobiální složkou

Pro další práci byly připravovány pomocí sonifikace lipozomy s obsahem PHB i bez obsahu PHB. Byly testovány různé koncentrace účinných látek enkapsulovaných do lipozomů. Dále byla připravována PHB vlákna pomocí forcespinningu a následně probíhalo navazování připravených částic na připravená nanovlákna.

### 4.5.1 Stanovení celkové antioxidační aktivity kurkuminu pomocí ABTS

Byl připraven kation ABTS<sup>•+</sup> tak, že byl ABTS rozpuštěn ve vodě na koncentraci 7 mM. Následně byl radikálový kation připraven přidáním peroxodisíranu draselného na konečnou koncentraci 4,45 mM. Takto připravený roztok byl ponechán 12 hodin ve tmě. Před použitím byl takto připravený radikálový kation zředěn ethanolom na absorbanční 0,700±0,02. Měření probíhalo při vlnové délce 734 nm oproti ethanolu.

Před začátkem měření byla zjištěna hodnota  $A_0$  z 1 ml ABTS<sup>•+</sup> s 10  $\mu$ l DMSO. Samotné měření probíhalo ve zúžené kyvetě, kdy bylo k 1 ml ABTS<sup>•+</sup> přidáno 10  $\mu$ l roztoku kurkuminu a byl sledován pokles absorbance po 10 minutách.

Kalibrační řada byla sestavena naředěním roztoku Troloxu na rozmezí koncentrací 50-400  $\mu$ g/ml, který byl rozpuštěn v 60% ethanolu. Jako slepý vzorek sloužil ethanol. V programu MS Excel byla sestavena kalibrační přímka a zobrazena hodnota spolehlivosti.

$$y = 0,0013 \cdot x \quad (1)$$

$$R^2 = 0,9945 \quad (2)$$

Pro zjištění antioxidační aktivity byly připraven zásobní roztok kurkuminu v DMSO, ze kterého byly ředěny nižší koncentrace, které byly použity pro samotné měření.

#### 4.5.2 Příprava roztoku PHB

Byl připraven 4% roztok PHB v chloroformu. Daná množství látek byla smíchána do laboratorní lahve DURAN a vložena na elektrickou míchačku s ohřevem. Směs byla zahřívána a míchána do chvíle, kdy roztok neobsahoval žádné pevné zbytky PHB.

Dále byl připravován také 5% a 10% roztok PHB v chloroformu. Postup byl stejný jako u 4% roztoku.

#### 4.5.3 Příprava lipozomů

Metodou sonifikace, pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoru, byly připravovány lipozomy s obsahem PHB i bez přídavku této látky.

##### 4.5.3.1 Příprava lipozomů s kurkuminem

Pro přípravu prázdných lipozomů byl do destilované vody navážen cholesterol a lecithin. Pro přípravu lipozomů s enkapsulovaným kurkuminem byla k této směsi navážena také jedna z koncentrací kurkuminu (0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml). Jednotlivé navážky jsou uvedeny v níže uvedené tabulce (Tabulka 2).

Kádinky s takto připravenou směsí byly vloženy do sonikátoru. Sonifikace probíhala vždy dohromady 1 minutu. Po sonikaci byly lipozomy vloženy na elektrickou míchačku s ohřevem do chvíle než se odpařil veškerý chloroform. Následně byl obsah kádinek centrifugován po dobu pěti minut při 6000 ot/min. Následně byl supernatant slit a dále centrifugován po dobu jedné hodiny při 11 000 ot/min. Po odlití supernatantu byly získány lipozomy.

Stejným způsobem byly připravovány také lipozomy s obsahem PHB a kurkuminu. Ke směsi lecithinu a cholesterolu byl přidán vždy 4% roztok PHB v chloroformu, který představoval 30 % z celkového pevného podílu lipozomů. Směs s PHB byla do destilované vody vylita těsně před sonifikací. Následně probíhala sonifikace, zahřívání a centrifugace.

Tabulka 2: Přehled navážek chemikálií pro přípravu kurkuminových lipozomů

	<b>Typ 1</b>	<b>Typ 2</b>
<b>Cholesterol</b>	10 mg	10 mg
<b>Lecithin</b>	90 mg	60 mg
<b>PHB</b>	–	30 mg
<b>Kurkumin</b>	1-10 mg	1-10 mg
<b>Destilovaná voda</b>	10 ml	10 ml

#### 4.5.3.2 Příprava lipozomů s ampicilinem

Pro přípravu prázdných lipozomů byl do destilované vody navážen cholesterol a lecithin. Pro přípravu lipozomů s enkapsulovaným ampicilinem byl k této směsi navážen také ampicilin. Jednotlivé navážky jsou uvedeny v níže uvedené tabulce (Tabulka 3).

Kádinky s takto připravenou směsí byly vloženy do sonikátoru. Sonifikace probíhala vždy dohromady 1 minutu. Následně byl obsah kádinek centrifugován po dobu jedné hodiny při 11 000 ot/min. Po odlití supernatantu byly získány lipozomy.

Podobným způsobem byly připravovány také lipozomy s obsahem PHB a ampicilinu. Ke směsi lecithinu a cholesterolu byl přidán vždy 4% roztok PHB v chloroformu, který představoval 30 % z celkového pevného podílu lipozomů. Směs s PHB byla vylita do destilované vody těsně před sonikací. Po proběhnutí sonikace byly lipozomy vloženy na magnetickou míchačku s ohřevem do doby než se odpařil veškerý chloroform. Po jeho odpaření byl obsah kádinek centrifugován jednu hodinu při 11 000 ot/min.

Po odlití supernatantu byly získány lipozomy.

Tabulka 3: Přehled navážek chemikálií pro přípravu lipozomů s ampicilinem a PHB

	<b>Typ 1</b>	<b>Typ 2</b>
<b>Cholesterol</b>	10 mg	10 mg
<b>Lecithin</b>	90 mg	60 mg
<b>PHB</b>	–	30 mg
<b>Ampicilin</b>	10 mg	10 mg
<b>Destilovaná voda</b>	10 ml	10 ml

#### 4.5.4 Charakterizace lipozomů

U lipozomů byla měřena jejich velikost, Zeta potenciál, enkapsulační účinnost a jejich stabilita.

##### 4.5.4.1 Spektrofotometrické stanovení enkapsulační účinnosti

Pro veškerá měření prováděná pomocí spektrofotometru bylo nejprve zjištěno absorpční maximum kurkuminu a ampicilinu. Jednotlivá absorpční maxima byla získána proměřením absorpčního spektra v rozsahu vlnových délek 200-900 nm.

Pro stanovení enkapsulační účinnosti u kurkuminu byla nejprve sestavena kalibrační přímka. Byl připraven zásobní roztok kurkuminu v chloroformu o koncentraci 1 mg/ml. Tento roztok

byl dále naředěn na koncentrace v rozmezí 6-0,25 µg/ml. U těchto koncentrací byla změřena absorbance při 419 nm a sestavena kalibrační přímka.

Dále byly připraveny lipozomy (s PHB i bez PHB) s koncentracemi kurkuminu 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml a 0,1 mg/ml. Tyto lipozomy byly vloženy do lyofilizátoru, aby bylo odstraněna veškerá vlhkost.

Před lyofilizací byly lipozomy zmrazeny v kryomrazáku na -80°C. Lyofilizace probíhala po dobu 24 hodin. Lyofilizované lipozomy byly následně rozpuštěny v 10 ml chloroformu a u takto připravených vzorků byla změřena absorbance při 419 nm. Ze získaných hodnot byla pomocí kalibrační přímky vypočítána enkapsulační účinnost.

Pro stanovení enkapsulační účinnosti u ampicilinu byla nejprve sestavena kalibrační přímka, stejně jako u kurkuminu. Byl připraven zásobní roztok ampicilinu 1,5 mg/ml. Tento roztok byl dále naředěn na koncentrace v rozmezí 1,4-0,2 mg/ml. U těchto koncentrací byla změřena absorbance při 268 nm a sestavena kalibrační přímka.

Následně byly připraveny lipozomy (s PHB i bez PHB) s koncentrací ampicilinu 1 mg/ml. Těsně po přípravě byly tyto lipozomy stočeny při 14 000 otáčkách po dobu 1 hodiny. Následně byl odebrán supernatant a byla změřena jeho absorbance pro stanovení koncentrace ampicilinu, která byla následně odečtena od celkového množství ampicilinu, a tak byla zjištěna enkapsulační účinnost.

#### **4.5.4.2 Stanovení velikosti lipozomů pomocí DLS**

Roztoky lipozomů, v destilované vodě i ve fyziologickém roztoku byly před samotným měřením stokrát naředěny destilovanou vodou do zkumavek typu Eppendorf. U obou prostředí a u všech druhů lipozomů byl pomocí DLS přístroje Malvern Zetasizer změřen distribuční koeficient a samotná velikost částic, vždy ve třech opakováních.

Částice použité pro měření jejich velikosti byly nejdříve odstředěné po dobu 5 minut na 6 000 rpm a následně ještě po dobu 60 minut při 11 000 rpm. Vzniklý sediment byl rozsuspendován a následně naředěn 100-krát.

#### **4.5.4.3 Stanovení stability lipozomů pomocí měření Zeta potenciálu**

Roztoky lipozomů v destilované vodě i ve fyziologickém roztoku byly před samotným měřením stokrát naředěny destilovanou vodou. Vybraný roztok byl vždy umístěn do Dip cely, která byla uložena do DLS přístroje Malvern Zetasizer. U obou prostředí a u všech druhů lipozomů byl Zeta potenciál proměřen vždy ve třech opakováních.

Částice použité pro měření jejich stability byly nejdříve odstředěné po dobu 5 minut na 6 000 rpm a následně ještě po dobu 60 minut při 11 000 rpm. Vzniklý sediment byl rozsuspendován a následně naředěn 100-krát.

#### **4.5.4.4 Stanovení dlouhodobé stability lipozomů**

Po třech týdnech byl změřen Zeta potenciál připravených lipozomů (viz. kapitola 4.5.4.3) a byl porovnán se Zeta potenciálem, který měly lipozomy bezprostředně po jejich přípravě.

#### **4.5.5 Uvolňování účinných látek z lipozomů**

Uvolňování účinných látek z lipozomů bylo stanovováno spektrofotometriky. Pro uvolňování účinných látek byly připraveny lipozomy podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.3. U kurkuminu byly sledovány pouze koncentrace 0,1 mg/ml a 0,25 mg/ml. Připravené lipozomy byly rozsuspendovány v 10 ml destilované vody, 10 ml fyziologického roztoku nebo v 10 ml ethanolu. Následně bylo toto množství naředěno do zkumavek v poměru 1:1 do daných prostředí. Zkumavky s fyziologickým roztokem byly inkubovány při teplotě 37 °C a zkumavky s destilovanou vodou byly uchovány při laboratorní teplotě.

Lipozomy s kurkuminem byly vždy po určitém časovém úseku stočeny v centrifuze na 10 minut při 3000 otáčkách za minutu. Supernatant byl slit a usazený kurkumin byl rozpuštěn v chloroformu. Následně byla změřena absorbance při 419 nm a vypočteno množství uvolněného kurkuminu.

Lipozomy obsahující ampicilin byly stáčeny po dobu 1 hodiny při 14 000 otáčkách za minutu. U supernatantu byla následně změřena absorbance při 268 nm a vypočteno množství uvolněného ampicilinu.

Pro zjištění jednotlivých absorpčních maxim byly připraveny roztoky kurkuminu a ampicilinu a byla proměřena absorpční spektra v rozmezí 200-900 nm.

#### **4.5.6 Příprava PHB vláken**

PHB vlákna byla připravována metodou forspinningu. Byly připraveny různé koncentrace roztoku PHB v chloroformu (2%, 4%, 5% a 10%) a různé objemy (10 ml, 20 ml, 30 ml a 40 ml) těchto různě koncentrovaných roztoků a byla optimalizována příprava čistých PHB nanovláken.

Pro přípravu nanovláken s účinnou látkou byly vypočítány navážky těchto látek pro 5 %, 8 % a 10 % z celkového množství PHB v roztoku chloroformu. Dále probíhala optimalizace přípravy nanovláken s aktivními látkami s různými koncentracemi účinných látek v různých objemech roztoku.

#### **4.5.7 Uvolňování účinných látek z PHB vláken**

Uvolňování účinných látek z PHB vláken bylo stanovováno spektrofotometriky. Pro uvolňování účinných látek z PHB vláken byla nastříhána vlákna na čtverce o rozměrech 2 cm<sup>2</sup> a byla zvážena jejich hmotnost. Následně byly tyto čtverce vloženy do zkumavek obsahujících 4 ml destilované vody nebo 4 ml fyziologického roztoku. Zkumavky s fyziologickým roztokem byly inkubovány při teplotě 37°C a zkumavky s destilovanou vodou byly uchovány při laboratorní teplotě.

U ampicilinových vláken byla po určitém časovém úseku vlákna vytažena ze zkumavky a usušena a zvážena. U roztoku byla změřena absorbance při 268 nm a vypočítáno množství uvolněného ampicilinu.

V případě kurkuminových vláken byla po určitém časovém úseku vlákna vytažena ze zkumavky a zvážena. Ke zbylému roztoku bylo přidáno stejné množství chloroformu a kurkumin byl do něj následně vytřepáván. Dále u něj byla změřena absorbance při 419 nm a vypočteno množství uvolněného kurkuminu.

#### 4.5.8 Uvolňování ampicilinu pomocí HPLC

Množství uvolněného ampicilinu z připravených lipozomů a nanovlákných krytů bylo stanoveno také pomocí kapalinové chromatografie.

Nejprve byla připravena koncentrační řada ampicilinu, ze které byla následně změřena a sestavena kalibrační přímka.

Vzorky uvolněného ampicilinu byly před samotným měřením naředěny na koncentraci 0,05–0,075 mg/ml do mobilní fáze, která byla složena z 0,01% kyseliny trifluoroctové (TFA) a acetonitrilu v poměru 80:20.

V níže uvedené tabulce jsou shrnuty parametry použité metody pro detekci ampicilinu pomocí kapalinové chromatografie.

*Tabulka 4: Parametry stanovení ampicilinu na kapalinovém chromatografu*

<b>Kolona</b>	Kinetex C18, 2,6 $\mu\text{m}$ , 100 A, 150 mm x 4,6 mm
<b>Nástřík na kolonu</b>	20 $\mu\text{l}$
<b>Mobilní fáze</b>	25°C
<b>Průtok mobilní fáze</b>	Polární složka A: 0,01% TFA Nepolární složka B: Acetonitril
<b>Eluce</b>	Izokratická, A:B = 80:20
<b>Vlnová délka detekce</b>	210 nm
<b>Celková doba analýzy</b>	10 min (+ 1 min promývání)

#### 4.5.9 Testování stability vláken

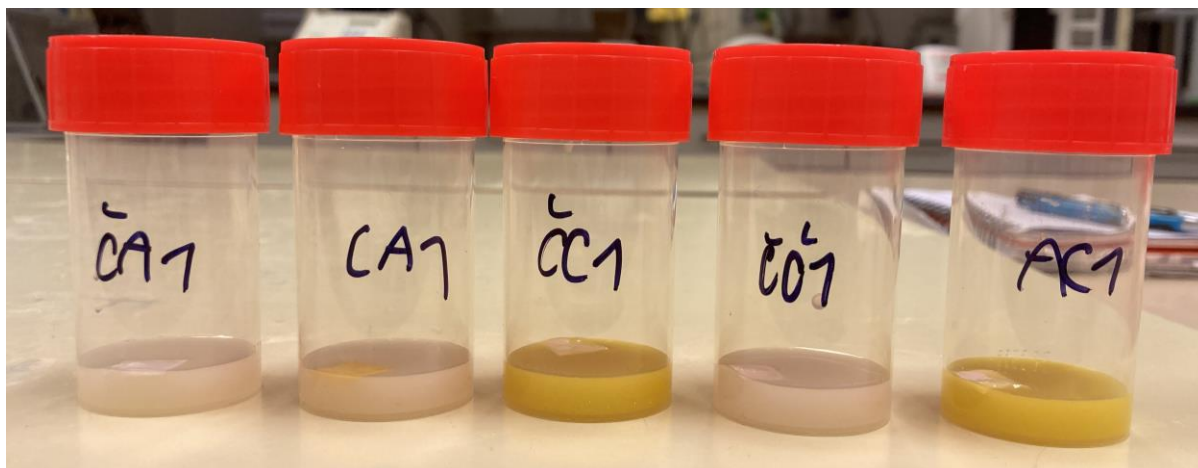
Pro testování stability vláken byly z čistých nanovlákných krytů bez obsahu aktivní složky vystřižovány čtverce o velikosti 1  $\text{cm}^2$ . Takto připravená vlákna byla následně zvážena a uložena do zkumavek typu Eppendorf, které byly naplněny destilovanou vodou, fyziologickým roztokem a 50% roztokem ethanolu. V časovém rozmezí 1 až 25 dní byly vlákna vždy vytaženy ze sledovaných prostředí a vysušeny. Po úplném vysušení vlákna byla opět změřena jeho hmotnost a byla porovnána s hmotností před ponořením do sledovaného prostředí.

#### 4.5.10 Příprava kombinovaných materiálů

Pro přípravu kombinovaných materiálů byly z čistých, ampicilinových i kurkuminových vláken vystřižovány čtverce o velikosti 1  $\text{cm}^2$ , které byly předem zváženy.

Následně byly připraveny lipozomy s obsahem PHB, jak prázdné tak i s obsahem aktivních látek stejně jako v kapitole 4.5.3.2. Připravené lipozomy byly rozsuspendovány v destilované vodě.

Takto připravený roztok lipozomů byl přelit do plastové nádoby k nanovláknům a nádoby byly ponechány po dobu 24 hodin na třepačce při laboratorní teplotě. Vysušená kombinovaná vlákna byla následně použita na antimikrobiální a cytotoxické testy a také na krátkodobé uvolňování aktivních látek.



Obrázek 9: Příprava kombinovaných materiálů

Navázání PHB částic na PHB vlákna bylo pozorováno pod fluorescenčním mikroskopem. Byl připraven 0,33% roztok Nilské červeni v destilované vodě. Do tohoto roztoku byl přidán připravený kombinovaný materiál a vše bylo po dobu 10 minut inkubováno ve tmě. Po následném promytí destilovanou vodou bylo sledování navázání částic na vlákna. Maximum fluorescence bylo očekáváno při excitační vlnové délce 560 nm.

#### 4.5.11 Uvolňování účinných látek z kombinovaných materiálů

Kombinované materiály připravené podle postupu v kapitole 4.5.10 byly vloženy do destilované vody a fyziologického roztoku a bylo sledováno uvolňování účinných látek po dobu 3 dnů.

Pro stanovení uvolněného ampicilinu byl kombinovaný materiál vytažen z modelového prostředí a byla změřena absorbance roztoků jednotlivých prostředí při 268 nm.

Pro následné stanovení uvolněného kurkuminu byl kombinovaný materiál opět vytažen z modelového prostředí a ke zbytku roztoku jednotlivých prostředí bylo přidáno stejné množství chloroformu. Následně byl kurkumin do tohoto chloroformu vytřepán a byla změřena absorbance při 419 nm.

## 4.6 Stanovení antimikrobiálních vlastností

Pro stanovení antimikrobiálních vlastností kurkuminu a ampicilinu byly vybrány čtyři mikroorganismy. *Candida glabrata*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* a *Staphylococcus epidermidis*. Pro provedení testů bylo nejprve nutné mikroorganismy nakultivovat v tekutém médiu.

### 4.6.1 Příprava médií a kultivace mikroorganismů

#### 4.6.1.1 *Candida glabrata*

Tekuté médium pro kultivaci mikroorganismů bylo připravováno do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 a 250 ml. Bylo naváženo potřebné množství chemikálií uvedených v níže přiložené tabulce (Tabulka 5).

Navážka těchto chemikálií byla smíchána a doplněna na objem 50 ml (100 ml baňka) nebo 100 ml (250 ml baňka) destilovanou vodou. Médium bylo následně sterilováno po dobu 30 minut při teplotě 120°C. Po vychladnutí byly jednotlivé mikroorganismy převedeny z kryozkumavky do 50 ml tekutého sterilního média a ponechány ke kultivaci po dobu 24 hodin při teplotě 37°C.

Tabulka 5: Chemikálie použité pro přípravu médií a jejich navážky

Mikroorganismus	Chemikálie pro přípravu média		
<i>C. Glabrata</i>	Yeast Extract Powder (10 g/l)	Pepton aus Casein (20 g/l)	D-glukosa monohydrát (22 g/l)
<i>E. Coli</i>	LB broth (25 g/l)		
<i>S. Epidermidis</i>	BHI médium (37 g/l)		
<i>M. Luteus</i>	Nutrient broth (25 g/l)		

Následně byla odebrána část inokula a naředěna sterilním médiem na hodnotu 0,5 McFarlandovy stupnice, která byla následně dále ředěna na vhodnou hodnotu. Takto naředěná kultura byla dále použita pro testování antimikrobiálních vlastností vybraných účinných látek.

### 4.6.2 Bujónová diluční metoda

Jednou z metod sledování antimikrobiální aktivity byla bujónová diluční metoda na mikrotitračních destičkách, za použití přístroje Synergy™ HTX Multi-Mode Reader. Pro tyto testy byla použita vždy už naředěná kultura mikroorganismu. Toto ředění je popsáno v kapitole 4.6.1. U mikrotitračních destiček byla vždy stanovena absorbance v čas  $t=0$ , při vlnové délce 630 nm.

#### 4.6.2.1 Aktivní látky a lipozomy

Pro stanovení antimikrobiálních vlastností aktivních látek a lipozomů byly používány 96-jamkové destičky. Do jamek bylo nejprve rozpipetováno nové sterilní médium o objemu 50  $\mu$ l na jamku a byly přidány koncentrační řady účinných látek a lipozomy taktéž v objemu 50  $\mu$ l na jamku. Nakonec byla do jamek rozpipetována naředěná kultura mikroorganismu o objemu 100  $\mu$ l na jamku. Takto připravené destičky byly inkubovány po dobu 24 hodin

na temperované třepačce při teplotě 37°C. Po uplynutí doby inkubace byla opět změřena absorbance při vlnové délce 630 nm.

Jako kontrola média bylo do jamek napipetováno pouze 200 µl sterilního média a jako buněčná kontrola bylo jamek napipetováno 100 µl média a 100 µl naředěné kultury mikroorganismu. Dále byla u *C. glabrata* jako kontrola použita koncentrační řada klotrimazolu a u ostatních mikroorganismů koncentrační řada ampicilinu. U kurkuminu byla jako kontrola použita koncentrační řada DMSO.

#### **4.6.2 Nanovláknenné kryty**

Pro stanovení antimikrobiálních vlastností připravených nanovláknenných krytů byly používány 24-jamkové destičky. Do jamek bylo nejprve rozpipetováno sterilní médium o objemu 1 ml na jamku a následně byla do jamek rozpipetována kultura mikroorganismu taktéž v objemu 1 ml na jamku. V tuto chvíli byla změřena absorbance v čase  $t=0$  a následně byly do jamek vloženy nanovláknenné kryty. Byly přidávány čtverce nanovláken o rozměrech 1 cm<sup>2</sup>, které byly nejprve zváženy a vysterilovány UV světlem. Takto připravené destičky s vlákny byly inkubovány po dobu 24 hodin na temperované třepačce při teplotě 37°C.

Po uplynutí doby inkubace byla vlákna opět pinzetou odstraněna z jamek a byla změřena absorbance při 630 nm. Jako kontrola média bylo do jamek napipetováno pouze 2 ml média a jako kontrola buněk bylo napipetováno pouze 2 ml naředěné kultury.

#### **4.6.3 Test na agarových plotnách**

Média pro jednotlivé organismy byla připravena stejně jako v kapitole 4.6.1 a bylo přidáno vypočtené množství Agarů (20 g/l). Takto připravené médium bylo sterilováno při teplotě 120°C po dobu 30 minut. Po částečném vychladnutí bylo médium sterilně přelito do připravených Petriho misek. Po ztuhnutí a vychladnutí byly Petriho misky uloženy dnem vzhůru do chladničky pro pozdější použití na antimikrobiální testy.

Na připravené agarové plotny bylo přeneseno 100 µl kultury mikroorganismu a rovnoměrně rozetřeno. Po zaschnutí byly do agarů vyřezávány jamky o velikosti 0,5 ml, do kterých bylo následně pipetováno vždy 50 µl vzorku.

#### **4.6.4 Resazurin test**

Po změření absorbance po 24 hodinách byl proveden test s resazurinem. V případě 96-jamkové destičky bylo do každé jamky napipetováno 20 µl resazurinu a v případě 24-jamkové destičky bylo do každé jamky napipetováno 200 µl resazurinu. Takto připravené destičky byly inkubovány po dobu 30 minut při teplotě 37°C. Po uplynutí doby inkubace byla u každé destičky změřena absorbance při 530 nm.

### **4.7 Stanovení bezpečnosti materiálů s využitím humánních keratinocytů**

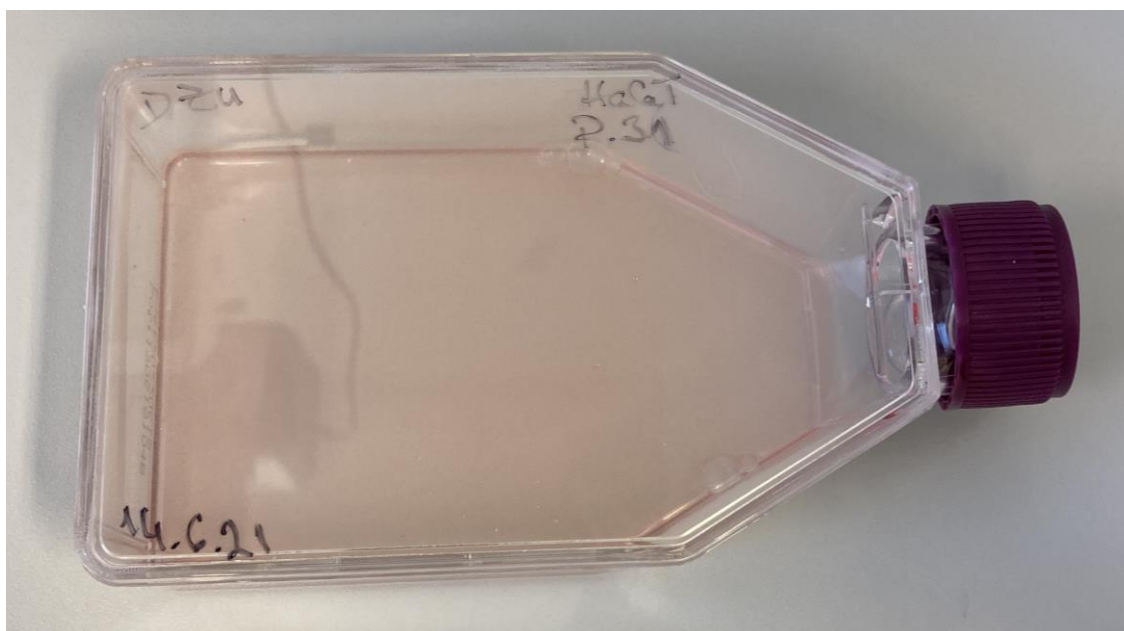
#### **4.7.1 Kultivace humánních keratinocytů linie HaCaT**

Humánní keratinocyty linie HaCaT byly kultivovány v komerčním médiu DMEM, s přísadkou 10% PBS a 1% antibiotika. Buňky byly kultivovány v kultivačních nádobách, které byly umístěny do sterilního inkubačního boxu. Podmínky uvnitř boxu zahrnovaly teplotu 37 °C, relativní vlhkost 90 % a 5% obsah CO<sub>2</sub>. Do nádob s buňkami z inkubátoru byla před další prací každá kultivační nádoba pečlivě zkontrolována. Buňky byly sledovány denně pod inverzním

mikroskopem, kvůli kontrole růstu a kontaminacím. S buňkami se pracovalo vždy ve sterilních podmínkách.

Při vysoké konfluenci (80 %) byly buňky pasážovány do nových kultivačních nádob s čerstvým médiem. Podle nárůstu buněk a stavu starého média bylo dle potřeby médium měněno.

Při pasážování se nejprve odstranilo médium a celý povrch kultivačních nádob byl nejméně třikrát promyt pomocí PBS. Následně byl přidán trypsin v adekvátním množství a kultivační lahvička byla vložena na 10 minut do kultivačního boxu. Po uplynutí této doby bylo pod mikroskopem zkontrolováno, zda se buňky oddělily ode dna nádoby. Povrch lahviček byl opět promyt PBS a suspenze buněk byla napipetována do centrifugačních zkumavek a centrifugována. Buňky byly následně rozsuspendovány v čistém médiu a přeneseny do nové kultivační nádoby. Médium bylo v nové nádobě doplněno na požadovaný objem. Následovala kontrola buněk pod inverzním mikroskopem a uložení kultivačních nádob do inkubačního boxu.



Obrázek 10: Velká kultivační nádoba

#### 4.7.2 MTT test cytotoxicity

Zcentrifugované buňky z předchozího kroku byly použity k provedení MTT testu. Tyto buňky byly rozsuspendovány v médiu a pomocí Bürkerovy komůrky a inverzního mikroskopu byla stanovena koncentrace buněk v tomto roztoku. Buněčná kultura byla následně naředěna na výslednou koncentraci  $2 \cdot 10^4$  buněk na 100  $\mu$ l média. Takto připravená kultura byla pipetována po 100  $\mu$ l do 96-jamkových destiček a po 500  $\mu$ l do 24-jamkových destiček. Jednotlivé destičky byly zkontrolovány pod mikroskopem a přeneseny do inkubačního boxu na dobu 24 hodin.

Po 24 hodinách bylo z jamek odpipetováno médium a přidáno 100  $\mu$ l sterilního vzorku v médiu v různých koncentračních řadách. Následně byly buňky spolu se vzorky inkubovány po dobu 24 hodin.

Do 24-jamkových destiček byla po 24 hodinách přidávána připravená nanovlákna, která byla před vlastním použitím pro cytotoxické testy přenesena do sterilních zkumavek typu Eppendorf a sterilována pod UV světlem po dobu 20 minut.

Po uplynutí 24 hodin bylo odpipetováno médium se vzorkem a do každé jamky 96-jamkové destičky bylo napipetováno 20  $\mu$ l MTT o koncentraci 2,5 mg/ml rozpuštěné v PBS pufru, do 24-jamkové destičky potom 100  $\mu$ l. Destičky byly opět ponechány ke kultivaci, tentokrát po dobu 3 hodin. Po uplynutí této doby bylo do každé jamky přidáno 100  $\mu$ l 10% SDS rozpuštěného v PBS pufru (96-jamková destička) nebo 500  $\mu$ l takto připraveného SDS (24-jamková destička). Destičky byly ponechány ve tmě při laboratorní teplotě dalších 24 hodin. Následně byla změřena absorbance při 540 nm. Viabilita buněk byla následně vypočtena jako poměr absorbance vzorku vůči kontrole média.

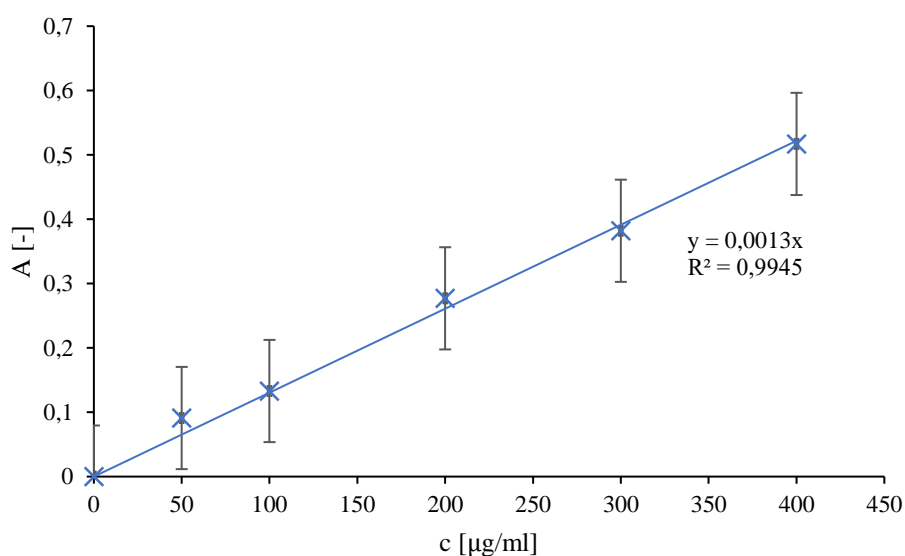
## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Optimalizace přípravy kombinovaných materiálů s antimikrobiální složkou

Během experimentů byly využívány dva typy částic popsané v kapitole 4.5.3 a dvě aktivní látky: kurkumin a ampicilin. Pro kontrolu byly připravovány částice také samostatně bez přídavku účinných látek a bez přídavku PHB.

#### 5.1.1 Antioxidační aktivita kurkuminu

Dle postupu v kapitole 4.5.1 byla sestavena kalibrační přímka Troloxu (Obrázek 11), podle které byla následně vypočtena antioxidační aktivita používaného kurkuminu.



Obrázek 11: Kalibrační přímka Troloxu

Tabulka 6: Výsledná antioxidační aktivita kurkuminu

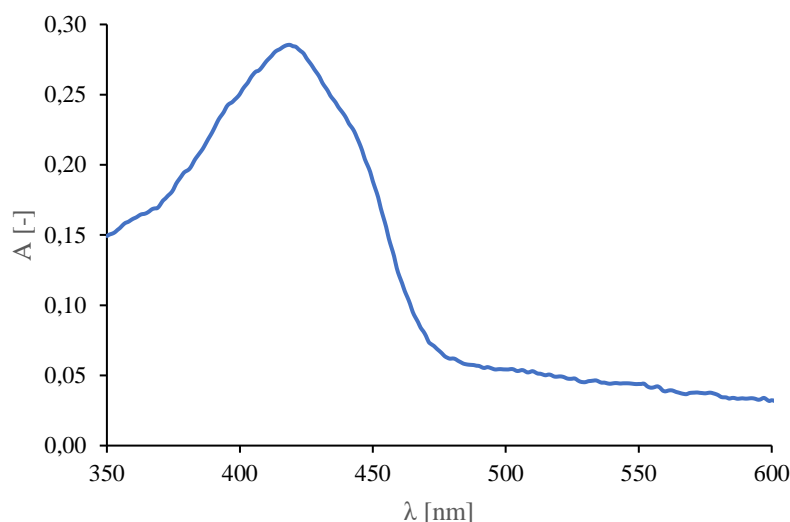
Koncentrace kurkuminu [mg/ml]	Celková antioxidační aktivita [mg/g]
0,005	46,410 ± 0,001

Celková antioxidační aktivita byla stanovována u několika různých koncentrací kurkuminu a výsledky jsou přehledně uvedeny v přiložené tabulce (Tabulka 6).

#### 5.1.2 Charakterizace lipozomů

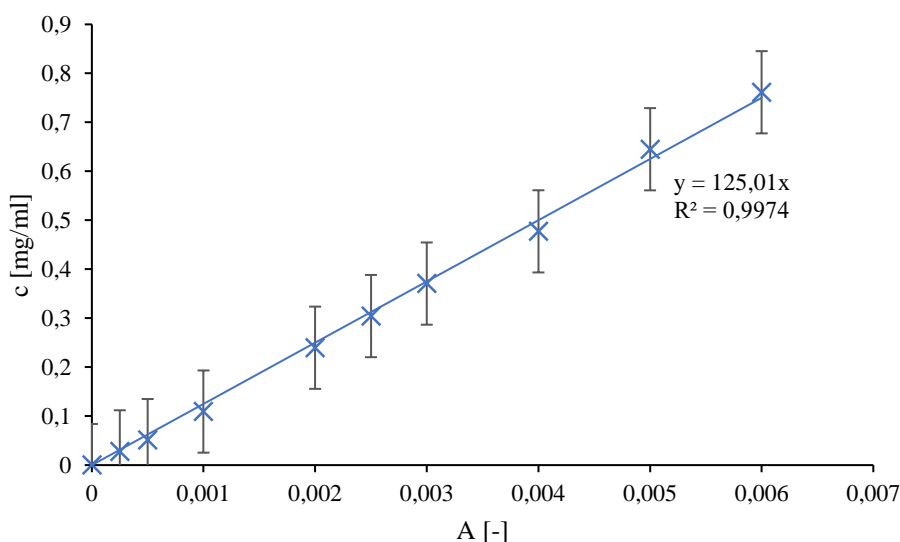
##### 5.1.2.1 Spektrofotometrické stanovení enkapsulační účinnosti kurkuminu

Před spektrofotometrickým stanovením byly připraven roztok kurkuminu v chloroformu a bylo proměřeno jeho absorpční spektrum, ze kterého bylo získáno absorpční maximum (419 nm), používané v dalších experimentech. Výsledky jsou uvedeny v následujícím grafu (Obrázek 12).



Obrázek 12: Absorpční spektrum kurkuminu

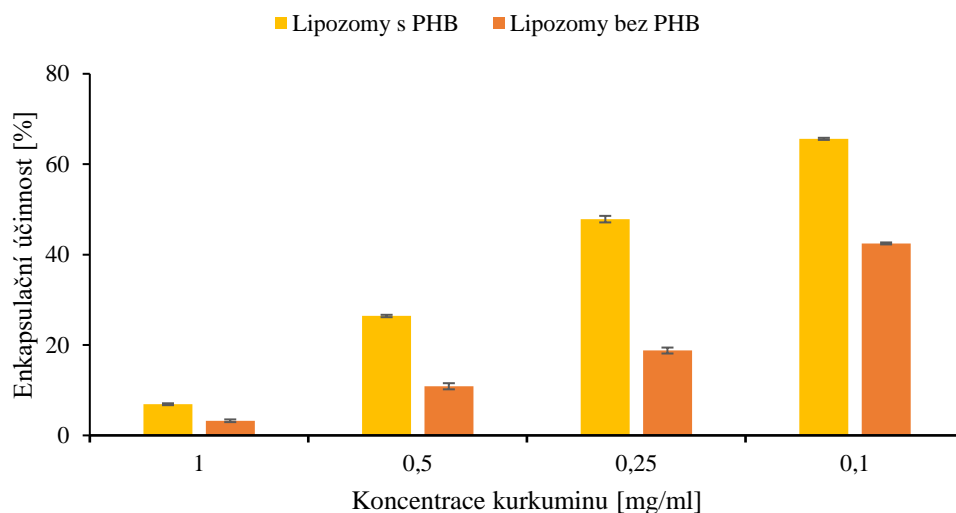
Pro stanovení enkapsulační účinnosti kurkuminu a následné měření uvolňování kurkuminu z připravených částic a vláken byla sestavena kalibrační přímka kurkuminu (Obrázek 13).



Obrázek 13: Kalibrační přímka kurkuminu

Enkapsulační účinnost byla stanovována podle postupu v kapitole 4.5.4.1 pro 4 různé koncentrace kurkuminu pro lipozomy s PHB i pro lipozomy bez PHB. Výsledky jsou uvedeny v níže přiloženém grafu (Obrázek 14).

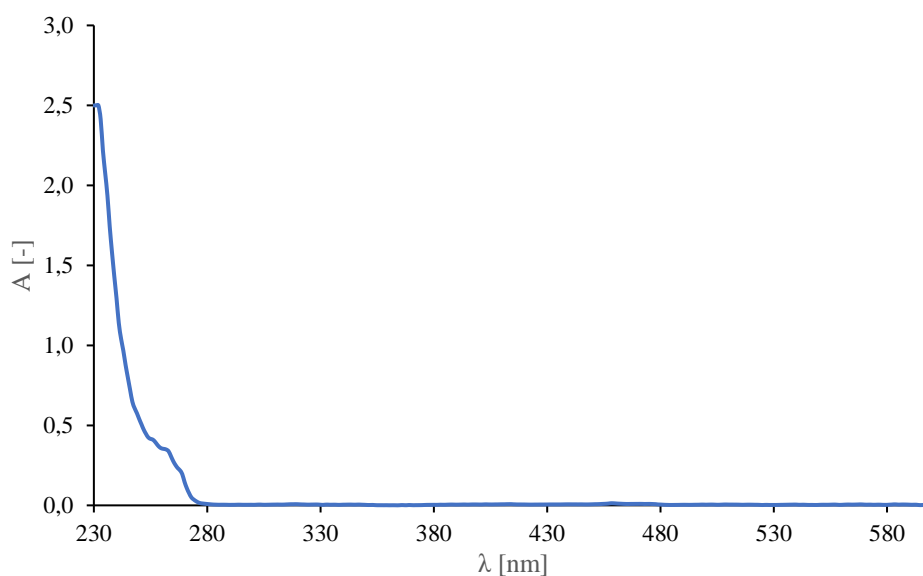
Nejvyšší enkapsulační účinnost byla zjištěna u lipozomů s přidavkem PHB, a to 65,5 % u koncentrace 0,1 mg/ml a 47,84 % u koncentrace 0,25 mg/ml. Nejvyšší zjištěná enkapsulační účinnost u lipozomů bez PHB byla zjištěna, a to 42,46 % u koncentrace 0,1 mg/ml. Přestože byla nejvyšší enkapsulační účinnost zaznamenána u lipozomů v nejnižší koncentraci, byly pro další práci kvůli většího množství kurkuminu, vybrány lipozomy v koncentraci 0,25 mg/ml, aby bylo možné detekovat uvolněný kurkumin z kombinovaných materiálů. Navzdory tomu však byly částice v obou koncentracích charakterizované na velikost, polydisperzitní index a zeta potenciál, a také bylo u obou koncentrací sledováno uvolňování z částic. Při porovnání enkapsulačních účinností u lipozomů s PHB a lipozomů bez PHB zjistíme, že u lipozomů s PHB byla enkapsulační účinnost vždy vyšší než u lipozomů bez PHB.



Obrázek 14: Enkapsulační účinnost kurkuminu

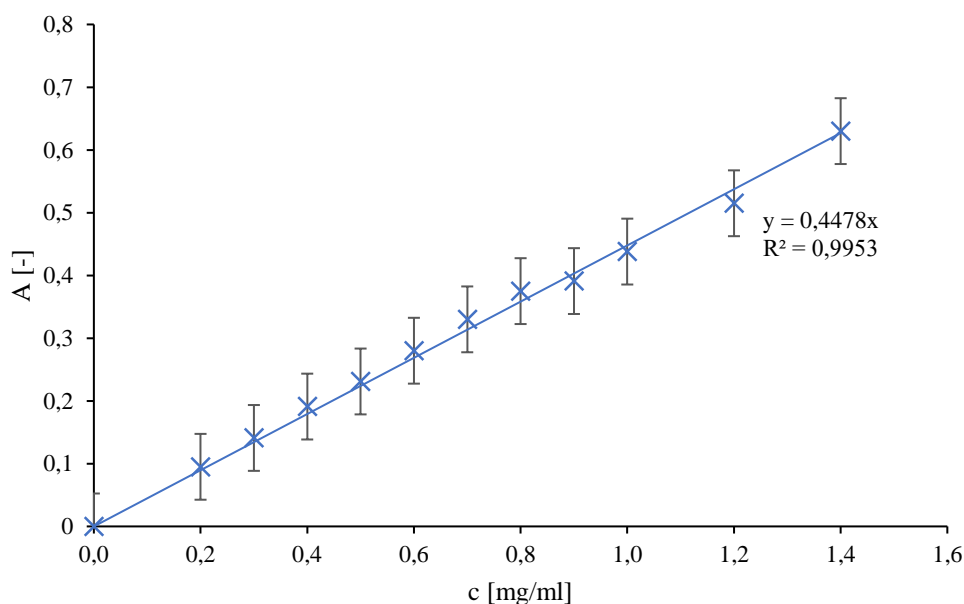
### 5.1.2.2 Spektrofotometrické stanovení enkapsulační účinnosti ampicilinu

Před spektrofotometrickým stanovením byly připraven roztok ampicilinu v destilované vodě a bylo proměřeno jeho absorpční spektrum, ze kterého bylo získáno absorpční maximum (268 nm), používané v dalších experimentech. Výsledky jsou uvedeny v následujícím grafu (Obrázek 15).



Obrázek 15: Absorpční spektrum ampicilinu

Pro stanovení enkapsulační účinnosti ampicilinu a následné měření uvolňování ampicilinu z připravených částic a vláken byla nejprve sestavena kalibrační přímka této aktivní látky (Obrázek 16).



Obrázek 16: Kalibrační přímka ampicilinu

Enkapsulační účinnost ampicilinu byla stanovována podle postupu v kapitole 4.5.4.1 pro připravené lipozomy s přidavkem PHB i bez tohoto přidavku. Výsledná enkapsulační účinnost v procentech byla zpracována do tabulky (Tabulka 7).

Tabulka 7: Enkapsulační účinnost ampicilinu

Druh lipozomů	Enkapsulační účinnost [%]
Lipozomy s PHB	53,31
Lipozomy bez PHB	42,97

Z výsledné tabulky (Tabulka 7) je patrné, že enkapsulační účinnost dosahovala vyšší hodnoty u lipozomů s enkapsulovaným ampicilinem v případě lipozomů s přidavkem PHB.

### 5.1.2.3 Stanovení velikosti a stability lipozomů

Pomocí přístroje Zetasizer ZS byla stanovena velikost částic, stejně tak jako polydisperzitní index (PdI) na principu DLS. Dále byla pomocí přístroje Zetasizer ZS stanovena na základě zeta potenciálu stabilita studovaných částic. Postup práce je popsán v kapitolách 4.5.4.2 a 4.5.4.3.

Sledovala se jejich velikost, distribuce a stabilita při styku s destilovanou vodou a fyziologickým roztokem. Hodnoty zeta potenciálu, velikosti a polydisperzitního indexu jsou uvedeny v tabulkách (Tabulka 8 a Tabulka 9) a byly zaznamenány první, sedmý a čtrnáctý den od samotné přípravy.

Tabulka 8: Naměřené hodnoty velikosti částic a polydisperzního indexu

Částice	destilovaná voda		fyziologický roztok	
	d [nm]	PdI [-]	d [nm]	PdI [-]
Prázdné lipozomy	219,60 ± 2,16	0,10 ± 0,03	186,23 ± 2,44	0,10 ± 0,02
Prázdné lipozomy s přídatkem PHB	371,97 ± 3,75	0,24 ± 0,01	268,50 ± 4,94	0,22 ± 0,01
Lipozomy s přídatkem ampicilinu	310,57 ± 6,02	0,24 ± 0,01	229,37 ± 7,88	0,19 ± 0,01
Lipozomy s přídatkem ampicilinu a PHB	386,90 ± 8,35	0,23 ± 0,01	276,90 ± 1,15	0,22 ± 0,02
Lipozomy s přídatkem kurkuminu 0,1 mg/ml	265,53 ± 6,04	0,21 ± 0,01	192,23 ± 1,86	0,11 ± 0,01
Lipozomy s přídatkem kurkuminu 0,1 mg/ml a PHB	363,03 ± 2,37	0,24 ± 0,01	255,20 ± 3,61	0,21 ± 0,01
Lipozomy s přídatkem kurkuminu 0,25 mg/ml	290,97 ± 1,44	0,27 ± 0,01	234,90 ± 2,38	0,23 ± 0,01
Lipozomy s přídatkem kurkuminu 0,25 mg/ml a PHB	373,27 ± 9,18	0,23 ± 0,01	282,43 ± 4,95	0,21 ± 0,02

Nejmenší částice v destilované vodě tvořily prázdné lipozomy bez přídatku PHB a účinných látek. Velikost těchto částic dosahovala  $219,60 \pm 2,16$  nm. Nejvyšší hodnota velikosti byla potom zaznamenána u PHB částic s enkapsulovaným ampicilem, a to  $386,90 \pm 8,35$  nm. Celkově můžeme říct, že větší částice tvořily lipozomy s přídatkem PHB v porovnání s těmi, které ve své struktuře PHB neobsahovaly. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena tím, že PHB se inkorporuje do fosfolipidové dvojvrstvy lipozomů, což ovlivňuje velikost částice spolu s její stabilitou.

Nejmenší částice ve fyziologickém roztoku tvořily stejně jako v destilované vodě prázdné lipozomy bez přídatku PHB a aktivních látek. Velikost těchto částic dosahovala hodnot  $186,23 \pm 2,44$  nm. Nejvyšší hodnota velikosti byla potom naměřena u částic s enkapsulovaným kurkuminem o koncentraci 0,25 mg/ml a s obsahem PHB, a to  $282,43 \pm 4,95$  nm. Celkově můžeme stejně jako u částic v destilované vodě konstatovat, že větší částice tvořily lipozomy s přídatkem PHB, v porovnání s těmi, které PHB ve své struktuře neobsahovaly.

Polydisperzní index u částic v prostředí destilované vody byl v rozsahu od  $0,10 \pm 0,03$  do  $0,27 \pm 0,01$ , z čehož vyplývá, že částice vykazovaly vysokou uniformitu. U částic v prostředí fyziologického roztoku byl v rozsahu hodnot od  $0,10 \pm 0,02$  do  $0,23 \pm 0,01$ , z čehož vyplývá, že částice vykazovaly vysokou uniformitu, stejně jako částice v prostředí destilované vody.

Tabulka 9: Naměřené hodnoty Zeta potenciálu (1-Prázdné lipozomy, 2-Prázdné lipozomy s přidavkem PHB, 3-Lipozomy s přidavkem ampicilinu, 4-Lipozomy s přidavkem ampicilinu a PHB, 5-Lipozomy s přidavkem kurkuminu 0,1 mg/ml, 6-Lipozomy s přidavkem kurkuminu 0,1 mg/ml a PHB, 7-Lipozomy s přidavkem kurkuminu 0,25 mg/ml, 8-Lipozomy s přidavkem kurkuminu 0,25 mg/ml a PHB)

Částice	Zeta potenciál [mV]					
	Destilovaná voda			Fyziologický roztok		
	1. den	7. den	14. den	1. den	7. den	14. den
1	-47,37 ± 1,32	-25,68 ± 1,98	-28,60 ± 2,19	-29,97 ± 2,27	-33,57 ± 3,09	-26,27 ± 2,67
2	-61,83 ± 4,90	-37,07 ± 0,63	-62,30 ± 5,44	-35,17 ± 1,40	-30,80 ± 1,61	-30,20 ± 1,40
3	-75,50 ± 1,14	-37,47 ± 3,65	-66,07 ± 2,23	-35,27 ± 0,60	-36,00 ± 1,35	-32,60 ± 0,45
4	-70,13 ± 0,93	-40,20 ± 1,20	-76,20 ± 1,74	-36,13 ± 0,81	-29,23 ± 4,77	-30,97 ± 0,39
5	-68,83 ± 5,36	-20,80 ± 2,69	-51,03 ± 5,20	-28,70 ± 1,06	-25,27 ± 0,12	-30,20 ± 0,92
6	-54,43 ± 1,56	-28,83 ± 1,11	-64,23 ± 0,25	-38,30 ± 0,75	-20,07 ± 2,95	-33,03 ± 0,50
7	-61,77 ± 1,40	-25,97 ± 2,30	-47,97 ± 1,03	-24,97 ± 2,18	-24,80 ± 0,73	-28,33 ± 2,38
8	-28,63 ± 1,93	-26,40 ± 0,70	-68,37 ± 0,12	-59,20 ± 0,99	-24,60 ± 0,78	-32,77 ± 0,95

U zeta potenciálu vycházíme z předpokladu, že stabilní částice mají hodnotu zeta potenciálu mimo interval hodnot -30 až +30 mV. Po prohlédnutí hodnot Zeta potenciálu ve výše uvedené tabulce (Tabulka 9) můžeme konstatovat, že většina částic byla mimořádně stabilní v první den i po uplynutí 14 dní.

### 5.1.3 Uvolňování účinných látek z lipozomů

Částice určené pro uvolňování účinných látek byly připraveny podle postupů v kapitole 4.5.3 a uvolňování bylo prováděno dle postupů uvedených v kapitole 4.5.5. Bylo sledováno uvolňování kurkuminu a ampicilinu z částic s přidavkem PHB i z částic bez tohoto přídatku, v destilované vodě, ve fyziologickém roztoku a v 50% ethanolu.

Při pokusech o uvolňování do 50% ethanolu docházelo ke srážení, a proto bylo dále pozorováno pouze uvolňování do destilované vody a do fyziologického roztoku.

#### 5.1.3.1 Ampicilin

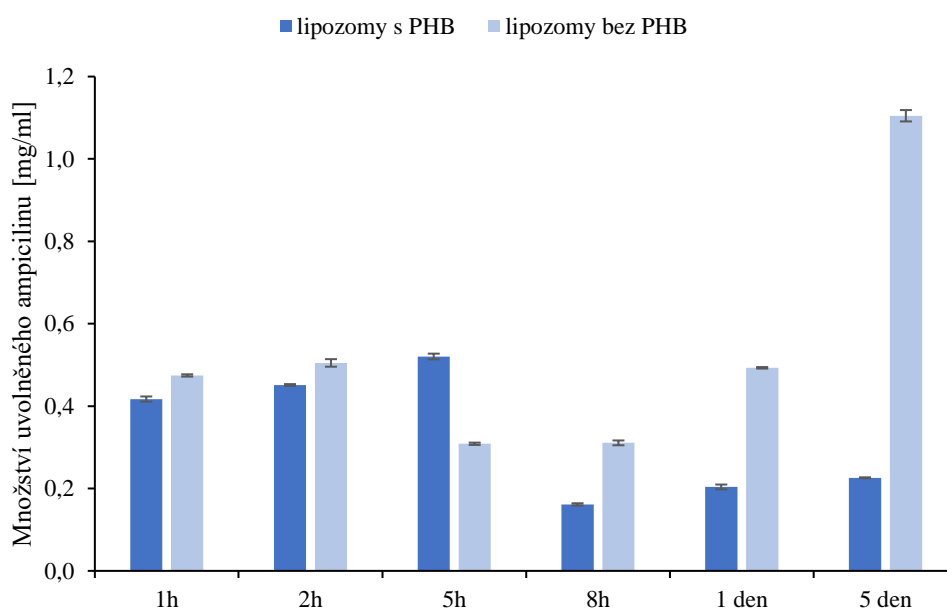
V následujících grafech (Obrázek 17 a Obrázek 18) jsou graficky zpracována množství uvolněného ampicilinu do destilované vody při laboratorní teplotě a do fyziologického roztoku při teplotě 37 °C.

Z grafu pro prostředí destilované vody (Obrázek 17) můžeme vyzorovat, že v případě lipozomů s přidavkem PHB uvolněné množství ampicilinu během prvních 5 hodin stoupá, v následujících 4 hodinách prudce poklesne a opět začíná vzrůstat. Podobně potom u lipozomů

bez přídavku PHB uvolněné množství ampicilinu v prvních hodinách narůstá, po 5 hodinách klesne, a v následujících dnech potom prudce stoupá.

Nejvyšší detekované množství uvolněného ampicilinu do destilované vody bylo u lipozomů bez PHB po 5 dnech, a to  $1,1 \pm 0,02$  mg/ml. U lipozomů s PHB pak bylo nejvyšší detekované množství ampicilinu po 5 hodinách, a to  $0,5 \pm 0,02$  mg/ml.

Z uvedených výsledků můžeme předpokládat, že po 5 až 8 hodinách pravděpodobně docházelo k degradaci uvolněného ampicilinu a následně opět začala převládat rychlost uvolňování nad rychlostí degradace. Nízké hodnoty uvolněné látky u lipozomů s PHB po 8 hodinách mohly být způsobeny mimo jiné také sníženou enkapsulační účinností u daných vzorků nebo ztrátou analytu při manipulaci.



Obrázek 17: Množství uvolněného ampicilinu do prostředí destilované vody

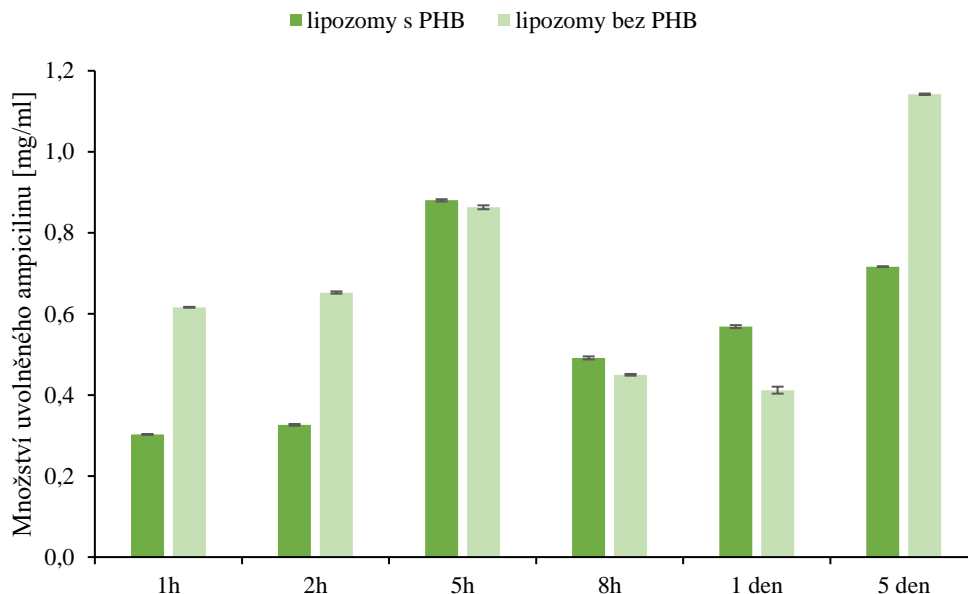
V následujícím grafu (Obrázek 18) jsou zpracována data pro uvolňování ampicilinu v prostředí fyziologického roztoku.

Můžeme vidět, že u lipozomů s přídavkem PHB během prvních 5 hodin koncentrace uvolněného ampicilinu roste, po 8 hodinách prudce klesne a v následujících dnech potom opět narůstá. Stejně tak u lipozomů bez přídavku PHB během prvních 5 hodin koncentrace uvolněného ampicilinu narůstá, po 8 hodinách klesne na polovina a v následujících dnech opět roste.

Nejvyšší detekované množství uvolněného ampicilinu do fyziologického roztoku bylo u lipozomů bez PHB po 5 dnech, a to  $1,1 \pm 0,02$  mg/ml. U lipozomů s PHB pak bylo nejvyšší detekované množství ampicilinu po 5 hodinách, a to  $0,8 \pm 0,01$  mg/ml.

Z uvedených výsledků je možné předpokládat, že v případě lipozomů s přídavkem PHB i v případě lipozomů bez přídavku PHB začal uvolněný ampicilin po 5 hodinách degradovat. Následně začala opět převládat rychlost uvolňování účinné látky nad rychlostí degradace.

Celkově je možné předpokládat, že degradace ampicilinu se začala projevovat vždy po 5 až 8 hodinách, a tedy bude v budoucnosti nutné provést dané uvolňovací testy v užších časových intervalech. Dále je z grafů viditelné, že největší množství ampicilinu a v rychlejším časovém úseku se uvolňovalo do destilované vody i do fyziologického roztoku v případě lipozomů bez přídavku PHB.



Obrázek 18: Množství uvolněného ampicilinu do prostředí fyziologického roztoku

### 5.1.3.2 Kurkumin

Do následujících grafů (Obrázek 19 a Obrázek 20) byly zpracovány výsledky uvolňování kurkuminu z lipozomů s přidavkem PHB i z lipozomů bez tohoto přidavku. Kurkumin byl uvolňován do destilované vody a fyziologického roztoku.

V kapitole 5.1.2.1 byla stanovována enkapsulační účinnost kurkuminu a bylo zjištěno, že nejlépe byly enkapsulovány koncentrace 0,1 mg/ml a 0,25 mg/ml. Právě tyto dvě koncentrace byly vybrány pro další práci a byly podrobeny testům na uvolňování účinné látky z lipozomů.

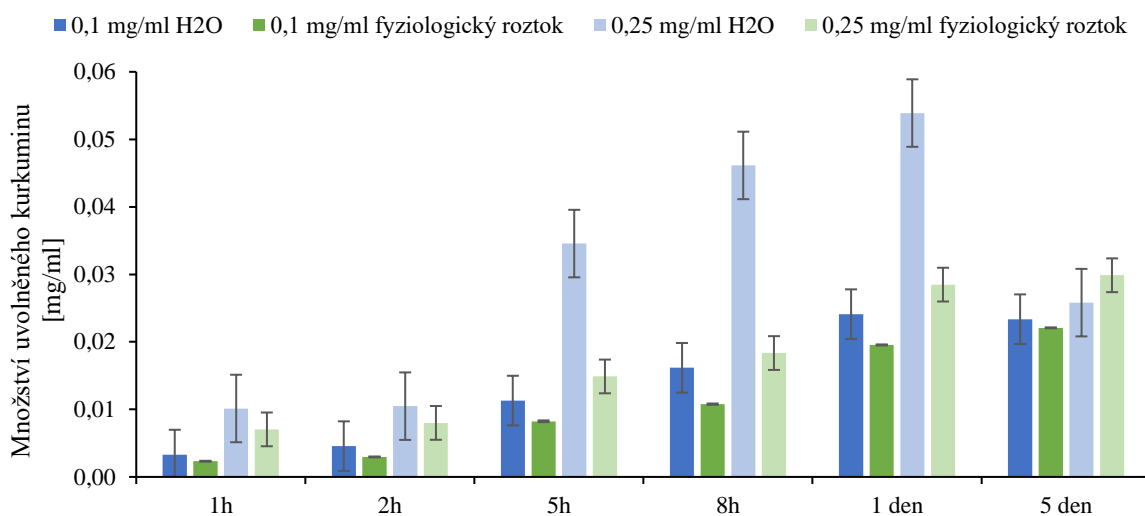
V prvním grafu (Obrázek 19) je zpracováno uvolňování kurkuminu z lipozomů bez PHB. Je jasně viditelné, že nejvyšší množství uvolněné účinné látky bylo detekováno po 24 hodinách u koncentrace 0,25 mg/ml v destilované vodě, a to  $0,054 \pm 0,025$  mg/ml. Všeobecně můžeme vidět, že větší množství kurkuminu se uvolňovalo z částic s vyšší koncentrací této látky. Dále je viditelné, že ve všech případech množství uvolněného kurkuminu po dobu prvních 24 hodin roste a v následujících dnech potom prudce klesá.

Můžeme tedy předpokládat degradaci kurkuminu v destilované vodě i ve fyziologickém roztoku po uplynutí 24 hodin od počátku uvolňování. Díky této skutečnosti bude třeba vybrané částice v budoucnosti podrobit dalším testům v rozsahu 1 až 5 dní pro zjištění přesnějšího vzoru uvolňování a případné degradace.

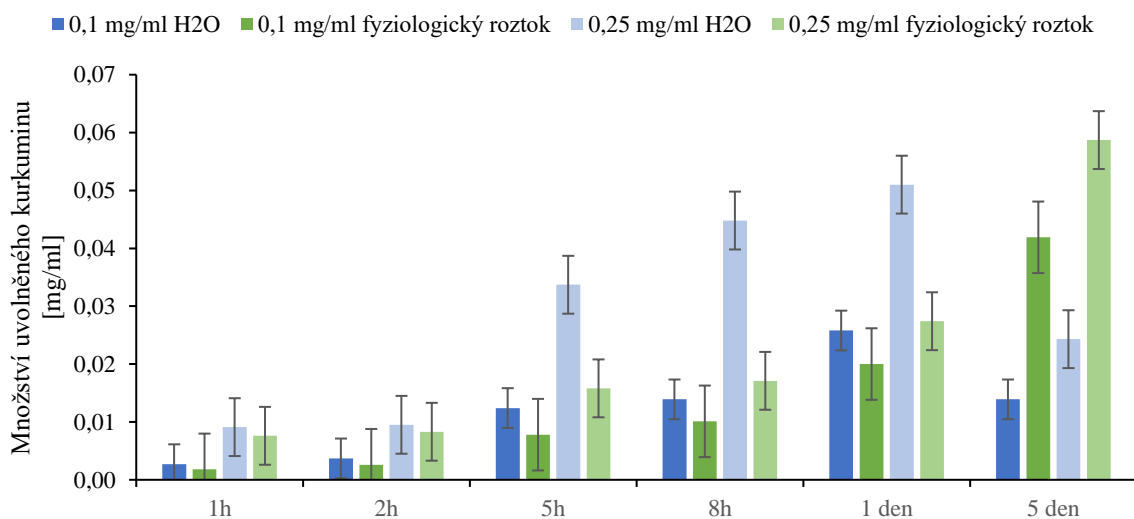
Ve druhém grafu (Obrázek 20) potom můžeme pozorovat postupné uvolňování kurkuminu z lipozomů s přidavkem PHB. Je jasně viditelné, že nejvyšší hodnoty uvolněné aktivní látky bylo dosaženo po 5 dnech u koncentrace 0,25 mg/ml ve fyziologickém roztoku, a to  $0,058 \pm 0,008$  mg/ml. V řadě uvolňované do fyziologického roztoku postupně narůstá množství uvolněného kurkuminu až do pátého dne.

Oproti tomu v řadě uvolňované do destilované vody můžeme pozorovat nárůst koncentrace uvolněné látky po dobu prvních 24 hodin, přičemž v následujících dnech tato koncentrace zase klesá. Toto bylo způsobeno pravděpodobně degradací uvolňovaného produktu po těchto 24 hodinách.

Celkově můžeme konstatovat, že větší množství uvolněného kurkuminu bylo detekováno u lipozomů s koncentrací kurkuminu 0,25 mg/ml. Při dalších experimentech byly tedy používány právě lipozomy s koncentrací kurkuminu 0,25 mg/ml.



Obrázek 19: Uvolňování kurkuminu z lipozomů bez PHB



Obrázek 20: Uvolňování kurkuminu z lipozomů s přidavkem PHB

#### 5.1.4 Optimalizace přípravy nanovláken

Nejprve byla připravována čistá PHB vlákna metodou forcespinningu podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.6. Při použití méně než 20 ml roztoku PHB v chloroformu byla vlákna příliš slabá pro další použití. Proto byla dále připravována pouze vlákna z 20 ml 4% roztoku PHB.

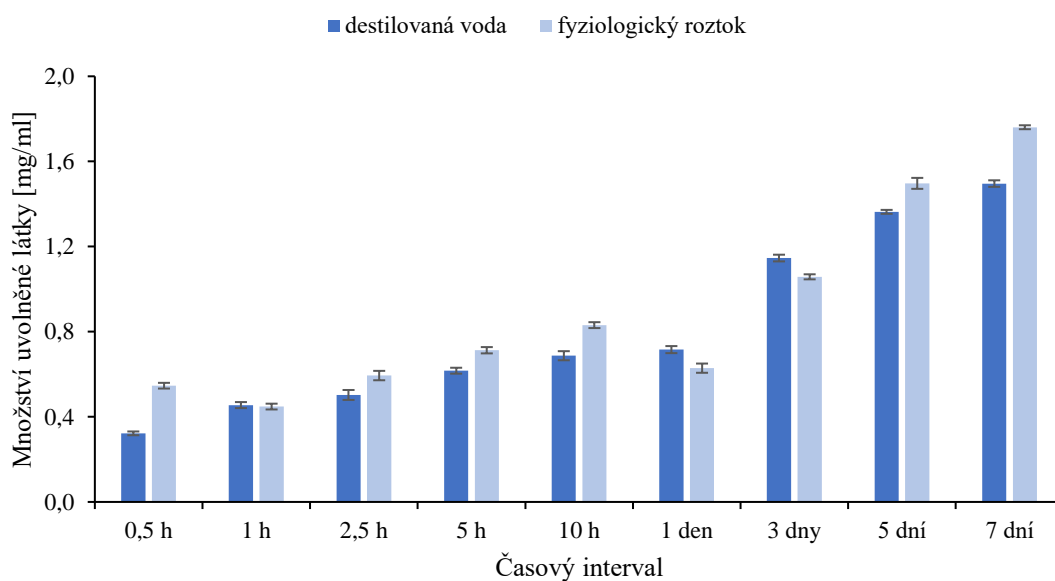
Při přípravě kurkuminových vláken byla opět vlákna z méně než 20 ml příliš slabá. Vlákna připravovaná z více než 20 ml byla příliš lepivá a trhala se. Celkově byla všechna čerstvě připravená kurkuminová vlákna příliš lepivá a po vyjmutí z forcespinningu se slepila a nedala se dále používat. Proto se každá kurkuminová vlákna nechala v přístroji vyschnout přes noc do dalšího dne. Takto připravená vlákna už nelepila, byla dostatečně silná a stabilní a mohly být dále použity pro prováděné experimenty.

Ve výsledku byla ampicilinová i kurkuminová vlákna připravována z 20 ml 4% roztoku PHB díky dostatečné síle a stabilitě podle čistých vláken a před samotným zvlákněním bylo v tomto roztoku vždy rozpuštěno 10 % z celkového množství PHB v roztoku, aby bylo dosaženo dostatečné adsorpce.

### 5.1.5 Uvolňování účinných látek z nanovláken

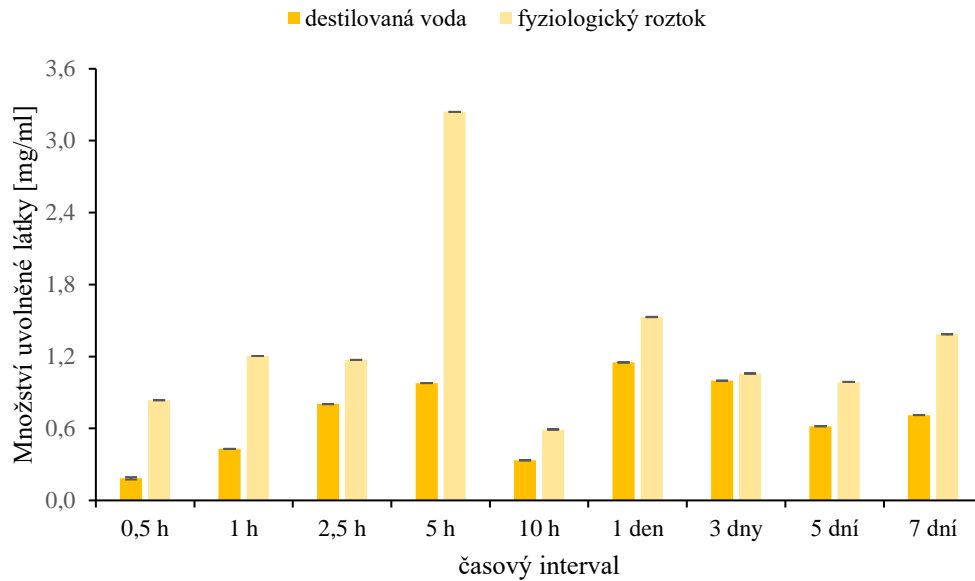
Postupné uvolňování aktivních látek z vytvořených nanovláknenných krytů bylo stanovováno spektrofotometricky. Veškerá měření probíhaly v triplicátech a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Stanovené hodnoty byly následně přepočítány na množství uvolněné látky v mg/ml.

V následujícím grafu (Obrázek 21) je zobrazeno postupné uvolňování ampicilinu z připravených PHB vláken. Z naměřených hodnot je viditelné, že větší množství ampicilinu se uvolňovalo do fyziologického roztoku při teplotě 37 °C. Dále je z grafu viditelné, že koncentrace uvolněného ampicilinu se v průběhu času postupně zvyšovala. Jedinou výjimku tvoří časový interval 24 hodin, kde pravděpodobně uvolněný ampicilin degradoval, ale následně převládla rychlost uvolňování nad rychlostí degradace. Nejvyšší množství uvolněného ampicilinu bylo detekováno u destilované vody ( $1,50 \pm 0,01$  mg/ml) i fyziologického roztoku ( $1,76 \pm 0,01$  mg/ml) po 7 dnech od začátku uvolňování.



Obrázek 21: Uvolňování ampicilinu z PHB vláken

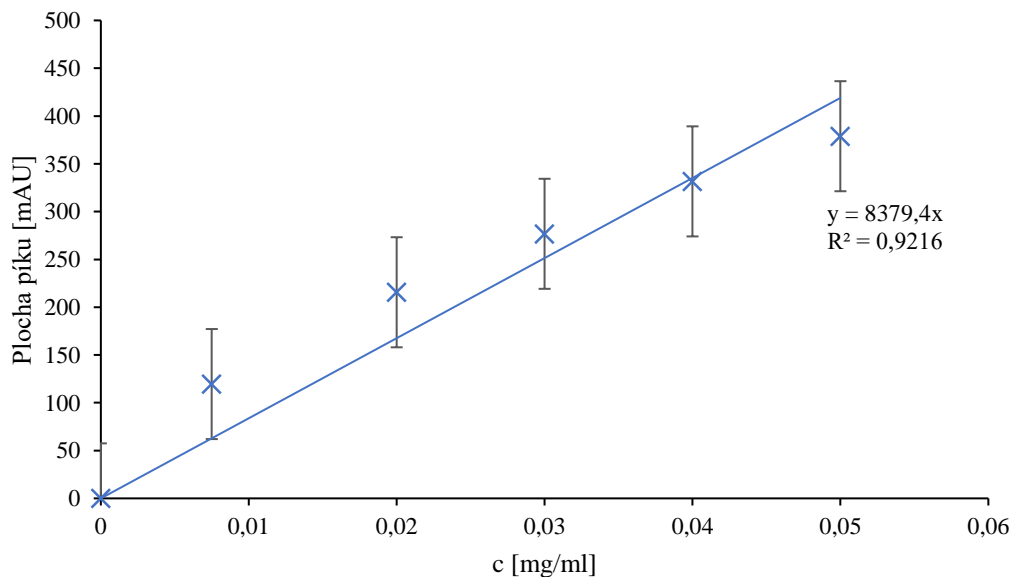
V následujícím grafu (Obrázek 22) je potom zobrazeno postupné uvolňování kurkuminu z připravených PHB vláken. Z naměřených hodnot je patrné, že množství uvolněné látky vždy po nějakou dobu roste, potom klesá a následně zase roste a klesá. Tohle je pravděpodobně způsobeno postupnou degradací uvolněné látky. Celkově se více kurkuminu z vláken uvolňovalo do fyziologického roztoku při teplotě 37 °C. V časovém intervalu 5 hodin si můžeme všimnout strmého nárůstu uvolněné látky ve fyziologickém roztoku. Toto bylo pravděpodobně způsobeno utržením části nanovláknenného krytu a jeho rozpuštěním při vytřepávání do chloroformu. Nejvyšší množství uvolněného kurkuminu bylo detekováno v případě destilované vody po 24 hodinách od začátku uvolňování ( $1,15 \pm 0,01$  mg/ml), v případě fyziologického roztoku potom po 5 hodinách od začátku uvolňování ( $3,24 \pm 0,01$  mg/ml).



Obrázek 22: Uvolňování kurkuminu z PHB vláken

### 5.1.6 Uvolňování ampicilinu pomocí HPLC

Pro stanovení uvolněného ampicilinu z částic i připravených vláken byla nejprve dle kapitoly 4.5.8 připravena koncentrační řada ampicilinu, která byla změřena na kapalinovém chromatografu. Z těchto hodnot byla sestavena kalibrační přímka (Obrázek 23), podle které byly následně stanovovány hodnoty uvolněného ampicilinu.



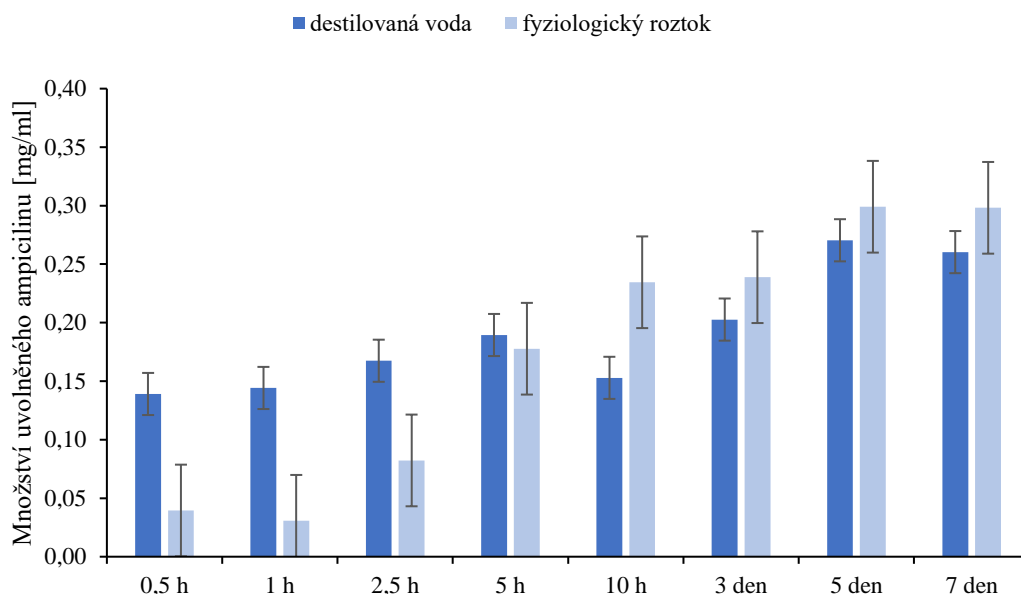
Obrázek 23: Kalibrační přímka ampicilinu z HPLC

### 5.1.6.1 PHB vlákna

Pro HPLC stanovení uvolněného ampicilinu byly naředěny stejné vzorky, které byly použity u spektrofotometrického stanovení v kapitole 5.1.5. Z grafu (Obrázek 24) je zřejmé, že v případě fyziologického roztoku koncentrace uvolněného ampicilinu postupně stoupala. V případě uvolňování do destilované vody koncentrace ampicilinu v průběhu prvních 10 hodin postupně klesala a následně zase stoupala. Toto bylo pravděpodobně způsobeno částečnou degradací ampicilinu, kdy po uplynutí 10 hodin rychlost uvolňování přesáhla rychlost degradace.

Nejvyšší množství ampicilinu bylo uvolněno v případě destilované vody ( $0,27 \pm 0,02$  mg/ml) i fyziologického roztoku ( $0,30 \pm 0,01$  mg/ml) 5 den od začátku uvolňování.

Při porovnání s daty ze spektrofotometrického stanovení zjišťujeme, že při kapalinové chromatografii byla detekována nižší množství uvolněného ampicilinu. Tato skutečnost je způsobena pravděpodobně stářím spektrofotometru a přesností metody.



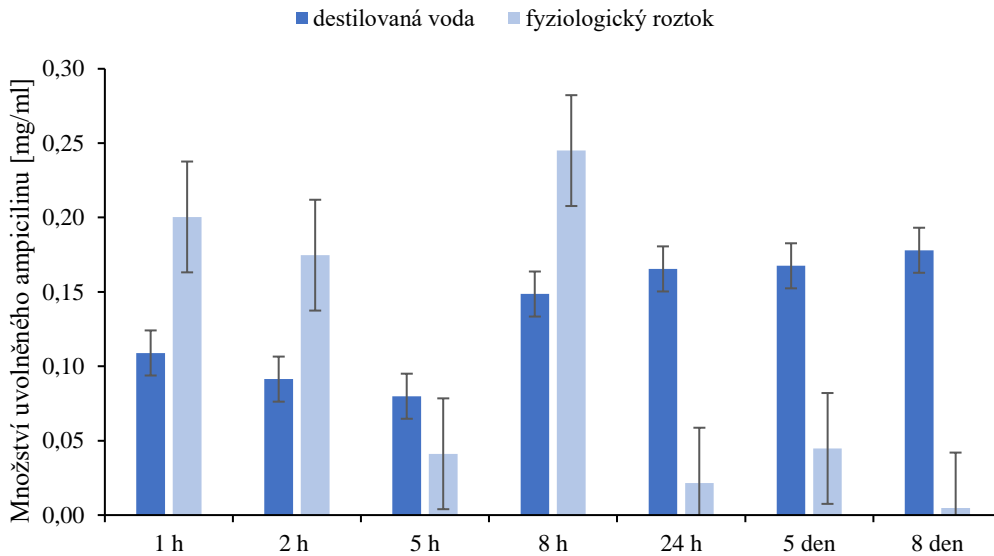
Obrázek 24: Množství uvolněného ampicilinu z připravených PHB vláken

### 5.1.6.2 Lipozomy

Množství uvolněného ampicilinu bylo stanovováno u částic s přídavkem PHB i u částic bez přídavku PHB. Stejně jako v případě vláken byly pro uvolňování ampicilinu z částic naředěny stejné vzorky, které bylo použity pro spektrofotometrické stanovení ampicilinu popsané v kapitole 5.1.3.1.

Z níže uvedeného grafu (Obrázek 25) je jasně viditelné, že v případě uvolňování do destilované vody se větší množství ampicilinu uvolnilo již po 1 hodině. Následujících několik hodin koncentrace uvolněného ampicilinu mírně klesala a od 8 hodiny opět pomalu vzrůstala. Nejvyšší množství ampicilinu bylo uvolněno do destilované vody po 8 dnech od začátku uvolňování ( $0,18 \pm 0,02$  mg/ml), do fyziologického roztoku potom po 8 hodinách od začátku uvolňování ( $0,25 \pm 0,04$  mg/ml).

V případě uvolňování do fyziologického roztoku hodnoty koncentrace ampicilinu nepravidelně vzrůstají a zase klesají, což mohlo být způsobeno postupnou degradací uvolněného ampicilinu.

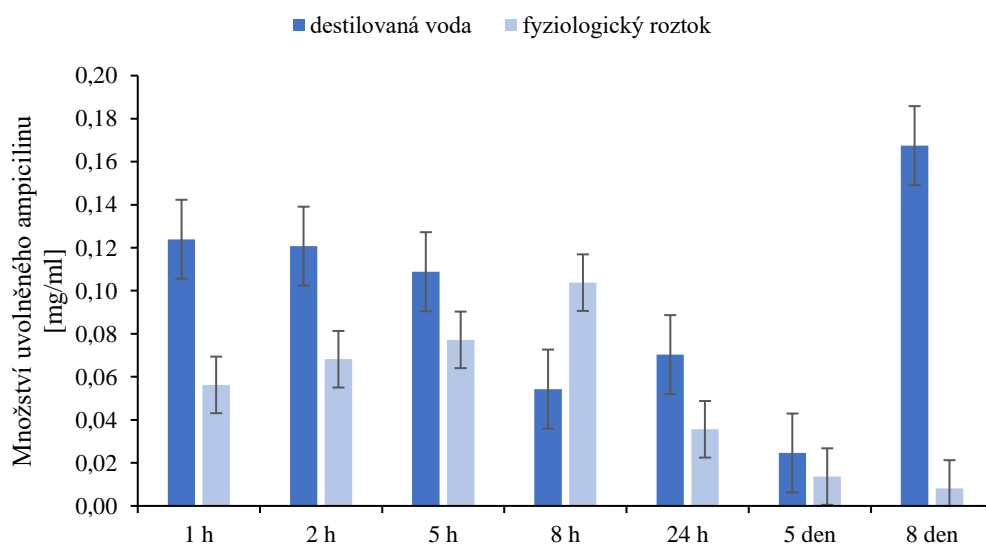


Obrázek 25: Množství uvolněného ampicilinu z částic s přídavkem PHB

V následujícím grafu (Obrázek 26) jsou uvedené koncentrace uvolněného ampicilinu z částic bez obsahu PHB. Můžeme vidět, že v případě fyziologického roztoku koncentrace uvolněného ampicilinu v prvních 8 hodinách postupně roste a pak postupně klesá až do 8 dne. V případě destilované vody prudce naroste koncentrace uvolněného ampicilinu již během první hodiny a následujících 8 hodin klesá. Po 24 hodin opět naroste a následně v průběhu několika dní střídavě roste a klesá.

Nejvyšší množství ampicilinu bylo detekováno v případě destilované vody po 8 dnech od počátku uvolňování ( $0,17 \pm 0,02$  mg/ml), v případě fyziologického roztoku po 8 hodinách od počátku uvolňování ( $0,10 \pm 0,02$  mg/ml).

Porovnáním s daty ze spektrofotometrického stanovení zjistíme, že při použití kapalinového chromatografu získáváme mnohem nižší koncentrace uvolněného ampicilinu. Stejně jako v případě HPLC uvolňování z připravených nanovláčkových krytů je tato skutečnost způsobena pravděpodobně způsobena nedostatečnou citlivostí spektrofotometrické metody nebo samotným stářím a kalibrací použitého spektrofotometru.



Obrázek 26: Množství uvolněného ampicilinu z částic bez obsahu PHB

### 5.1.7 Testování stability vláken

Vlákná pro testování jejich stability byly připraveny podle postupu popsáném v kapitole 4.5.6 a bylo postupováno podle postupu pro testování stability popsáném v kapitole 4.5.9. Stabilita bylo sledována ve třech různých prostředích při dvou různých teplotách. Vlákná v destilované vodě a v 50% ethanolu byly uchovávány při laboratorní teplotě, oproti tomu vlákna ve fyziologickém roztoku byla uchovávána při teplotě 37 °C. Výsledky jsou zaznamenány v následujících tabulkách (Tabulka 10 a Tabulka 11).

Tabulka 10: Úbytek hmotnosti vláken v průběhu 1 až 7 dní

ÚBYTEK	dní			
	1	2	5	7
	[mg]			
destilovaná voda	0,00 ± 1,11	0,00 ± 2,33	0,00 ± 3,12	0,00 ± 2,07
fyziologický roztok	0,00 ± 1,62	0,00 ± 2,11	0,00 ± 2,35	0,00 ± 3,11
ethanol 50 %	0,00 ± 1,23	0,00 ± 2,01	0,00 ± 2,18	0,00 ± 3,52

Tabulka 11: Úbytek hmotnosti vláken v průběhu 10 až 25 dní

ÚBYTEK	dní		
	10	14	25
	[mg]		
destilovaná voda	0,00 ± 1,42	0,00 ± 3,36	0,00 ± 3,35
fyziologický roztok	0,00 ± 1,58	0,00 ± 2,21	0,03 ± 0,96
Ethanol 50 %	0,00 ± 2,55	0,03 ± 2,30	0,10 ± 2,51

Ve výše uvedených tabulkách je zaznamenán úbytek hmotností jednotlivých vláken po ponoření do modelových prostředí v určitých časových intervalech. Po prohlédnutí první tabulky zjistíme, že v prvních 7 dnech byla vlákna stabilní ve všech připravených modelových prostředích. Ve druhé tabulce vidíme, že stabilita vláken byla u 50% ethanolu narušena po 14 dnech a úbytek hmotnosti činil v průměru  $0,03 \pm 2,30$  mg. Po 25 dnech je změna hmotnosti vlákna pozorována již ve dvou případech. U vláken v 50% ethanolu činil tento úbytek hmotnosti v průměru  $0,10 \pm 2,51$  mg a u vláken ve fyziologickém roztoku činil tento úbytek hmotnosti v průměru  $0,03 \pm 0,96$  mg. Z obou tabulek můžeme také vidět, že vlákna byla po dobu 25 dní stabilní v prostředí destilované vody.

Z těchto skutečností můžeme konstatovat, že 4% PHB vlákna jsou ve vodném prostředí a fyziologickém roztoku po dobu 1 měsíce mimořádně stabilní. Pro 50% ethanol můžeme předpokládat stabilitu 4% PHB vláken alespoň po dobu 25 dní.

## 5.2 Stanovení antimikrobiálních vlastností

Antimikrobiální vlastnosti byly testovány u obou použitých aktivních látek (kurkumin, ampicilin), lipozomů v 6 různých kombinacích, připravených vláken a připravených kombinovaných materiálů. Testy na 4 mikroorganismech byly provedeny podle postupů v kapitole 4.6.2.

### 5.2.1 Bujónová diluční metoda

Antimikrobiální aktivita byla stanovována pomocí bujónové diluční metody, která je popsána v kapitole 4.6.2 a je vyjádřena v procentech. Nula procent představuje nulovou antimikrobiální aktivitu a veškeré kladné hodnoty potom vyjadřují procentuální velikost antimikrobiálního účinku jednotlivých vzorků.

#### 5.2.1.1 Kurkumin a ampicilin

Byly připraveny koncentrační řady ampicilinu (v destilované vodě) a kurkuminu (v DMSO) o 12 různých hodnotách a byla hledána minimální inhibiční koncentrace (dále jen MIC) u jednotlivých mikroorganismů. Jednotlivé výsledky byly zpracovány do přehledné tabulky.

U nejvyšších koncentrací kurkuminu (50–6,25 mg/ml) nebylo možné správně stanovit nárůst mikroorganismů díky výraznému zbarvení kurkuminu, a proto byly za účelem přesnějších výsledků pro kurkumin následně provedeny také testy na agarových plotnách.

Tabulka 12: Výsledky bujónové diluční metody pro ampicilin

Koncentrace ampicilinu [µg/ml]	S. Epidermidis	E. Coli	M. Luteus
	Viabilita [%]		
6,250	0,000±1,011	8,521±1,120	0,000±1,235
3,130	0,000±1,069	83,631±2,522	0,000±1,267
1,560	0,000±1,068	85,206±3,414	0,000±3,444
0,780	0,000±1,049	93,218±3,081	0,000±1,031
0,391	0,000±1,024	97,083±5,62	0,523±1,145
0,195	0,000±0,947	99,991±0,961	15,571±1,684
0,098	0,000±1,057	100,000±4,031	68,000±1,272
0,049	14,150±1,038	100,000±4,041	85,787±1,190
0,024	62,80±1,065	100,000±2,164	86,550±2,072

Pro stanovení MIC ampicilinu u *S. Epidermidis* byla vypracována výše uvedená tabulka (Tabulka 12), ze které je patrné, že MIC ampicilinu u tohoto mikroorganismu byla stanovena na  $2,4 \cdot 10^{-5}$  mg/ml. Při zopakování experimentu bylo dosaženo stejných výsledků.

Z výše uvedené tabulky je také patrné, že ve většině připravených koncentrací ampicilinu byl detekován nárůst mikroorganismů. I přes to mohla být stanovena MIC ampicilinu u *E. Coli*, a to na  $3,13 \cdot 10^{-5}$  mg/ml. Můžeme tedy předpokládat, že vyšší koncentrace než je tato budou inhibovat další růst *E. Coli*.

Z tabulky můžeme také vyčíst hodnoty pro *M. Luteus*, a MIC ampicilinu je patrná v hodnotě  $2,4 \cdot 10^{-5}$  mg/ml. Díky této skutečnosti předpokládáme, že všechny vyšší koncentrace ampicilinu než je MIC budou inhibovat další možný růst u *M. Luteus*.

Koncentrační řada ampicilinu 0,05 až  $2,44 \cdot 10^{-5}$  mg/ml byla otestována také u *C. Glabrata*, ale ve všech těchto koncentracích byl detekován nárůst daného mikroorganismu. Tenhle výsledek byl očekáván, jelikož ampicilin jako širokospektrální antibiotikum nepůsobí proti růstu kvasinek.

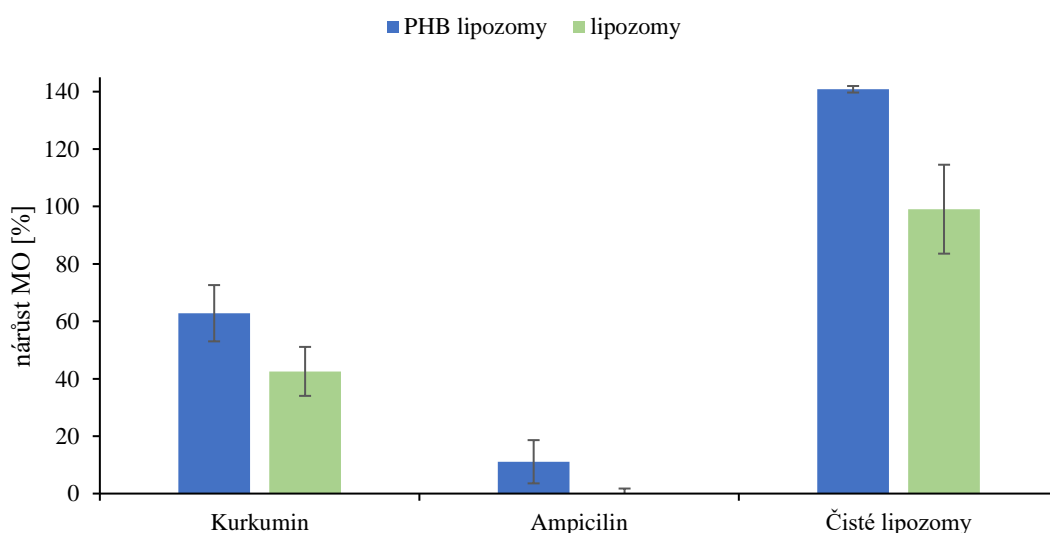
### 5.2.1.2 Lipozomy

Pro stanovení antimikrobiální aktivity jednotlivých částic byly podle postupů v kapitole 4.5.3 připraveny 2 druhy lipozomů. S přídavkem PHB a bez přídavku PHB. Pro přehlednost jsou všechny typy připravovaných částic uvedeny v níže přiložené tabulce (Tabulka 13). Takto připravené částice byly pipetovány v triplicátech do jednotlivých jamek v připravených destičkách. Výsledný procentuální nárůst mikroorganismů byl zpracován do přehledných grafů.

Tabulka 13: Přehled částic připravovaných pro antimikrobiální testy

Částice	
S přídavkem PHB	Bez přídavku PHB
Čisté	Čisté
Ampicilin 1 mg/ml	Ampicilin 1 mg/ml
Kurkumin 0,25 mg/ml	Kurkumin 0,25 mg/ml

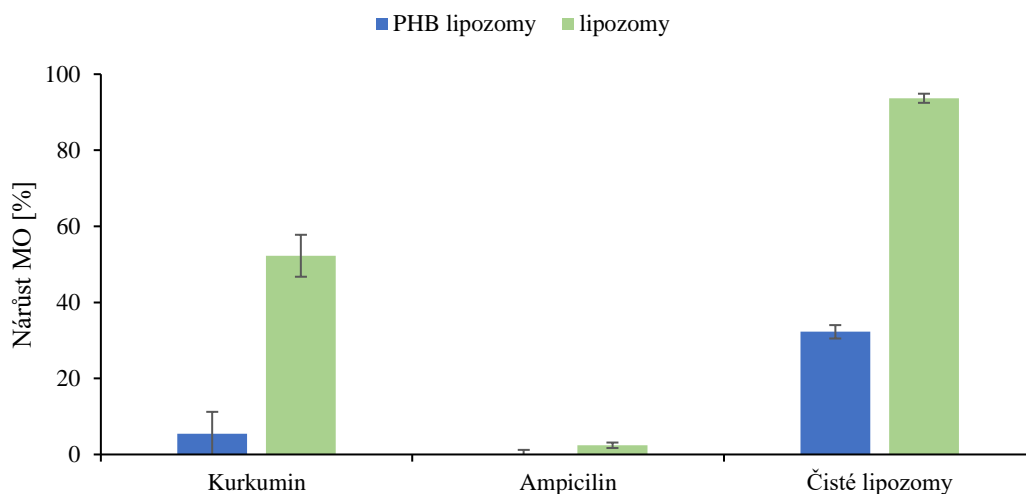
Z následujícího grafu (Obrázek 27) je patrné, že nejnižší nárůst *S. Epidermidis* byl pozorován u lipozomů s enkapsulovaným ampicilinem, kdy u těch bez přídavku PHB byl nárůst *S. Epidermidis* téměř nulový. Nízkého nárůstu ( $42,5 \pm 5,1$  %) dosahovaly také lipozomy s enkapsulovaným kurkuminem bez přídavku PHB. U čistých lipozomů bez enkapsulovaných aktivních látek, byl v případě přídavku PHB i bez tohoto přídavku indikován 100% nárůst *S. Epidermidis*, a tedy můžeme tvrdit, že čisté lipozomy jako takové, s přídavkem PHB i bez něj, nemají účinky vůči *S. Epidermidis*. V případě čistých lipozomů s PHB vidíme, že dokonce podporovaly růst mikroorganismů.



Obrázek 27: Nárůst *S. Epidermidis* při použití lipozomů

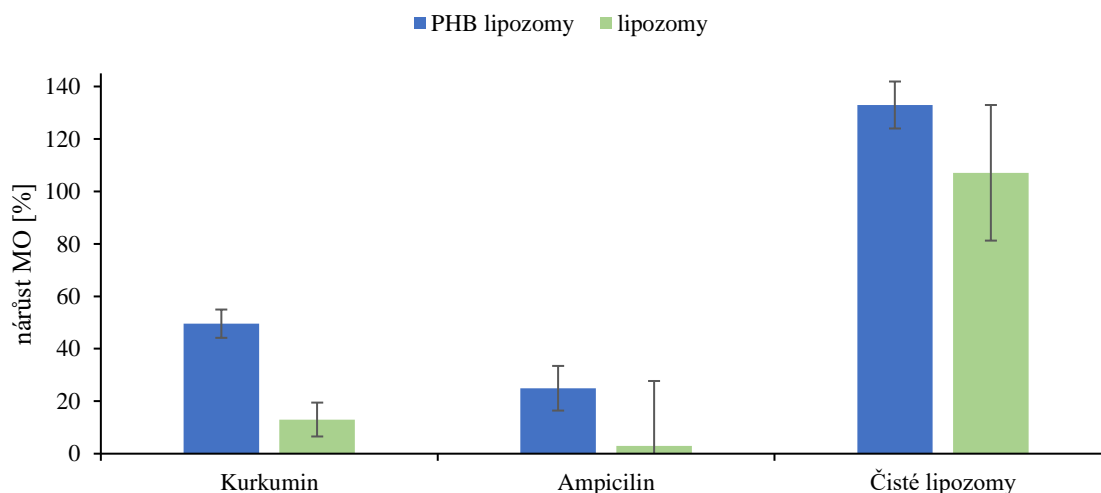
V následujícím grafu (Obrázek 28) můžeme vidět, že stejně jako v případě *S. Epidermidis* byl u *E. Coli* indikován téměř nulový nárůst při použití lipozomů s enkapsulovaným ampicilinem. Toto platí pro částice s přídavkem PHB i bez něj. Téměř nulový nárůst *E. Coli* byl indikován také v případě lipozomů s přídavkem PHB a enkapsulovaným kurkuminem.

Nízký nárůst byl pozorován také v případě čistých lipozomů s přídatkem PHB ( $32,3 \pm 2,2 \%$ ). Oproti tomu v případě čistých lipozomů bez přídatku PHB byl nárůst *E. Coli* téměř 100%. Můžeme tedy předpokládat, že PHB může napomáhat růstu *E. Coli*.



Obrázek 28: Nárůst *Escherichia Coli* při použití lipozomů

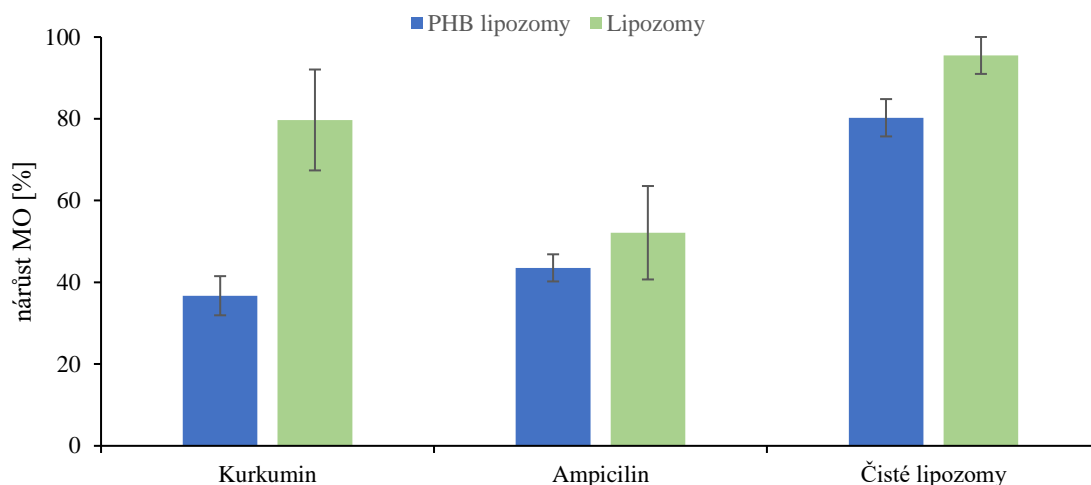
Z následujícího grafu (Obrázek 29) je možné vyčíst, že čisté lipozomy s enkapsulovaným ampicilinem, stejně tak jako čisté lipozomy s enkapsulovaným kurkuminem vykazovaly téměř nulový nárůst *M. Luteus*. V případě ampicilinu byl nízký nárůst ( $24,5 \pm 3,1 \%$ ) detekován i v případě lipozomů s přídatkem PHB. Dále je z grafu patrné, že stejně jako v případě *S. Epidermidis* čisté lipozomy bez enkapsulovaných aktivních látek, s přídatkem PHB i bez něj, neinhibují nárůst testovaného mikroorganismu, ba naopak spíše napomáhají jeho růstu.



Obrázek 29: Nárůst *Micrococcus Luteus* při použití lipozomů

U *C. Glabrata* byl detekován nárůst nižší než 50% u PHB lipozomů s enkapsulovaným kurkuminem ( $36,7 \pm 2,3 \%$ ) a ampicilinem ( $43,5 \pm 2,1 \%$ ).

V případě čistých lipozomů, jak s přídatkem PHB tak i bez něj, byl detekován více než 100% nárůst *C. Glabrata* a tedy můžeme stejně jako v případě předchozích mikroorganismů předpokládat, že materiál z čistých lipozomů může napomáhat růstu mikroorganismů.



Obrázek 30: Nárůst *C. Glabrata* při použití lipozomů

### 5.2.2 Agarové plotny

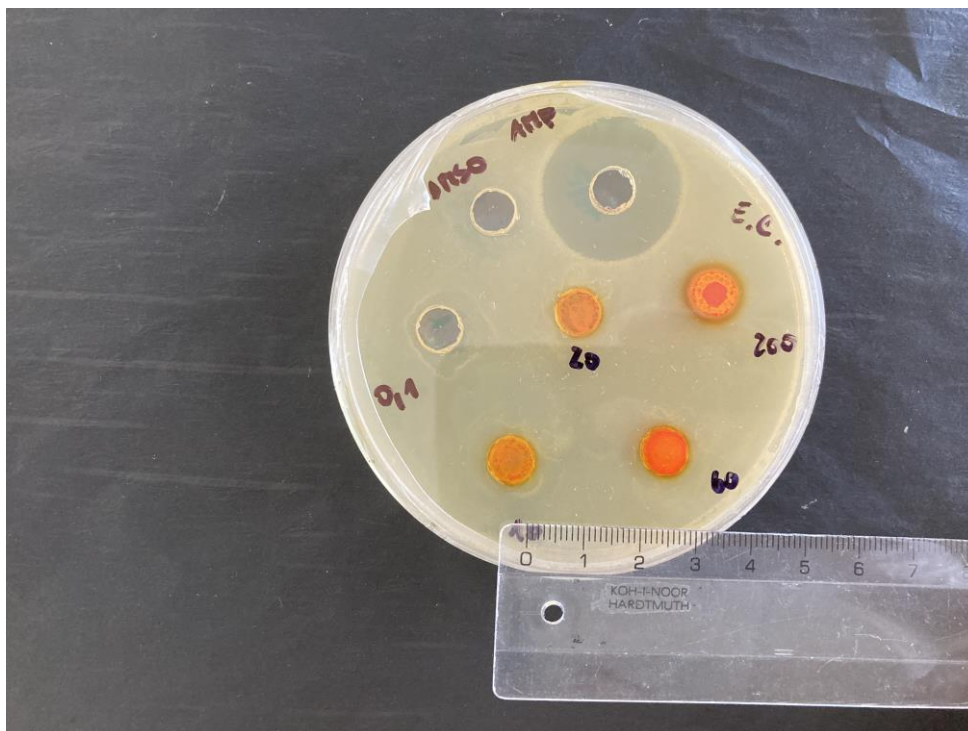
Díky velmi výraznému zbarvení kurkuminu bylo třeba provést také test, který nebyl závislý na zbarvení vzorku. Proto byly nakultivovány mikroorganismy podle postupu v kapitole 4.6.1 a bylo postupováno podle postupu uvedeném v kapitole 4.6.3.

Mikroorganismy s kurkuminem a kontrolami byly inkubovány 24 hodin při 37 °C a následně byly změřeny inhibiční zóny. Výsledky jsou uvedeny v příložené tabulce (Tabulka 14).

Tabulka 14: Inhibiční zóny u jednotlivých mikroorganismů

Mikroorganismus	Účinná látka a její koncentrace					
	Ampicilin	Kurkumin				
	1,00 mg/ml	200,00 mg/ml	60,00 mg/ml	20,00 mg/ml	10,00 mg/ml	0,10 mg/ml
	[mm]					
<i>S. Epidermidis</i>	16,56 ± 0,83	1,67 ± 0,66	1,33 ± 0,47	0	0	0
<i>M. Luteus</i>	18,67 ± 1,10	1,72 ± 0,41	0,94 ± 0,36	0,28 ± 0,10	0	0
<i>E. Coli</i>	8,22 ± 0,62	1,06 ± 0,28	0,56 ± 0,43	0,83 ± 0,23	0	0
<i>C. Glabrata</i>	9,00 ± 0,81	2,28 ± 0,85	1,08 ± 0,44	0	0	0

Z výše uvedené tabulky (Tabulka 14) můžeme vyčíst jednotlivé minimální inhibiční koncentrace kurkuminu pro jednotlivé mikroorganismy. MIC kurkuminu u *S. Epidermidis* a *C. Glabrata* byla touto metodou stanovena na přibližně 60 mg/ml. MIC kurkuminu u *M. Luteus* a *E. Coli* byla touto metodou stanovena na přibližně 20 mg/ml. Kurkumin byl rozpuštěn v DMSO, a proto byla tato látka také přidána na agarové plotny. U žádného mikroorganismu však nebyly pozorovány inhibiční zóny u DMSO. Předpokládáme, že antimikrobiální účinek kurkuminu byl způsoben pouze kurkuminem, ne přídatkem DMSO.



Obrázek 31: Příklad vyhodnocení testu na agarových plotnách pro *E. Coli*

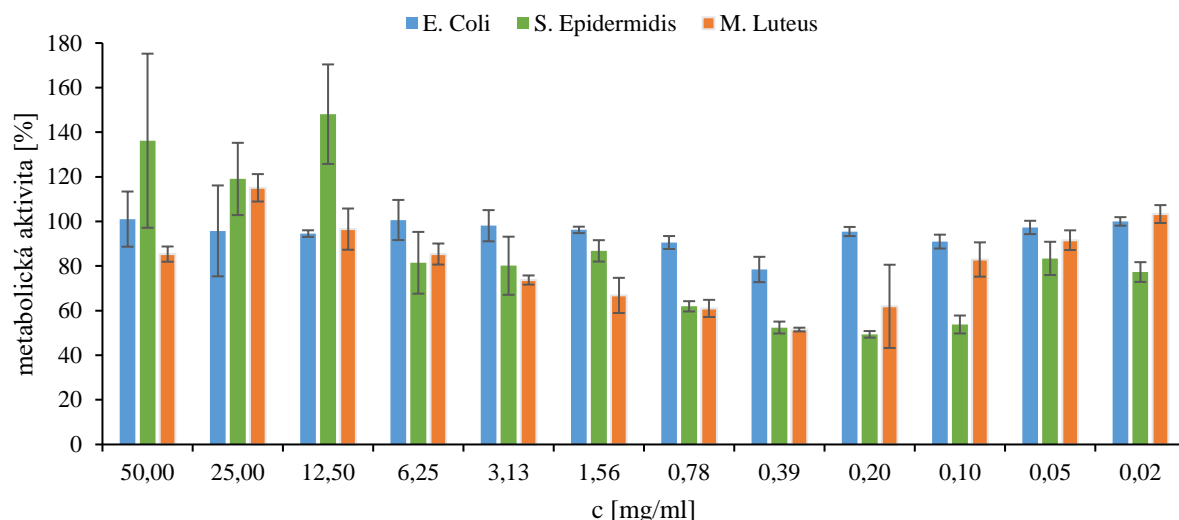
### 5.2.3 Resazurin test

Po 24 hodinové inkubaci mikroorganismů s vybranými vzorky byl proveden Resazurin test podle postupů v kapitole 4.6.4. Byla sledována metabolická aktivita přítomných mikroorganismů v jednotlivých jamkách. Jednotlivé výsledky resazurin testu byly vyjádřeny jako procenta z absorbance buněčné kontroly a byly zpracovány do grafů.

#### 5.2.3.1 Ampicilin a kurkumin

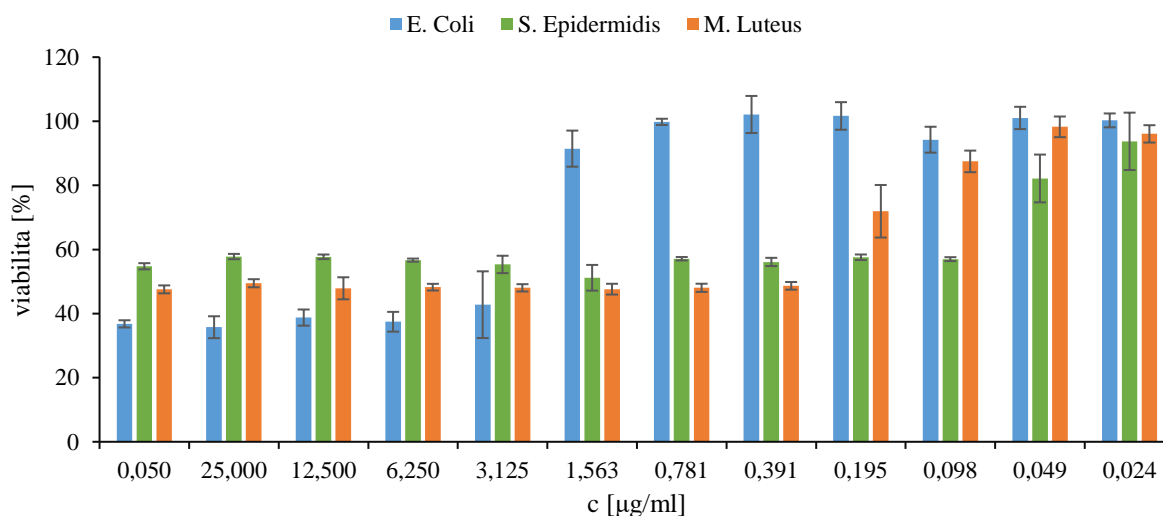
U aktivních látek bylo postupováno stejně jako v kapitole 4.6.2.1 a po 24 hodinové inkubaci bylo přidáno barvivo. Po další půlhodinové inkubaci při 37°C byla změřena absorbance a vypočtena procentuální metabolická aktivita buněk oproti buněčné kontrole.

Z výsledného grafu (Obrázek 32) můžeme vidět, že nejnižší metabolické aktivity bylo při použití kurkuminu dosaženo u *S. Epidermidis* ( $49,37 \pm 3,25$  %) při koncentraci 0,2 mg/ml a *M. Luteus* ( $51,52 \pm 2,31$  %) při koncentraci 0,39 mg/ml. U *E. Coli* byla nejnižší detekovaná metabolická aktivita  $78,46 \pm 3,47$  % při koncentraci 0,39 mg/ml. Oproti tomu metabolická aktivita *C. Glabrata* se ve většině případů pohybovala v hodnotách přes 100 %, a proto nebyla výsledná data zahrnuta do výsledného grafu.



Obrázek 32: Výsledek Resazurin testu u kurkuminu

V následujícím grafu (Obrázek 33) jsou zpracovány výsledky Resazurin testu pro koncentrační řadu ampicilinu. U *C. Glabrata* bylo vždy dosaženo metabolické aktivity buněk přes 100 %, a proto nejsou data zahrnuta do grafu. Tento výsledek byl dopředu očekáván, jelikož ampicilin jako širokospektrální antibiotikum nepůsobí proti kvasinkám. Dále můžeme vidět, že vysoký nárůst metabolické aktivity u *E. Coli* nastal až u koncentrace ampicilinu  $1,56 \cdot 10^{-5}$  mg/ml, u *S. Epidermidis* u koncentrace  $4,88 \cdot 10^{-5}$  mg/ml a u *M. Luteus* při koncentraci  $9,77 \cdot 10^{-5}$  mg/ml.



Obrázek 33: Výsledek Resazurin testu u ampicilinu

Pro přehlednost byla pro porovnání zjištěných metabolických aktivit jednotlivých mikroorganismů se zjištěnými minimálními inhibičními koncentracemi při použití ampicilinu vytvořena následující tabulka (Tabulka 15). Předpokládáme, že u koncentrací nižších než MIC bude metabolická aktivita nulová nebo velmi nízká. V případě *S. Epidermidis* a *M. Luteus* můžeme vidět, že metabolická aktivita buněk roste až ve vyšší koncentraci než je MIC. V případě *E. Coli* toto neplatí, a proto můžeme předpokládat, že MIC u tohoto mikroorganismu sice inhibuje růst mikroorganismů, ale umožňuje dále jejich metabolickou aktivitu.

Tabulka 15: Porovnání zjištěné MIC a metabolické aktivity mikroorganismů u ampicilinu

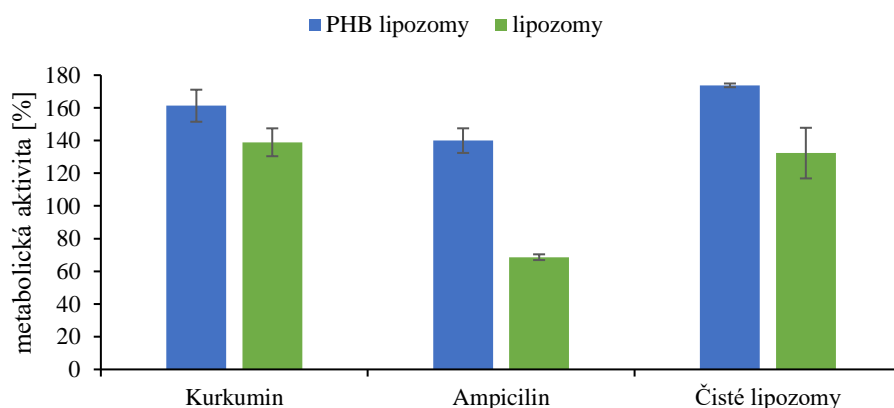
Koncentrace [mg/ml]	MIC, bujónová diluční metoda	Nárůst metabolické aktivity, Resazurin test
<i>S. Epidermidis</i>	$2,44 \cdot 10^{-5}$	$4,88 \cdot 10^{-5}$
<i>E. Coli</i>	$3,13 \cdot 10^{-5}$	$1,56 \cdot 10^{-5}$
<i>M. Luteus</i>	$2,44 \cdot 10^{-5}$	$9,77 \cdot 10^{-5}$

### 5.2.3.2 Lipozomy

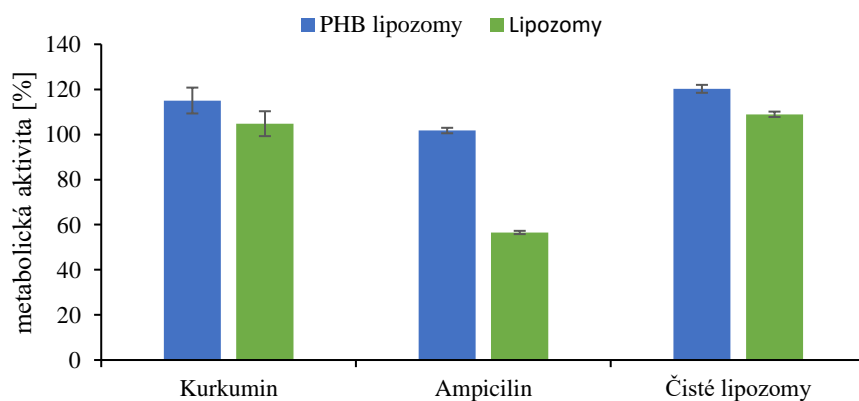
Lipozomy byly připraveny podle postupu v kapitole 4.5.3 a dále bylo postupováno podle kapitol 4.6.2 a 4.6.4. Po 30minutové inkubaci s barvivem byla změřena absorbance a byla vypočtena procentuální metabolická aktivita jednotlivých mikroorganismů oproti buněčné kontrole.

Z následujícího grafu (Obrázek 34) můžeme zjistit, že nízká metabolická aktivita buněk byla u *S. Epidermidis* detekována pouze v případě ampicilinu enkapsulovaného do lipozomů bez přídavku PHB. Ve všech ostatních případech byla detekována metabolická aktivita přes 100 %.

Z grafu vytvořeného pro výsledky u *E. Coli* (Obrázek 35) můžeme vyčíst, že stejně jako v případě *S. Epidermidis* je výrazný pokles metabolické aktivity pozorován pouze v případě ampicilinu enkapsulovaného do lipozomů bez přídavku PHB.



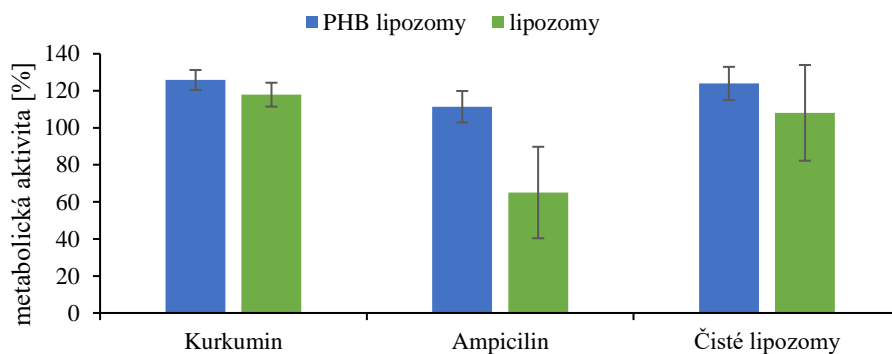
Obrázek 34: Výsledek Resazurin testu u lipozomů pro *S. Epidermidis*



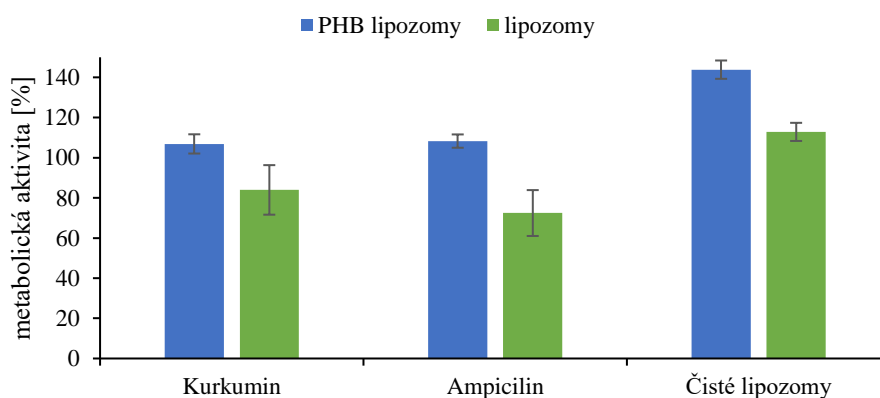
Obrázek 35: Výsledek Resazurin testu u lipozomů pro *E. Coli*

Z následujícího grafu (Obrázek 36) zjišťujeme, že nízká metabolická aktivita buněk byla při Resazurin testu detekována pouze v případě ampicilinu enkapsulovaného do lipozomů bez přídavku PHB. V ostatních vzorcích lipozomů byla detekována metabolická aktivita buněk mikroorganismu přes 100 %.

Z grafu pro *C. Glabrata* (Obrázek 37) vidíme, že metabolická aktivita nižší než 100 % byla detekována v případě lipozomů s enkapsulovaným ampicilinem a lipozomů s enkapsulovaným kurkuminem, v obou případech bez přídavku PHB.



Obrázek 36: Výsledek Resazurin testu u lipozomů pro *M. Luteus*



Obrázek 37: Výsledek Resazurin testu u lipozomů pro *C. Glabrata*

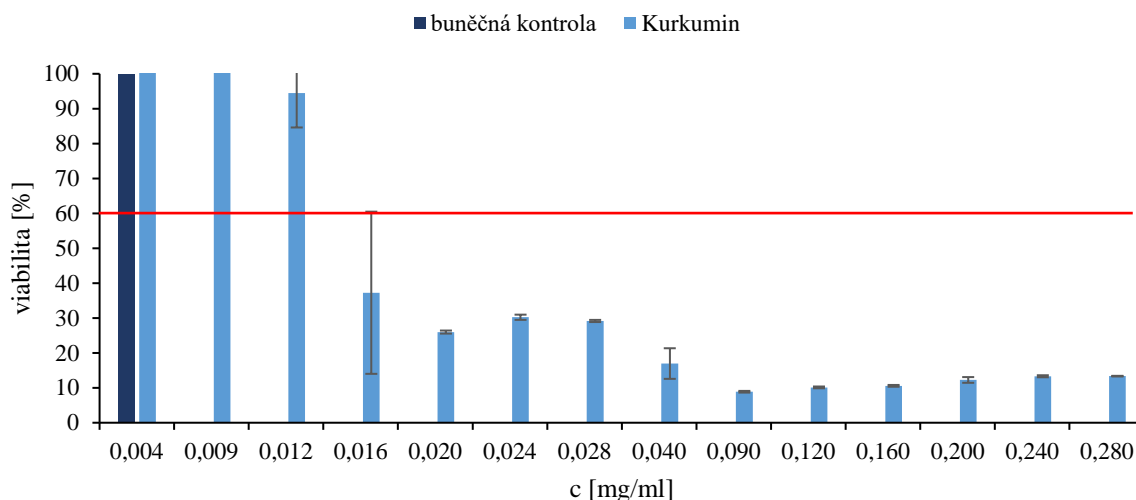
### 5.3 Stanovení cytotoxicity

Byla testována také toxicita aktivních látek (kurkumin, ampicilin) enkapsulovaných do lipozomů, samotných lipozomů v 6 různých kombinacích, připravených vláken a připravených kombinovaných materiálů. Testy byly provedeny podle postupů v kapitole 4.7.2. Všeobecně se látky považují za cytotoxické v případě, že viabilita buněk po 24 hodinové inkubaci spolu s danými látkami klesne pod 60 %.

#### 5.3.1 MTT test

Jednotlivé výsledky MTT testů byly vyjádřeny jako procenta z absorbance buněčné kontroly a následně byly graficky zpracovány do přehledných grafů.

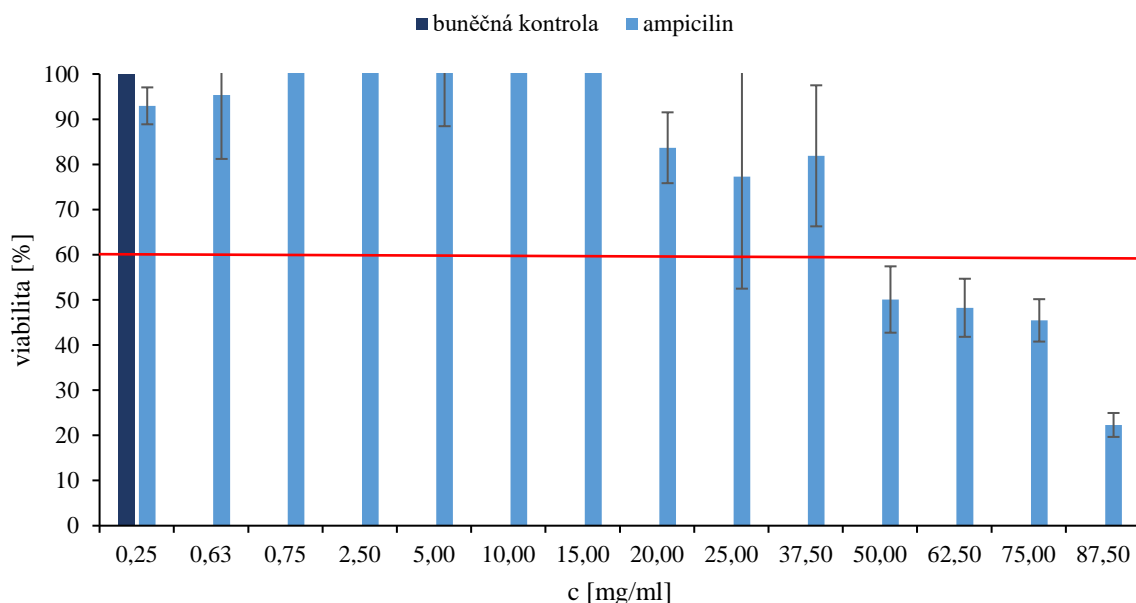
Pro stanovení cytotoxicity kurkuminu byly připraveny dvě různé koncentrace aktivní látky, které byly do jednotlivých jamek dále ředěny. Výsledky MTT testu pro kurkumin jsou graficky znázorněny v uvedeném grafu (Obrázek 38).



Obrázek 38: Závislost viability buněk na koncentraci kurkuminu

Z grafu (Obrázek 38) je patrné, že hranice viability 60 % doahují pouze 3 koncentrace (0,004 mg/ml, 0,009 mg/ml a 0,012 mg/ml). U dvou z těchto koncentrací dosahovala viabilita buněk více než 100 % (0,004 mg/ml a 0,009 mg/ml). Od těchto koncentrací je možné kurkumin považovat za necytotoxický, a tedy bezpečný pro další použití například v krytech ran.

Pro stanovení cytotoxicity ampicilinu byl připraven jeho zásobní roztok, ze kterého byla dále naředěna koncentrační řada, která byla pipetována do jednotlivých jamek. Výsledky MTT testu pro ampicilin jsou graficky znázorněny v uvedeném grafu (Obrázek 39).



Obrázek 39: Závislost viability buněk na koncentraci ampicilinu

Z grafu (Obrázek 39) je patrné, že hranice cytotoxicity nedosáhly hned 4 nejvyšší připravené koncentrace ampicilinu. První necytotoxická koncentrace ampicilinu je tedy 1,5 mg/ml. Z 10 koncentrací přesahujících 60% viabilitu hned 5 přesahuje hranici 100 %, a tedy všechny tyto koncentrace mohou být považovány za bezpečné.

Pro stanovení cytotoxicity jednotlivých částic byly podle postupů v kapitole 4.5.3 připraveny dvě řady lipozomů. Řada bez přídavku PHB a řada s přídavkem PHB. Pro

přehlednost jsou tyto částice uvedeny níže v tabulce (Tabulka 16). Takto připravené lipozomy byly rozsuspendovány do 10 ml destilované vody a byly dále ředěny na 2–14% roztoky, které byly dále pipetovány do jednotlivých jamek.

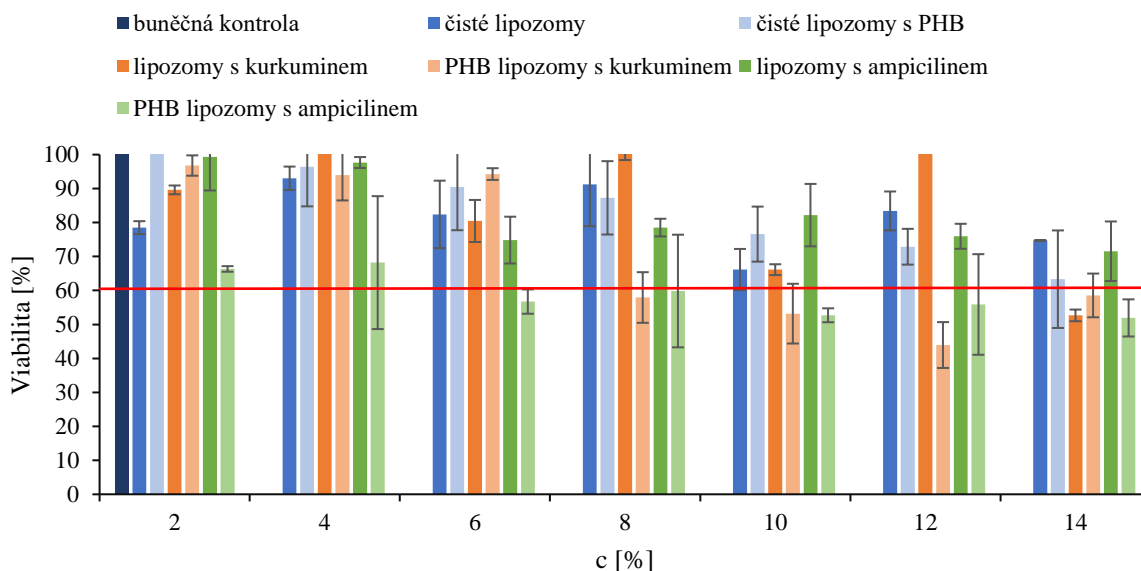
Tabulka 16: Přehled jednotlivých částic připravovaných pro MTT test

Částice	
S přídavkem PHB	Bez přídavku PHB
Čisté	Čisté
Ampicilin 1 mg/ml	Ampicilin 1 mg/ml
Kurkumin 0,25 mg/ml	Kurkumin 0,25 mg/ml

Z uvedeného grafu (Obrázek 40) je patrné, že viability 60 % dosáhla většina koncentrací připravených částic. Čisté lipozomy dosáhly na uvedenou hodnotu jak s přídavkem PHB, tak i bez tohoto přídavku ve všech připravovaných koncentracích. Díky tomuto faktu bylo ověřeno, že takto připravované lipozomy jsou bezpečné pro další použití v kosmetice či medicínských aplikacích.

U lipozomů s enkapsulovaným kurkuminem dosahovaly lepších výsledků částice bez přídavku PHB. Nejvyšší viability bylo v tomto případě dosaženo u lipozomů bez přídavku PHB ve 4% koncentraci, a to více než 120 %. Ve stejné řadě částic bylo viability vyšší než 100 % dosaženo také u 8% a 12% koncentrace. Naopak jediná koncentrace, která v této řadě nedosáhla na hranici 60 %, byla nejvyšší, tedy 14% koncentrace. U kurkuminových lipozomů s přídavkem PHB dosáhly 60% viability pouze čtyři nejnižší koncentrace těchto částic

U lipozomů s enkapsulovaným ampicilem dosahovaly lepších výsledků částice bez přídavku PHB, stejně jako tomu bylo u kurkuminu. V této řadě přesáhly hodnotu 60% viability vzorky ve všech koncentracích, přičemž nejvyšší viabilita byla pozorována u nejnižší, tedy 2% koncentrace těchto částic. Oproti tomu u ampicilinových částic s přídavkem PHB dosáhly 60% viability pouze částice v koncentracích 2 % a 4 %.

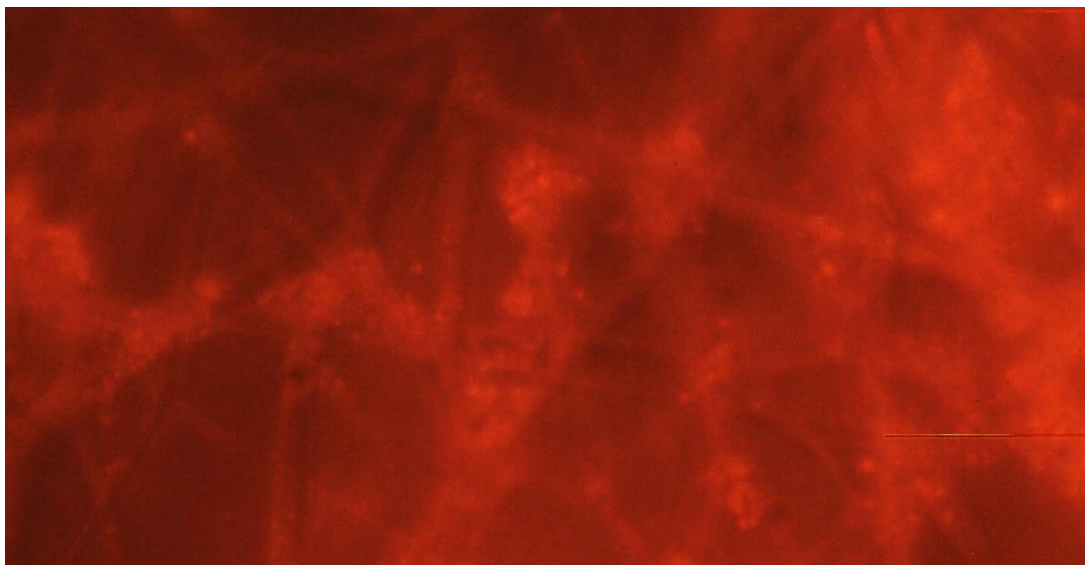


Obrázek 40: Závislost viability buněk na koncentraci lipozomů

## 5.4 Kombinované materiály

### 5.4.1 Vazba lipozomů s přidavkem PHB na PHB vlákna

Kombinované materiály byly připravovány podle postupu v kapitole 4.5.10. Pod fluorescenčním mikroskopem bylo sledováno navázání prázdných lipozomů s přidavkem PHB na PHB vlákna (adsorpce). Pro pozorování těchto materiálů pod fluorescenčním mikroskopem byla použita jako fluorescenční sonda Nilská červeň.



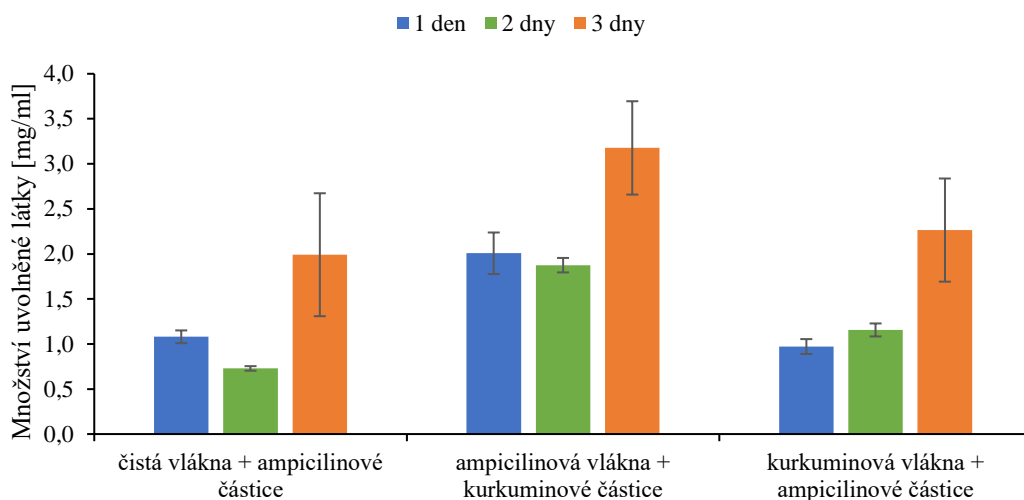
*Obrázek 41: Snímek z fluorescenčního mikroskopu, zvětšení 100x*

V přiloženém snímku z fluorescenčního mikroskopu (Obrázek 41) můžeme pozorovat oranžové shluky částic, což budou pravděpodobně naše lipozomy ukotvené ve struktuře nanovlákněného PHB krytu. Předpokládáme tedy, že vazba lipozomů s přidavkem PHB na PHB vlákna byla úspěšná.

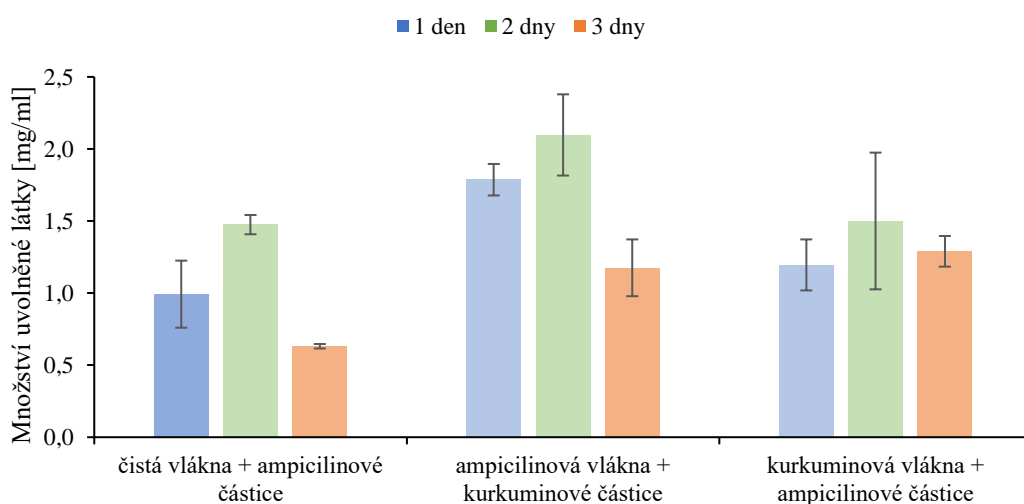
### 5.4.2 Uvolňování účinných látek z kombinovaných materiálů

Byly připraveny kombinované materiály podle postupu v kapitole 4.5.10 a bylo sledováno uvolňování účinných látek v časových intervalech 1, 2 a 3 dny. Uvolňování probíhalo podle postupu, který je popsán v kapitole 4.5.11.

Toto uvolňování bylo sledováno ve dvou prostředích. V destilované vodě při laboratorní teplotě a ve fyziologickém roztoku při teplotě 37 °C. Výsledná data byla zpracována do následujících grafů.



Obrázek 42: Uvolňování ampicilinu do fyziologického roztoku

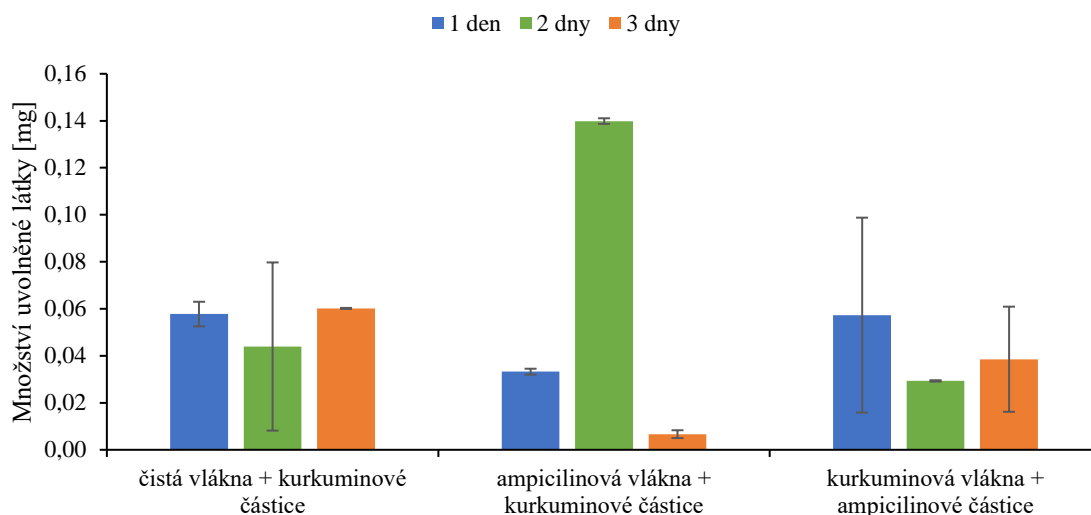


Obrázek 43: Uvolňování ampicilinu do destilované vody

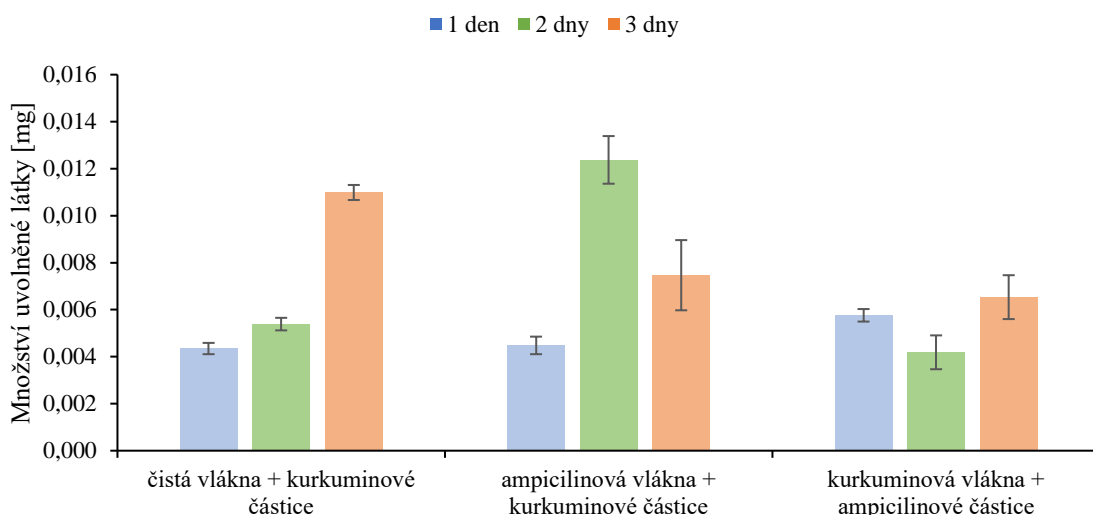
Ve výše uvedených grafech je zpracováno uvolňování ampicilinu z kombinovaných materiálů do fyziologického roztoku (Obrázek 42) a destilované vody (Obrázek 43). Je jasně viditelné, že do fyziologického roztoku se ampicilin z čistých vláken s ampicilinovými částicemi uvolňoval rychleji a ve větším množství. Dále je u fyziologického roztoku viditelné, že po druhém dni množství uvolněného ampicilinu ze všech materiálů kleslo a následující den zase vzrostlo. To mohlo být způsobeno například částečnou degradací uvolněné látky.

Ve vodném prostředí potom v prvních dvou dnech koncentrace uvolněného ampicilinu u všech materiálů roste a po 3 dnech klesá. Stejně jako v případě fyziologického roztoku předpokládáme, že po 3 dnech začalo docházet k degradaci uvolněného ampicilinu.

Nejvíce ampicilinu do destilované vody se uvolnilo z ampicilinových vláken s kurkuminovými částicemi, a to po 3 dnech od začátku uvolňování ( $3,18 \pm 0,5$  mg/ml). Do fyziologického roztoku se potom nejvíce ampicilinu uvolnilo po 2 dnech opět v případě ampicilinových vláken s kurkuminovými částicemi ( $2,09 \pm 0,32$  mg/ml). Obecně můžeme pozorovat, že ampicilin se z připravených materiálů uvolňoval ve větším množství do destilované vody.



Obrázek 44: Uvolňování kurkuminu do fyziologického roztoku



Obrázek 45: Uvolňování kurkuminu do destilované vody

Ve výše uvedených grafech je zpracováno uvolňování kurkuminu z kombinovaných materiálů do fyziologického roztoku (Obrázek 44) a destilované vody (Obrázek 45). Stejně jako v předchozím případě je z uvedených grafů zřejmé, že v případě čistých vláken s kurkuminovými částicemi se do fyziologického roztoku kurkumin uvolňoval rychleji a ve větším množství než do destilované vody.

Největší množství uvolněného kurkuminu do destilované vody bylo detekováno po 2 dnech u ampicilinových vláken s kurkuminovými částicemi ( $0,012 \pm 0,001$  mg/ml). Do fyziologického roztoku se potom nejvíce kurkuminu uvolnilo po 2 dnech, opět v případě ampicilinových vláken s kurkuminovými částicemi ( $0,140 \pm 0,005$  mg/ml). V tomto případě je jasně viditelné, že kurkumin se u všech materiálů uvolňoval ve větším množství do fyziologického roztoku.

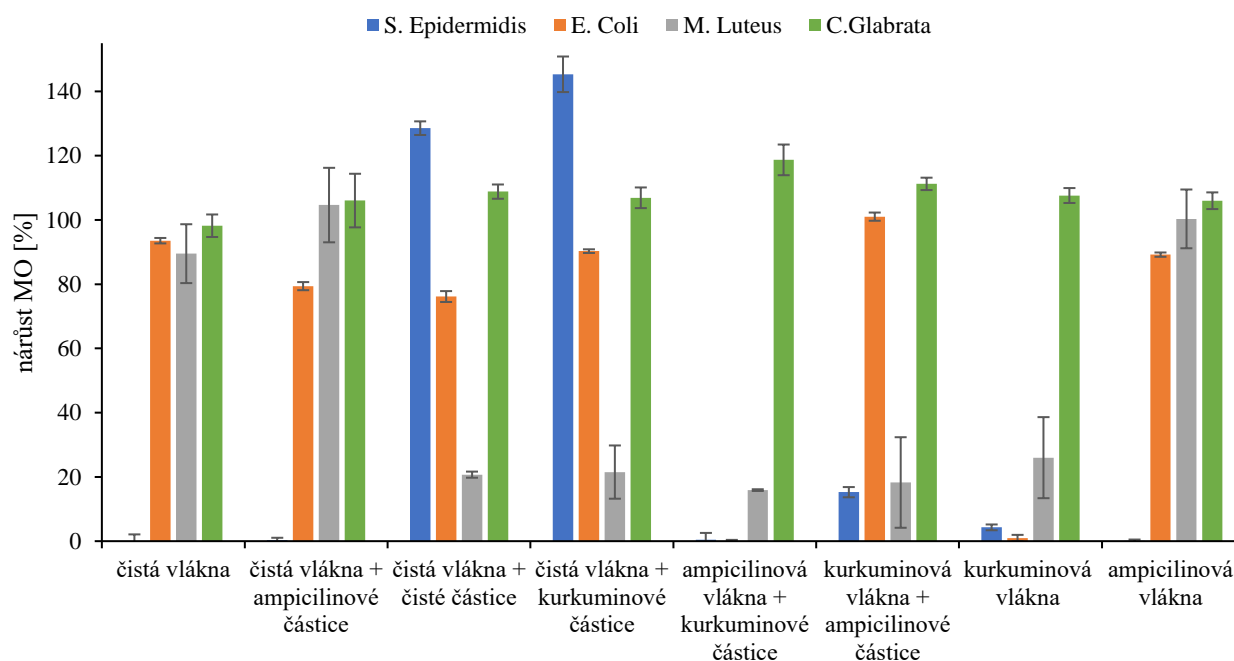
Můžeme vidět, že hodnoty uvolněného kurkuminu ve fyziologickém roztoku i v destilované vodě v jednotlivých dnech kolísají. Toto může být opět způsobeno částečnou degradací uvolněné aktivní látky.

Z výše uvedených zjištění je zřejmé, že bude třeba experimenty pro uvolňování aktivních látek z kombinovaných materiálů zopakovat v užších časových intervalech. Kolísání hodnot uvolněných látek mohlo být v obou případech způsobeno nedostatečnou citlivostí analytické metody nebo v případě kurkuminu nedostatečným vytřepáním do chloroformu.

### 5.4.3 Antimikrobiální testy

#### 5.4.3.1 Bujónová diluční metoda

Pro testování antimikrobiální aktivity vláken a kombinovaných materiálů byla tato vlákna a materiály připraveny podle postupů v kapitolách 4.5.6 a 4.5.10. Následně byl sledován nárůst jednotlivých mikroorganismů po 24 hodinové inkubaci s danými materiály.



Obrázek 46: Nárůst jednotlivých mikroorganismů při pužití připravených vláken a kombinovaných materiálů

Z výše uvedeného grafu (Obrázek 46) je patrné, že nejlepších výsledků dosahovala s výjimkou u *C. Glabrata* ampicilinová vlákna s kurkuminovými částicemi a kurkuminová vlákna. Růst *S. Epidermidis* byl inhibován u všech připravených materiálů, kromě čistých vláken s čistými částicemi a čistých vláken s kurkuminovými částicemi. Tohle může být způsobeno nízkou koncentrací kurkuminu ve výsledných částicích. Nejlepšího výsledku bylo v tomto případě dosaženo u ampicilinových vláken s kurkuminovými částicemi, a tedy můžeme předpokládat, že ampicilin a kurkumin budou mít v tomto případě synergický efekt.

U *E. Coli* byl minimální nárůst pozorován v případě ampicilinových vláken s kurkuminovými částicemi a u kurkuminových vláken. Toto bylo způsobeno pravděpodobně vysokou koncentrací kurkuminu.

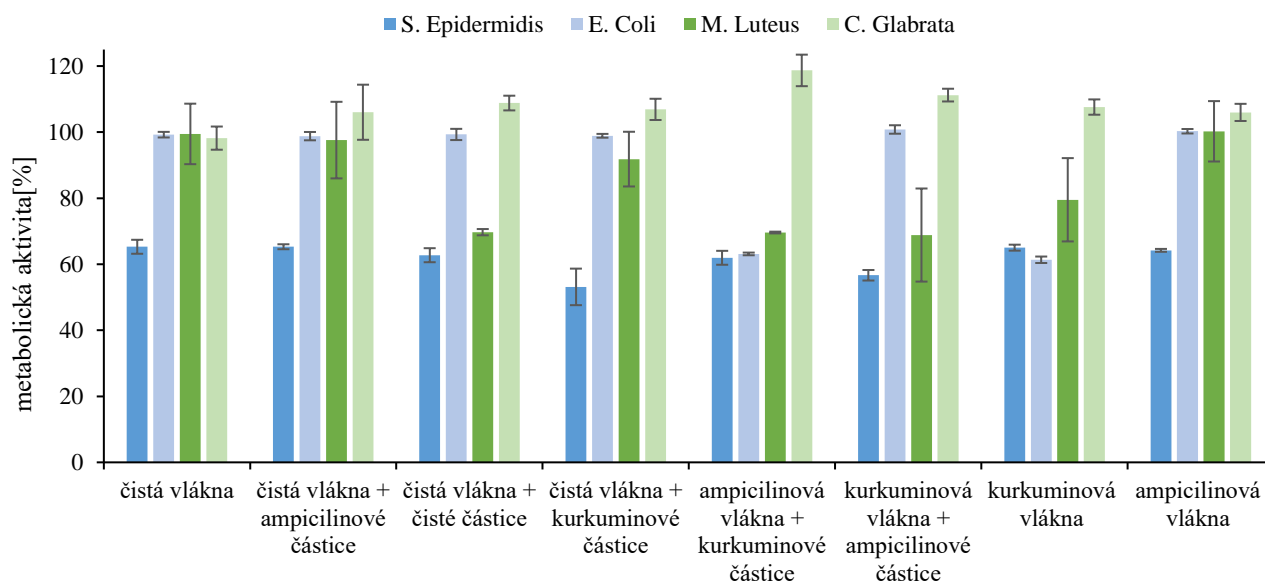
U *M. Luteus* byl nízký nárůst (15-25 %) detekován u všech připravených materiálů s výjimkou čistých vláken, čistých vláken s ampicilinovými částicemi a ampicilinových vláken. Vůbec nejlepšího výsledku bylo dosaženo u ampicilinových vláken s kurkuminovými částicemi, stejně jako *S. Epidermidis* a *E. Coli*. Můžeme tedy předpokládat vysoké antimikrobiální účinky tohoto kombinovaného materiálu.

U *C. Glabrata* byl detekován vysoký nárůst u všech mikroorganismů a tedy nemůžeme v tomto případě předpokládat antimikrobiální účinky připravených kombinovaných materiálů a vláken.

Z provedeného testu můžeme konstatovat, že pro další výzkum jsou velmi zajímavá ampicilinová vlákna s kurkuminovými částicemi, kurkuminová vlákna s ampicilinovými částicemi a samotná kurkuminová vlákna.

#### 5.4.3.2 Resazurin test

Použitá vlákna a kombinované materiály použité v tomto testu byly připraveny podle postupů uvedených v kapitolách 4.5.6 a 4.5.10.

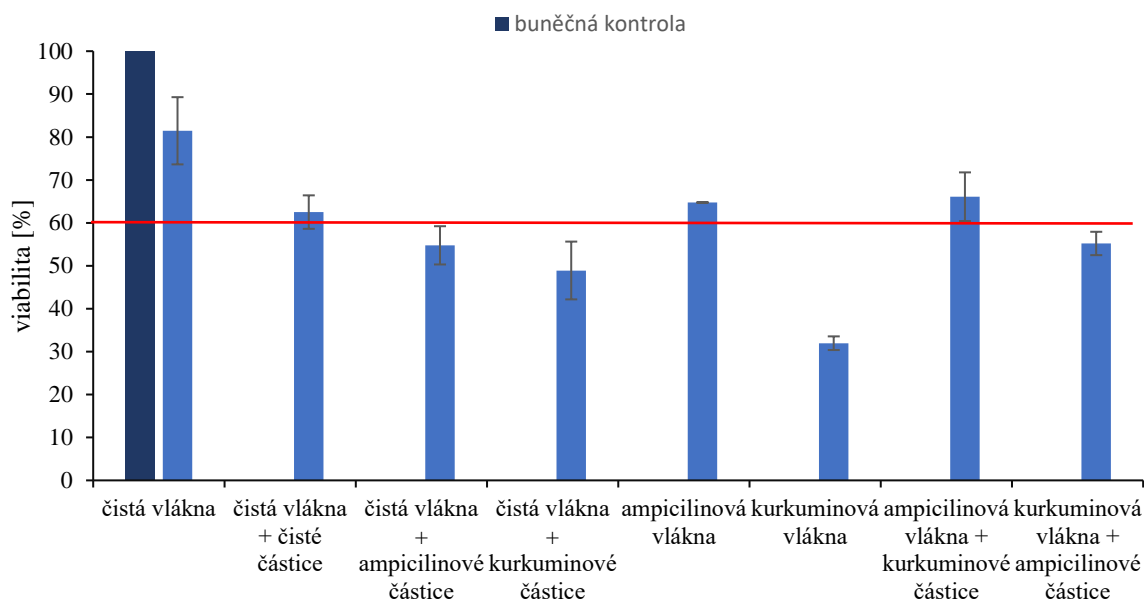


Obrázek 47: Vyhodnocení Resazurin testu u připravených vláken a kombinovaných materiálů

Z výsledného grafu (Obrázek 47) je patrné, že u všech mikroorganismů a všech typů připravených materiálů byla metabolická aktivita těchto mikroorganismů po 24 hodinách stále více než 50 %. Nejnižší metabolická aktivita mikroorganismů byla dle tohoto testu pozorována u všech typů materiálů u *S. Epidermidis*, nejvyšší pak naopak u *C. Glabrata*.

#### 5.4.4 MTT test

Pro stanovení cytotoxicity vláken a kombinovaných materiálů byla připravena vlákna a tyto materiály podle postupů v kapitolách 4.5.6 a 4.5.10. Výsledky MTT testu pro připravená vlákna a kombinované materiály jsou uvedeny v grafu (Obrázek 48).



Obrázek 48: Vyhodnocení MTT testu pro připravená vlákna a kombinované materiály

Z výsledného grafu (Obrázek 48) je patrné, že hranice 60% viability dosáhly pouze 4 druhy testovaných materiálů. Z připravených vláken to byla čistá vlákna a ampicilinová vlákna.

Z kombinovaných materiálů potom této hodnoty dosáhla čistá vlákna s navázanými čistými částicemi a ampicilinová vlákna s navázanými kurkuminovými částicemi. Toto mohlo být u kurkuminových vláken způsobeno například příliš vysokou koncentrací samotné účinné látky, stejně tak jako vysokou koncentrací uvolněné účinné látky z ampicilinových částic.

## 6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá optimalizací přípravy a samotnou přípravou kombinovaných nanostrukturních antimikrobiálních biomateriálů, stejně tak jako charakterizací těchto materiálů. Dále se zabývá testováním výsledných kombinovaných materiálů a antimikrobiálních látek inkorporovaných do struktury těchto vytvořených materiálů. Všechny vytvořené materiály a použité antimikrobiální látky byly také testovány na případné cytotoxické účinky pomocí MTT testu.

Byly připraveny dva druhy lipozomů, jedny s přídavkem PHB a druhé bez tohoto přídavku. Do obou druhů takto připravených lipozomů byly inkorporovány tyto aktivní látky: ampicilin a kurkumin. U kurkuminu bylo testováno několik koncentrací a byla změřena jejich enkapsulační účinnost. Nejvyšší enkapsulační účinnost byla detekována u PHB lipozomů s koncentrací kurkuminu 0,1 mg/ml (65,5 %) a 0,25 mg/ml (47,84 %) a u PHB lipozomů s koncentrací ampicilinu 1 mg/ml (53,3 %). Tyto lipozomy byly následně podrobeny testům na uvolňování účinných látek.

Připravené lipozomy byly podrobeny měření jejich velikosti a dlouhodobé stability, přičemž bylo zjištěno, že PHB lipozomy byly větší a vykazovaly větší stabilitu. Celkově bylo zjištěno, že lipozomy s přídavkem PHB i lipozomy bez tohoto přídavku vykazovaly vysokou stabilitu během prvních 3 týdnů.

U obou typů lipozomů, s kurkuminem i ampicilinem, bylo sledováno postupné uvolňování těchto látek do destilované vody při laboratorní teplotě a do fyziologického roztoku při 37 °C. V případě ampicilinu se větší množství, a daleko rychleji, uvolňovalo do destilované vody i do fyziologického roztoku v případě lipozomů bez přídavku PHB. Toto bylo způsobeno pravděpodobně právě přídavkem PHB, který byl inkorporovaný do stěny lipozomů, což pravděpodobně ovlivnilo rychlost uvolňování. Bylo také vyzorováno, že přibližně po 5 hodinách začínalo pravděpodobně docházet k degradaci této uvolněné látky.

U kurkuminu bylo detekováno nejvyšší množství uvolněné látky v koncentraci 0,25 mg/ml v případě lipozomů s přídavkem PHB i bez tohoto přídavku, do destilované vody i do fyziologického roztoku.

Dále byly připraveny 4% PHB vlákna metodou forcespinningu. Kdy nejvhodnější objem roztoku PHB v chloroformu pro přípravu jednoho nanovlákného krytu byl stanoven na 20 ml. Bylo zjištěno, že tato vlákna jsou po dobu 25 dní velmi stabilní v prostředí destilované vody a fyziologického roztoku a po dobu 14 dní v 50% roztoku ethanolu.

Následně byla připravena PHB vlákna s inkorporovanými účinnými látkami. V obou případech se jako nejlepší ukázala inkorporace účinné látky v této hmotnosti: 10 % hmotnosti z celkové hmotnosti PHB. U takto připravených vláken bylo následně sledováno uvolňování inkorporovaných účinných látek. U ampicilinových vláken byl v průběhu 7 dní sledován postupný nárůst uvolněné látky. U kurkuminových vláken koncentrace uvolněného kurkuminu v nepravidelných časových intervalech rostla a zase se snižovala (nejvyšší nárůst před dalším poklesem byl sledován v časových intervalech 5 hodin, 24 hodin a 7 dní).

Po zhodnocení předchozích měření byly z PHB vláken s účinnými látkami a lipozomů s přídavkem PHB (kvůli předpokládanému navázání pomocí adsorbce) vytvořeny kombinované materiály, u kterých bylo následně sledováno uvolňování účinných látek. Pomocí

fluorescenčního mikroskopu bylo prokázáno, že byla opravdu připravena vlákna s adsorbovanými částicemi, tedy naše kombinované materiály.

U všech vytvořených nanovlákných krytů a kombinovaných materiálů, spolu s účinnými látkami a vytvořenými lipozomy, byly provedeny testy mikrobiální aktivity. Na základě těchto testů byly stanoveny minimální inhibiční koncentrace kurkuminu. Tato koncentrace byla u *S. Epidermidis* stanovena na přibližně 60 mg/ml, *M. Luteus* přibližně 20 mg/ml, *E. Coli* přibližně 20 mg/ml a *C. Glabrata* přibližně 60 mg/ml. Dále byly stanoveny minimální inhibiční koncentrace u ampicilinu. Tato koncentrace byla u *S. Epidermidis*  $2,4 \cdot 10^{-5}$  mg/ml, *M. Luteus*  $2,4 \cdot 10^{-4}$  mg/ml a *E. Coli*  $3,13 \cdot 10^{-3}$  mg/ml.

Téměř nulový nárůst *S. Epidermidis* byl potom pozorován u lipozomů s enkapsulovaným ampicilinem (lipozomy s PHB i bez PHB). V případě *E. Coli* byl stejně jako v případě *S. Epidermidis* indikován téměř nulový nárůst u lipozomů s enkapsulovaným ampicilinem (lipozomy s PHB i bez PHB). Také byl u *E. Coli* indikován téměř nulový nárůst v případě PHB lipozomů s enkapsulovaným kurkuminem. U *M. Luteus* byl následně pozorován téměř nulový nárůst opět u lipozomů s enkapsulovaným ampicilinem (lipozomy s PHB i bez PHB) a u lipozomů s enkapsulovaným kurkuminem. Nakonec u *C. Glabrata* byl nárůst nižší než 50 % pozorován pouze u PHB lipozomů s enkapsulovaným ampicilinem a kurkuminem.

Z kombinovaných materiálů a nanovláken potom dosahovaly nejlepších antimikrobiálních výsledků ampicilinová vlákna s navázanými kurkuminovými částicemi a samotná kurkuminová vlákna, kde s výjimkou *C. Glabrata* byl nárůst všech použitých mikroorganismů nižší než 20 %. Můžeme tedy předpokládat, že tyto materiály mohou být využity v budoucích experimentech ke tvorbě antimikrobiálních krytů ran.

Nakonec byl proveden MTT test cytotoxicity pro zjištění bezpečnosti připravených materiálů. U kurkuminu byla jako bezpečná pro buňky zjištěna koncentrace 0,012 mg/ml. U ampicilinu byla tato hodnota stanovena na 1,5 mg/ml. V případě připravovaných lipozomů, prošly bezpečně všechny částice v koncentracích 2–8%. U koncentrací 10–14 % přesáhly viabilitu 60 % pouze prázdné lipozomy s PHB, prázdné lipozomy bez PHB a lipozomy s ampicilinem. Dále bylo z bezpečnostních testů zjištěno, že z připravených vláken a kombinovaných materiálů můžeme považovat za bezpečné pro použití s humánními buňkami čistá vlákna, čistá vlákna s prázdnými lipozomy, ampicilinová vlákna a ampicilinová vlákna s kurkuminovými částicemi. Kurkuminová vlákna a kurkuminová vlákna s ampicilinovými částicemi pravděpodobně nedosáhly hranice bezpečnosti kvůli příliš vysoké koncentraci kurkuminu.

Propojení dat z provedených experimentů vytváří podklady pro budoucí testování kombinovaných antimikrobiálních nanostrukturních biomateriálů. Můžeme předpokládat, že tyto materiály mají svou budoucnost na poli biodegradabilních krytů ran.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-5636-3.
- [2] GUERRA, Ana, Jorge BELINHA a Renato Natal JORGE. Modelling skin wound healing angiogenesis: A review. *Journal of Theoretical Biology*. 2018, **459**, 1-17. ISSN 00225193. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtbi.2018.09.020
- [3] BOER, Magdalena, Ewa DUCHNIK, Romuald MALESZKA a Mariola MARCHLEWICZ. Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Advances in Dermatology and Allergology*. 2016, **1**, 1-5. ISSN 1642-395X. Dostupné z: doi:10.5114/pdia.2015.48037
- [4] MARTÍNEK, Jindřich a Zdeněk VACEK. *Histologický atlas*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2393-8.
- [5] KOLARSICK, Paul A. J., Maria Ann KOLARSICK a Carolyn GOODWIN. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*. 2011, **3**(4), 203-213. ISSN 1945-760X. Dostupné z: doi:10.1097/JDN.0b013e3182274a98
- [6] BOLZINGER, Marie-Alexandrine, Stéphanie BRIANÇON, Jocelyne PELLETIER a Yves CHEVALIER. *Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane*. 2012, **17**(3), 156-165. ISSN 13590294. Dostupné z: doi:10.1016/j.cocis.2012.02.001
- [7] RODRIGUES, Francisca a Maria Beatriz P.P. OLIVEIRA. Cell-based in vitro models for dermal permeability studies. *Concepts and Models for Drug Permeability Studies*. Elsevier, 2016, 2016, , 155-167. ISBN 9780081000946. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100094-6.00010-9
- [8] SEN, Chandan K., Gayle M. GORDILLO, Sashwati ROY, et al. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair and Regeneration*. 2009, **17**(6), 763-771. ISSN 10671927. Dostupné z: doi:10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x
- [9] AMBEKAR, Rushikesh S. a Balasubramanian KANDASUBRAMANIAN. Advancements in nanofibers for wound dressing: A review. *European Polymer Journal*. 2019, **117**, 304-336. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.05.020
- [10] ZEMAN, Miroslav. *Chirurgická propedeutika*. 2. přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2000. ISBN 80-716-9705-2.
- [11] DHIVYA, Selvaraj, Viswanadha Vijaya PADMA a Elango SANTHINI. Wound dressings – a review. *BioMedicine*. 2015, **5**(4). ISSN 2211-8039. Dostupné z: doi:10.7603/s40681-015-0022-9
- [12] DHIVYA, Selvaraj, Viswanadha Vijaya PADMA a Elango SANTHINI. Wound dressings – a review. *BioMedicine*. 2015, **5**(4). ISSN 2211-8039. Dostupné z: doi:10.7603/s40681-015-0022-9
- [13] SADRI, Rad, Maryam HOSSEINI, S.N. KAZI, et al. A facile, bio-based, novel approach for synthesis of covalently functionalized graphene nanoplatelet nano-coolants toward improved thermo-physical and heat transfer properties. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2018, **509**, 140-152. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2017.07.052

- [14] HOCELLA, Michael F., David W. MOGK, James RANVILLE, et al. Natural, incidental, and engineered nanomaterials and their impacts on the Earth system. *Science*. 2019, **363**(6434). ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.aau8299
- [15] DEEPAK, Amar, Amit Kumar GOYAL a Goutam RATH. Nanofiber in transmucosal drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2018, **43**, 379-387. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2017.11.008
- [16] JAIN, Ritu, Saritha SHETTY a Khushwant S. YADAV. Unfolding the electrospinning potential of biopolymers for preparation of nanofibers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020, **57**. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2020.101604
- [17] NAGARAJAN, Sakthivel, Mikhael BECHELANY, Narayana S. KALKURA, Philippe MIELE, Celine P. BOHATIER a Sebastien BALME. Electrospun Nanofibers for Drug Delivery in Regenerative Medicine. *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*. Elsevier, 2019, 2019, , 595-625. ISBN 9780128140291. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814029-1.00020-X
- [18] TORRES-MARTINEZ, Erick José, José Manuel CORNEJO BRAVO, Aracely SERRANO MEDINA, Graciela Lizeth PÉREZ GONZÁLEZ a Luis Jesús VILLARREAL GÓMEZ. A Summary of Electrospun Nanofibers as Drug Delivery System. *Current Drug Delivery*. 2018, **15**(10). ISSN 15672018. Dostupné z: doi:10.2174/1567201815666180723114326
- [19] MUTLU, Gozde, Semih CALAMAK, Kezban ULUBAYRAM a Eylem GUVEN. Curcumin-loaded electrospun PHBV nanofibers as potential wound-dressing material. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2018, **43**, 185-193. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2017.09.017
- [20] BARTIS, Domokos a Judit PONGRACZ. *Three dimensional tissue cultures and tissue engineering* [online]. University of Pécs, 2011 [cit. 2021-5-30]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/271373926\\_Three\\_dimensional\\_tissue\\_cultures\\_and\\_tissue\\_engineering](https://www.researchgate.net/publication/271373926_Three_dimensional_tissue_cultures_and_tissue_engineering)
- [21] ZHANG, Y. Z., J. VENUGOPAL, Z.-M. HUANG, C. T. LIM a S. RAMAKRISHNA. Characterization of the Surface Biocompatibility of the Electrospun PCL-Collagen Nanofibers Using Fibroblasts. *Biomacromolecules*. 2005, **6**(5), 2583-2589. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm050314k
- [22] LLORENS, Elena, Elaine ARMELIN, María DEL MAR PÉREZ-MADRIGAL, Luís DEL VALLE, Carlos ALEMÁN a Jordi PUIGGALÍ. Nanomembranes and Nanofibers from Biodegradable Conducting Polymers. *Polymers*. 2013, **5**(3), 1115-1157. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym5031115
- [23] KAMBLE, Pallavi, Bhakti SADARANI, Anuradha MAJUMDAR a Sukhwinder BHULLAR. Nanofiber based drug delivery systems for skin: A promising therapeutic approach. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2017, **41**, 124-133. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2017.07.003
- [24] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Eva SLANINOVA, Ines FRITZ, Christina DAFFERT, Katharina MEIXNER, Zuzana SEDRLOVA a Martin KOLLER. Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020, **104**(11), 4795-4810. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-020-10568-1

- [25] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Martin KOLLER, Dan KUCERA a Iva PERNICOVA. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances*. 2018, **36**(3), 856-870. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.006
- [26] MA, Linlin, Ziheng ZHANG, Jun LI, Xingxing YANG, Bin FEI, Polly H. M. LEUNG a Xiaoming TAO. A New Antimicrobial Agent: Poly (3-hydroxybutyric acid) Oligomer. *Macromolecular Bioscience*. 2019, **19**(5). ISSN 1616-5187. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.201800432
- [27] PAPANEOPHYTOU, Christos, George KATSIPIIS, Eleftherios HALEVAS a Anastasia A. PANTAZAKI. Polyhydroxyalkanoates Applications in Drug Carriers. *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*. Singapore: Springer Singapore, 2019, 2019-01-25, , 77-124. ISBN 978-981-13-3758-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-13-3759-8\_5
- [28] BONARTSEV, A. P., G. A. BONARTSEVA, I. V. RESHETOV, K. V. SHAITAN a M. P. KIRPICHNIKOV. Application of Polyhydroxyalkanoates in Medicine and the Biological Activity of Natural Poly(3-Hydroxybutyrate). *Acta Naturae*. 2019, **11**(2), 4-16. ISSN 2075-8251. Dostupné z: doi:10.32607/20758251-2019-11-2-4-16
- [29] SARKAR, Kamal, Carlos GOMEZ, Steve ZAMBRANO, Michael RAMIREZ, Eugenio DE HOYOS, Horacio VASQUEZ a Karen LOZANO. Electrospinning to Forcespinning™. *Materials Today*. 2010, **13**(11), 12-14. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(10)70199-1
- [30] BHARDWAJ, Nandana a Subhas C. KUNDU. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*. 2010, **28**(3), 325-347. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004
- [31] WITKOWSKA, Evelin, Tomasz SZYMBORSKI, Agnieszka KAMIŃSKA a Jacek WALUK. Polymer mat prepared via Forcespinning™ as a SERS platform for immobilization and detection of bacteria from blood plasma. *Materials Science and Engineering: C*. 2017, **71**, 345-350. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2016.10.027
- [32] OBREGON, Nancy, Victor AGUBRA, Madhab POKHREL, et al. Effect of Polymer Concentration, Rotational Speed, and Solvent Mixture on Fiber Formation Using Forcespinning®. *Fibers*. 2016, **4**(4). ISSN 2079-6439. Dostupné z: doi:10.3390/fib4020020
- [33] JAYARAMAN, Krishnan, M. KOTAKI, Y. ZHANG, X. MO a S. RAMAKRISHNA. Recent Advances in Polymer Nanofibers. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. American Scientific Publishers, 2004, **4**, 52-65. Dostupné také z: <https://scholarbank.nus.edu.sg/handle/10635/52601>
- [34] MA, Peter X. a Ruiyun ZHANG. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *Journal of Biomedical Materials Research*. John Wiley, 1999, **46**(1), 60-72. Dostupné z: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199907\)46:1%3C60::AID-JBM7%3E3.0.CO;2-H?casa\\_token=8vtw3MDAZCIAAAAAA:jHdNnpvHfsGZaHWtrYICIPeJdJ3rBd\\_KIBl84ZydVkpZnNob0xVmlsQ6l1nLN1V\\_csHvvXrQuu\\_iaMpK](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1097-4636(199907)46:1%3C60::AID-JBM7%3E3.0.CO;2-H?casa_token=8vtw3MDAZCIAAAAAA:jHdNnpvHfsGZaHWtrYICIPeJdJ3rBd_KIBl84ZydVkpZnNob0xVmlsQ6l1nLN1V_csHvvXrQuu_iaMpK)
- [35] HASSAN, Mohammad Abouelreesh, Bong Yeol YEOM, Arnold WILKIE, Behnam POURDEYHIMI a Saad A. KHAN. Fabrication of nanofiber meltblown membranes and their

- filtration properties. *Journal of Membrane Science*. 2013, **427**, 336-344. ISSN 03767388. Dostupné z: doi:10.1016/j.memsci.2012.09.050
- [36] CORNEJO BRAVO, José Manuel, Luis Jesús VILLARREAL GÓMEZ a Aracely SERRANO MEDINA. Electrospinning for Drug Delivery Systems: Drug Incorporation Techniques. *Electrospinning - Material, Techniques, and Biomedical Applications*. InTech, 2016, 2016-12-21. ISBN 978-953-51-2821-2. Dostupné z: doi:10.5772/65939
- [37] DING, Yaping, Wei LI, Feng ZHANG, Zehua LIU, Nazanin ZANJANIZADEH EZAZI, Dongfei LIU a Hélder A. SANTOS. Electrospun Fibrous Architectures for Drug Delivery, Tissue Engineering and Cancer Therapy. *Advanced Functional Materials*. 2019, **29**(2). ISSN 1616301X. Dostupné z: doi:10.1002/adfm.201802852
- [38] TIPDUANGTA, Pratchaya, Peter BELTON, László FÁBIÁN, Li Ying WANG, Huiru TANG, Mark EDDLESTON a Sheng QI. Electrospun Polymer Blend Nanofibers for Tunable Drug Delivery: The Role of Transformative Phase Separation on Controlling the Release Rate. *Molecular Pharmaceutics*. 2015, **13**(1), 25-39. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00359
- [39] VERRECK, Geert, Iksoo CHUN, Joel ROSENBLATT, Jef PEETERS, Alex Van DIJCK, Jurgen MENSCH, Marc NOPPE a Marcus E. BREWSTER. Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer. *Journal of Controlled Release*. 2003, **92**(3), 349-360. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(03)00342-0
- [40] XU, X, X CHEN, P MA, X WANG a X JING. The release behavior of doxorubicin hydrochloride from medicated fibers prepared by emulsion-electrospinning. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008, **70**(1), 165-170. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2008.03.010
- [41] SON, Young Ju, Woo Jin KIM a Hyuk Sang YOO. Therapeutic applications of electrospun nanofibers for drug delivery systems. *Archives of Pharmacal Research*. 2014, **37**(1), 69-78. ISSN 0253-6269. Dostupné z: doi:10.1007/s12272-013-0284-2
- [42] NIKMARAM, Nooshin, Shahin ROOHINEJAD, Sara HASHEMI, Mohamed KOUBAA, Francisco J. BARBA, Alireza ABBASPOURRAD a Ralf GREINER. Emulsion-based systems for fabrication of electrospun nanofibers: food, pharmaceutical and biomedical applications. *RSC Advances*. 2017, **7**(46), 28951-28964. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C7RA00179G
- [43] BASAR, A.O., S. CASTRO, S. TORRES-GINER, J.M. LAGARON a H. TURKOGLU SASMAZEL. Novel poly( $\epsilon$ -caprolactone)/gelatin wound dressings prepared by emulsion electrospinning with controlled release capacity of Ketoprofen anti-inflammatory drug. *Materials Science and Engineering: C*. 2017, **81**, 459-468. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.08.025
- [44] ZHANG, Jianguang, Kexin QIU, Binbin SUN, Jun FANG, Kuihua ZHANG, Hany EI-HAMSHARY, Salem S. AL-DEYAB a Xiumei MO. The aligned core–sheath nanofibers with electrical conductivity for neural tissue engineering. *J. Mater. Chem. B*. 2014, **2**(45), 7945-7954. ISSN 2050-750X. Dostupné z: doi:10.1039/C4TB01185F
- [45] LU, Yang, Jiangnan HUANG, Guoqiang YU, Romel CARDENAS, Suying WEI, Evan K. WUJCIK a Zhanhu GUO. Coaxial electrospun fibers: applications in drug delivery and tissue

- engineering. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2016, **8**(5), 654-677. ISSN 1939-5116. Dostupné z: doi:10.1002/wnan.1391
- [46] MEINEL, Anne J., Oliver GERMERSHAUS, Tessa LUHMANN, Hans P. MERKLE a Lorenz MEINEL. Electrospun matrices for localized drug delivery: Current technologies and selected biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2012, **81**(1), 1-13. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2012.01.016
- [47] YOSHIDA, Mutsumi, Robert LANGER, Andreas LENDLEIN a Joerg LAHANN. From Advanced Biomedical Coatings to Multi-Functionalized Biomaterials. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*. 2006, **46**(4), 347-375. ISSN 1532-1797. Dostupné z: doi:10.1080/15583720600945394
- [48] RAJANGAM, Kanya, Heather A. BEHANNA, Michael J. HUI, Xiaoqiang HAN, James F. HULVAT, Jon W. LOMASNEY a Samuel I. STUPP. Heparin Binding Nanostructures to Promote Growth of Blood Vessels. *Nano Letters*. 2006, **6**(9), 2086-2090. ISSN 1530-6984. Dostupné z: doi:10.1021/nl0613555
- [49] ZHOU, Fang, Xiaoling JIA, Yang YANG, et al. Nanofiber-mediated microRNA-126 delivery to vascular endothelial cells for blood vessel regeneration. *Acta Biomaterialia*. 2016, **43**, 303-313. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2016.07.048
- [50] MOHANRAJ, V J a Y CHEN. Nanoparticles - A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2007, **5**(1), 561-573. ISSN 1596-9827. Dostupné z: doi:10.4314/tjpr.v5i1.14634
- [51] KHAN, Ibrahim, Khalid SAEED a Idrees KHAN. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. 2019, **12**(7), 908-931. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
- [52] GUO, Dan, Guoxin XIE a Jianbin LUO. Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2014, **47**(1). ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/0022-3727/47/1/013001
- [53] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013, **8**(1). ISSN 1556-276X. Dostupné z: doi:10.1186/1556-276X-8-102
- [54] PRIYADARSHANA, Gayan, Nilwala KOTTEGODA, Atula SENARATNE, Ajith DE ALWIS a Veranja KARUNARATNE. Synthesis of Magnetite Nanoparticles by Top-Down Approach from a High Purity Ore. *Journal of Nanomaterials*. 2015, **2015**, 1-8. ISSN 1687-4110. Dostupné z: doi:10.1155/2015/317312
- [55] ZHOU, Yue, Cun-Ku DONG, Li-Li HAN, Jing YANG a Xi-Wen DU. Top-Down Preparation of Active Cobalt Oxide Catalyst. *ACS Catalysis*. 2016, **6**(10), 6699-6703. ISSN 2155-5435. Dostupné z: doi:10.1021/acscatal.6b02416
- [56] IRAVANI, Siavash. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*. 2011, **13**(10). ISSN 1463-9262. Dostupné z: doi:10.1039/c1gc15386b
- [57] CROMWELL, G.L. *Swine nutrition: Antimicrobial agents*. USA: Reed Publishing (USA), 1991, 297-314. ISBN 0-409-90095-8. Dostupné také z: [https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=qq\\_YBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA297&dq=antimicrobial+agents&ots=WYnjHHXTIY&sig=4w9APJEyrTHp5ApnOOqgGV5Pvy3E&redir\\_esc=y#v=onepage&q=antimicrobial%20agents&f=false](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=qq_YBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA297&dq=antimicrobial+agents&ots=WYnjHHXTIY&sig=4w9APJEyrTHp5ApnOOqgGV5Pvy3E&redir_esc=y#v=onepage&q=antimicrobial%20agents&f=false)

- [58] BRYSKIER, Andre et al., *Antimicrobial agents: Antibacterials and antifungals*. USA: ASM press, 2005. ISBN 9781555812379. Dostupné také z: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20053172599>
- [59] SHARMA, R.A., A.J. GESCHER a W.P. STEWARD. Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer*. 2005, **41**(13), 1955-1968. ISSN 09598049. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejca.2005.05.009
- [60] JOE, B., M. VIJAYKUMAR a B. R. LOKESH. Biological Properties of Curcumin- Cellular and Molecular Mechanisms of Action. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004, **44**(2), 97-111. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408690490424702
- [61] WANG, Ying-Jan, Min-Hsiung PAN, Ann-Lii CHENG, Liang-In LIN, Yuan-Soon HO, Chang-Yao HSIEH a Jen-Kun LIN. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1997, **15**(12), 1867-1876. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/S0731-7085(96)02024-9
- [62] JOVANOVIĆ, Slobodan V., Steen STEENKEN, Charles W. BOONE a Michael G. SIMIC. H-Atom Transfer Is A Preferred Antioxidant Mechanism of Curcumin. *Journal of the American Chemical Society*. 1999, **121**(41), 9677-9681. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja991446m
- [63] LIN, Jen-Kun, Min-Hsiung PAN a Shoei-Yn LIN-SHIAU. Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin. *BioFactors*. 2000, **13**(1-4), 153-158. ISSN 09516433. Dostupné z: doi:10.1002/biof.5520130125
- [64] TONNESEN, Hanne Hjorth, Jan KARLSEN a Gerard Beijersbergen HENEGOUWEN. Studies on curcumin and curcuminoids VIII. Photochemical stability of curcumin. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. 1986, **183**(2), 116-122. ISSN 0044-3026. Dostupné z: doi:10.1007/BF01041928
- [65] SREEJAYAN a M N A RAO. Curcuminoids as Potent Inhibitors of Lipid Peroxidation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1994, **46**(12), 1013-1016. ISSN 2042-7158. Dostupné z: doi:10.1111/j.2042-7158.1994.tb03258.x
- [66] HUANG, Mou-Tuan, Wei MA, Yao-Ping LU, et al. Effects of curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and tetrahydrocurcumin on 12- O - tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion. *Carcinogenesis*. 1995, **16**(10), 2493-2497. ISSN 0143-3334. Dostupné z: doi:10.1093/carcin/16.10.2493
- [67] BOLES, M. O. a R. J. GIRVEN. The structures of ampicillin: a comparison of the anhydrate and trihydrate forms. *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry*. **32**(8), 2279-2284. ISSN 05677408. Dostupné z: doi:10.1107/S0567740876007590
- [68] [https://www.researchgate.net/publication/270275231\\_THE\\_USE\\_OF\\_NATURAL\\_PRODUCT\\_SUBSTRATES\\_FOR\\_THE\\_SYNTHESIS\\_OF\\_LIBRARIES\\_OF\\_BIOLOGICALLY\\_ACTIVE\\_NEW\\_CHEMICAL\\_ENTITIES/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/270275231_THE_USE_OF_NATURAL_PRODUCT_SUBSTRATES_FOR_THE_SYNTHESIS_OF_LIBRARIES_OF_BIOLOGICALLY_ACTIVE_NEW_CHEMICAL_ENTITIES/figures?lo=1)
- [69] HEJZLAR, Miroslav. *Antibiotika v praxi*. 2. přeprac. a rozš. vyd., (1. v nakl. Makropulos). Praha: Makropulos, 1995. Galén. ISBN 80-901-7764-6.

- [70]RAFAILIDIS, Petros I, Eleni N IOANNIDOU a Matthew E FALAGAS. Ampicillin/Sulbactam. *Drugs*. 2007, **67**(13), 1829-1849. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-200767130-00003
- [71]BYRD, Allyson L., Yasmine BELKAID a Julia A. SEGRE. The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*. 2018, **16**(3), 143-155. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro.2017.157
- [72]PEUTHERER, John Forrest, Richard C. B. SLACK a David GREENWOOD. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Vyd. 1., čes. Praha: Grada, 1999. ISBN 80-716-9365-0.
- [73]TENOVER, F C, J M SWENSON, C M O'HARA a S A STOCKER. Ability of commercial and reference antimicrobial susceptibility testing methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995, **33**(6), 1524-1527. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/jcm.33.6.1524-1527.1995
- [74]WIEGAND, Irith, Kai HILPERT a Robert E W HANCOCK. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 2008, **3**(2), 163-175. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2007.521
- [75]LONSWAY, David R., Mindy G. ELROD, Nathan KENDRICK, Rebekah TILLER, Maureen M. SULLIVAN, Jonathan R. EDWARDS, David D. BLANEY a Maria KARLSSON. Correlation Between Etest and Reference Broth Microdilution for Antimicrobial Susceptibility Testing of Burkholderia pseudomallei. *Microbial Drug Resistance*. 2020, **26**(4), 311-318. ISSN 1076-6294. Dostupné z: doi:10.1089/mdr.2019.0260
- [76]HERTZ, L., B. H. J. JUURLINK a S. SZUCHET. Cell Cultures. *Neurochemical Systems*. Boston, MA: Springer US, 1985, 1985, , 603-661. ISBN 978-1-4684-7020-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4684-7018-5\_23
- [77]ALBERTS, Bruce, Denis BRAY a Alexander JOHNSON. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero, [2006]. ISBN 80-902-9062-0.
- [78]CIAPETTI, G., E. CENNI, L. PRATELLI a A. PIZZOFERRATO. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials*. 1993, **14**(5), 359-364. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/0142-9612(93)90055-7
- [79]AULA, Sangeetha, Samyuktha LAKKIREDDY, Kaiser JAMIL, Atya KAPLEY, A. V. N. SWAMY a Harivardhan Reddy LAKKIREDDY. Biophysical, biopharmaceutical and toxicological significance of biomedical nanoparticles. *RSC Advances*. 2015, **5**(59), 47830-47859. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C5RA05889A

## **8 SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha 1: Hmotnosti kombinovaných materiálů použitých při MTT testu .....	81
Příloha 2: Hmotnosti jednotlivých vláken použitých při MTT testu .....	81

## 9 PŘÍLOHY

*Příloha 1: Hmotnosti kombinovaných materiálů použitých při MTT testu*

Kombinovaný materiál		Hmotnost před adsorbci [mg]	Hmotnost po adsorbci [mg]	Adsorbované množství částic [mg]
Čistá vlákna + čisté částice	1	7,2	7,7	0,5
	2	7,8	8,3	0,5
	3	4,8	5,2	0,4
Čistá vlákna + kurkuminové částice	1	9,4	10,3	0,9
	2	5,0	6,4	1,4
	3	6,1	7,5	1,4
Čistá vlákna + ampicilin	1	15,2	15,4	0,2
	2	17,3	17,9	0,6
	3	13	13,0	0,0
Ampicilinová vlákna + kurkuminové částice	1	5,7	6,4	0,7
	2	5,7	6,0	0,3
	3	8,7	9,2	0,5
Kurkuminová vlákna + ampicilinové částice	1	10,0	10,5	0,5
	2	6,2	7,3	1,1
	3	5,4	5,8	0,4

*Příloha 2: Hmotnosti jednotlivých vláken použitých při MTT testu*

Materiál		Hmotnost [mg]
Čistá vlákna	1	8,4
	2	7,9
	3	7,6
Ampicilinová vlákna	1	5,3
	2	7,6
	3	8,1
Kurkuminová vlákna	1	3,5
	2	5,4
	3	4,4