

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Využití nanotechnologií jako moderních nástrojů v léčbě infekcí vyvolaných multirezistentními kmeny bakterií



Matěj Sklenář

Brno 2013

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor 06 – Zdravotnictví

**Využití nanotechnologií jako moderních nástrojů v léčbě
infekcí vyvolaných multirezistentními kmeny bakterií**

**The Use of Nanotechnology As Modern Tools to Treat
Infections Caused by Multiresistant Bacteria Strains**

Autor: Matěj Sklenář
Škola: Střední průmyslová škola chemická, Brno

Vedoucí práce: PhDr. Marcela Helešicová
Garant: Prof. Ing. René Kizek, PhD.
Specialista: Mgr. Olga Kryštofová
Dr. Ing. Branislav Ruttkay-Nedecký
Školitel: Mgr. Dagmar Chudobová

Brno 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracoval samostatně pod vedením PhDr. Marcely Helešicové, použil jsem pouze podklady (literaturu, SW atd.) uvedené v příloženém seznamu a postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů v platném znění.

V Brně dne 18. 2. 2013

podpis:

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat Prof. Ing. Renému Kizekovi, Ph.D. za umožnění vykonávat středoškolskou odbornou činnost v Laboratoři metalomiky a nanotechnologií Mendelovy univerzity v Brně, PhDr. Marcele Helešicové za odborné vedení mé práce, Mgr. Dagmar Chudobové a Dr. Ing. Branislavu Ruttkay-Nedeckému za odborné rady, trpělivost, ochotu a čas, který věnovali mně a mojí práci v laboratoři. Doc. RNDr. Pavlu Kopelovi, Ph.D. za konzultaci a přípravu nanočástic, týmu RNDr. Michala Masaříka, Ph.D. za výsledky stanovené na lidských tkáních, a také Mgr. Olze Kryštofové za podporu, rady a cenné připomínky k mojí práci.



Tato práce vznikla v rámci projektu CEITEC - Středoevropského technologického institutu s pomocí výzkumné infrastruktury financované projektem CZ.1.05/1.1.00/02.0068 z Evropského fondu regionálního rozvoje.



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



**OP Výzkum a vývoj
pro inovace**

Anotace

Tato studie je věnována vývoji antimikrobiální komplexní látky, ideální pro pokrytí cévních implantátů s následným využitím v transplantační chirurgii. Ve studii je rovněž uvedeno srovnání efektu použití nanomateriálů oproti běžně používaným solím kovů. Byly vytvořeny komplexy polymerních látek (kyselina hyaluronová, kolagen a chitosan) se stříbrnými nanočásticemi nebo dusičnanem stříbrným. Schopnost tvorby komplexů polymerních látek s dusičnanem stříbrným nebo stříbrnými nanočásticemi byla studována pomocí elektrochemických a spektrofotometrických metod. Baktericidní efekt těchto látek byl stanoven metodami růstových křivek a inhibičních zón na bakteriální kultuře *Staphylococcus aureus*. Viabilita eukaryotických buněk při styku se zkoumanými látkami byla pozorována MTT testem. Ze získaných dat byla vyhodnocena, jako nejvhodnější látka k zajištění antimikrobiální povahy cévního implantátu komplex stříbrných nanočástic s chitosanem.

Klíčová slova: Mikrobiologie, spektrofotometrie, elektrochemie, nanotechnologie, nanočástice, rezistence mikroorganismů

Annotation

This work focuses on antimicrobial complex substances development, suitable to cover vascular implants with the secondary use in transplantation surgery. This work also presents a comparison of the effect using nanomaterials against ordinary substances. The formation of complexes took place between silver nanoparticles, silver ions and the polymer substances (hyaluronic acid, collagen and chitosan). The ability of complex formation of these substances was studied using electrochemistry and spectrophotometry. Bactericidal effect of these compounds was determined by growth-curve methods and inhibition zones on a bacterial culture *Staphylococcus aureus*. The viability of eukaryotic cells in straight confrontation with observed substances was observed using the MTT test. According to the data obtained, the complex of silver nanoparticles with chitosan was evaluated as the best substance to ensure antimicrobial behaviour of vascular implants.

Keywords: Microbiology, spectrophotometry, electrochemistry, nanotechnology, resistant microorganisms

Annotation

Diese Arbeit ist der Entwicklung einer komplexen antimikrobiellen Substanz gewidmet, die zum Bedecken Gefäßimplantate dienen soll und die man anschließend in der Transplantationschirurgie verwenden kann. Die Arbeit ist auch ein Vergleich der Wirkung bei der Verwendung von Nanomaterialien gegenüber üblicherweise verwendeten Metallsalzen. Es wurden Komplexe der polymeren Substanzen (Hyaluronsäure, Kollagen und Chitosan) mit Silber-Nanopartikeln und Silbernitrat gebildet. Die Fähigkeit zur Komplexbildung von Polymeren mit Silbernitrat oder Silbernanopartikeln zu bilden, wurde durch elektrochemische und spektrophotometrische Methoden untersucht. Die bakterizide Wirkung dieser Substanzen wurde nach der Methode von Wachstumskurven und die Hemmzonen für die Bakterienkultur *Staphylococcus aureus* bestimmt. Die Lebensfähigkeit von eukaryotischen Zellen im Kontakt mit den untersuchten Verbindungen wurde mit MTT-Test beobachtet. Aus den erhaltenen Daten wurde als das am besten geeignete Mittel, um die antimikrobielle Beschaffenheit des Gefäßimplantats sicherzustellen, das Komplex Silbernanopartikel mit Chitosan ausgewertet.

Stichworte: Mikrobiologie, Spektrophotometrie, Elektrochemie, Nanotechnologie, Nanopartikel, Resistenz von Mikroorganismen

Obsah

1	Úvod.....	12
2	Teoretická část	13
2.1	Problematika cévních implantátů.....	13
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.3	Antibiotická rezistence.....	14
2.4	Stříbro.....	15
2.5	Polymerní látky	15
2.5.1	Kyselina hyaluronová	15
2.5.2	Kolagen.....	16
2.5.3	Chitosan	17
3	Cíle práce	18
4	Experimentální část.....	19
4.1	Materiál a metody	19
4.1.1	Příprava nanočástic stříbra.....	19
4.1.2	Metodika elektrochemického stanovení	19
4.1.3	Metodika spektrofotometrického stanovení.....	20
4.1.4	Příprava živného média	20
4.1.5	Příprava biologického materiálu.....	20
4.1.6	Příprava MTT testu	21
4.2	Výsledky a diskuze	22
4.2.1	Elektrochemická stanovení	22
4.2.2	Spektrofotometrická stanovení	25
4.2.3	Metoda růstových křivek	27
4.2.4	Metoda inhibičních zón	31
4.2.5	Stanovení toxicity komplexů pro fibroblasty.....	32

5	Závěr	35
6	Použitá literatura	37
7	Seznam obrázků	45
8	Prezentace práce na konferencích	46

Seznam použitých zkratek

AgNPs – nanočástice stříbra

HA – kyselina hyaluronová

KOL – kolagen

CHIT – chitosan

LB médium – Luria Bertani médium

AU – absorpční jednotka

MTT – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid

DSMO – dimethylsulfoxid

DPV – diferenční pulzní voltametrie

TIC – totální inhibiční koncentrace

MIC – minimální inhibiční koncentrace

IC50 – střední letální koncentrace

HFF – lidské předkožkové fibroblasty

1 Úvod

V oboru transplantační chirurgie dochází k pooperačním komplikacím způsobeným rezistentními kmeny bakterií. Tyto problémy vedou k složitým reoperacím, komplikacím zdravotního stavu a v nejzávažnějším případě smrti pacienta. Infikace organismu bývá způsobena oslabením imunitního systému v důsledku implantace cizorodého tělesa do lidského těla.

Bakterie *Staphylococcus aureus* způsobuje závažné infekční onemocnění, i přes vysokou úroveň medicíny a znalost antibiotických léčiv. Právě antibiotická léčiva nepřímo způsobují odolnost bakterie *Staphylococcus aureus*. Ani tento fakt však nezabrání nadměrnému užívání antibiotik, jak laickou veřejností, tak některými lékaři. Důsledkem tohoto počínání je vytváření stresových podmínek pro kmeny bakterií, kdy ve valné většině dochází k jejich smrti. Existují ovšem jedinci, kteří přežijí a dále se rozmnožují, vyvinuli si rezistenci vůči danému antibiotickému léčivu. Tato nová vlastnost bakterií je dále přenášena na budoucí kolonie. Vývoj odolnosti bakterií je přirozeným jevem, ale neuvážená manipulace s antibiotiky tento proces výrazně urychluje.

Řešením tohoto problému je hledání látek se stejným výsledkem účinku, ale jiným mechanismem inhibice růstu bakterií, především rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus*. Možné řešení nabízí použití kovů, jejichž antibakteriální účinky jsou známy již po staletí, nabízí se také možnost využití kovů ve formě nanočástic, které díky svým malým rozměrům mohou lépe vstupovat do organismu a zároveň disponují větší aktivní plochou. Nevýhodou použití kovů v lidském organismu je jejich negativní působení na metabolické dráhy.

Alternativou jak zajistit bezpečnost organismu je použití látky, která je dokonale biodegradabilní a biokompatibilní s lidským tělem. Těmito vlastnostmi disponují mnohé polymery, jež zároveň vykazují vysokou antimikrobiální aktivitu. Polymerní látky jsou schopné do své struktury vázat i další látky, především kovy a tvořit s nimi komplexy. Tvorbou komplexu získáme sloučeninu disponující vysokým antimikrobiálním efektem, který je také biokompatibilní a biodegradabilní pro lidské tělo. Tato komplexní látka se nabízí, jako vhodný prostředek při boji proti rezistentním kmenům bakterií a zároveň je vhodným materiálem pro vývoj cévních implantátů, které zajistí bezpečnost a bezproblémové přijetí lidským tělem.

2 Teoretická část

2.1 Problematika cévních implantátů

V průběhu pooperační péče dochází k řadě komplikací, jednou z nejzávažnějších jsou bakteriální infekce (Randall, a kol., 2013). Tato skutečnost souvisí zejména s nárůstem používání umělých cévních náhrad (Cox, 1992, Thompson, a kol., 2013). Infekce postihují 1-10 % pacientů (v závislosti na operované části těla, věku, způsobu operace, odolnosti organismu vůči infekcím, pooperační péči), kteří se podrobili transplantaci cévy (Capita a Alonso-Calleja, 2013, O'Brien, 2011, Tatterton a Homer-Vanniasinkam, 2011, Teebken, a kol., 2012, Thompson, a kol., 2013). Díky těmto komplikacím následně dochází k oslabení imunitního systému, nutnosti reoperací. Jako nejčastější infekční patogen spojený s cévními operacemi se uvádí bakterie *Staphylococcus aureus* (Lalueza, a kol., 2011).

2.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je grampozitivní bakterie, tvarem se řadí mezi koky (Obr. č. 1) a vyskytuje se ve shlucích, které jsou nepohyblivé (Gutierrez-Larrainzar, a kol., 2013). Jedná se o jednu z nejrozšířenějších bakterií, podle některých studií je přítomna na kůži každého člověka (Dukic, a kol., 2013). Lidský organismus je schopen se infekcím způsobeným touto bakterií bránit (Chang, a kol., 2013). Vážné onemocnění však způsobuje v poúrazovém a pooperačním období, kdy je riziko infekce vysoké. Další ohroženou skupinou jsou jedinci trpící imunologickou nedostatečností, především lidé trpící HIV (Taguchi, a kol., 2013).



Obrázek 1: *Staphylococcus aureus* zv. 1000x.
<http://newsatjama.jama.com>

Staphylococcus aureus způsobuje vážné záněty, abscesy a sepse (Chang, a kol., 2013). Tyto zdravotní komplikace jsou vyvolány produkcí enzymů a toxinů exfoliatinu, enterotoxinu, cytotoxinů a leukotoxinů (Barnette a Hart, 2011). Pomocí enzymu hyaluronidázy rozkládá bakterie kyselinu hyaluronovou na cukerné jednotky, kterými se následně vyživuje.

Infekce způsobené bakterií *Staphylococcus aureus* jsou léčitelné antibiotiky, 80 % kmenů je však rezistentní vůči nejběžnějšímu antibiotiku penicilinu (Papich, 2012). Rezistence této bakterie je závažným problémem celé společnosti, methilicin a vancomycin rezistentní *Staphylococcus aureus* patří mezi nejodolnější kmeny a způsobují nejzávažnější infekční onemocnění (Garbacz, a kol., 2013). Léčba povrchových infekcí je zvládnutelná antibiotiky, hloubkové záněty jsou léčeny chirurgickými zákroky a podáváním silných antibiotik (Xue, a kol., 2013).

2.3 Antibiotická rezistence

Antibiotická rezistence je odolnost infikujících organismů vůči antibiotikům (Alarcon, a kol., 2012, Randall, a kol., 2013). Je přirozeným jevem, díky němuž se bakterie chrání před nepříznivým prostředím. Rezistenci dělíme na primární a sekundární, přičemž rezistence primární odpovídá geneticky podmíněné necitlivosti bakterií na dané antibiotikum bez ohledu na eventuální předchozí kontakt s antibiotikem. (Capita a Alonso-Calleja, 2013)

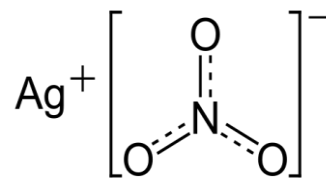
Rezistence sekundární vzniká až v průběhu antibiotické terapie nebo následkem předchozího podávání antibiotika. Evoluční teorie genetické selekce vyžaduje, aby téměř 100 % infikujících organismů bylo zničeno při působení antibiotik, tím se zajistí prevence genetické selekce na rezistenci. V přítomnosti antibiotika se selektují rezistentní kmeny, které se nacházejí v každé velké bakteriální populaci. Rychlost rozvoje sekundární rezistence závisí na frekvenci mutací a na množství bakterií s určitým stupněm rezistence. Rezistence může být přenosná. Nejčastěji je zprostředkována plazmidy, má charakter sekundárního typu a je častější u gramnegativních bakterií. Genetický materiál může být předáván z jednoho mikroorganismu na druhý. Jsou definovány obecné mechanismy rezistence:

- omezená penetrace antibiotika do bakteriální buňky
- změna cílové struktury, metabolické změny v bakteriální buňce, které zabrání účinku antibiotika na cílových strukturách
- enzymatická inhibice/inaktivace antibiotika.

Podpoření sekundární rezistence je jedním z vedlejších efektů nadměrného užívání antibiotik. (Thompson, a kol., 2013).

2.4 Stříbro

Stříbro bylo využíváno k potlačení infekcí a plísní již 4000 let př. n. l. (Alexander, 2009). Antimikrobiální účinek závisí na biologické dostupnosti stříbra, zejména ve formě iontů (dusičnan stříbrný, thiosíran stříbrný) (Obr. č. 2), kovového stříbra (nanočástice) nebo oxidujícího v médiích vytvářejících nanočástice (Choi, a kol., 2008, Kittler, a kol., 2010, Moser, a kol., 2013).



Obrázek 2: Struktura dusičnanu stříbrného.
<http://www.antonides.com>

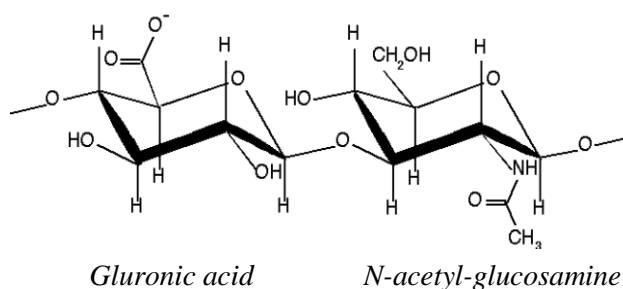
Mechanismus baktericidního účinku stříbra je zapříčiněn účastí v metabolismu ATP, vytvářejí se hydroxylové a kyslíkové radikály, které disponují baktericidním účinkem (Lalueza, a kol., 2011). Nanočástice stříbra o průměru 1 – 100 nm jsou běžně využívány pro zajištění hygienicky čistého prostředí, díky svým mimořádným antimikrobiálním a fungicidním účinkům, zároveň však nízké toxicitě vůči eukaryotickým organismům (Alarcon, a kol., 2012, Csoka, a kol., 2012, Travan, a kol., 2009). Nanočástice stříbra mají velkou aktivní plochu, která zajišťuje výjimečné mechanické a chemické vlastnosti nadřazené původní látce (Chou, a kol., 2008).

2.5 Polymerní látky

2.5.1 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HA), také známá jako hyaluronan, je lineární polysacharid tvořený opakujícími se disacharidovými jednotkami kyseliny D-glukuronové a N-acetylglukosaminu (Obr. č. 3) (Hrabarova, a kol., 2012). Nachází se v těle savců v extracelulárním matrixu, svalových a nervových tkáních, očním sklivci a kůži (Kenne, a kol., 2013). Je kompatibilní s lidským tělem, je biodegradabilní, tvoří biopolymery a tvoří molekuly o velikosti až 10^7 Da (Hrabarova, a kol., 2009, Sintzel, a kol., 1996, Stern, 2003, Teh, a kol., 2012). Syntéza této polymerní látky probíhá v plazmatické membráně fibroblastů (Bastow, a kol., 2008). Kyselina hyaluronová disponuje fyziologickými funkcemi v intracelulárním matrixu, jako je vázání vody

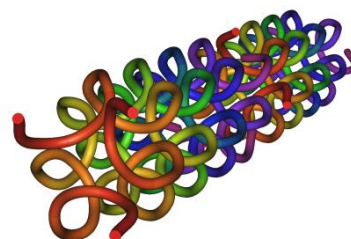
na proteiny, výstavba extracelulární matrice, a také hraje důležitou roli při organizaci komplexů proteoglykanů v měkkých pojivových tkáních (Evanko a Wight, 1999, Kogan, a kol., 2007). Výskyt kyseliny hyaluronové se zvyšuje v oblastech proliferace a buněk v rámci organismu, polymery hrají důležitou roli v mitóze. Díky své struktuře je kyselina hyaluronová využívána v oční chirurgii, tkáňovém inženýrství a kosmetice, kde slouží k urychlení regenerace tkání (Becker, a kol., 2009, Goa a Benfield, 1994, Kim, a kol., 2009, Noble, 2002, Ortonne, 1996).



Obrázek 3: Struktura kyseliny hyaluronové.
<http://www.twbionova.com>

2.5.2 Kolagen

Kolagen je protein skládající se z trojitě šroubovice, dvě vlákna jsou identická, třetí se liší pořadím aminokyselin (Obr. č. 4) (Cox, 1992). Jedná se o nejrozšířenější protein v lidském těle, nachází se v kůži, šlachách, kostech, rohovce a dalších pojivových tkáních (Alarcon, a kol., 2012, Gautieri, a kol., 2012, Park, a kol., 2012, Shoulders a Raines, 2009). Tvoří majoritní část extracelulárního matrixu (Gayatri, a kol., 2001). Hraje hlavní roli při embryonálním vývoji, dospívání, hojení ran a vnímání motorických jevů (Cowin, 2000, Cowin, 2004, Mosesson, a kol., 2001, Osborn, a kol., 2006, Satcher, a kol., 1997, Silver, a kol., 2003, Welch, a kol., 1990). Ve srovnání s ostatními přírodními polymery disponuje kolagen nesrovnatelně vyšší biokompatibilitou a biodegradabilitou (Mandal, a kol., 2012, O'Brien, 2011, Zhang, a kol., 2006). Samotný protein disponuje vysokou elasticitou, kdy je schopen deformovat svůj tvar a následně jej obnovit (Silver, a kol., 2003). Vykazuje silné antibakteriální a bakteriostatické účinky, přičemž pro eukaryotické organismy není toxický (Marin, a kol., 2008). Hustá struktura kolagenu dokáže zajistit nepropustnost biomateriálů (Saeidi, a kol., 2012). Technická a finanční nenáročnost přípravy dělají z tohoto



Obrázek 4: Strukturální model molekuly kolagenu.
<http://www.jointrehab.com>

proteinu ideální látku pro tvorbu biomateriálů použitelných ve farmacii, tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně (*Pallela, a kol., 2011, Park, a kol., 2012, Rao, 1995, Reing, a kol., 2010*).

2.5.3 Chitosan

Chitosan je lineární polysacharid, složený z 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranózových a 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranózových jednotek (*Ghosh a Ali, 2012*). Syntetizuje se buď v těle živočichů nebo průmyslově částečnou deacetylizací chitinu (Obr. č. 5), což je hlavní složka schránek mušlí a korýšů (*Mohamed, a kol., 2013*). Jedná se o nejrozšířenější biopolymer (*Chang, a kol., 2013*). Díky svým netoxickým, biokompatibilním a biodegradabilním vlastnostem je využíván, jako prostředek pro cílenou aplikaci léčiv v lidském těle (*Jayakumar, a kol., 2010*). Tento derivát chitinu zároveň disponuje vysokou antimikrobiální aktivitou, díky níž je využíván jako prostředek dosažení sterility umělých implantátů (*Madhumathi, a kol., 2010, Pires, a kol., 2013*). Polymerní struktura zajišťuje snadnou tvorbu komplexů s kovy (*Huang, a kol., 2012, Lee, a kol., 2004, Madhumathi, a kol., 2010*).



Obrázek 5: Průběh enzymatické deacetylace chitinu a následný vznik chitosanu.

<http://de.academic.ru>

3 Cíle práce

- 1. Charakterizovat průběh tvorby komplexu stříbra a polymerních sloučenin pomocí elektrochemických a spektrofotometrických metod.**
- 2. Stanovit hodnotu antimikrobiální aktivity kombinací jednotlivých zkoumaných látek za použití metod růstových křivek a inhibičních zón.**
- 3. Studovat toxicitu komplexů vůči lidskému organismu pomocí MTT testu.**
- 4. Vyhodnocení kombinace látek s nejlepšími vlastnostmi pro následné využití při vývoji cévních implantátů.**

4 Experimentální část

4.1 Materiál a metody

4.1.1 Příprava nanočástic stříbra

Stříbrné nanočástice (AgNPs) byly připraveny metodou podle Khana (Khan, A at Al. 2011). Heptahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (0,134 g) byl rozpuštěn v ACS vodě (25 ml). Do roztoku hydrogenfosforečnanu sodného byl za stálého míchání přidán roztok AgNO_3 (0,085 g) v 25 ml ACS vody. Došlo k okamžitému vzniku koloidního roztoku AgNPs. Vzniklá směs byla míchána po dobu 1 h. AgNPs byly skladovány ve tmě při teplotě 4 °C. 1 ml směsi obsahoval 1,08 mg AgNPs o velikosti 10 – 100 nm.

4.1.2 Metodika elektrochemického stanovení

Elektrochemická stanovení byla prováděna pomocí metody diferenční pulzní voltametrie (DPV). Stanovení probíhala na přístroji CH Instruments (Austin, USA) s 3 – elektrodovým zapojením. Jako pracovní elektroda byla zvolena uhlíková pastová, jako referenční elektroda byla použita Ag/AgCl/3M KCl a pomocná platinová elektroda. Náplň pastové elektrody byla připravena z 0,1 g expandovaného uhlíku a 300 μl minerálního oleje (Sigma-Aldrich, USA), tato směs byla po dobu 25 minut třena v achátové misce a následně naplněna do elektrody. Vzorky byly měřeny v prostředí 0,2M acetátového pufru pH5. Počáteční potenciál činil -0,2 V konečný potenciál 0,5 V, pulzní perioda 0,05 s, citlivost (A/V) 1e^{-5} , amplituda 50 mV. Vzorek se skládal z 1950 μl acetátového pufru, 50 μl roztoku AgNO_3 nebo AgNPs (100 μM) a v 5 minutových intervalech bylo přidáváno 20 μl polymerní látky (100 μM). Jako kontrola byl přeměřen samotný acetátový pufr. Po každém přidání polymerní látky následovaly tři přeměření. Byl sestaven grafický voltamogram, na jehož základě byla vyhodnocena tvorba komplexů a grafy, které znázorňují výšky signálů a míru interakce látek.

4.1.3 Metodika spektrofotometrického stanovení

Absorpční spektra byla zaznamenána spektrofotometrem SPECORD 210 (Analytik Jena, Německo) v rozsahu vlnových délek $\lambda=200 - 700$ nm. Byly použity křemenné kyvety o optické dráze 1 cm (Hellma Essex, Velká Británie). Analyzovaný vzorek byl tvořen kombinací látek nanočástic AgNPs nebo AgNO₃ s HA, KOL nebo CHIT a MiliQ vodou. Bylo provedeno referenční stanovení pro MiliQ vodu a následně byly samostatně přeměřeny vzorky AgNPs a AgNO₃ (100 μM) v MiliQ vodě. Do vzorku AgNPs nebo AgNO₃ s MiliQ (celkový objem 2000 μl) bylo přidáno 20 μl polymerní látky a mícháno po dobu 5 minut pro urychlení interakce látek a přeměřeno. Tento postup následoval do obsahu polymerní látky 160 μl (45 min.) v kyvetě. Jednotlivé záznamy signálů byly proloženy a vyhodnocena interakce a tvorba komplexů látek.

4.1.4 Příprava živného média

Pro přípravu 1 l LB média bylo v zásobní lahvi o objemu 1 l rozpuštěno 5 g masového peptonu (Sigma-Aldrich, USA), 5 g NaCl (Sigma-Aldrich, USA), 1,5 g masového extraktu (HIMEDIA, Mumbai, Indie), 1,5 g kvasničného extraktu (HIMEDIA, Mumbai, Indie) a rozpuštěno v 1 l miliQ vody. Před sterilizací bylo pH média upraveno na pH = 7,4. Sterilizace probíhala v autoklávu při 121 °C, 30 min. (BMT, Česká Republika).

4.1.5 Příprava biologického materiálu

Bakteriální kultura *Staphylococcus aureus* (NCTC 8511)(Česká sbírka mikroorganismů v Brně, Česká republika) byla za sterilních podmínek odebrána ze šikmého agarů a 24 hodin inkubována s živným médiem v inkubátoru Hood TH 15 (Edmund Buhler GmbH, Německo) při 37 °C při 600 rpm. Narostlá kultura byla pro další experiment ředěna kultivačním médiem na absorbanci 0,1 AU. Petriho miska obsahovala tuhé živné médium složeného z tryptonu 10 g·l⁻¹, NaCl 5 g·l⁻¹, kvasničného extraktu 5 g·l⁻¹ a baktericidního agarů 15 g·l⁻¹(HIMEDIA, Mumbai, Indie), sterilní destilovaná voda MilliQ 18 ml. Sterilizace tohoto média probíhala v autoklávu při 121 °C, 30 min. (BMT, Česká republika).

Pro účely metody inhibičních zón byl na Petriho misky s agarem napipetován 1 ml LB média obsahujícího bakteriální kulturu naředěnou na 0,1 AU při vlnové délce 600 nm. Vzorky textilie (1 x 1 cm) byly napuštěny příslušnou polymerní látkou (8,3 mM HA, 13,4 mM KOL a 9,7 mM CHIT) a roztokem 300 μ M AgNO₃, 250 μ M AgNPs. Vzorky byly v dané směsi ponechány po dobu 1 hodiny a následně umístěny na střed Petriho misky. Takto připravené Petriho misky byly uzavřeny, zaizolovány a kultivovány při 37 °C v inkubátoru (Sanyo, USA) po dobu 24 hodin. Po jednodenní kultivaci byla provedena fotodokumentace.

Pro metodu růstových křivek byla do mikrodestičky napipetována naředěná kultura (viz ředění na 0,1 AU) *Staphylococcus aureus* v různých kombinacích s testovanými látkami nebo i samostatně jako kontrolní měření. Koncentrace dusičnanu stříbrného a nanočástic stříbra činily 0; 10; 25; 50; 75; 150; 225 a 300 μ M, koncentrace kyseliny hyaluronové, kolagenu a chitosanu byly vždy stejné (100 mM). Celkový objem v jamkách mikrodestičky činil 300 μ l. Měření probíhalo v čase 0, dále pak vždy v půlhodinových intervalech po dobu 24 hodin, při teplotě 37 °C a vlnové délce 620 nm. Dosažené hodnoty byly vyhodnoceny do grafické podoby ve formě růstových křivek pro každou variantu jednotlivě.

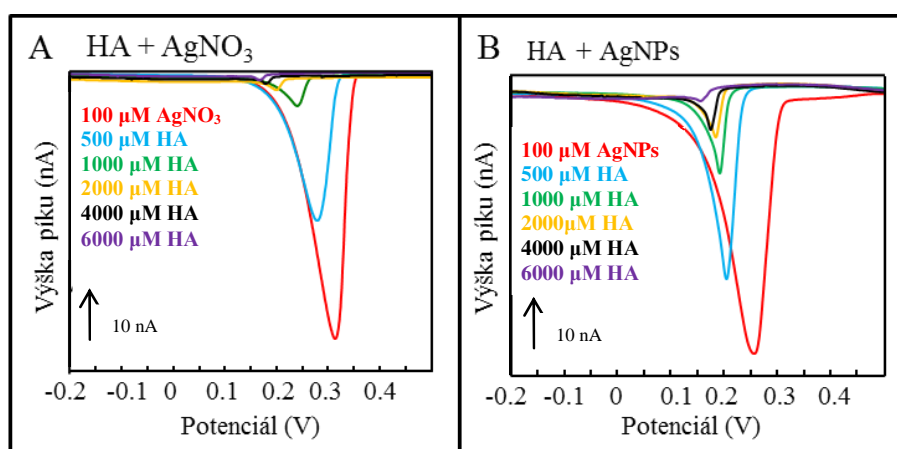
4.1.6 Příprava MTT testu

Název MTT byl metodě přiřazen na základě použití látky 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid, zkráceně MTT. Buněčná suspenze byla napipetována do jamek mikrotitrační destičky (jamky 2 – 11), každá jamka obsahovala 8000 buněk (jamka 1 a 12 obsahovala čisté médium bez buněk). Destička byla uložena do CO₂ termoboxu, po 48 hodinách bylo z jamek 2 – 11 odsáno médium a přidáno nové s danou koncentrací testované látky (jamka 1 a 12 obsahovala čisté médium). Destička byla opět uložena do CO₂ termoboxu a testovaná látka působila 48 hodin. Po této době byl odsán obsah jamek 1-11 a jamky byly doplněny novým médiem bez testované látky, k tomu bylo do každé jamky přidáno 50 μ l MTT. Destička byla zabalena do alobalu a na 4 hodiny uložena do CO₂ termoboxu. Po 4 hodinách byl obsah jamek odsán a do jamek bylo přidáno 200 μ l DMSO a 25 μ l glycinového pufru. Obsah byl promíchán a byla měřena absorbance při vlnové délce 570 nm.

4.2 Výsledky a diskuze

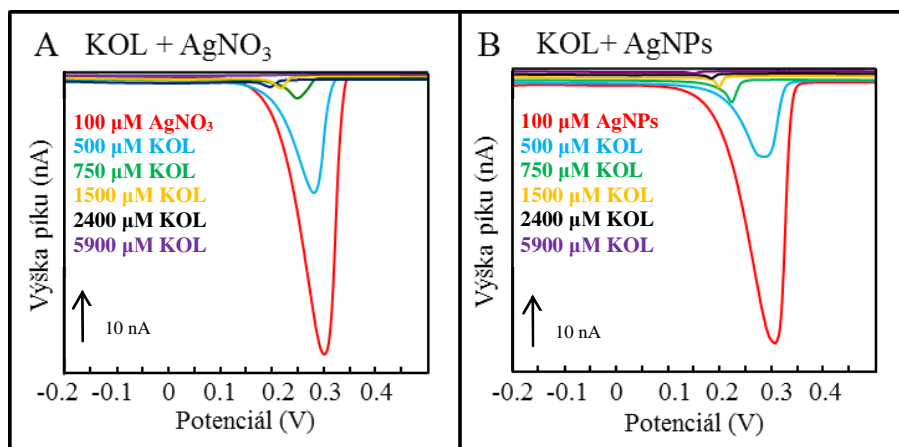
4.2.1 Elektrochemická stanovení

Cílem této studie bylo, určit zdali při interakci polymerních látek s kovem dochází k tvorbě komplexu. Elektrochemická stanovení byla prováděna pomocí metody diferenční pulzní voltametrie, jako pracovní elektroda byla použita pastová elektroda plněná expandovaným uhlíkem. Docházelo k titraci roztoku dusičnanu stříbrného (AgNO_3) a stříbrných nanočástic (AgNPs), v 5 minutových intervalech byla přidávána kyselina hyaluronová (HA), kolagen (KOL) nebo chitosan (CHIT).



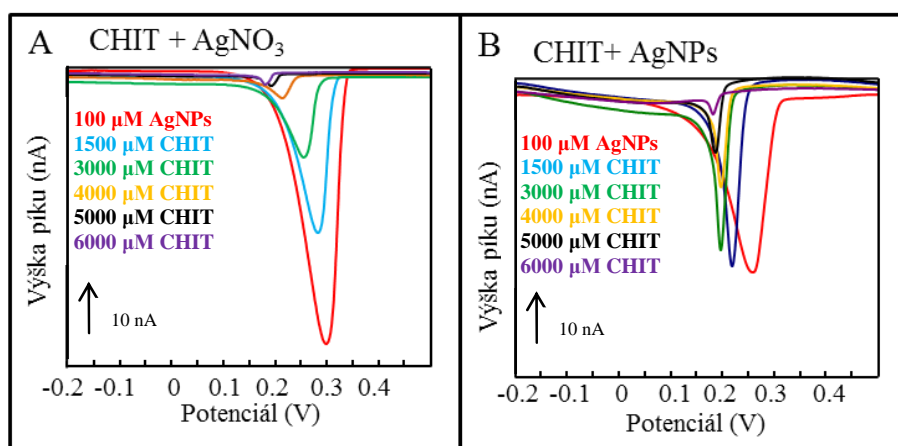
Obrázek 6: Elektrochemická analýza interakce HA s AgNO_3 a AgNPs. Varianta A – AgNO_3 (100 μM), HA (500; 1000; 2000; 4000 a 6000 μM). Varianta B – AgNPs (100 μM), HA (500; 1000; 2000; 4000 a 6000 μM).

Prvním studovaným komplexem v našem experimentu byla kyselina hyaluronová v kombinaci s dusičnanem stříbrným (6A) a nanočásticemi stříbra (6B) o koncentracích 100 μM . Po 5 minutovém míchání vzorku byl stanoven u každé varianty komplexu signál pomocí DPV a bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací kyseliny hyaluronové dochází k poklesu signálu, jak u komplexů kyseliny hyaluronové s dusičnanem stříbrným, tak u komplexů kyseliny hyaluronové s nanočásticemi stříbra. Nejvyšší koncentrace kyseliny hyaluronové v komplexu s dusičnanem stříbrnými a stříbrnými nanočásticemi byla stanovena na 6000 μM . Zároveň bylo měřením zjištěno, že se zvyšující se koncentrací kyseliny hyaluronové dochází k posunu signálu. V případě komplexů kyseliny hyaluronové s dusičnanem stříbrným se signál posouval z potenciálu 0,30 V až do potenciálu 0,19V a u komplexu HA s AgNPs docházelo k posunu z potenciálu 0,27 V až do potenciálu 0,19V.



Obrázek 7: Elektrochemická analýza interakce KOL s AgNO_3 a AgNPs. Varianta A – AgNO_3 (100 μM), KOL (500; 750; 1500; 2400 a 5900 μM). Varianta B – AgNPs (100 μM), KOL (500; 750; 1500; 2400 a 5900 μM).

Následovalo stanovení tvorby komplexů kolagenu s dusičnanem stříbrným (7A) a nanočásticemi stříbra (7B). V průběhu interakce docházelo u obou variant ke snížení a posunu píku do záporného potenciálu. Varianta kolagen s dusičnanem stříbrným vykazovala razantnější snížení píku od koncentrace 750 μM . U varianty obsahující dusičnan stříbrný probíhalo stanovení od koncentrace 500 μM do konečné koncentrace 5900 μM , byl zaznamenán posun potenciálu z 0,3 V do 0,21 V. U vzorku stříbrných nanočástic s kolagenem bylo prováděno stanovení od koncentrace kolagenu 500 μM až po koncentraci 5900 μM , posun potenciálu začínal v hodnotě 0,27 V a končil v potenciálu 0,21 V.

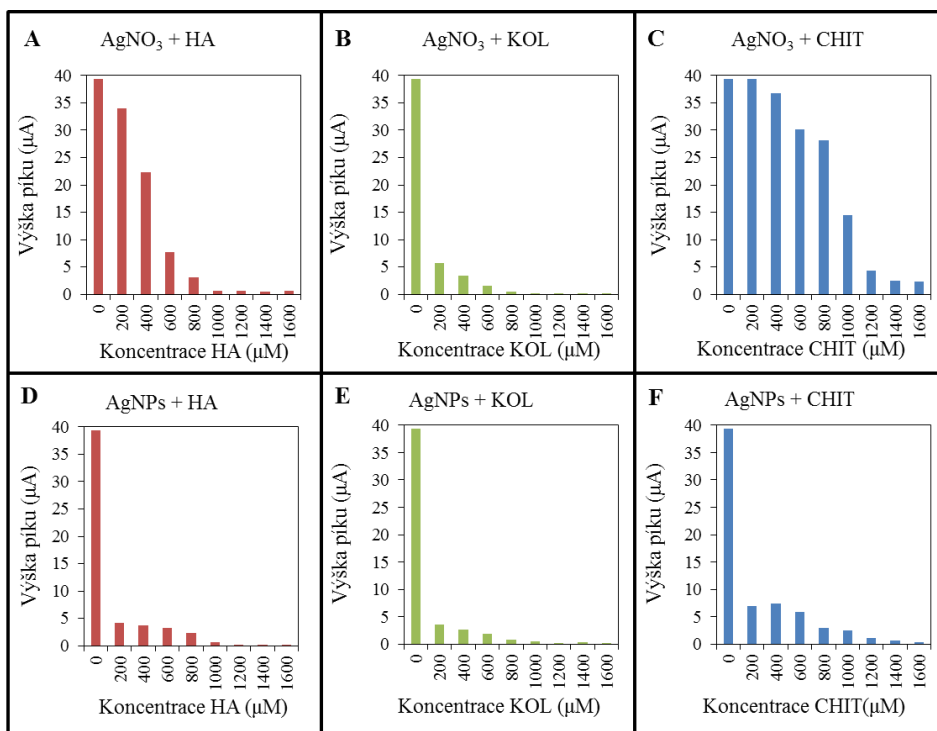


Obrázek 8: Elektrochemická analýza interakce CHIT s AgNO_3 a AgNPs. Varianta A – AgNO_3 (100 μM), CHIT (1500; 3000; 4000; 5000 a 6000 μM). Varianta B – AgNPs (100 μM), CHIT (1500; 3000; 4000; 5000 a 6000 μM).

Koncentrace chitosanu se pohybovala u varianty s dusičnanem stříbrným (8A) v rozmezí 1500 μM na začátku titrace až 6000 μM na konci titrace. Rozpětí koncentrací

u komplexu s nanočásticemi stříbra (8B) bylo 1500 μM na začátku a 6000 μM na konci titrace. Změna potenciálu obou sledovaných vzorků se v průběhu přidávání chitosanu projevila snížením píku a posunutím celého signálu směrem k 0. Konkrétně byla změna potenciálu varianty s dusičnanem stříbrným zaznamenána z 0,3 V do 0,18 V. Hodnota potenciálu varianty se stříbrnými nanočásticemi činila na počátku měření 0,27 V a na konci dosahovala 0,17 V.

Ze stanovených výsledků vyplývá, že v každém z šesti případů, kdy dochází k interakci mezi dusičnanem stříbrným nebo stříbrnými nanočásticemi s polymerními látkami vzniká komplexní látka. Vznik komplexů lze pozorovat na obrázcích 9, 10, 11 a také na sumárním obrázku číslo 9. Lze konstatovat, že již při nejnižších koncentracích probíhala tvorba u variant se stříbrnými nanočásticemi.



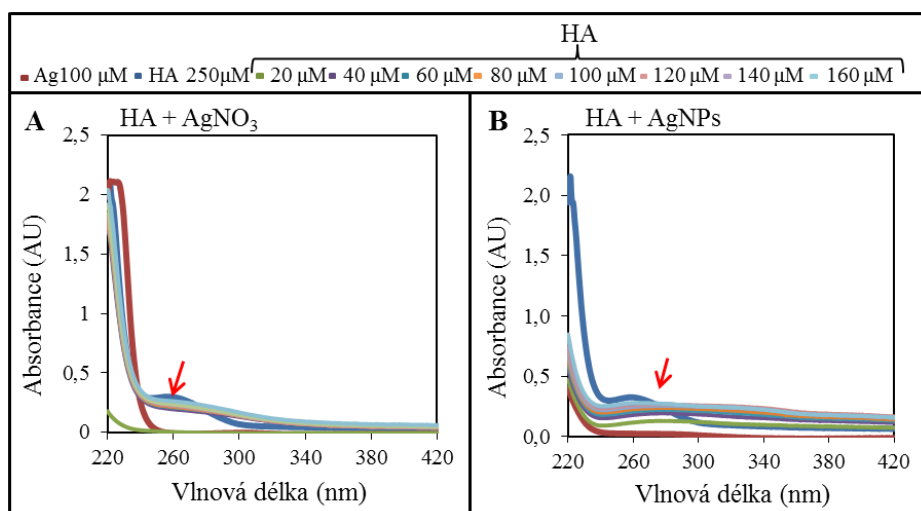
Obrázek 9: Znázornění výšek píků z elektrochemického stanovení. Koncentrace AgNO₃ a AgNPs činila 100 μM . Polymerní látky o koncentracích (0; 200; 400; 600; 800; 1000; 1200; 1400 a 1600 μM).

Na obrázku číslo 9 jsou znázorněny výsledky z elektrochemického stanovení, sloupce v grafu znázorňují výšky jednotlivých píků v průběhu testu. Veškerá použitá data byla přepočítána pro odstranění zkreslení způsobeného ředěním, k jakému docházelo přidáváním polymerní látky. Tyto údaje také udávají schopnost, při jakém množství polymerní látky se tvoří komplex mezi dusičnanem stříbrným nebo stříbrnými nanočásticemi a polymerní látkou. Ve všech pozorovaných variantách komplexů

docházelo k tvorbě komplexů. K nejrychlejším interakcím docházelo u varianty dusičnanu stříbrného s kolagenem. Naopak k nejpomalejší tvorbě komplexu docházelo u kombinace dusičnanu stříbrného s chitosanem.

4.2.2 Spektrofotometrická stanovení

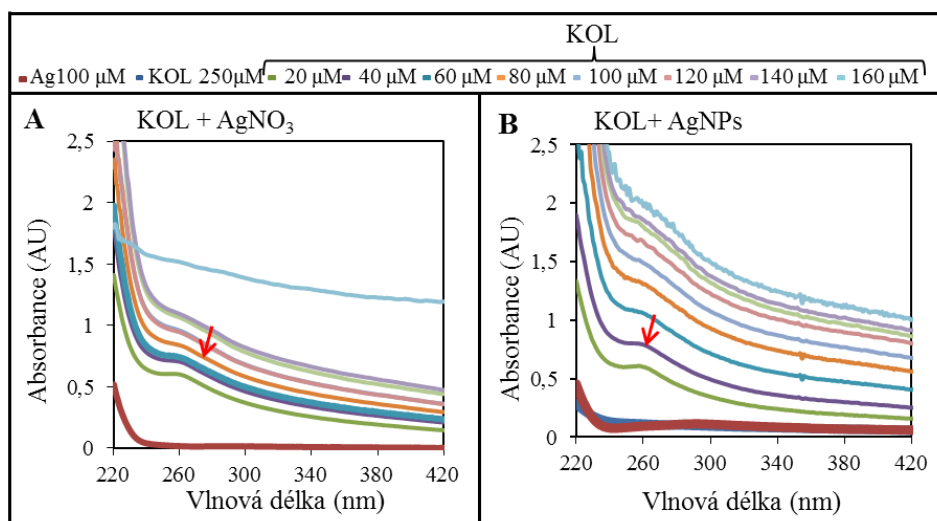
Spektrofotometrická stanovení měla za cíl detekovat tvorbu komplexu na základě pozorování signálů v různých vlnových délkách. Stanovení byla prováděna v rozmezí vlnových délek $\lambda = 200 - 700$ nm. Vzorek byl složen z vodného roztoku dusičnanu stříbrného nebo stříbrných nanočástic ($100 \mu\text{M}$), a po každém měření bylo přidáno $20 \mu\text{l}$ 1% polymerní látky kyseliny hyaluronové, kolagenu nebo chitosanu. Měření probíhalo v 5 minutových intervalech, kdy byl vzorek v mezičase míchán za účelem uskutečnění interakce obou látek. Dusičnan stříbrný se detekuje ve vlnové délce 300 nm. Spektrofotometrickým stanovením stříbrných nanočástic získáme signál při vlnové délce 310 nm. Kyselina hyaluronová dává signál v UV oblasti a to při vlnové délce 267 nm. Při detekci samotného kolagenu a chitosanu nebyl stanoven zřetelný signál.



Obrázek 10: Spektrofotometrická analýza interakce HA s AgNO_3 (A), HA s AgNPs (B). Koncentrace AgNO_3 byla $100 \mu\text{M}$, koncentrace HA činila 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140 a $160 \mu\text{M}$. Samotná HA o koncentraci $250 \mu\text{M}$. Tvorba komplexu AgNO_3 s HA při 260 nm (A) a AgNPs s HA při 270 nm (B) – červená značka. 25°C , $\lambda = 220\text{-}420$ nm.

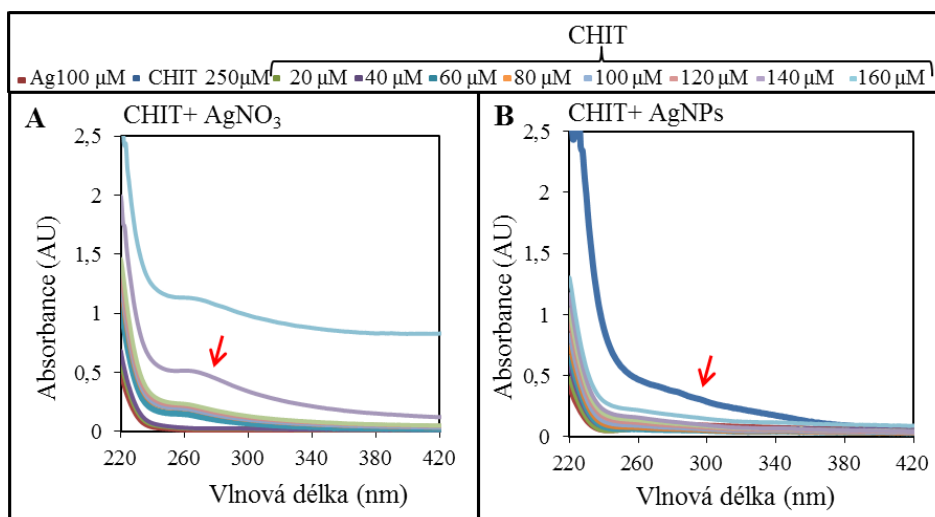
Prvním komplexem zkoumaným spektrofotometricky za účelem zjištění tvorby komplexu byla kombinace dusičnanu stříbrného (10A) a stříbrných nanočástic (10B) v kombinaci s kyselinou hyaluronovou. Při interakci kyseliny hyaluronové s dusičnanem stříbrným (10A) docházelo k tvorbě komplexu látek, signál komplexu se

nacházel při vlnové délce 260 nm (červená značka). Interakce nanočástic stříbra s kyselinou hyaluronovou (10B) tvořila komplex ve vlnové délce 275 nm (červená značka).



Obrázek 11: Spektrofotometrická analýza interakce KOL s AgNO₃ (A), HA s AgNPs (B). Koncentrace AgNO₃ byla 100 μM, koncentrace KOL činila 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140 a 160 μM. Samotný KOL o koncentraci 250 μM. Tvorba komplexu AgNO₃ s KOL při 268 nm (A) a AgNPs s KOL při 254 nm (B) – červená značka. 25 °C, λ= 220-420 nm.

Při interakci kolagenu s dusičnanem stříbrným (11A) docházelo k tvorbě komplexu těchto látek, signál tohoto komplexu se nacházel při vlnové délce 268 nm (červená značka). Nanočástice stříbra s kolagenem (11B) tvořily komplexní látku, jejíž signál byl detekován při vlnové délce 254 nm (červená značka). Kvůli vlastnostem kolagenu, jehož vyšší koncentrace dosahovaly při měření až hodnot 2 AU, byl vzorek rozředěn a následně přepočten pro lepší srovnání s výsledky ostatních variant.



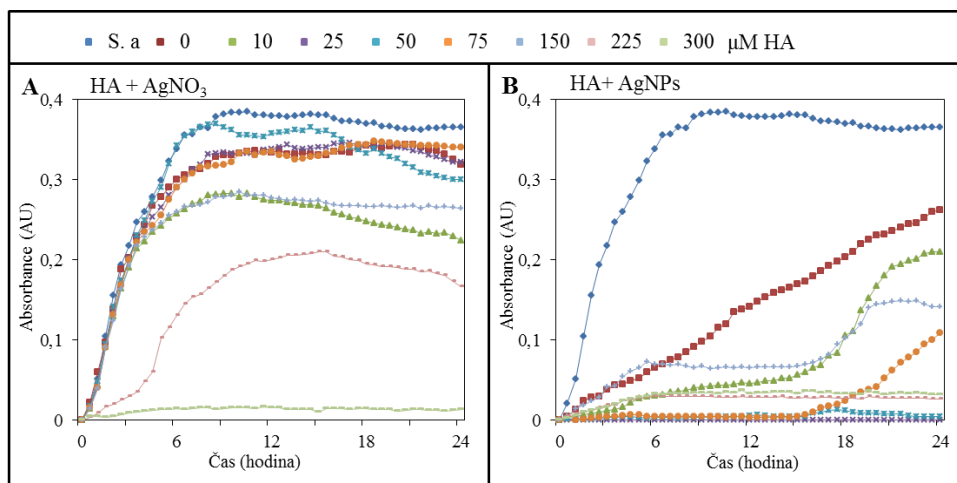
Obrázek 12: Spektrofotometrická analýza interakce CHIT s AgNO₃ (A), CHIT s AgNPs (B). Koncentrace AgNO₃ byla 100 μM, koncentrace CHIT činila 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140 a 160 μM. Samotný CHIT o koncentraci 250 μM. Tvorba komplexu AgNO₃ s CHIT při 279 nm (A) a AgNPs s CHIT při 295 nm (B) – červená značka. 25 °C, λ= 220-420 nm.

Posledními zkoumanými komplexy byly kombinace dusičnanu stříbrného s chitosanem (12A) a nanočásticemi stříbra s chitosanem (12B). Tvorba komplexu byla u varianty dusičnanu stříbrného s chitosanem stanovena při vlnové délce 279 nm (červená značka). Komplex stříbrných nanočástic s chitosanem byl stanoven při vlnové délce 295 nm (červená značka). Kvůli vlastnostem kolagenu, jehož vyšší koncentrace dosahovaly při měření až hodnot 2 AU, byl vzorek rozředěn a následně přepočten pro lepší srovnání s výsledky ostatních variant.

4.2.3 Metoda růstových křivek

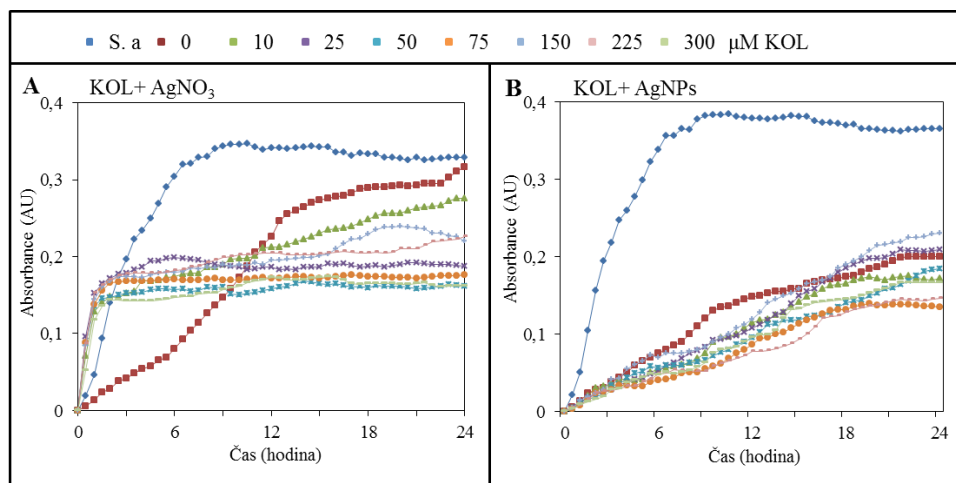
Princip metody růstových křivek spočívá ve stanovování počtu buněk organismu v čase, následně jsou tato data vyhodnocena pomocí spojnicového grafu. V předložených výsledcích byla stanovována antimikrobiální aktivita pozorovaných forem stříbra dusičnanu stříbrného (AgNO_3) a stříbrných nanočástic (AgNPs) s polymerními látkami kyselinou hyaluronovou (HA), kolagenem (KOL) a chitosanem (CHIT). Test byl prováděn na kultuře grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*. Stanovení počtu buněk probíhalo pomocí spektrofotometru na základě hodnoty absorbance jednotlivých jamek mikrotitrační destičky. Hodnota absorbance odpovídala přímo úměrně počtu buněk, čím vyšší byla stanovena, tím vyšší počet buněk byl obsažen v jamce. Dále byly vyhodnoceny hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) což je hodnota, při které začíná inhibice růstu oproti běžnému růstu bakterie a totální inhibiční koncentrace (TIC) jako koncentrace, při které je růst bakterie úplně zastaven, tudíž je kultura usmrcena.

Obrázek 13A zobrazuje vliv kombinací kyseliny hyaluronové s dusičnanem stříbrným. U kombinace s dusičnanem stříbrným je zřetelný růst u všech koncentrací kyseliny hyaluronové, který se svým průběhem i počtem buněk kopíruje růst čisté kultury bez příměsi testovaných látek. Počet buněk je srovnatelný, od 6 hodiny nižší. K významnému poklesu počtu buněk, dochází u koncentrací 150 – 300 μM , výjimkou je koncentrace 10 μM , jež kopíruje křivku koncentrace 150 μM do 15. hodiny, kdy počet buněk klesá k absorbanci 0,234 AU. Koncentrace 150 μM byla také stanovena, jako MIC. Koncentrace 300 μM vykazuje růst kultury do 3 hodiny a následně dochází k inhibici dalšího růstu kultury až do konce testu, tato koncentrace vykazovala ze všech kombinací nejvyšší antimikrobiální aktivitu.



Obrázek 13: Růst kultury *Staphylococcus aureus* za působení komplexů HA s AgNO₃ (A) a HA s AgNPs (B). Koncentrace AgNO₃ činila 300 μM , AgNPs 250 μM a koncentrační řada HA 0; 10; 25; 50; 75; 150; 225 a 300 μM . Varianta 0 obsahovala pouze stříbro, varianta S. a obsahovala pouze kulturu *Staphylococcus aureus*, sloužila jako kontrola. Expozice kultury vůči komplexům probíhala 24 hodin při 37 °C, měřeno při vlnové délce 620 nm.

Obrázek 13B znázorňuje vliv různých koncentrací kyseliny hyaluronové v kombinaci s nanočásticemi stříbra na bakteriální kulturu. Varianta obsahující pouze nanočástice stříbra vykazuje razantní pokles oproti kontrolní kultuře *Staphylococcus aureus*. Koncentrace 10 μM byla stanovena jako MIC. Křivky znázorňující látky obsahující kyselinu hyaluronovou o koncentraci 10 a 150 μM mají téměř shodný průběh i počet buněk, s tím, že v 18. hodině dochází k zastavení růstu varianty 150 μM . Koncentrace 225 a 300 μM vykazují růst buněk do 5. hodiny měření, a poté dochází k úplné inhibici kultury, koncentrace 75 μM nevykazuje známky množení až do 15. hodiny testu, následně došlo k mírnému růstu kultury. Varianta obsahující 25 μM kyseliny hyaluronové vykazuje absolutní inhibiční efekt od času 0 do 24 hodin. Při porovnání grafů 13A a 13B je patrná vyšší antimikrobiální aktivita právě u kombinací obsahujících nanočástice stříbra. U varianty AgNPs s HA byla koncentrace MIC stanovena 10 μM , zde dochází k razantnímu omezení růstu kultury, naproti tomu hodnota MIC pro kombinaci AgNO₃ s HA byla stanovena na 150 μM . K úplné inhibici kultury u kombinace AgNO₃ s HA nedocházelo, blíží se jí pouze u varianta 300 μM , naproti tomu kyselina hyaluronová v kombinaci se stříbrnými nanočásticemi a 50 μM TIC dosahuje.



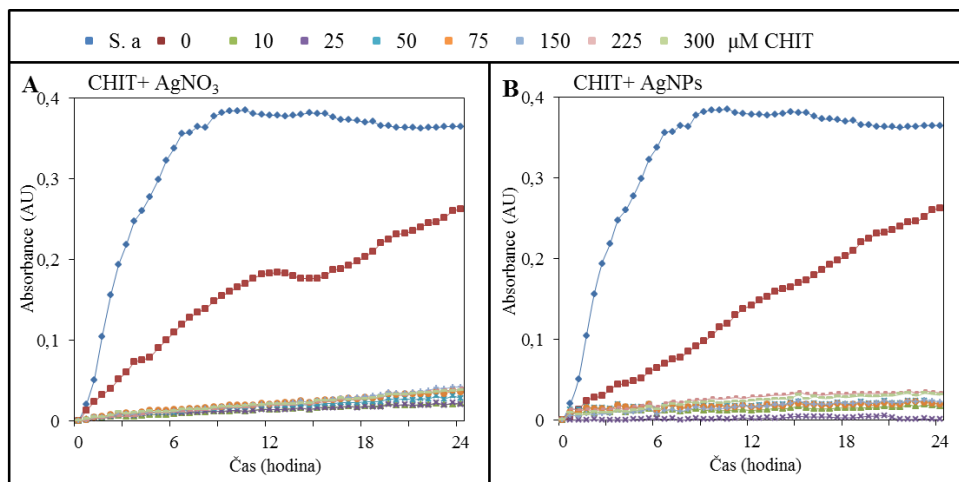
Obrázek 14: Růst kultury *Staphylococcus aureus* za působení komplexů KOL s AgNO₃ (A) a KOL s AgNPs (B). Koncentrace AgNO₃ činila 300 μM , AgNPs 250 μM a koncentrační řada KOL 0; 10; 25; 50; 75; 150; 225 a 300 μM . Varianta 0 obsahovala pouze stříbro, varianta S. a obsahovala pouze kulturu *Staphylococcus aureus*, sloužila jako kontrola. Expozice kultury vůči komplexům probíhala 24 hodin při 37 °C, měřeno při vlnové délce 620 nm.

Obrázek 14A ukazuje průběh růstu bakteriální kultury ovlivněné kombinací látek dusičnanu stříbrného a kolagenu. Testovací kultura s příměsí dusičnanu stříbrného bez kolagenu vykazuje v prvních 9 hodinách výrazně větší inhibiční efekt oproti variantám obsahujícím kolagen. Veškeré varianty kombinující dusičnan stříbrný a kolagen, mají téměř identický x růst v první hodině testu. Koncentrace 10 μM se v 12. hodině odlišuje od průběhu růstu ostatních koncentrací a dochází ke zvýšení růstu kultury. Nejvyšší antimikrobiální aktivitou disponují varianty AgNO₃ s KOL o koncentracích 50, 75 a 300 μM . MIC byla stanovena od koncentrace 50 μM . V důsledku neustálého růstu kultury, nebyla žádná z koncentrací vyhodnocena jako totální inhibiční. Na obrázku 14B je znázorněno působení nanočástic stříbra v kombinaci s kolagenem na bakteriální kulturu *Staphylococcus aureus*. Varianta obsahující pouze samotné stříbrné nanočástice vykazuje podobný průběh růstu jako ostatní kombinace obsahující různé koncentrace kolagenu.

Do první hodiny testu, je růst kultur téměř identický, MIC byla stanovena od koncentrace 10 μM . Vůbec nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazovaly koncentrace 75 a 225 μM , které v 24. hodině testu dosahovali hodnoty absorbance 1,36 AU. TIC nebylo možné určit v důsledku nedostatečné antimikrobiální aktivity látek a zachování poměrně aktivního růstu kultury.

Při porovnání grafů 14A a 14B je patrná vyšší antimikrobiální aktivita kolagenu v kombinaci se stříbrnými nanočásticemi, zároveň zde není výrazný rozdíl mezi působením samotného stříbra a kombinací stříbra s kolagenem, tento jev je patrný

především u varianty se stříbrnými nanočásticemi (14B). Vyšší antimikrobiální aktivita stříbrných nanočástic je pozorována především v průběhu mezi 0. až 15. hodinou, na konci měření dosahovala hodnota počtu buněk ekvivalentní hodnoty. Žádná z testovaných variant nezpůsobila totální inhibici kultury.



Obrázek 15: Růst kultury *Staphylococcus aureus* za působení komplexů CHIT s AgNO₃ (A) a CHIT s AgNPs (B). Koncentrace AgNO₃ 300 μM , AgNPs 250 μM a koncentrační řada CHIT 0; 10; 25; 50; 75; 150; 225 a 300 μM . Varianta 0 obsahovala pouze stříbro, varianta S. a obsahovala pouze kulturu *Staphylococcus aureus*, sloužila jako kontrola. Expozice kultury vůči komplexům probíhala 24 hodin při 37 °C, měřeno při vlnové délce 620 nm.

V průběhu testu (15A) antimikrobiální aktivity dusičnanu stříbrného s chitosanem byl inhibiční efekt samotného stříbra výrazně nižší než v kombinaci s chitosanem. MIC byla stanovena od 10 μM . Koncentrace v rozmezí 10 – 300 μM vykazovaly stejný průběh růstu, shodoval se i počet buněk, a to s hodnotami v rozmezí 0,021 – 0,042 AU, u této kombinace nebyla stanovena TIC.

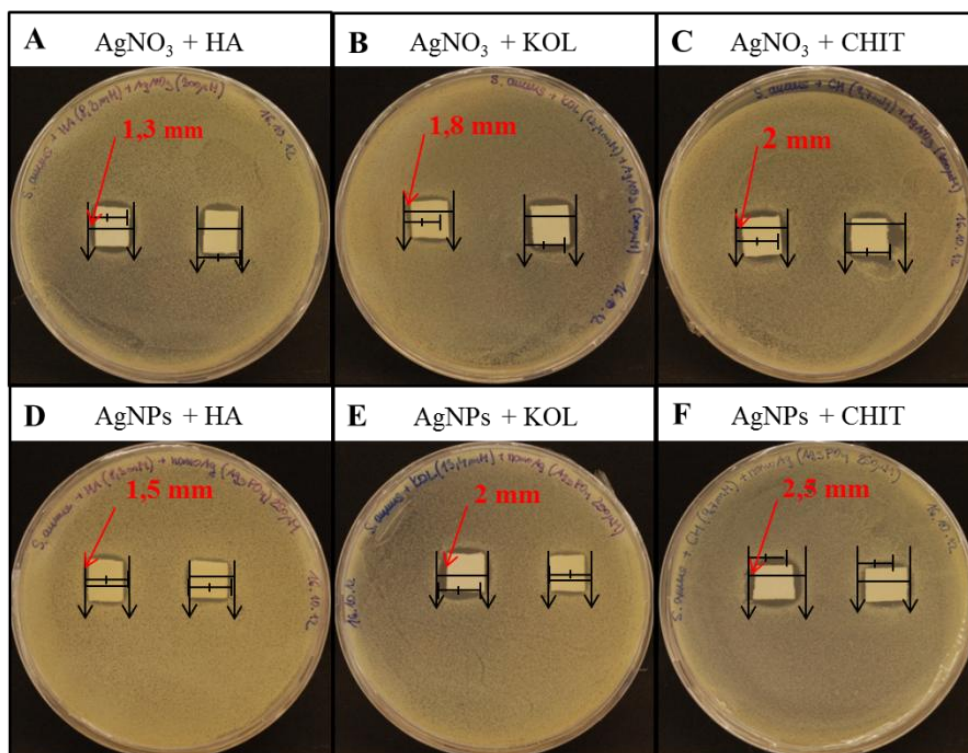
Průběh růstu varianty obsahující nanočástice stříbra (15B) byl lineární, koncentrace v rozmezí 10 – 300 μM vykazují stejný průběh růstu s rozdílem počtu buněk. Minimální inhibiční koncentrace byla stanovena od 10 μM . Varianta zkoumané látky s obsahem chitosanu o koncentraci 25 μM vykazovala nejvyšší antimikrobiální účinky, kdy nebyl zaznamenán žádný růst kultury, proto byla tato varianta určena jako TIC.

Při porovnání variant 15A a 15B je zřejmá vysoká antimikrobiální aktivita obou variant, s rozdílem kombinace nanočástic stříbra s chitosanem o koncentraci 25 μM , která splňovala podmínky (TIC). Komplexy obsahující chitosan disponují výrazně vyšší antimikrobiální aktivitou, než ostatní pozorované látky. Kombinace chitosanu se stříbrnými nanočásticemi dosahuje nejvyššího antimikrobiálního efektu.

4.2.4 Metoda inhibičních zón

Cílem této metody bylo stanovit antimikrobiální aktivitu sledovaných komplexů. Princip metody spočívá v působení komplexu na bakteriální kulturu *Staphylococcus aureus*. Byla připravena Petriho miska, na kterou byl nanesen LB agar, živná půda vytvářející bakteriím vhodné prostředí pro růst. Na LB agar byla rovnoměrně aplikována kultura *Staphylococcus aureus*, do středu Petriho misky byly umístěny dva vzorky textilie z materiálu určeného pro vývoj cévní náhrady, tyto vzorky byly napuštěny zkoumanými komplexy. V průběhu kultivace působily sledované komplexy na kulturu, jak v místě vzorku textilie, tak v jejím okolí. Stanovením rozsahu inhibiční aktivity v okolí čtverečků byla zjištěna antimikrobiální aktivita daných komplexů. Tyto údaje byly mezi sebou navzájem porovnány a následně vyhodnoceny. Výsledky tohoto testu byly porovnány s výsledky metody růstových křivek.

U testu inhibičních zón bylo ve variantě kyseliny hyaluronové s dusičnanem stříbrným (16A) dosaženo inhibiční zóny o rozměru 1,3 mm. Působením komplexu kolagenu a dusičnanu stříbrného (16B) vznikla zóna, v níž byla inhibována kultura *Staphylococcus aureus* o velikosti 1,8 mm. Komplex dusičnanu stříbrného s chitosanem (16C) vytvořil na Petriho misce inhibiční zónu 2 mm. Právě varianta pracující s komplexem dusičnanu stříbrného a chitosanu vytvořila vůbec největší inhibiční zónu mezi všemi variantami obsahujícími dusičnan stříbrný. Kyselina hyaluronová v kombinaci s nanočásticemi stříbra (16D) dosahovala inhibiční zóny o velikosti 1,5 mm. Komplex kolagenu se stříbrnými nanočásticemi (16E) vykazoval inhibiční zónu o velikosti 2 mm. Varianta stříbrných nanočástic s chitosanem (16F) vytvářela v kultuře *Staphylococcus aureus* inhibiční zónu, jejíž rozměr dosahoval 2,5 mm. Kombinace chitosanu s nanočásticemi stříbra byla vyhodnocena, jako nejúčinnější mezi všemi ostatními variantami obsahujícím, jak dusičnan stříbrný, tak stříbrné nanočástice. Výsledky testu prokázaly vyšší antimikrobiální aktivitu variant obsahujících nanočástice stříbra. Vždy byly srovnány stejné polymerní látky s rozdílnými formami stříbra.



Obrázek 16: Působení komplexů AgNO₃ a AgNPs v kombinaci s polymerními látkami na kulturu *Staphylococcus aureus*. Koncentrace stříbra činily 300 μM AgNO₃ a 250 μM AgNPs, polymerní látky 8,3 mM HA, 13,4 mM KOL a 9,7 mM CHIT. Kultivace probíhala 24 hodin při 37 °C v termoboxu. Velikosti zón činily u komplexu AgNO₃ s HA 1,3 mm, AgNO₃ s KOL 1,8 mm, AgNO₃ s CHIT 2 mm, AgNPs s HA 1,5 mm, AgNPs s KOL 2 mm a AgNPs s CHIT 2,5 mm.

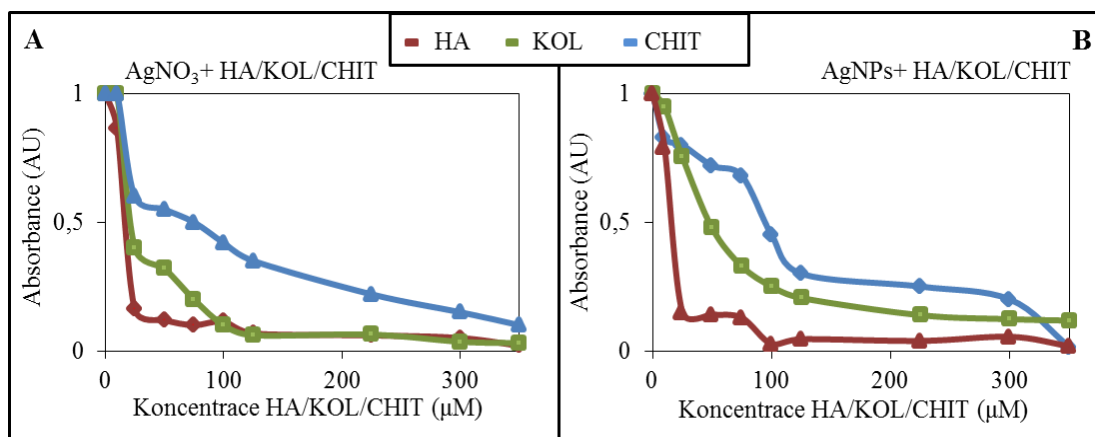
4.2.5 Stanovení toxicity komplexů pro fibroblasty

Vysoká antimikrobiální aktivita látky je při vyhodnocení nejlepšího komplexu pro účely transplantační chirurgie jedním z hlavních aspektů, ale zároveň nesmí být komplex toxický pro lidské fibroblasty, tudíž pro člověka samotného. Proto byl proveden test (MTT test) k vyhodnocení cytotoxicity sledovaných komplexů. Tento test je založen na principu redukce žlutého rozpustného 3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan. Reakce probíhala na mitochondriální membráně živých buněk. Po přidání silného detergentu se formazan rozpustil, vzniklý barevný roztok se poté kvantitativně vyhodnotil spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk. Pro účely testování byla zvolena koncentrace 8000 buněk na 200 μl média. Pro testování toxicity vůči fibroblastům byly použity lidské předkožkové fibroblasty (HFF). Po kultivaci bylo provedeno spektrofotometrické stanovení a hodnoty absorbance byly

převedeny na procento viability buněk a sestavil se graf závislosti aktivity buněk na koncentraci cytostatika. Hodnota IC₅₀ byla stanovena pomocí lineární regrese pro všechny varianty. IC₅₀ je střední inhibiční koncentrace, při dosažení této koncentrace dochází k úmrtí 50 % buněk. Cytotoxický účinek je vyjadřován jako procento cytotoxicity, které se vypočítá podle vztahu:

$$\text{cytotoxicita \%} = \left(\frac{Avz}{Ak} \right) * 100$$

kde *Avz* je absorbance buněk s daným komplexem a *Ak* je absorbance kontroly s rozpouštědlem (k buňkám bylo přidáno rozpouštědlo bez komplexu).



Obrázek 17: Výsledky MTT testu varianty AgNO₃ s HA, KOL a CHIT (A). Varianty AgNPs s HA, KOL a CHIT(B). AgNO₃, AgNPs o koncentracích 100 µM, polymerní látky HA, KOL, CHIT o koncentraci 100 µM. Na HFF bylo působeno sledovanými komplexy 48 hodin, v prostředí CO₂ boxu, 37 °C, stanoveno při 570 nm.

Obrázek 17A demonstruje působení komplexů kyseliny hyaluronové, kolagenu a chitosanu s dusičnanem stříbrným na buněčnou linii lidských předkožkových fibroblastů (HFF), ze stanovených dat byly stanoveny střední letální koncentrace, nejvyšší toxicitou působí komplex obsahující dusičnan stříbrný a kyselinu hyaluronovou, IC₅₀ činila 25,4 µM. Tato kombinace zároveň vykazuje nejvyšší toxicitu ze všech látek. Komplex kolagenu s dusičnanem stříbrným vykazuje střední letální dávku v koncentraci 30,2 µM. Varianta s nejnižší toxicitou pro eukaryotické buňky v rámci komplexů složených z polymerní látky a dusičnanu stříbrného byl komplex chitosanu s AgNO₃. Na obrázku 17B jsou zaznamenány výsledky působení pozorovaných komplexů (AgNPs s HA, AgNPs s KOL a AgNPs s CHIT) na lidské předkožkové fibroblasty. Nejvyšší hodnoty letální koncentrace byly stanoveny u kombinace kyseliny hyaluronové s nanočásticemi stříbra 28,54 µM. Tato hodnota je však nižší v porovnání s variantou komplexu kyseliny hyaluronové s dusičnanem stříbrným. Komplex stříbrných nanočástic s kolagenem dosahuje hodnoty

IC₅₀ = 50,8 μM, tato hodnota je téměř dvojnásobná oproti komplexu kolagenu s dusičnanem stříbrným. Chitosan v kombinaci se stříbrnými nanočásticemi dosahoval hodnoty střední letální koncentrace v 101,55 μM. Právě varianta chitosanu s nanočásticemi stříbra byla shledána jako vůbec nejméně toxická ze všech testovaných komplexů. Komplexy obsahující stříbrné nanočástice disponovaly ve všech variantách nižším hodnotou IC₅₀ než komplexy obsahující dusičnan stříbrný.

5 Závěr

Cílem této studie bylo charakterizovat komplex vhodný pro pokrytí umělého cévního implantátu. Na komplexní sloučeninu byly kladeny specifické nároky. Primárně se jedná o trvajících antimikrobiální účinek, díky kterému budou vyloučeny jakékoliv projevy infekce v době rekonvalescence. Dále minimální míra toxicity komplexu pro eukaryotické buňky a vysoká úroveň biokompatibility, díky níž by proběhlo přijetí umělého cévního implantátu bez komplikací.

Jako látky, účastníci se tvorby komplexu, byly vybrány stříbrné nanočástice a dusičnan stříbrný, které vynikají svojí mimořádnou antimikrobiální aktivitou. Pro tvorbu komplexu s těmito formami stříbra byly zvoleny látky polymerního charakteru, kyselina hyaluronová, kolagen a chitosan, které jsou plně biodegradabilní a biokompatibilní, jsou u nich pozorovány antimikrobiální účinky a jejich polymerní struktura zajišťuje vhodný vazebný prostor pro stříbrné nanočástice nebo dusičnan stříbrný. Tyto látky vždy ve variantě stříbro s kyselinou hyaluronovou, kolagenem nebo chitosanem byly zkoumány z hlediska interakce tvorby komplexu mezi sebou, z hlediska míry antimikrobiálního efektu a míry toxicity vůči eukaryotickým buňkám.

Tvorba komplexů stříbrných částic s kyselinou hyaluronovou, kolagenem nebo chitosanem byla studována elektrochemicky metodou diferenční pulzní voltametrie a spektrofotometricky při postupné interakci látek. Antimikrobiální aktivita komplexů byla zkoumána na bakteriální kultuře *Staphylococcus aureus* metodami růstových křivek a inhibičních zón. Při stanovení toxicity vůči eukaryotickým buňkám byla sledována viabilita buněk v různých koncentracích komplexů pomocí MTT testu a následně vyhodnocena střední letální koncentrace.

Komplex nanočástic s chitosanem byl vyhodnocen, jako ideální varianta pro naše účely. Tvorba tohoto komplexu probíhala již při nízkých koncentracích chitosanu, výsledky elektrochemických stanovení korelují se závěry spektrofotometrických metod a potvrzují vzájemně dobrou interakci a tvorbu komplexu. Komplex disponuje mimořádnými antimikrobiálními účinky, tyto účinky byly řádově vyšší než u ostatních zkoumaných variant. Kombinace těchto dvou látek byla shledána, i přes svoji výjimečnou antimikrobiální aktivitu, jako netoxická pro lidský organismus.

Výsledky uvedené v této studii budou použity při vývoji materiálu umělé cévní náhrady. Konkrétně se jedná o modifikaci povrchu materiálu látkou, který zajistí

bezproblémové přijetí implantátu lidským tělem a ochranu před infekcí díky antimikrobiální aktivitě komplexu. Námi nabízené řešení boje s bakteriálními infekcemi pomocí komplexů polymerních látek s nanočásticemi kovu je univerzální. V některých případech je možné těmito komplexy nahradit antibiotika, která při léčbě vykazují negativní vedlejší účinky. Uvedené výsledky budou použity v článku *Antimicrobial polymers* a budou sloužit jako porovnání pro studie obdobného charakteru.

6 Použitá literatura

- ALARCON, E. I.; UDEKWU, K.; SKOG, M.; PACIONI, N. L.; STAMPLECOSKIE, K. G.; GONZALEZ-BEJAR, M.; POLISETTI, N.; WICKHAM, A.; RICHTER-DAHLFORS, A.; GRIFFITH, M.; SCAIANO, J. C. The biocompatibility and antibacterial properties of collagen-stabilized, photochemically prepared silver nanoparticles. *Biomaterials*, 2012, roč. 33. č. 19, s. 4947-4956. ISSN 0142-9612.
- ALEXANDER, J. W. History of the Medical Use of Silver. *Surgical Infections*, 2009, roč. 10. č. 3, s. 289-292. ISSN 1096-2964.
- BARNETTE, D.; HART, M. Effect of SigB transcriptional regulators in hyaluronidase regulation in *Staphylococcus aureus*. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 2011, roč. 241. č., s. ISSN 0065-7727.
- BASTOW, E. R.; BYERS, S.; GOLUB, S. B.; CLARKIN, C. E.; PITSILLIDES, A. A.; FOSANG, A. J. Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, roč. 65. č. 3, s. 395-413. ISSN 1420-682X.
- BECKER, L. C.; BERGFELD, W. F.; BELSITO, D. V.; KLAASSEN, C. D.; MARKS, J. G.; SHANK, R. C.; SLAGA, T. J.; SNYDER, P. W.; ANDERSEN, F. A.; COSMETIC INGREDIENT REVIEW, E. Final Report of the Safety Assessment of Hyaluronic Acid, Potassium Hyaluronate, and Sodium Hyaluronate. *International Journal of Toxicology*, 2009, roč. 28. č., s. 5-67. ISSN 1091-5818.
- CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2013, roč. 53. č. 1, s. 11-48. ISSN 1040-8398.
- COWIN, S. C. How is a tissue built? *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme*, 2000, roč. 122. č. 6, s. 553-569. ISSN 0148-0731.
- COWIN, S. C. Tissue growth and remodeling. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2004, roč. 6. č., s. 77-107. ISSN 1523-9829.
- COX, G. N. Molecular and biochemical aspects of nematode collagens. *Journal of Parasitology*, 1992, roč. 78. č. 1, s. 1-15. ISSN 0022-3395.

- CSOKA, L.; BOZANIC, D. K.; NAGY, V.; DIMITRIJEVIC-BRANKOVIC, S.; LUYT, A. S.; GROZDITS, G.; DJOKOVIC, V. Viscoelastic properties and antimicrobial activity of cellulose fiber sheets impregnated with Ag nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 2012, roč. 90. č. 2, s. 1139-1146. ISSN 0144-8617.
- DUKIC, V. M.; LAUDERDALE, D. S.; WILDER, J.; DAUM, R. S.; DAVID, M. Z. Epidemics of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: A Meta-Analysis. *Plos One*, 2013, roč. 8. č. 1, s. ISSN 1932-6203.
- EVANKO, S. P.; WIGHT, T. N. Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1999, roč. 47. č. 10, s. 1331-1341. ISSN 0022-1554.
- GARBACZ, K.; ZARNOWSKA, S.; PIECHOWICZ, L.; HARAS, K. Staphylococci Isolated from Carriage Sites and Infected Sites of Dogs as a Reservoir of Multidrug Resistance and Methicillin Resistance. *Current Microbiology*, 2013, roč. 66. č. 2, s. 169-173. ISSN 0343-8651.
- GAUTIERI, A.; PATE, M. I.; VESENTINI, S.; REDAELLI, A.; BUEHLER, M. J. Hydration and distance dependence of intermolecular shearing between collagen molecules in a model microfibril. *Journal of Biomechanics*, 2012, roč. 45. č. 12, s. 2079-2083. ISSN 0021-9290.
- GAYATRI, R.; SHARMA, A. K.; RAJARAM, R.; RAMASAMI, T. Chromium(III)-induced structural changes and self-assembly of collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, roč. 283. č. 1, s. 229-235. ISSN 0006-291X.
- GHOSH, A.; ALI, M. A. Studies on physicochemical characteristics of chitosan derivatives with dicarboxylic acids. *Journal of Materials Science*, 2012, roč. 47. č. 3, s. 1196-1204. ISSN 0022-2461.
- GOA, K. L.; BENFIELD, P. Hyaluronic acid a review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. *Drugs*, 1994, roč. 47. č. 3, s. 536-566. ISSN 0012-6667.
- GUTIERREZ-LARRAINZAR, M.; RUA, J.; DE ARRIAGA, D.; DEL VALLE, P.; GARCIA-ARMESTO, M. R. In vitro assessment of synthetic phenolic antioxidants for inhibition of foodborne *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*

- and *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control*, 2013, roč. 30. č. 2, s. 393-399. ISSN 0956-7135.
- HRABAROVA, E.; RYCHLY, J.; SASINKOVA, V.; VALACHOVA, K.; JANIGOVA, I.; CSOMOROVA, K.; JURANEK, I.; SOLTES, L. Structural characterisation of thiol-modified hyaluronans. *Cellulose*, 2012, roč. 19. č. 6, s. 2093-2104. ISSN 0969-0239.
- HRABAROVA, E.; VALACHOVA, K.; RYCHLY, J.; RAPTA, P.; SASINKOVA, V.; MALIKOVA, M.; SOLTES, L. High-molar-mass hyaluronan degradation by Weissberger's system: Pro- and anti-oxidative effects of some thiol compounds. *Polymer Degradation and Stability*, 2009, roč. 94. č. 10, s. 1867-1875. ISSN 0141-3910.
- HUANG, G. Q.; SUN, Y. T.; XIAO, J. X.; YANG, J. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. *Food Chemistry*, 2012, roč. 135. č. 2, s. 534-539. ISSN 0308-8146.
- CHANG, C. W.; LI, S. Y.; HUANG, S. H.; HUANG, C. K.; CHEN, Y. Y.; CHEN, C. C. Effects of ultraviolet germicidal irradiation and swirling motion on airborne *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* under various relative humidities. *Indoor Air*, 2013, roč. 23. č. 1, s. 74-84. ISSN 0905-6947.
- CHANG, H. W.; LIN, Y. S.; TSAI, Y. D.; TSAI, M. L. Effects of chitosan characteristics on the physicochemical properties, antibacterial activity, and cytotoxicity of chitosan/2-glycerophosphate/nanosilver hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*, 2013, roč. 127. č. 1, s. 169-176. ISSN 0021-8995.
- CHOI, O.; DENG, K. K.; KIM, N. J.; ROSS, L.; SURAMPALLI, R. Y.; HU, Z. Q. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*, 2008, roč. 42. č. 12, s. 3066-3074. ISSN 0043-1354.
- CHOU, C. W.; HSU, S. H.; WANG, P. H. Biostability and biocompatibility of poly(ether) urethane containing gold or silver nanoparticles in a porcine model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008, roč. 84A. č. 3, s. 785-794. ISSN 1549-3296.
- JAYAKUMAR, R.; MENON, D.; MANZOOR, K.; NAIR, S. V.; TAMURA, H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials-A short

- review. *Carbohydrate Polymers*, 2010, roč. 82. č. 2, s. 227-232. ISSN 0144-8617.
- KENNE, L.; GOHIL, S.; NILSSON, E. M.; KARLSSON, A.; ERICSSON, D.; KENNE, A. H.; NORD, L. I. Modification and cross-linking parameters in hyaluronic acid hydrogels-Definitions and analytical methods. *Carbohydrate Polymers*, 2013, roč. 91. č. 1, s. 410-418. ISSN 0144-8617.
- KIM, J.; PARK, Y.; TAE, G.; LEE, K. B.; HWANG, C. M.; HWANG, S. J.; KIM, I. S.; NOH, I.; SUN, K. Characterization of low-molecular-weight hyaluronic acid-based hydrogel and differential stem cell responses in the hydrogel microenvironments. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, roč. 88A. č. 4, s. 967-975. ISSN 1549-3296.
- KITTLER, S.; GREULICH, C.; GEBAUER, J. S.; DIENDORF, J.; TREUEL, L.; RUIZ, L.; GONZALEZ-CALBET, J. M.; VALLET-REGI, M.; ZELLNER, R.; KOLLER, M.; EPPLE, M. The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, 2010, roč. 20. č. 3, s. 512-518. ISSN 0959-9428.
- KOGAN, G.; SOLTES, L.; STERN, R.; GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 2007, roč. 29. č. 1, s. 17-25. ISSN 0141-5492.
- LALUEZA, P.; MONZON, M.; ARRUEBO, M.; SANTAMARIA, J. Bactericidal effects of different silver-containing materials. *Materials Research Bulletin*, 2011, roč. 46. č. 11, s. 2070-2076. ISSN 0025-5408.
- LEE, S. B.; KIM, Y. H.; CHONG, M. S.; LEE, Y. M. Preparation and characteristics of hybrid scaffolds composed of beta-chitin and collagen. *Biomaterials*, 2004, roč. 25. č. 12, s. 2309-2317. ISSN 0142-9612.
- MADHUMATHI, K.; KUMAR, P. T. S.; ABHILASH, S.; SREEJA, V.; TAMURA, H.; MANZOOR, K.; NAIR, S. V.; JAYAKUMAR, R. Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 2010, roč. 21. č. 2, s. 807-813. ISSN 0957-4530.
- MANDAL, A.; MEDA, V.; ZHANG, W. J.; FARHAN, K. M.; GNANAMANI, A. Synthesis, characterization and comparison of antimicrobial activity

- of EG/TritonX-100 capped silver nanoparticles on collagen scaffold. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2012, roč. 90. č., s. 191-196. ISSN 0927-7765.
- MARIN, M. L.; MCGILVRAY, K. L.; SCAIANO, J. C. Photochemical Strategies for the Synthesis of Gold Nanoparticles from Au(III) and Au(I) Using Photoinduced Free Radical Generation. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, roč. 130. č. 49, s. 16572-16584. ISSN 0002-7863.
- MOHAMED, C.; CLEMENTINE, K. A.; DIDIER, M.; GERARD, L.; NOELLE, D. C. M. Antimicrobial and physical properties of edible chitosan films enhanced by lactoperoxidase system. *Food Hydrocolloids*, 2013, roč. 30. č. 2, s. 576-580. ISSN 0268-005X.
- MOSER, A.; STEPHAN, R.; CORTI, S.; JOHLER, S. Comparison of genomic and antimicrobial resistance features of latex agglutination test-positive and latex agglutination test-negative *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 2013, roč. 96. č. 1, s. 329-334. ISSN 0022-0302.
- MOSESSON, M. W.; SIEBENLIST, K. R.; MEH, D. A. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. In: NIEUWENHUIZEN, W.; MOSESSON M. W.; DEMAAT M. P. M., eds. Fibrinogen. New York: New York Acad Sciences, 2001 (vol 936).
- NOBLE, P. W. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biology*, 2002, roč. 21. č. 1, s. 25-29. ISSN 0945-053X.
- O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 2011, roč. 14. č. 3, s. 88-95. ISSN 1369-7021.
- ORTONNE, J. P. A controlled study of the activity of hyaluronic acid in the treatment of venous leg ulcers. *Journal of Dermatological Treatment*, 1996, roč. 7. č. 2, s. 75-81. ISSN 0954-6634.
- OSBORN, E. A.; RABODZEY, A.; DEWEY, C. F.; HARTWIG, J. H. Endothelial actin cytoskeleton remodeling during mechanostimulation with fluid shear stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2006, roč. 290. č. 2, s. C444-C452. ISSN 0363-6143.
- PALLELA, R.; BOJJA, S.; JANAPALA, V. R. Biochemical and biophysical characterization of collagens of marine sponge, *Ircinia fusca* (Porifera:

- Demospongiae: Irciniidae). *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, roč. 49. č. 1, s. 85-92. ISSN 0141-8130.
- PAPICH, M. G. Selection of antibiotics for meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: time to revisit some old drugs? *Veterinary Dermatology*, 2012, roč. 23. č. 4, s. 352-E64. ISSN 0959-4493.
- PARK, Y. J.; CHOI, G. J.; KIM, S. H.; HAHN, J.; LEE, T. G.; LEE, W. J.; MOON, D. W. Nanoscale characterization of acid and thermally treated collagen fibrils. *Acta Biomaterialia*, 2012, roč. 8. č. 9, s. 3381-3391. ISSN 1742-7061.
- PIRES, N. R.; CUNHA, P. L. R.; MACIEL, J. S.; ANGELIM, A. L.; MELO, V. M. M.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Sulfated chitosan as tear substitute with no antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, 2013, roč. 91. č. 1, s. 92-99. ISSN 0144-8617.
- RANDALL, C. P.; OYAMA, L. B.; BOSTOCK, J. M.; CHOPRA, I.; ONEILL, A. J. The silver cation (Ag): antistaphylococcal activity, mode of action and resistance studies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, roč. 68. č. 1, s. 131-138. ISSN 0305-7453.
- RAO, K. P. Recent developments of collagen-based materials for medical applications and drug delivery systems. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 1995, roč. 7. č. 7, s. 623-645. ISSN 0920-5063.
- REING, J. E.; BROWN, B. N.; DALY, K. A.; FREUND, J. M.; GILBERT, T. W.; HSIONG, S. X.; HUBER, A.; KULLAS, K. E.; TOTTEY, S.; WOLF, M. T.; BADYLAK, S. F. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*, 2010, roč. 31. č. 33, s. 8626-8633. ISSN 0142-9612.
- SAEIDI, N.; KARMELEK, K. P.; PATEN, J. A.; ZAREIAN, R.; DIMASI, E.; RUBERTI, J. W. Molecular crowding of collagen: A pathway to produce highly-organized collagenous structures. *Biomaterials*, 2012, roč. 33. č. 30, s. 7366-7374. ISSN 0142-9612.
- SATCHER, R.; DEWEY, C. F.; HARTWIG, J. H. Mechanical remodeling of the endothelial surface and actin cytoskeleton induced by fluid flow. *Microcirculation-London*, 1997, roč. 4. č. 4, s. 439-453. ISSN 1073-9688.
- SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen Structure and Stability. Annual Review of Biochemistry. Palo Alto: Annual Reviews, 2009 (vol 78).

- SILVER, F. H.; FREEMAN, J. W.; SEEHRA, G. P. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *Journal of Biomechanics*, 2003, roč. 36. č. 10, s. 1529-1553. ISSN 0021-9290.
- SINTZEL, M. B.; BERNATCHEZ, S. F.; TABATABAY, C.; GURNY, R. Biomaterials in ophthalmic drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1996, roč. 42. č. 6, s. 358-374. ISSN 0939-6411.
- STERN, R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology*, 2003, roč. 13. č. 12, s. 105R-115R. ISSN 0959-6658.
- TAGUCHI, K.; MIYAKAWA, T.; OHMURA, T.; HORIO, M.; ANRAKU, Y.; OKADA, T.; MIZUTA, H.; SAITO, H.; KAWAGUCHI, T. A reduced linezolid dosage maintains favorable efficacy with minimal hematologic toxicity in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-infected patient with renal insufficiency. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2013, roč. 45. č. 1, s. 77-80. ISSN 0036-5548.
- TATTERTON, M. R.; HOMER-VANNIASINKAM, S. Infections in vascular surgery. *Injury-International Journal of the Care of the Injured*, 2011, roč. 42. č., s. S35-S41. ISSN 0020-1383.
- TEEBKEN, O. E.; BISDAS, T.; ASSADIAN, O.; RICCO, J. B. Recommendations for Reporting Treatment of Aortic Graft Infections. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 2012, roč. 43. č. 2, s. 174-181. ISSN 1078-5884.
- TEH, B. M.; SHEN, Y.; FRIEDLAND, P. L.; ATLAS, M. D.; MARANO, R. J. A review on the use of hyaluronic acid in tympanic membrane wound healing. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2012, roč. 12. č. 1, s. 23-36. ISSN 1471-2598.
- THOMPSON, J. M.; GUNDOGDU, A.; STRATTON, H. M.; KATOULI, M. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in hospital wastewaters and sewage treatment plants with special reference to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Applied Microbiology*, 2013, roč. 114. č. 1, s. 44-54. ISSN 1364-5072.

- TRAVAN, A.; PELILLO, C.; DONATI, I.; MARSICH, E.; BENINCASA, M.; SCARPA, T.; SEMERARO, S.; TURCO, G.; GENNARO, R.; PAOLETTI, S. Non-cytotoxic Silver Nanoparticle-Polysaccharide Nanocomposites with Antimicrobial Activity. *Biomacromolecules*, 2009, roč. 10. č. 6, s. 1429-1435. ISSN 1525-7797.
- WELCH, M. P.; ODLAND, G. F.; CLARK, R. A. F. Temporal relationship of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin expression to wound contraction. *Journal of Cell Biology*, 1990, roč. 110. č. 1, s. 133-145. ISSN 0021-9525.
- XUE, T.; ZHAO, L. P.; SUN, B. L. LuxS/AI-2 system is involved in antibiotic susceptibility and autolysis in *Staphylococcus aureus* NCTC 8325. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2013, roč. 41. č. 1, s. 85-89. ISSN 0924-8579.
- ZHANG, Z. K.; LI, G. Y.; SHI, B. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 2006, roč. 90. č. 1, s. 23-28. ISSN 0144-0322.

7 Seznam obrázků

Obrázek 1: <i>Staphylococcus aureus</i> zv. 1000x.	13
Obrázek 2: Struktura dusičnanu stříbrného.	15
Obrázek 3: Struktura kyseliny hyaluronové.	16
Obrázek 4: Strukturní model molekuly kolagenu.	16
Obrázek 5: Průběh enzymatické deacetilace chitinu a následný vznik chitosanu.	17
Obrázek 6: Elektrochemická analýza interakce HA s AgNO ₃ a AgNPs.	22
Obrázek 7: Elektrochemická analýza interakce KOL s AgNO ₃ a AgNPs.	23
Obrázek 8: Elektrochemická analýza interakce CHIT s AgNO ₃ a AgNPs.	23
Obrázek 9: Znázornění výšek pík z elektrochemického stanovení.	24
Obrázek 10: Spektrofotometrická analýza interakce HA s AgNO ₃ , HA s AgNPs.	25
Obrázek 11: Spektrofotometrická analýza interakce KOL s AgNO ₃ , HA s AgNPs.	26
Obrázek 12: Spektrofotometrická analýza interakce CHIT s AgNO ₃ , CHIT s AgNPs..	26
Obrázek 13: Růst kultury <i>Staphylococcus aureus</i> za působení komplexů HA s AgNO ₃ a HA s AgNPs.	28
Obrázek 14: Růst kultury <i>Staphylococcus aureus</i> za působení komplexů KOL s AgNO ₃ a KOL s AgNPs.	29
Obrázek 15: Růst kultury <i>Staphylococcus aureus</i> za působení komplexů CHIT s AgNO ₃ a CHIT s AgNPs.	30
Obrázek 16: Působení komplexů AgNO ₃ a AgNPs v kombinaci s polymerními látkami na kulturu <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Obrázek 17: Výsledky MTT testu varianty AgNO ₃ s HA, KOL a CHIT, AgNPs s HA, KOL a CHIT.	33

8 Prezentace práce na konferencích

BEZDEKOVA, A.; SKLENAR, M.; SOCHOR, J.; BABULA, P.; ADAM, V.; KIZEK, R. Electrochemical and spectrometric study of hyaluronic acid-silver(I) ions complex In FOJTA, M.; NAVRATIL T.; PIVONKOVA H. (eds.). *45th Heyrovsky Discussion: August 13-17, CEITEC-Central European Institute of Technology, Brno. Brno, Czech Republic, 2012, s. P-2, 1-1. ISBN 978-80-87541-03-6*

SKLENAR, M.; BEZDEKOVA, A.; DOSPIVOVA, D.; SOCHOR, J.; BABULA, P.; TRNKOVA, L.; HUBALEK, J.; ADAM, V.; KIZEK, R. Electrochemical study of hyaluronic acid-silver ions complex In TRNKOVA, L.; KIZEK R.; HUBALEK J. (eds.). *XII. Pracovni setkani fyzikalnich chemiku a elektrochemiku: June 30-31, Mendelova univerzita v Brne. Brno, Czech Republic, 2012, s. 192-194. ISBN 978-80-7375-618-5*

SKLENAR, M.; BEZDEKOVA, A.; CHUDOBOVA, D.; SOCHOR, J.; BASTL, K.; ADAM, V.; KIZEK, R. Využití nanocastic stříbra k eliminaci bakteriální infekce *Staphylococcus aureus*. In HAJDUCH, M. (eds.). *VIII. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie: November 29-30, SOLEN. Olomouc, Czech Republic, 2012, s. B36-B37. ISSN 1802-4475.*

SKLENAR, M.; BEZDEKOVA, A.; SOCHOR, J.; KOPEL, P.; KIZEK, R. Využití nanotechnologií jako moderních nástrojů v léčbě infekcí vyvolaných multirezistentními kmeny bakterií. In DZIK, P. (eds.). *Studentská konference Chemie je život: December 7, Vysoké učení technické. Brno, Czech Republic, 2012, s. 42. ISBN 978-80-214-4545-8.*

Tato práce byla odbornou porotou v kategorii středoškolských studentů vyhodnocena jako vítězná.