



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií



MODIFIKACE PLASTŮ POMOCÍ ANTIBAKTERIÁLNÍCH NANOVRSTEV PRO ZDRAVOTNICKÉ APLIKACE

Bakalářská práce

Studijní program: B3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942R002 – Nanomateriály
Autor práce: **Barbora Lavičková**
Vedoucí práce: Mgr. Veronika Zajícová, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Mechatronics, Informatics
and Interdisciplinary Studies ■

MODIFICATION OF PLASTICS THROUGH ANTIBACTERIAL NANOLAYERS FOR MEDICAL APPLICATIONS

Bachelor thesis

Study programme: B3942 – Nanotechnology

Study branch: 3942R002 – Nanomaterials

Author: **Barbora Lavičková**

Supervisor: Mgr. Veronika Zajícová, Ph.D.



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Barbora Lavičková**
Osobní číslo: **M11000051**
Studijní program: **B3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Modifikace plastů pomocí antibakteriálních nanovrstev pro zdravotnické aplikace**
Zadávací katedra: **Ústav nových technologií a aplikované informatiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

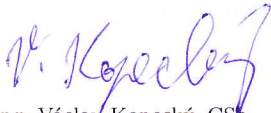
1. Vypracování rešerše s využitím zahraniční literatury na téma plasty ve zdravotnictví, jejich vlastnosti, aplikace, výroba, výhody a nevýhody z hledisek (ekonomického, ekologického, užitného).
2. Charakterizace aktuální problematiky patogenních mikroorganismů ve zdravotnictví v ČR a ve světě.
3. Metoda sol-gel a její bližší specifikace se zaměřením na plastové materiály v souvislosti se zvýšením jejich antimikrobiální účinnosti z hlediska různých typů patogenních mikroorganismů.
4. Modifikace povrchů různých typů plastových materiálů, které se používají ve zdravotnictví (katetry, operační roušky, rukavice).
5. Optimalizace podmínek polymerace vrstev na plastových materiálech (fotopolymerace, tepelná polymerace, kombinace).
6. Optimalizace podmínek aplikace nanovrstev na plastové materiály (metodiky nanášení solu).
7. Prokázání antimikrobiálních účinků připravených nanovrstev na denním světle a pod UV-A zářením, porovnání aktivity se stávajícími produkty.
8. Ekonomické porovnání (výhody x nevýhody upravených materiálů oproti stávajícím).

Rozsah grafických prací: dle potřeby
Rozsah pracovní zprávy: cca 45 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:

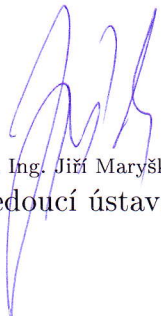
- [1] TALARO, K. P. AND CHESS, B. Foundations in Microbiology. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2011. 834 s. ISBN 978-0-07337529-8.
- [2] SLAMBOROVA, I., ZAJICOVA, V., KARPISKOVA, J., EXNAR, P., et al. New type of protective hybrid and nanocomposite hybrid coatings containing silver and copper with an excellent antibacterial effect especially against MRSA. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2013, 33(1), s. 265-273.
- [3] STEFANI, S., CHUNG, D. R., LINDSAY, J. A., FRIEDRICH, A. W., et al. Meticcillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. International Journal of Antimicrobial Agents, 2012, 39(4), s. 273-282.
- [4] BRINKER, C. J. AND SCHERER, G. W. Sol-gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-gel Processing. Academic Press, 1990. 928 s. ISBN 978-0-12-134970-7.
- [5] HAAS, K. H., AMBERG-SCHWAB, S., ROSE, K. AND SCHOTTNER, G. Functionalized coatings based on inorganic-organic polymers (ORMOCER (R) s) and their combination with vapor deposited inorganic thin films. Surface & Coatings Technology, 1999, 111(1), s. 72-79.
- [6] HAAS, K.-H., AMBERG-SCHWAB, S. AND ROSE, K. Functionalized coating materials based on inorganic-organic polymers. Thin Solid Films, 1999, 351(1), s. 198-203.
- [7] HAAS, K. H. AND WOLTER, H. Synthesis, properties and applications of inorganic-organic copolymers (ORMOCER (R) s). Current Opinion in Solid State & Materials Science, 1999, 4(6), s. 571-580.

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Veronika Zajícová, Ph.D.
Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: 21. října 2013
Termín odevzdání bakalářské práce: 16. května 2014


prof. Ing. Václav Kopecký, CSc.
děkan




prof. Dr. Ing. Jiří Maryška, CSc.
vedoucí ústavu

V Liberci dne 21. října 2013

Prohlášení

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

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

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

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

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

Datum: 12.5.2014

Podpis: Lavičková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce Mgr. Veronice Zajícové, Ph.D. za její cenné rady, podporu, trpělivost a především její přátelský přístup v průběhu mé práce, díky kterému jsem získala mnoho zkušeností a znalostí o práci v laboratoři a o hybridních vrstvách. Také bych chtěla poděkovat své konzultantce Doc. Mgr. Ireně Lovětínské-Šlamborové, Ph.D. za její cenné připomínky a informace v oboru mikrobiologie.

Mé poděkování patří také laborantkám Soně Rothové a Marcele Krejčíkové, díky kterým byl čas strávený v laboratoři prospěšný a velmi poučný.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat lidem, kteří mi pomohli s analýzou vzorků. Zejména pak Ing. Janě Müllerové, Ph.D., Ing. Pavlu Kejzlarovi, Ph.D., Ing. Adamu Pazourkovi, Ph.D., Ing. Janě Turečkové, Ph.D., Ing. Janu Grégrovi a paní Haně Pohlreichové.

Velký dík patří mé milované rodině, která mě v mém studiu velmi podporuje a bez které by mi nikdy nebylo umožněno napsat tuto práci.

Anotace

Metodou sol-gel byly připraveny organicko-anorganické soly a z nich hybridní vrstvy na bázi 3-(trimethoxysilyl)propyl methakrylátu (TMSPM), methyl methakrylátu (MMA), tetraethylorthosilikátu (TEOS) a isopropoxidu titanu (IPTI) s obsahem vybraných typů iontů kovů ($\text{Ag}^{\text{+I}}$, $\text{Cu}^{\text{+II}}$, $\text{Zn}^{\text{+II}}$, $\text{Ti}^{\text{+IV}}$) vykazujících antibakteriální a antimykotické vlastnosti. Připravené soly byly nanесeny na povrch různých polymerů (PP, PE, PVC, PMMA, latex) a dále zpracovány, v závislosti na odolnosti vybraných materiálů, tepelnou polymerací nebo fotopolymerací. Všechny vybrané modifikované polymerní materiály jsou široce využívány ve zdravotnictví.

Vlastnosti připravených solů a vrstev byly sledovány pomocí Zetasizer, IR spektroskopie, SEM mikroskopie, metody ICP, antibakteriálními a antimykotickými testy.

U vrstev na textiliích a PMMA byla stanovena chemická odolnost vůči dezinfekcím běžně používaných v nemocničních zařízeních. Dále byl stanoven průběh postupného uvolňování iontů z hybridních vrstev nanесených na textilních materiálech do vody o pH 6,5.

U všech typů vrstev byla určena antibakteriální a antimykotická aktivita pomocí metod AATCC metoda 100 ¹, AATCC metoda 147 ² a Inhibiční metoda. Antibakteriální aktivita byla testována na patogenních kmenech MRSA, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. Antimykotická aktivita byla testována na kvasince *Candida glabrata*.

Klíčová slova: polymer, metoda sol-gel, hybridní vrstvy, polymerace, antibakteriální vrstvy, antimykotické vrstvy

Annotation

Organic-inorganic sols were prepared using the sol-gel method same as the hybrid coatings based on 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate (TMSPM), methyl methacrylate (MMA), tetraethylorthosilicate (TEOS) and titanium(IV) isopropoxide (IPTI) with content of selected metal ions ($\text{Ag}^{\text{+I}}$, $\text{Cu}^{\text{+II}}$, $\text{Zn}^{\text{+II}}$, $\text{Ti}^{\text{+IV}}$) showing antibacterial and antimycotic properties. Prepared sols were applied to different polymer surfaces (PP, PE, PVC, PMMA and latex). Next, depending on tolerance of the selected materials, were these layers of sols treated by heat or photo polymerisation. All selected modified polymeric materials are widely used in healthcare.

Properties of prepared sols and coatings were observed by Zetasizer, IR spectroscopy, SEM microscopy, ICP method, antibacterial and antimycotic tests.

Chemical resistance against disinfection commonly used in hospital facilities was determined at textile coatings and PMMA. The progressive course of ion release from hybrid coatings applied to textile materials in water at pH 6.5 was determined as next.

Antibacterial and antimycotic activities were observed using the methods AATCC Method 100 ¹, AATCC Method 147 ² and Inhibic method. Antibacterial activity was tested on the pathogenic bacterial strain MRSA, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. Antimycotic activity was tested on the yeast *Candida glabrata*.

Key words: polymer, method sol-gel, hybrid coating, polymeration,
antibacterial coating, antimycotic coating

Seznam použitých zkratk a symbolů

AATCC	Americká asociace textilní chemie a koloristů (American Association of Textile Chemistry and Colorists)
ARO	anesteziologicko-resuscitační oddělení
ATR	zeslabená úplná reflektance (Attenuated total reflectance)
BET	Brunauer–Emmett–Teller
BPO	dibenzoyl peroxid
BSE	zpětně odražené elektrony
CERAMERs	keramické polymery (ceramic polymers)
CFU	kolonii tvořící jednotka (colony-forming units)
CXI	Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSL	dynamický rozptyl světla
EDA	energiově disperzní analýza
EHEC	enterohemoragická <i>Escherichia coli</i>
EIEC	enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
EPEC	enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
ETEC	enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
EtO	ethylen oxid
EU	Evropská unie
FT-IR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy)
G⁻	gramnegativní bakterie
G⁺	grampozitivní bakterie
HDPE	vysokohustotní polyethylen (high density polyethylene)
HPP	homopolymer polypropylen
ICP-MS	hmotnostní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem
IMC	infekce močových cest
IPA	propan-2-ol
IPTI	isopropoxid titanu
JIP	jednotka intenzivní péče
KMT FS	Katedra materiálů, Fakulta strojní
LCS	Oddělení nanomateriálů v přírodních vědách
LDPE	nízko hustotní polyethylen (low density polyethylene)

LLDPE	lineární nízko hustotní polyethylen (linear low-density polyethylen)
MDPE	středné hustotní polyethylen (medium-density polyethylene)
MMA	methyl methakrylát
MRSA	methicillin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MTEOS	methyltriethoxysilan
MU	Masarykova univerzita
NBR	butadien-akrylonitrilový kaučuk
NI	nozokomiální infekce
ORMOCERs	organicky modifikované keramiky (organically modified ceramics)
ORMOSILs	organicky modifikované silikáty (organically modified silicates)
PA	polyamid
PC	polykarbonát
PE	polyethylen
PEEK	polyetheretherketon
PEG	polyethylenglykol
PEG-DMA	polyethylenglykol-dimethakrylát
PES	polyethersulfon
PET	polyethylentereftalát
PG	peptidoglykan
PMMA	polymethylmetakrylát
POLYCERAMs	polymerní keramické materiály (polymeric ceramic materials)
POM	polyoxymethylen
PP	polypropylen
PTFE	polytetrafluorethylen
PVA	polyvinylalkohol
PVC	polyvinylchlorid
PVDF	polyvinylidfluorid
RCP	náhodný kopolymer polypropylenu (random copolymer polypropylene)
RNA	ribonukleová kyselina
SE	sekundární elektrony
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TEOS	tetraethylorthosilikát
TMSPM	3-(trimethoxysilyl) propyl methakrylát
TUL	Technická univerzita v Liberci

UHMWPE	ultra vysoko hustotní polyethylen (ultra-high molecular weight polyethylene)
UV	ultrafialové záření
VRSA	vancomycin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
WDA	vlnově disperzní analýza
WHONET	internetová databáze světové zdravotnické organizace pro infekce
Z-N katalyzátory	Ziegler-Nattovy katalyzátory

Obsah

1.	Úvod	14
2.	Teoretická část	15
2.1.	Polymer	15
2.1.1.	Syntetické polymery a jejich aplikace ve zdravotnictví	15
2.1.1.1.	Polyetylen (PE).....	18
2.1.1.2.	Polypropylen (PP)	19
2.1.1.3.	Polyvinylchlorid (PVC).....	20
2.1.1.4.	Polymethylmethakrylát (PMMA).....	21
2.1.1.5.	Butadien-akrylonitrilový kaučuk (NBR)	22
2.1.2.	Základní druhy polymerů s antimikrobiálními vlastnostmi	23
2.1.2.1.	Polymery s antimikrobiální aktivitou bez jakýchkoliv úprav	23
2.1.2.2.	Chemicky modifikované polymery s antimikrobiálními vlastnostmi	24
2.1.2.3.	Polymery s antimikrobiální organickou složkou	24
2.1.2.4.	Polymery s antimikrobiální anorganickou složkou	25
2.2.	Patogenní mikroorganismy	26
2.2.1.	Rezistence	27
2.2.1.1.	Rozvoj a šíření rezistence	27
2.2.1.2.	Mechanismy rezistence	29
2.2.1.3.	Současný stav a omezení výskytu rezistence	29
2.2.2.	Nozokomiální infekce.....	30
2.2.3.	Biofilm	31
2.3.	Bakterie a jejich dělení	32
2.3.1.	Staphylococcus aureus.....	34
2.3.2.	Escherichia coli.....	34
2.3.3.	Proteus mirabilis	35
2.3.4.	Pseudomonas aeruginosa	36
2.3.5.	Acinetobacter baumannii	37

2.4.	Kvasinky	38
2.4.1.	Candida albicans	38
2.5.	Metoda sol-gel	39
2.5.1.	Charakteristika metody	39
2.5.2.	Techniky aplikace solu	40
2.6.	Hybridní materiály	41
2.6.1.	Prekurzory používané pro přípravu hybridních materiálů	41
2.6.2.	Příprava hybridních materiálů pomocí metody sol-gel	42
2.6.3.	Vlastnosti hybridních materiálů	43
2.6.3.1.	Adheze a mechanické vlastnosti	43
2.6.3.2.	Hydrofobicita / hydrofilicita hybridních materiálů	43
2.6.4.	Antibakteriální povrchy (vrstvy)	44
3.	Použité experimentální metody	46
3.1.	Modifikace povrchu plazmou	46
3.1.1.	Metoda sol-gel	46
3.1.2.	Měření distribuce a velikosti částic	46
3.1.3.	Infračervená spektroskopie	47
3.1.4.	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	47
3.1.5.	Testování uvolňování iontů	48
3.1.6.	Testování antibakteriálních a antimykotických účinků vrstev	49
4.	Experimentální část	50
4.1.	Příprava výchozích solů	50
4.1.1.	Použité chemikálie a postup přípravy solů	50
4.1.2.	Distribuce velikosti částic v solu	51
4.2.	Studium vlastností připravených hybridních vrstev	53
4.2.1.	Substráty použité pro nanášení vrstev	53
4.2.2.	Předúprava substrátů před nanášením vrstev	54
4.2.3.	Optimalizace doby polymerace	54
4.2.4.	Nanesení, dokončení polymerace a vznik hybridní vrstvy	59

4.2.5.	Kvalita povrchu připravených vrstev – SEM	59
4.2.6.	Uvolňování iontů z povrchu	61
4.2.7.	Chemická odolnost hybridních vrstev	63
4.3.	Antibakteriální a antimykotické účinky hybridních vrstev	67
4.3.1.	Postup testování hybridních vrstev	68
4.3.2.	Inhibice bakteriálního kmene MRSA	69
4.3.3.	Inhibice bakteriálního kmene <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74
4.3.4.	Inhibice bakteriálního kmene <i>Escherichia coli</i>	77
4.3.5.	Inhibice mykotického kmene <i>Candida glabrata</i>	81
5.	Shrnutí výsledků, diskuze	85
6.	Závěr	87
7.	Literatura	89
8.	Přílohy	96

1. Úvod

Nozokomiální infekce, neboli infekce získané v nemocnici jsou celosvětovým problémem. Celkově více než 1,4 milionů pacientů trpí nozokomiálními infekcemi, jež jsou velmi těžce léčitelné a jejich léčba je finančně nákladná. Z tohoto důvodu se mnoho výzkumných týmů zabývá problematikou nárůstu a vhodné eliminace patogenních mikroorganismů, především pak rezistentních organismů, jako jsou MRSA (Methycilin Rezistentní *Staphylococcus aureus*), VRE (Vankomycin - Rezistentní enterokoky), Ampicilin Rezistentní *Proteus mirabilis*, a Flukonazol nebo Ketokonazol Rezistentní *Candida glabrata*, jejichž počet stále narůstá. I přes poměrně rychlý vývoj a uvádění na trh nových a efektivnějších dezinfekčních činidel se rezistentní kmeny stále množí a způsobují další a další problematické, dlouhodobé a obtížně léčitelné infekce, jejichž léčba je často finančně nákladnější než léčba, kvůli které byl pacient do zdravotnického zařízení přijat.

Velká část materiálů využívaných ve zdravotnictví je z přírodních nebo syntetických polymerů. Podíl těchto materiálů na trhu stoupá každým rokem, v současnosti se ve zdravotnictví spotřebuje přes 40 milionů tun plastů. Většina používaných plastů je známá pro své dobré biokompatibilní vlastnosti, díky nimž jsou vhodné nejen pro aplikace v nemocnicích, ale bohužel také pro množení patogenních mikroorganismů a tvorbu biofilmu. Problém při používání polymerů nastává ve chvíli, kdy dochází k jejich kontaktu s pacientem či personálem a možnému přenosu patogenního mikroorganismu, nebo jeho uvolnění z biofilmu.

Z výše uvedených důvodů se velmi rozvíjí vývoj a syntéza tzv. antibakteriálních polymerů, které by mohly být využitelné v nemocnicích a jiných zdravotnických zařízeních, kde je vysoké riziko vzniku nozokomiálních infekcí. Velký aplikační potenciál mají tyto polymery především v prostředí, kde je nutná 100% sterilizace (life-stany pacientů po transplantacích a onkologických léčbách, u pacientů s nízkou nebo dočasně nulovou imunitou, inkubátory pro nedonošené novorozence a jednotek intenzivní péče).

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium hybridních vrstev s obsahem iontů kovů, vykazujících antibakteriální a antimykotické vlastnosti. Testované hybridní vrstvy, vyvinuté na CXI TUL by mohly nalézt využití ve zdravotnictví, což bylo hlavním cílem jejich vývoje. Práce se zabývá především vlastnostmi připravených hybridních vrstev, jejich výslednou antibakteriální a antimykotickou aktivitou vůči typickým patogenním mikroorganismům, a jejich vhodnou implementací na polymerní vzorky se specifickými vlastnostmi.

2. Teoretická část

2.1. Polymer

Původně se jednalo o pojem zdůrazňující opakování stavební jednotky, avšak časem se stal synonymem pro makromolekulární látku. Polymery jsou velké molekuly tvořené opakujícími se vzájemně pospojovanými menšími molekulami tzv. monomery.^{3,4}

Jedná se o rozsáhlou skupinu, která je spjata s našimi každodenními životy a to tak, že někteří autoři hovoří o současnosti jako o době polymerní.^{3,5} Základní dělení polymerů je na přírodní (celulosa, nukleové kyseliny, proteiny aj.) a syntetické (polyethylen, polypropylen, polyamidy aj.).^{3,4,6}

2.1.1. Syntetické polymery a jejich aplikace ve zdravotnictví

Syntetické polymery mají podobné chemické vlastnosti jako nízkomolekulární látky, ale jejich fyzikální vlastnosti jsou značně ovlivněny velikostí molekul. Základní dělení syntetických polymerů je podle fyzikálních vlastností neboli složení a teplotního chování na termoplasty, reaktoplasty, elastomery, vlákna. První dvě skupiny jsou podskupinou plastů (obr. 1). Termoplasty jsou za normálních podmínek tuhé, ale s vyšší teplotou měknou, jde o vratnou změnu, proto jsou z nich lisovány různé předměty. Oproti tomu u reaktoplastů jde o změnu nevratnou vlivem rozsáhlého síťování. Vlákna se získávají z roztaveného polymeru, který se tažením orientuje podél osy vlákna. Poslední skupinou jsou elastomery, vysoce elastické polymery, který se po deformaci vrací do původního stavu.

POLYMERY			
TERMOPLASTY	REAKTOPLASTY	VLÁKNA	ELASTOMERY
PLASTY			KAUČUKY

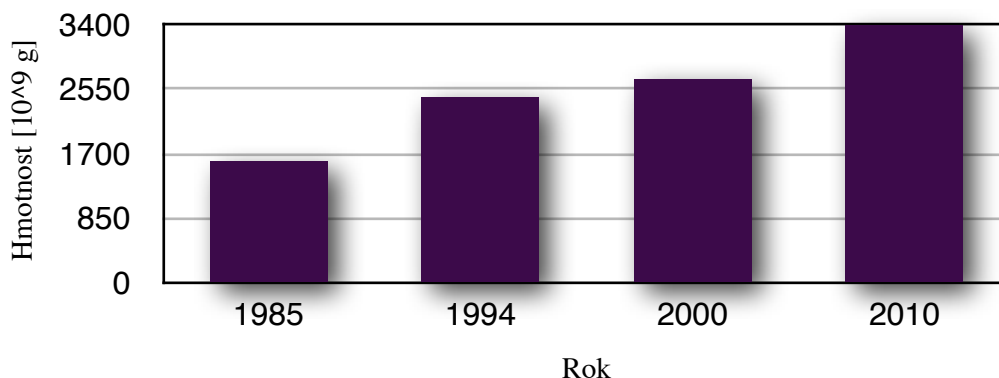
Obr. 1: Rozdělení syntetických plastů

Dalším možným členěním polymerů je dělení podle metody přípravy neboli růstu polymerů. Prvním typem jsou polymery připravené řetězovou reakcí, kdy počáteční impulz vyvolá sled dílčích dějů. Druhým typem jsou polymery se stupňovitým růstem, zde dochází k relativně pomalému růstu řetězce, při kterém se jednotlivé vazby tvoří nezávisle na sobě.

Existuje mnoho dalších dělení této rozsáhlé skupiny. Například podle morfologie polymerů na amorfni a semikrystalické, dále podle chemického složení, molekulární struktury, aplikací, hustoty apod.^{4,6}

Pro svou snadnou zpracovatelnost, vlastnosti a cenovou dostupnost jsou polymery velmi důležitou součástí zdravotnického průmyslu. Z ekonomického hlediska je trh se zdravotnickými

potřebami jeden z nejvíce rozvíjejících se. Podíl polymerů na zdravotnickém trhu každým rokem stoupá (obr. 2).



Obr. 2: Celosvětový objem plastů ve zdravotnických zařízeních ⁷

Polymery můžeme rozdělit podle jejich použití na in vivo – vně pacienta a na in vitro – styk s vnitřním prostředím pacienta. První skupinu můžeme dále rozdělit na výrobky určené pro jedno použití (injekční stříkačky, sáčky, rukavice, obaly aj.) a na plastové výrobky zajišťující funkčnost lékařských a diagnostických přístrojů (laboratorní pomůcky, konektory, spojovací hadičky aj.). Přestože tyto výrobky přijdou do styku s pacientem, kontaktní čas je tak krátký, že můžeme jejich bezpečnostní rizika zanedbat.

Druhou skupinu rozdělujeme, podle doby kontaktu s tkání, krví nebo jinými tělními tekutinami, na krátkodobé kontaktní přístroje (dialyzační přístroje, katetry, krevní oxygenátory, umělé srdce aj.), střednědobé implantáty, tedy implantáty, které se po nějaké době vyndají nebo jsou vstřebány (vstřebatelné stehy, scaffoldy, desky pomáhající při hojení kostí aj.), a na dlouhodobé implantáty (srdeční chlopně, kardiostimulátory, umělé klouby, ústní implantáty aj.). ⁷⁻¹²

U každé této skupiny rozhoduje při volbě materiálu jiná vlastnost. Důležité jsou především mechanické, fyzikální a chemické vlastnosti a také biokompatibilita. Nejčastěji používanými nerozložitelnými plasty ve zdravotnictví jsou polyvinyl chlorid (PVC), polyethylen (PE), polypropylen (PP), polytetrafluorethylen (PTFE).

Aplikace syntetických nerozložitelných polymerů v medicíně	
PVC	vaky na krev a roztoky, chirurgické obaly, dialyzační pomůcky
PP	umělé cévy, netkané textilie, membrány
PMMA	krvní pumpy, membrány pro krvní dialyzéry, nitrooční čočky
POM	dílce inkubátorů
PET	implantované spojnice, cévní implantáty, sítky, srdeční pumpy
LDPE	injekční stříkačky, farmaceutické láhve, sáčky
UHMW PE	vysoce namáhané dílce farmaceutických strojů (plnicí stroje a linky)
UHMW PE	kloubní náhrady – kyčelní a kolenní
PTFE	katétry, cévní implantáty
PVDF	kluzné součásti lékařských přístrojů, dílce sterilizačních přístrojů
PA	katétry, obráběné díly – kluzné elementy
PEEK	aplikace pro zubní lékařství, součásti tomografů
PES	dílce přístrojů pro dialýzu

Obr. 3: Aplikace různých druhů polymerů v medicíně. ¹³

Při volbě zdravotnického polymerního materiálu se řídíme pěti základními kritérii:

- ◆ Teplotní kritérium, je důležité, aby koncová teplota použití byla nižší než teplota měknutí.
- ◆ Mechanické a fyzikální kritérium, zvažujeme především zatížení, namáhání a jiné vlivy používání na daný materiál, také jsou důležité vlastnosti typu průhlednost, barva a absorpce tekutin.
- ◆ Elektrické kritérium, v současnosti roste využití elektroniky, proto je nutné zvažovat vodivost materiálu nebo jeho statické nabíjení.
- ◆ Chemická a biologická odolnost, při použití polymeru je nutné zvážit jeho odolnost vůči desinfekčním prostředkům, kyselinám, olejům a biologickým činitelům jako je krev, moč a stolice.
- ◆ Sterilizační kapacita, toto kritérium je pro polymery ve zdravotnictví velmi důležité. Polymery můžeme sterilizovat pomocí různých metod. Mezi nejběžnější patří ethylen oxid (EtO), pára, plazma a radiace. ^{7, 10, 14}

Na materiály používané ve zdravotnictví jsou kladeny vysoké nároky. Obvykle je tedy nutné polymery určitým způsobem upravovat. Jednou z možností jsou různé typy příprav a chemických složení polymerů, další velmi rozšířenou možností je přidání různých aditiv. V poslední době se také rozvinulo využití kompozitních materiálů, které mají díky svému složení unikátní vlastnosti. Ve zdravotnictví se výrazně rozvíjí využívání biodegradabilních polymerů. Mnoho firem vyrábí speciálně určené polymery pro zdravotnictví, složení těchto materiálů a jejich výrobní postup je však často firemním tajemstvím nebo je velmi dobře chráněno patenty. ^{8, 15, 16}

2.1.1.1. Polyethylen (PE)

Jedná se o velmi rozšířený a využívaný termoplast, který vzniká řetězovou polymerací ethenu. Mezi jeho hlavní výhody patří nízké výrobní náklady, snadná zpracovatelnost, chemická odolnost, a především zdravotní nezávadnost. Za normálních podmínek je bílý, v tenkých vrstvách transparentní. Používá se na výrobu obalů, nákupních tašek, izolací kabelů, ale také vláken. Vlastnosti PE jsou silně závislé na způsobu polymerace, která ovlivňuje jak molekulovou hmotnost, tak prostorové uspořádání v řetězci makromolekuly a stupeň krystalinity. Různými přípravami lze vyrobit několik typů PE, které dělíme podle rozvětvení makromolekul a molekulové hmotnosti.³

Tabulka 1: Charakteristické vlastnosti LDPE (low density PE) a HDPE (high density PE)

	LDPE	HDPE
Hustota [g/cm ³]	do 0,93	do 0,97
Krystalinita [%]	50–70	65–95
Pevnost v tahu [MPa]	20–33	9–15
Chemická odolnost	nereaktivní, kromě silných oxidačních činidel	nereaktivní, kromě silných oxidačních činidel
Teplota tání [°C]	105–115	125–136

Nejdéle připravovaným je nízkohustotní PE označovaný LDPE (low density PE). Vyrábí se radikálovou polymerací při vysokých tlacích, tato reakce je obtížně regulovatelná a vzniká tak rozvětvený řetězec s nižší krystalinitou. Jedná se o měkký ohebný avšak pevný polymer. Běžně se používá především na fólie a balící materiály. Ve zdravotnictví se používá především pro svou snadnou tvárnost a nízké náklady na zajištění sterility, na výrobky jednorázové spotřeby, jako jsou zdravotnické lahve, injekční stříkačky, epidurální katetry, nitrožilní vaky, sáčky a netkané textilie (zástěry, rukavice).^{3, 6, 8, 12, 14, 17}

Dalšími velmi důležitými polymery jsou vysokohustotní PE označovaný HDPE (high density PE) a ultravysokohustotní PE označovaný UHMWPE (ultra-high molecular weight PE). Připravují se beztlakovou polymerací v rozpouštědle s použitím Ziegler-Nattových (Z-N) katalyzátorů. Vzniklý lineární polymer s velmi vysokou krystalinitou je nejtvrďší a nejméně ohebný PE. Používá se na výrobu bedýnek pro potraviny, kontejnerů a potrubí. Vláknina vyrobená z UHMWPE se mohou využít jako náhrada za Kevlar. Vzhledem ke svým vynikajícím mechanickým vlastnostem, ořezuvzdornosti a chemické odolnosti, našel PE široké uplatnění ve zdravotnictví pro výrobu farmaceutických přístrojů, výrobních linek, ale také jako součást kloubních výplní a jiných implantátů (obr. 4).^{3, 6, 8, 12, 14, 17-20}

Kromě těchto základních druhů se můžeme setkat také s lineárním nízkohustotním polymerem LLDPE (linear low-density PE), nebo PE o střední hustotě MDPE (medium-density PE).



Obr. 4: Kyčelní kloub s vložkou z UHMWPE od firmy Endoimplant ¹³

2.1.1.2. Polypropylen (PP)

Jeden z ekonomicky nejvýznamnějších termoplastů s velmi širokým uplatněním. Při výrobě bez použití katalyzátorů vzniká ataktický polymer (methylová funkční skupina je na opačných stranách – trans), který má parafinový až blátivý charakter. Proto se běžně vyrábí pomocí Z-N katalyzátorů izotaktický PP (methylová funkční skupina je na stejné straně – cis), který je vysokomolekulární a vysoce krystalický. V posledních letech se také rozšířil výzkum a použití katalyzátorů na bázi metalocenů, které se dají kombinovat s Z-N katalyzátory. Tímto způsobem lze získat syndiotaktický PP s velmi specifickými vlastnostmi, ale také homopolymer PP (HPP) a radom copolymers (RDP), které jsou průhledné a mají lepší vlastnosti než běžný izotaktický PP. PP je rovněž dobře zvláknitelný, vlákna jsou málo navlhavá, čehož se využívá v řadě aplikací (např. do integrovaných pletenin).

Má velmi podobné vlastnosti jako PE. Liší se vyšší hustotou, bodem tání (až 176 °C), větší mechanickou pevností, odolností vůči oděru a chemikáliím, avšak má nižší odolnost vůči mrazu, povětrnostním podmínkám a oxidaci. Vzhledem ke své vysoké krystalinitě je neprůhledný, avšak velmi snadno barvitelný. Ačkoliv PP nedosahuje tak dobrých specifických vlastností jako jiné polymery např. teplotní odolnost (PC), odolnost proti nárazu (PET) nebo flexibilita (PVC), je jeho hlavní výhodou, kromě odolnosti proti chemikáliím, to že má všechny své uvedené vlastnosti na vysoké úrovni, což značně rozšiřuje možnost jeho aplikací. ^{3, 6, 21}

Tabulka 2: Charakteristické vlastnosti polypropylenu

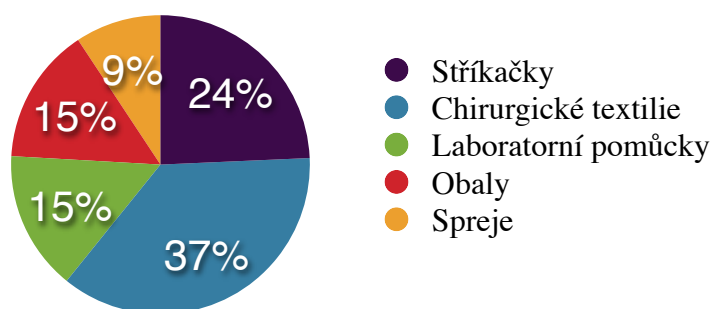
	PP
Hustota [g/cm ³]	0,91
Krystalinita [%]	60–70
Pevnost v tahu [MPa]	34–38
Chemická odolnost	nereaktivní, kromě silných oxidačních činidel
Teplota tání [°C]	160–176

Především díky možnosti zpracování všemi druhy sterilizace, ale také díky své transparentnosti (HPP, RDP) a chemické odolnosti, nalezl PP široké uplatnění ve zdravotnictví.

Hlavní kategorie PP ve zdravotnictví:

- ◆ Zdravotnické pomůcky (injekční stříkačky, nitrožilní vaky, filtry, stehy aj.).
- ◆ Laboratorní pomůcky (špičky pipet, centrifugační zkumavky, zkumavky na odběry tělních tekutin aj.).
- ◆ Balení zdravotnických pomůcek, primárně určené k ochraně sterility (kalíšky pro kontaktní čočky, kontejnery, sáčky aj.).
- ◆ Obaly léků (lahvičky od léků, inhalátory, nosní spreje aj.).

Zvláštní kategorií využití PP ve zdravotnictví jsou netkané PP textilie, které se využívají především na chirurgické a ochranné oblečení, masky, filtry, dialyzační membrány a tvoří největší segment využití PP ve zdravotnictví. ^{8, 12, 14, 17, 22, 23}



Obr. 5: Procentuální rozdělení prodeje PP ve zdravotnictví, USA 2011 ²⁴

2.1.1.3. Polyvinylchlorid (PVC)

Patří mezi první vyrobené syntetické plasty. V současnosti patří PVC mezi nejdůležitější termoplasty a je nejvýznamnějším představitelem vinylových polymerů. Vyrábí se radikálovou polymerací v suspenzi, nebo polymerací v emulzi či v monomerní fázi. Při výrobě je nutné sledovat zbytkový obsah monomeru, který je karcinogenní. PVC je značně rozšířen, především kvůli svému levnému a snadnému zpracování, schopnosti želatinace se změkčovadly a značné chemické odolnosti.

Vyrobený produkt je bílý prášek termodynamického charakteru. Čistý polymer se zpracovává stabilizátory, mazivy a modifikátory, výsledný produkt je tvrdý, málo elastický polymer, s výbornými izolačními vlastnostmi. Obvykle se používá na tvrdé výrobky, jako jsou trubky, podlahové krytiny, kohouty aj.

Vlastnosti PVC se modifikují přidávkou změkčovadel (esterů vícesytných karboxylových kyselin), po jejichž přidávku vznikne pasta, která se tepelně zpracovává tak, aby došlo k želatinaci. Měkčené plasty se lépe zpracovávají, ale mají nižší chemickou a tepelnou odolnost. Běžně se používá na výrobu folií, nádob, pláštěnek aj. ^{3, 6, 7, 25}

V poslední době se použití měkčeného PVC snižuje a to z důvodu obsahu škodlivých ftalátů, které se z plastu vyplavují nebo vypařují. Ftaláty negativně ovlivňují schopnost reprodukce, způsobují vrozené vady a neplodnost. Dalším problémem je likvidace PVC. Při spalování PVC

dochází k uvolnění toxických, většinou karcinogenních látek (chlorovodíku, hexachlorbenzenu, furanu a dioxinu), které narušují funkci endokrinního systému.^{17, 21}

Tabulka 3: Charakteristické vlastnosti PVC

	PVC	PVC plastikovaný
Hustota [g/cm ³]	1,38–1,55	1,16–1,35
Pevnost v tahu [MPa]	45–75	10–25
Chemická odolnost	kyseliny, zásady, nasycené uhlovodíky, alkoholy	kyseliny, zásady, nasycené uhlovodíky, alkoholy
Maximální teplota použití krátkodobě [°C]	75–100	55–65

Vysoké uplatnění našel plastikovaný PVC ve zdravotnictví, kde je často používán na jednorázové výrobky, jako jsou obaly na krev, dále se používá na krevní a močové katetry, kanyly, infuzní sety (obr. 6), dialyzační sety, soupravy pro enterální výživu, obaly na léky, rukavice, dlahy, identifikační náramky. Také se používá na terapeutické a diagnostické přístroje, nábytek a konstrukční prvky v nemocnicích.^{7, 8, 12, 17, 25}

Přibližně 25 % všech zdravotnických produktů vyrobených z plastu je z PVC, to řadí PVC mezi nejpoužívanější plasty ve zdravotnictví,⁷ avšak v současnosti je stále častěji PVC nahrazován alternativními polymery, které nejsou měkčené.²⁵



Obr. 6: Krevní vak a infuzní set z PVC²⁶

2.1.1.4. Polymethylmethakrylát (PMMA)

Je transparentní termoplast, který patří mezi nejdůležitější syntetické polymery, je běžně známý pod obchodním názvem plexisklo nebo organické sklo. Vzniká řetězovým růstem, čili není krystalický a je i ve větších šířkách průhledný. PMMA je o polovinu lehčí než sklo, má lepší mechanickou odolnost i světelnou propustnost. Má však nižší odolnost vůči chemikáliím a jeho povrch se v organických rozpouštědlech narušuje či rozpouští. Využívá se jako náhrada skla, na výrobky pro denní použití jako jsou tužky, sponky a potřeby pro domácnost. Také se používá jako aditivum do maziv pro nízké teploty.^{3, 6, 21}

Tabulka 4: Charakteristické vlastnosti PMMA

	PMMA
Hustota [g/cm ³]	1,19
Pevnost v tahu [MPa]	73
Chemická odolnost	slabé kyseliny, louhy, alifatické uhlovodíky
Teplota tání [°C]	160–190

Díky své biokompatibilitě se PMMA hojně využívá ve zdravotnictví např. na zubní protézy, transplantáty nebo výrobu dětských inkubátorů (obr. 7, 8). Další možností využití je v in vitro diagnostice, na krevní pumpy a membrány pro krevní dialyzátory. Polymerací 2-hydroxyethylmethakrylátu vzniká bobtnavý polymer, ze kterého se vyrábějí kontaktní čočky.^{8,} 12, 14, 27, 28

**Obr. 7:** Neonatální inkubátor²⁹**Obr. 8:** Nedonošené novorozence³⁰

2.1.1.5. Butadien-akrylonitrilový kaučuk (NBR)

Jedná se o elastomer, obvykle nazývaný nitrilový kaučuk. Podle možnosti určení ho řadíme k olejovzdorným kaučukům. Vyrábí se emulzní polymerací z butadienu a akrylonitrilu. Obvykle NBR obsahují 28-33 % akrylonitrilu, tyto NBR řadíme do skupiny se středním obsahem akrylonitrilu, existují však i kaučuky s nižším a nebo vyšším podílem. Obsah akrylonitrilu výrazně ovlivňuje vlastnosti kaučuku, s jeho rostoucím obsahem klesá elasticita, ale stoupá odolnost. Používá se především v místech, kde je potřeba jeho zvýšená odolnost proti olejům, benzínu a oděru, např. benzínové hadice, těsnění, klínové řemeny, dopravní pásy.^{3,6}

Tabulka 5: Charakteristické vlastnosti NBR

	NBR
Pevnost v tahu [MPa]	4–25
Chemická odolnost	kyseliny, louhy, rozpouštědla
Teplotní použitelnost [°C]	- 40 až 110

NBR se ve zdravotnictví používá zejména na ochranné rukavice, které jsou hypoalergenní a odolné vůči chemikáliím i oděru. V lékařství se používají NBR rukavice především pro práci v nesterilním prostředí, např. na krátkodobé vyšetření. I přesto že mají srovnatelnou odolnost vůči biologickým látkám, je jejich využití v chirurgii omezeno snížením jemné motoriky. Rukavice patří mezi základní a nejdůležitější prvky bariérové ochrany proti nozokomiálním infekcím, a právě nitrilové rukavice mají nižší schopnost přenosu bakterií. I přesto se v současnosti zkoumají nejrůznější antibakteriální a antiadhezní vrstvy pro tento typ rukavic.^{17, 31-35}

2.1.2. Základní druhy polymerů s antimikrobiálními vlastnostmi

Mikroorganismy jsou nejstarší živé organismy na naší planetě a za dobu své existence si vytvořily řadu mechanismů, které jim pomáhají kolonizovat povrch (2.2.3.). V současnosti se mnoho výzkumných pracovišť zabývá tím, jak tento jev omezit nebo eliminovat. Existuje spousta speciálně připravovaných polymerů, které vykazují antibakteriální účinky. Tyto polymery lze rozdělit do čtyř základních skupin.

2.1.2.1. Polymery s antimikrobiální aktivitou bez jakýchkoliv úprav

Tato skupina polymerů je velmi rozsáhlá, obsahuje osm podskupin:

- ◆ První podskupina zahrnuje antimikrobiální polymery, kde je přítomen kvartérní atom dusíku, který je buď obsažen v hlavním řetězci nebo v postranních. Tyto polymery mají kladný náboj a reagují destruktivně s záporně nabitou buněčnou stěnou nebo cytoplasmatickou membránou. Patří zde např. poly(4-vinylpyridin), polysiloxany.
- ◆ Do druhé méně rozsáhlé podskupiny se řadí polymery obsahující guanidin, který je používán jako antimikrobiální činidlo. Tyto polymery vykazují dobrou rozpustnost ve vodě, široko spektrální baktericidní účinky a nízkou toxicitu.
- ◆ Další skupinou jsou polymery napodobující přirozené peptidy. Antimikrobiální peptidy tvoří důležitou součást imunitního systému, způsobují protržení cytoplasmatické membrány buněk mikroorganismů.
- ◆ Halogenované polymery spadají do čtvrté podskupiny. Řadíme zde polymery obsahující fluor, jehož mikrobiální aktivita je spojena s povrchovou aktivitou a hydrofobními vlastnostmi. Dále polymery obsahující chlor a v neposlední řadě často využívané N-halaminy, kde je jeden nebo více atomů halogenů (Cl^{+I} nebo Br^{+I}) kovalentně vázáno na atom dusíku. Následně dochází k pomalému uvolňování atomů halogenů a jejich reakci s biologickými receptory, což způsobí smrt nebo inaktivaci buňky.
- ◆ Pátá podskupina obsahuje polymery s fosforovými a sulfonovými deriváty, které inhibují buňku stejně jako polymery z první skupiny.

- ◆ Do šesté podskupiny řadíme polymery s deriváty kyseliny benzoové a fenolu. Fenoly jsou biocidní látky, které reagují se stěnou bakteriální buňky a způsobí rozpad membrány. Benzaldehydy jsou netoxické antibakteriální látky, které mají široké spektrum účinku.
- ◆ Předposlední podskupina obsahuje organokovové polymery, tj. polymery obsahující v hlavním nebo postranním řetězci kovalentně vázan atom kovu (Sn, Ca, Gd, Cd, Ce, Co, Zn, Mn, Ni).
- ◆ Poslední osmá podskupina obsahuje polymery s chemickou strukturou, které nelze zařadit do předchozích skupin. Například dendritické polymery, polymery připravené ze slabých kationtových polyelektrolytů, polymery obsahující sacharidové konstituční jednotky, případně sacharidy a další.³⁶⁻⁴⁰

2.1.2.2. Chemicky modifikované polymery s antimikrobiálními vlastnostmi

Další skupinou jsou polymery vykazující antimikrobiální účinky až po chemické modifikaci. Existuje celá řada způsobů, jak inkorporovat antimikrobiální látky do polymerů. Chemické „antibakteriální“ modifikace dělíme na tři základní typy:

- ◆ Kovalentní inkorporace nízkomolekulárních antimikrobiálních sloučenin. Kovalentně lze navázat řadu sloučenin například cyklické N-chloraminové zbytky, antibakteriální sloučeniny s karboxylovými skupinami, levofloxacin, ale také penicilínová a ampicilínová antibiotika či léčiva obsahující sulfoamidovou skupinu.
- ◆ Navázání antimikrobiálních peptidů. Peptidy různých sekvencí jsou vázány na povrch polymeru pomocí kovalentních vazeb.
- ◆ Posledním typem modifikace je roubování antimikrobiálními polymery. Polymery se roubojí pomocí řetězců s antimikrobiálními skupinami.³⁷⁻³⁹

2.1.2.3. Polymery s antimikrobiální organickou složkou

Tato skupina obsahuje polymery, do kterých nebyla antimikrobiální složka navázána kovalentně.

- ◆ Přídavek nízkomolekulárních antimikrobiálních sloučenin do polymeru. Nejčastěji používané antimikrobiální činidlo je triclosan, např. při inkorporaci do polyvinylalkoholu (PVA). Dalším činidlem je chlorhexidinediacetát, který se používá v dentálních aplikacích. Kromě těchto dvou uvedených sloučenin se také často používá tetracyklin, chlortetracyklin, doxycyklin, levofloxacin, rifampicin a mnoho dalších.
- ◆ Míchání polymerů s antimikrobiálními syntetickými nebo přírodními polymery uvedenými výše.³⁷⁻³⁹

2.1.2.4. Polymery s antimikrobiální anorganickou složkou

Poslední skupinu tvoří polymery s přídavkem aktivních anorganických systémů, které rozdělujeme do tří podskupin na základě charakteru anorganické složky.

- ◆ Prvním typem aktivních anorganických činidel jsou kovové částice. Nejčastěji se používají nanočástice stříbra, které jsou známe svými antimikrobiální účinky působícími na široké spektrum mikroorganismů. Některé studie se také zabývají inkorporací nanočástic mědi, zinku či zlata na povrch polymerů.^{37,38}
- ◆ Druhým typem jsou oxidy kovů. Nejčastěji používaným oxidem kovu pro antibakteriální úpravu je oxid titaničitý, který se používá jako fotokatalyzátor schopný degradace buněčné bakteriální stěny, který lze snadno inkorporovat do polymerní matrice. Na podobném principu, jako TiO_2 pracuje také oxid zinečnatý. Dále lze použít oxid dusnatý, který je běžně produkován v těle a jednou z jeho funkcí je likvidace bakterií.
- ◆ Posledním typem jsou organo-montmorillonity, ze kterých se tvoří kompozity. Používají se např. organojílové organo-montmorillonity modifikované kationtovými povrchově aktivními látkami.³⁷⁻³⁹

2.2. Patogenní mikroorganismy

Mikroorganismy definujeme jako živé organismy, které nelze pozorovat okem. Lze je rozdělit do čtyř základních skupin: viry, bakterie, mykotické organismy (kvasinky, plísňe) a jednobuněční parazité. Jedná se o organismy rozšířené po celé Zemi, podílející se na mnoha biologických aktivitách nezbytných pro ekosystém, jako jsou fotosyntéza, rozklad a recyklace. Některé mikroorganismy jsou však pro živočichy patogenní a mohou být příčinou onemocnění nebo infekcí.

Patogenita neboli choroboplodnost je schopnost mikrobu způsobit infekci či onemocnění. Název pochází z řeckých slov pathos = choroba a gennaó = tvořím, plodím. Patogenita je složitý jev, zahrnující vztah mikrobu a hostitele, z tohoto důvodu závažnost a typ infekce závisí, jak na vlastnostech patogenu, tak na zdraví pacienta. Infekce způsobené patogenními organismy léčíme pomocí antimikrobiotik, z nichž nejdéle používaná jsou antibiotika. V poslední době však dochází k nárůstu rezistence vůči těmto látkám.⁴¹⁻⁴³

Rozděluje dva základní typy patogenních mikroorganismů:

- ◆ Primárně (striktně) patogenní mikroorganismy, které jsou schopné způsobit nemoc u zdravého člověka a obvykle jsou spjaty s určitým druhem onemocnění, např. rýma, malárie, vzteklin.
- ◆ Mikroorganismy podmíněné (fakultativně) patogenní, které způsobují onemocnění lidem se sníženou imunitou. Mezi faktory oslabující imunitu patří vysoký věk, nízký věk, genetická porucha imunity, operace, transplantace, rakovina, diabetes či infekce závažnějšího charakteru.⁴¹

Často bývá zaměňován termín patogenita a virulence. Virulence je míra neboli stupeň patogenity a je dána schopností mikroorganismu usadit se v hostiteli a způsobit jeho poškození. Termín patogenita se používá v souvislosti s rodem nebo druhem, virulence se používá v rámci kmene a může být u jednoho druhu značně odlišná. Všechny vlastnosti a schopnosti mikroorganismu způsobit nemoc se nazývají faktory virulence.^{41,43}



Obr. 9: Diagram vstupu, usazení a odchodu původce infekce⁴¹

Mikroby mají celou řadu faktorů virulence ovlivňujících průnik a odolnost organismu proti obraným látkám hostitele (obr. 9). Do těla většinou pronikají přes kůži, dýchací, gastrointestinální a urogenitální trakt, ale také při porodu z těla matky. V první fázi dojde k adhezi neboli přilnutí mikrobu k buňce, k tomu slouží mikroorganismům chemické látky

adheziny a buněčné orgány jako jsou fimbrie a bičíky. Po ukotvení může mikrob (např. bakterie) začít produkovat cytotoxiny či jiné toxiny. Toxiny jsou bílkoviny účinkující jako enzymy s určitou specifickou aktivitou, které významně ovlivňují průběh nemoci. Produkce toxinů ničí okolní buňky a následný průnik, invaze mikrobu do organismu, může končit fatálními následky.⁴⁴

2.2.1. Rezistence

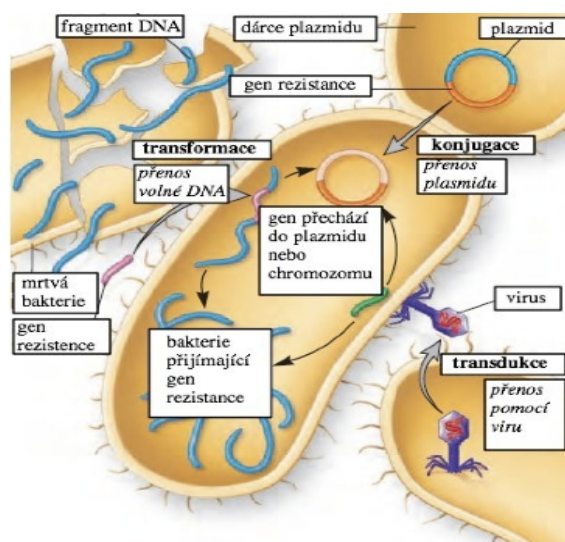
Definice rezistence mikroorganismů na léčiva je složitá. Obecně lze říci, že se jedná o adaptaci mikroorganismu na léčivo, což má za následek, že původní inhibiční množství léku nyní mikroorganismus toleruje. Podle klinické definice je mikrob rezistentní pokud je koncentrace látky potřebná k jeho inhibici vyšší než dohodnutá hraniční koncentrace. V biologickém významu označuje termín rezistence vyšší minimální inhibiční koncentraci než u ostatních (citlivých) členů populace. Z hlediska genetické definice obsahuje rezistentní kmen geny rezistence vůči antibiotiku.

S výjimkou přirozeně rezistentních druhů, nelze tedy na mikroorganismy pohlížet jako na citlivé nebo rezistentní, protože populace obsahují organismy s různou citlivostí a záleží pouze na počtu přeživších.^{41, 42}

2.2.1.1. Rozvoj a šíření rezistence

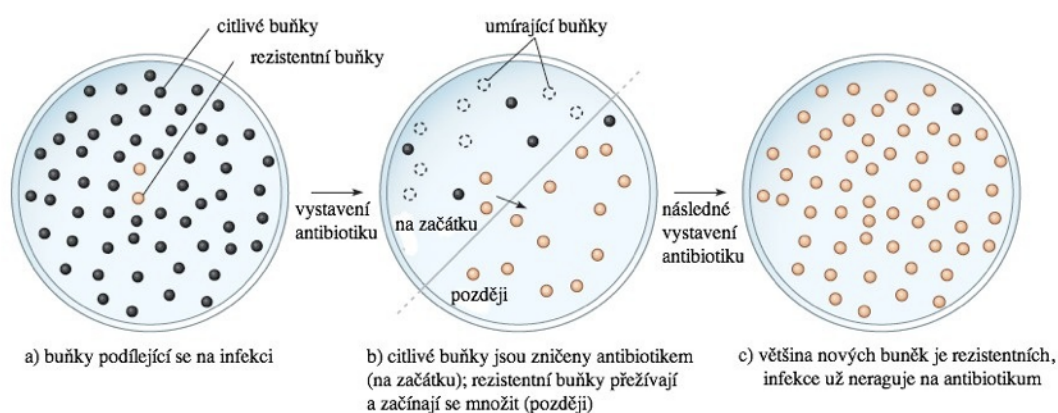
Rezistence je vlastnost získaná díky genetické přizpůsobivosti mikrobiálních populací. Geny rezistence mohou být přirozenou součástí buňky nebo se může jednat o vlastnost získanou. Přirozené geny rezistence vznikly pravděpodobně při ochraně buňky před inhibicí vlastním antibiotikem. Jedná se pouze o malou skupinu organismů, která není s ohledem na antimikrobiální léčbu problémem. Mnohem významnější je získání rezistence na látku, která byla původně pro buňku inhibiční.

Vývoj nového rezistentního mikrobu probíhá mutací chromozomu nebo získáním genu pomocí transferu od jiného druhu. První typ vyplývá ze spontánních mutací v bakteriální populaci. Druhý typ je akvizice transpozonu nebo plasmidu pomocí: konjugace – přenosu DNA při těsném kontaktu; transformace – absorpce volné DNA, RNA; transdukce – přenosu fágové nukleové kyseliny pomocí bakteriofágů (obr. 10).



Obr. 10: Přenos rezistence ⁴¹

V přírodě běžně dochází k mutacím, proto jsou rezistentní buňky přítomny stále, ovšem ve velmi nízké koncentraci, ve které se nejsou schopny uplatnit. Ke zvýšení frekvence výskytu dochází pomocí selekčního tlaku (antibiotika, dezinfekční přípravky, těžké kovy). Běžný citlivý mikrob je inhibován a zničen, ale rezistentní přežívá a množí se, následně vznikne populace rezistentní k léčivu (obr. 11).



Obr. 11: Model přirozené selekce: a) v každé populaci je určitá frekvence rezistentních buněk; b) tlak okolního prostředí (vystavení léku) vybere pouze přeživší buňky; c) časem se rezistentní buňky stanou dominantní. ⁴¹

V současnosti se jeví jako velká hrozba pro vznik a šíření rezistence masivní používání desinfekčních prostředků. Jejich vysoká spotřeba v domácnostech, je často škodlivá, protože potlačuje běžnou mikroflóru a zároveň stimuluje funkci efluxních pump, proteinových pump zabudovaných v buňce, a tím i schopnost buňky vylučovat antibiotika. Předpokládá se, že právě toto má za následek rozšíření komunitních multirezistentních organismů.

Mezi lokality s nejvyšší pravděpodobností vzniku rezistence patří nemocniční zařízení, ústavy sociální péče a velkochovy zvířat. Jedná se tedy především o místa s vysokou koncentrací lidí a zvýšeným používáním antimikrobiálních léčiv či desinfekcí. ^{41, 42, 44}

2.2.1.2. Mechanismy rezistence

Existuje pět základních mechanismů bakteriální rezistence. Prvním mechanismem je inaktivace léku pomocí produkce enzymu, nejznámější je inaktivace penicilinu pomocí enzymu beta-laktamázy, která hydrolyzuje beta-laktamový kruh. Dalším je snížení propustnosti a absorpce léku do buňky strukturální změnou porinu nebo zvýšením eliminace léku pomocí efluxních pump. Čtvrtým mechanismem je změna vazebného místa v ribozomu a následná neschopnost adheze léčiva. Posledním je ovlivnění metabolického rozkladu popřípadě alternativní rozklad na produkty neškodné pro mikroorganismus. Velmi důležitá je také změna rezistence bakterií v biofilmu (2.2.3). ^{41, 42, 44}

2.2.1.3. Současný stav a omezení výskytu rezistence

Nejznámější a nejvíce rozšířená je rezistence bakterií na antibiotika, především z důvodu jejich nejdelsího používání z antimikrobiálních látek. Přes značná omezení v současnosti stále roste počet rezistentních mikroorganismů. Nejzávažnější jsou případy infekcí způsobených multirezistentními bakteriálními kmeny. Infekce způsobené multirezistentními kmeny negativně ovlivňují léčbu a výskyt nozokomiálních infekcí, dále ovlivňují selhání běžné antibiotické léčby a s tím související mortalitu. Také zvyšují náklady spojené s léčbou a vývojem nových přípravků.

Zabránit rozvoji a šíření rezistence lze několika způsoby. Mezi základní možnosti patří snížení spotřeby antibiotik a jejich uvážené používání. Především je důležité vyloučení zbytečných aplikací a zákaz přidávání antibiotik do krmení pro zvířata. Velmi důležitý je průkaz původce infekce. Dalším způsobem je vývoj nových léčiv a jejich uplatnění v klinické praxi. V současnosti vývoj nových léků zaostává, především pro svoji finanční a časovou náročnost či možnost rychlého rozvoje rezistence. Probíhající výzkumy se soustředí především na vývoj antimikrobiálních látek, které se podávají ve vyšších dávkách, ale kratší dobu, což je efektivnější, méně nákladné a s nižším počtem vedlejších účinků.

Velmi důležité jsou dlouhodobé strategie boje proti rezistenci, podstatná je především surveillance. Surveillance spočívá ve sběru, analýze, sdělování dat zdravotnickému personálu a monitorování výskytu rezistentních mikroorganismů. V této oblasti, se kromě většiny vyspělých zemí, intenzivně angažuje Světová zdravotnická organizace, která má k dispozici software pro sběr a analýzu dat WHONET.

Mnoho zemí v rozvoji rezistence spatřuje velký problém, který se snaží co nejefektivněji řešit. Například v České republice je obzvláště závažný nárůst rezistence G⁻ tyčinek (enterobakterie,

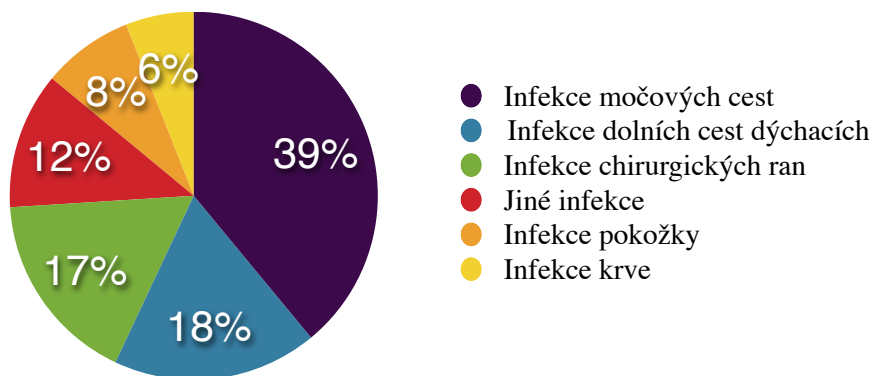
pseudomonády, acinetobacter), rezistence těchto mikrobů je u nás jednou z nejvyšších v EU. ⁴² Vzhledem k této alarmující skutečnosti byl ustanoven Národní antibiotický program, který obsahuje dlouhodobé cíle soustředěné především na surveillanci, potlačení výskytu a šíření všech rezistentních kmenů. ^{41, 42, 45}

2.2.2. Nozokomiální infekce

Jedná se o nemoci vzniklé v souvislosti s pobytem v nemocnici, obvykle jsou tak označovány infekce, které vznikly u pacienta po 48 hodinách po přijetí do nemocnice. Představují nežádoucí komplikace v nemocniční péči, jako jsou zvýšení mortality nebo prodloužení hospitalizace. Přestože jejich omezený výskyt je indikátorem vyšší kvality péče, je jejich výskyt v nemocničním prostředí nevyhnutelný, současné nemocnice jsou sběrná místa patogenních a rezistentních organismů.

Základní dělení nozokomiálních infekcí (NI) je podle původu:

- ◆ Endogenní infekce jsou infekce vyvolané vlastní mikroflórou pacienta, kdy se původce dostane z běžného působiště do jiného systému či orgánu a zde vyvolá infekci.
- ◆ Exogenní infekce jsou infekce, kdy je původce zanesen z vnějšího prostředí. Pacienti se mohou nakazit přímo, pokud je přítomen zdroj infekce, obvykle ruce personálu, nebo nepřímo, kdy zdroj není přítomen, avšak původce je v prostředí, ve kterém je schopen přežít: voda, strava, vzduch, operační rána, kontaminované předměty, lékařské vybavení, katetry, atd.



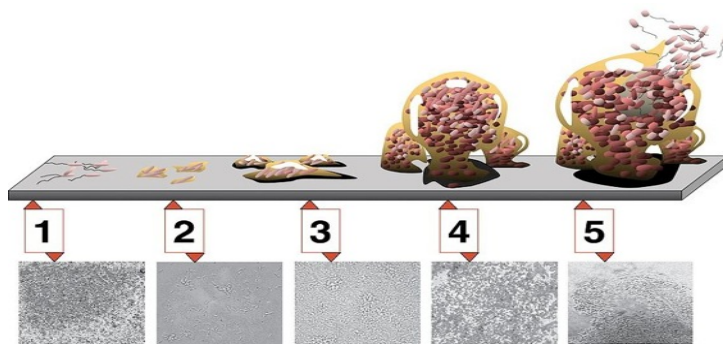
Obr. 12: Graf výskytu nozokomiálních infekcí ⁴¹

Přibližně jedna čtvrtina všech NI se vyskytuje u pacientů na JIP a ARO, hlavní příčinou je používání katetrů a mechanické ventilace. Mezi rizikové faktory vzniku NI patří přítomnost normální mikroflóry, kvantita potencionálně patogenních organismů a koncentrace těžce nemocných. Faktory ze strany pacientů jsou extrémní věk, chronická onemocnění a dlouhodobá hospitalizace. I přes snahu o dodržování a monitorování NI, zůstávají uvedené infekce (obr. 12) velkým problémem současné medicíny a jejich výskyt v poledních letech prudce narůstá. ^{41, 46}

2.2.3. Biofilm

Přirozené prostředí pro život mikroorganismů je ve společenství neboli biofilmu. Biofilm je značně rozšířený jev, který můžeme denně pozorovat na usazeninách na WC, ve sprše, na trupech lodí, v čističkách odpadních vod, ale i v našem těle, kde se biofilm tvoří na zubech (zubní plak) nebo jako ochranná vrstva žaludeční sliznice. Většinou se jedná o společenství několika mikrobiálních skupin (bakterií, hub, prvoků a řas).

Vzniká především ve vodném prostředí. Vhodným podkladem pro jeho tvorbu je tenká vrstva organického materiálu, na kterou se mohou přichytit volně se pohybující buňky, tzv. primární kolonisté, obvykle planktonické (volně plující) bakterie. Po přilnutí začnou bakterie produkovat polysacharid, který je přichytí k povrchu, z této látky se postupně vytvoří matrice s mikrokoloniemi a spleť kanálků (obr. 13).



Obr. 13: Stádia vývoje biofilmu – 1. prvotní přilnutí, 2. nevratné uchycení, 3.–4. růst, 5. disperze ⁴⁷

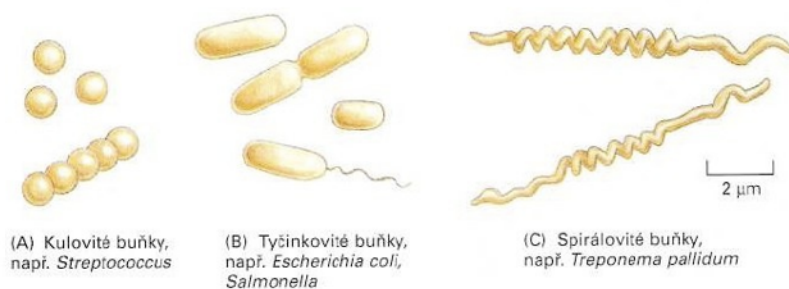
Fenotyp bakteriální buňky se v biofilmu mění, dochází k mutaci genů regulujících vývoj biofilmu, podílejících se na virulenci a rezistenci bakterie. Po nějakou dobu jsou změněné vlastnosti zachovány i u buněk uvolněných z biofilmu.

Předpokládá se, že okolo 60 % všech infekcí je způsobeno mikroorganismy z biofilmu, např. endokarditida nebo zánět močových cest. Největším problémem při léčbě těchto infekcí je rezistence bakterií vůči antibiotikům a odolnost biofilmu proti chemickým a antimikrobiálním látkám. Buňka v biofilmu je až tisíckrát více rezistentní než planktonická buňka, což je způsobeno jak vlastnostmi biofilmu, tak změnou fenotypu buňky.

Ve zdravotnictví způsobuje biofilm největší problémy na pomůckách zavedených do tělních dutin a tkání: močových katetrech, respiračních trubicích a mnoha dalších, z tohoto důvodu se v současnosti hledají způsoby, jak se biofilmu zbavit. Jednou z možností je aplikace antimikrobiálních látek. ^{41,44}

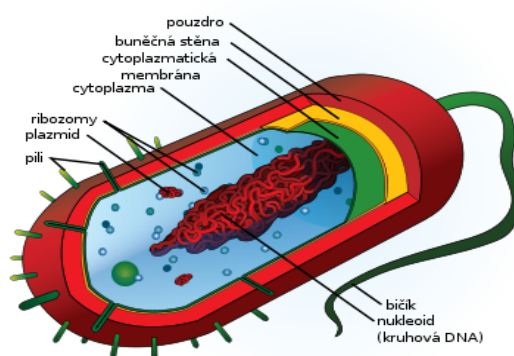
2.3. Bakterie a jejich dělení

Název pochází z řeckého baktrón = hůl, berla, chůda. Bakterie je jednobuněčný prokaryotický mikroorganismus, který může tvořit kolonie nezávislých buněk. Prokaryotické buňky jsou jedny s nerozšířenějších organismů na Zemi především proto, že se dokáží adaptovat na mnohá prostředí, ale také díky svému rychlému reprodukčnímu cyklu. Dokáží se rychle vyvíjet a získávat nové schopnosti, jako je například rezistence nebo schopnost využití nových zdrojů potravy. Některé druhy mohou být patogenní pro jiné organismy, především pro svou schopnost proniknutí do organismu, produkci toxinů a stimulaci zánětlivé reakce. ^{43, 48, 49}



Obr. 14: Základní tvary bakteriální buňky ⁴⁹

Z dnešních buněk mají bakterie nejjednodušší strukturu. Mají pouze tři základní struktury: kulovou, okrouhlou nebo spirálovitou (obr. 14). Prokaryotické buňky nemají na rozdíl od eukaryotických buněk jádro s DNA. Bakterie obsahuje cytoplazmu s DNA, která je ohraničena buněčnou stěnou. Vnitřní struktura buňky je bez jakékoliv viditelné struktury, DNA není vázána v žádné organele (obr. 15). ^{43, 49}

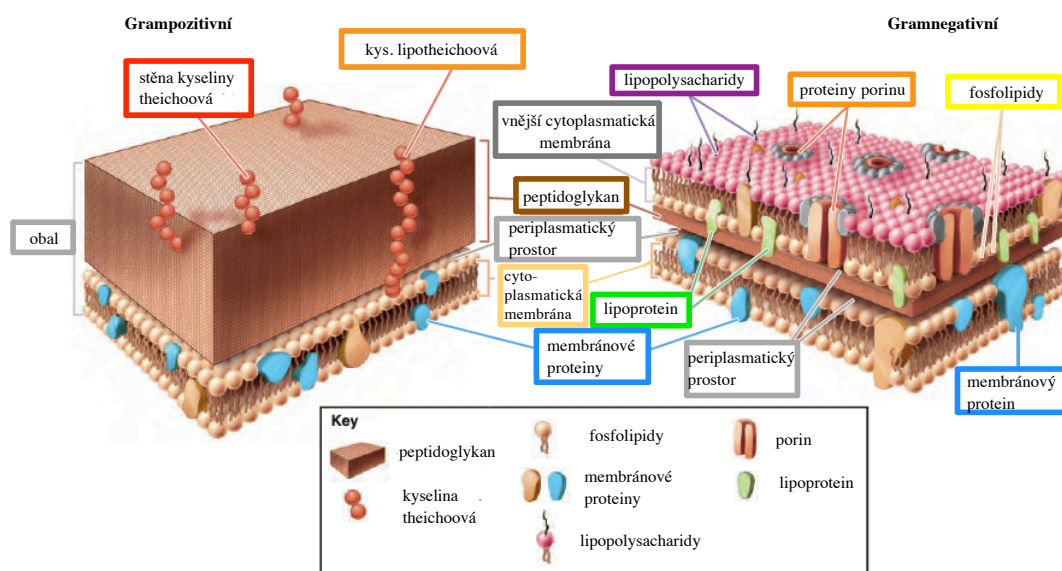


Obr. 15: Prokaryotické buňky ⁵⁰

Jedním ze základních dělení prokaryotních buněk je dělení podle typů buněčné stěny. Existují tři základní typy prokaryotních buněk: mycoplasmy, grampozitivní (G^+) a gramnegativní (G^-) bakterie. ⁴⁸

Mycoplasmy jsou nejjednodušší prokaryotické buňky, které se vyznačují tím, že nemají buněčnou stěnu, ale pouze cytoplasmatickou membránu.

G^+ bakterie je tvořena silnou buněčnou stěnou s peptidoglykanu (PG) a vnitřní buněčnou membránou. G^- bakterie má složitější stavbu, skládá se ze dvou buněčných membrán vnitřní, vnější a buněčné stěny z PG (obr. 16).



Obr. 16: Srovnání struktury buněčné stěny G^+ a G^- buňky ⁴¹

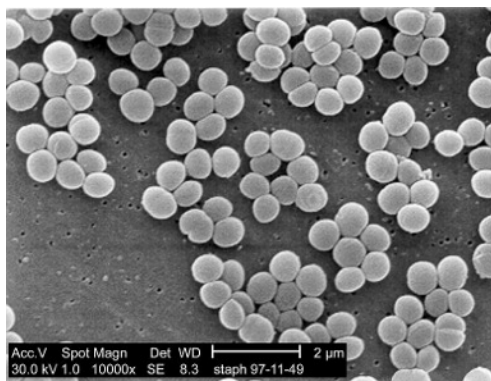
Buňky jsou stabilní a pevné především díky makromolekule PG. Mnoho druhů léčiv je účinných díky své schopnosti se navázat na PG, narušit celistvost buněčné stěny a tím zvýšit náchylnost buňky k lýze neboli destrukci buňky. Vnější membrána G^- buněk zabráňuje vázání látek na PG a přispívá k ochraně buňky proti desinfekčním prostředkům a lékům. Výjimkou jsou chemické prostředky na bázi alkoholu, které vnější membránu rozpouštějí. Kvůli těmto vlastnostem buněčné stěny je často nutné použít pro léčbu infekcí způsobených G^+ a G^- bakteriemi jiné druhy léčiv.

K určení druhu bakterií se používá Gramovo barvení, známé již z 19. století. Jedná se o barvení buněk krystalovou violetí a následné odbarvování. Základním principem je rozdíl rozpustnosti buněčné stěny v alkoholu, G^- bakterie se po rozpuštění buněčné stěny odbarví, ale G^+ bakterie zůstane obarvena. ⁴¹

Bakterie také dělíme, podle prostředí potřebnému k růstu, na aerobní (vyžadují ke svému růstu přítomnost vzdušného kyslíku), na anaerobní (vyznačující se metabolismem probíhajícím bez vzdušného kyslíku) a na striktně anaerobní bakterie (kyslík na ně působí inhibičně až toxicky). Existují také fakultativně anaerobní bakterie, které jsou schopny růst za obou podmínek. ⁴³

2.3.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) neboli zlatý stafylokok je fakultativně anaerobní G⁺ kok, který se vyskytuje ve shlucích podobných hroznům. Je nepohyblivý a netvoří spory. Jedná se o oportunní patogen s četnými faktory virulence (toxiny, enzymy). Běžně se nachází v lidském těle, přibližně 20 % až 60 % lidí je přenašečem této bakterie, avšak kolonizace u nich nevede k příznakům nemoci.



Obr. 17: MRSA ⁵¹



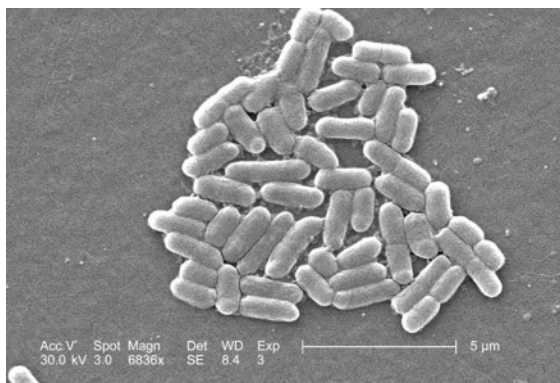
Obr. 18: Rána infikovaná bakteriemi
Staphylococcus aureus ⁵²

S. aureus patří mezi nejčastější původce nozokomiálních infekcí. Napadá především pacienty s katetry, s diabetem, na ventilátorech nebo s pooperačními ranami. Infekce může způsobit lehké hnisavé záněty kůže, ale také závažné nemoci, které mohou skončit smrtí, např. syndrom toxického šoku. ^{41, 53, 54}

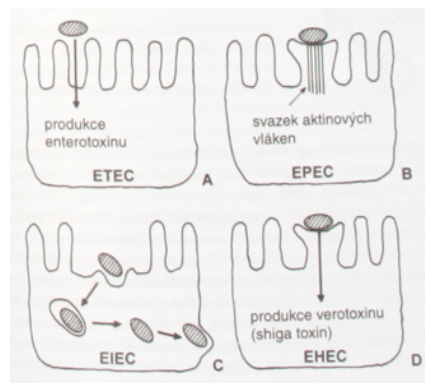
Jedním z největších problémů při léčbě stafylokokové infekce je narůstající rezistence bakterie vůči antibiotikům. Hlavní hrozbou je narůst infekcí kmene MRSA (methicillin-rezistentní *S. aureus*) (obr. 17). Infekce se šíří kontaktem, často napadá dlouhodobě hospitalizované pacienty, avšak byly zaznamenány i případy mezi sportovci, vězni a dětmi ve školce. Některé nemocnice udávají, že více než polovina všech izolovaných kmenů *S. aureus* je MRSA. MRSA je obvykle léčena vancomycinem, avšak rezistence na toto antibiotikum výrazně roste, u celé řady případů byla prokázána tzv. VRSA (vancomycin-rezistentní *S. aureus*). ^{41, 54, 55}

2.3.2. *Escherichia coli*

Je G⁻ fakultativně anaerobní tyčinková bakterie tvořící biofilm z čeledi *Enterobacteriaceae*. Běžně se nachází v trávicím traktu teplokrevných živočichů, kde syntetizuje důležité vitaminy K, B12 a působí proti přemnožení škodlivých bakterií. Její přítomnost ve vodě nebo potravinách indikuje fekální znečištění. Jedná se o tzv. modelový organismus, který slouží pro rozsáhlé výzkumy. ^{43, 53}



Obr. 19: *Escherichia coli* ⁵⁶



Obr. 19: Patogenní působení *E. coli* ⁴⁴

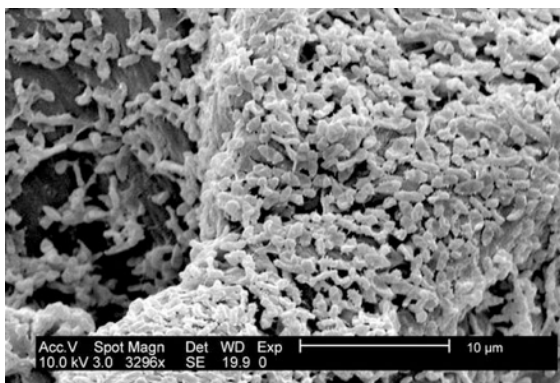
Escherichia coli (*E. coli*) je podmíněný patogen, který může vyvolat mnoho druhů střevních onemocnění. Z bakterie se obvykle stane patogen po přenosu plasmidu s geny faktorů virulence od jiných mikrobů. *E. coli* je zodpovědná až za 80 % všech cestovních průjmů a většinu infekcí močových cest.

Rozděluje čtyři základní skupiny kmenů způsobujících střevní onemocnění (obr. 20):

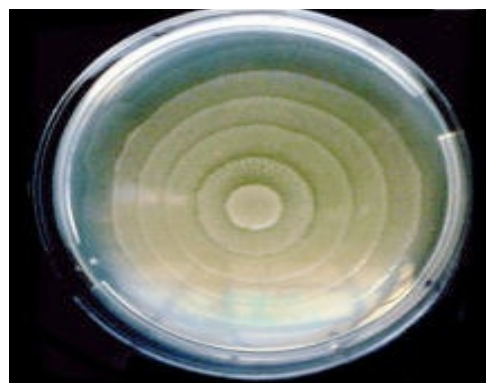
- ◆ **Enteropatogenní *E. coli* (EPEC)** způsobuje průjmy novorozenců a kojenců, neprodukuje enterotoxiny, je největší hrozbou v rozvojových zemích.
- ◆ **Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC)** se vyskytuje především v tropických oblastech, kde způsobuje cestovatelské průjmy, produkuje 2 typy enterotoxinů.
- ◆ **Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC)** proniká do buněk sliznice.
- ◆ **Enterohemoragická *E. coli* (EHEC)**, je nejnebezpečnější z uvedené třídy mikroorganismů. Produkuje cytotoxin verotoxin způsobující hemoragickou kolitidu. Toto onemocnění se vyskytuje především u dětí a seniorů, obvykle má těžký průběh a často způsobuje selhání ledvin až smrt. ^{43, 44, 53}

2.3.3. *Proteus mirabilis*

Jedná se o G⁻ fakultativně aerobní bakterii tyčinkovitého tvaru, jenž má bičíky po celém povrchu, patří do rodu *proteus*. Obvykle se nachází v lidském trávicím traktu, ale vyskytuje se také v půdě, ve vodě, na rostlinách a v exkrementech zvířat. Může způsobit infekci močových cest (IMC), ale také sekundární infekce při poraněních, dekubitách a otitidách. ^{43, 53} Jedná se o velmi pohyblivý mikrob charakteristický svým plazivým pohybem, který lze dobře identifikovat z koloniálního růstu na agaru. Periodicky střídané fáze buněk tvoří na krevním nebo čokoládovém agaru charakteristické vlny (obr. 22).



Obr. 21: *Proteus mirabilis*⁵⁷



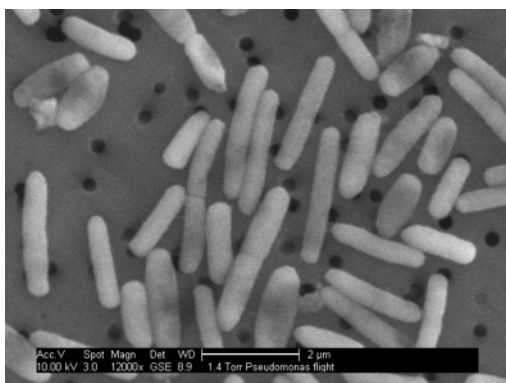
Obr. 22: Charakteristické růstové vlny
P. mirabilis na agaru⁵⁸

Řadí se mezi patogenní bakteriální kmeny, obsahuje četné faktory virulence – fimbrie, proteolytické enzymy, cytotoxiny, hemolyziny, ureázu a bičíky.⁴⁴ Bakterie nezpůsobuje IMC u normálních hostitelů, obvykle je izolována u komplikovaných případů IMC, pacientů s urolitiázou nebo s dlouhodobou katetrizací.⁵⁹

Proteus mirabilis se běžně léčí antibiotiky používanými k léčbě IMC, komplikace v léčbě mohou nastat především při výskytu ledvinových kamenů, renálního zjizvení, nebo při zavedení permanentního katedru. Avšak výrazně se zvyšuje rezistence vůči antibiotikům, především ampicilinu a trimethoprimu.⁶⁰

2.3.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Je G⁻ aerobní bakterie tyčinkovitého tvaru s jedním polárním bičíkem. Spadá do tzv. fluorescenčních pseudomonás, vytváří žlutozelený fluoerescein a modrozelený pigment pyocyanin, podle kterého byla bakterie původně pojmenována. Běžně se nachází v půdě, ve vodě a na rostlinných produktech, také může být izolována ze slin nebo kůže. Je rezistentní na běžné čističe a mýdla, je schopna růst i při teplotě 42 °C, proto jí můžeme nalézt na dezinfikovaných nástrojích, nádobí i na sociálních zařízeních. Často se vyskytuje v horkých vířivkách a bazénech.



Obr. 23: *Pseudomonas aeruginosa*⁶¹

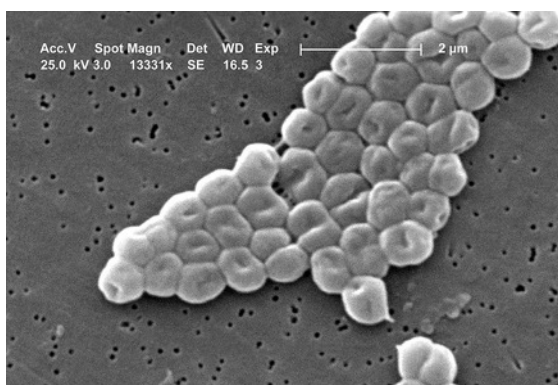


Obr. 24: Infekce způsobená *P. aeruginosa*⁶²

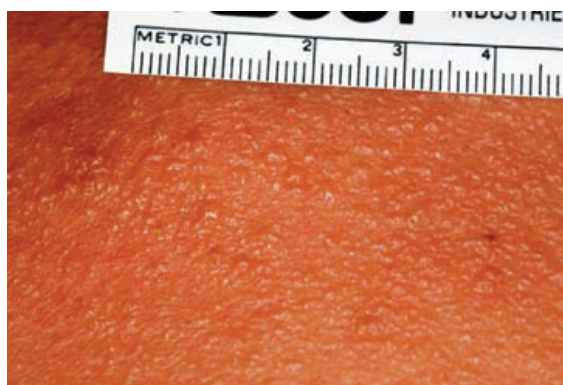
P. aeruginosa je považována za extracelulární, striktně patogenní bakterii, která způsobuje nozokomiální infekce. Bakterie tvoří biofilm, díky kterému je značně odolná proti antibiotikům a jiným antimikrobiálním přípravkům. Vyvolává vyrážky, záněty středního ucha, močových cest, ale také lokální infekce u popálenin a bércových vředů. Má značné faktory virulence (cytolytické exotoxiny, antifagocytární polysacharidovou slizovou vrstvu, enzymy degradující okolní tkáň, včetně Toxinu A). Toxin A je považován za nejedovatější produkt tohoto mikroorganismu. ^{41, 43, 53}

2.3.5. *Acinetobacter baumannii*

G⁻ aerobní bakterie, je krátká opouzdřená tyčinka obvykle se vyskytující v párech nebo řetězcích různé délky. Jedná se o kmen nehemolytický a oxidující glukózu. ⁵³ Běžně se vyskytuje v okolním prostředí, ale je také součástí běžné mikroflóry kůže a dýchacích cest člověka. Dokáže přežít měsíce ve dřezech, na toaletách, povlečení, klikách, katetrech a respirátorech.



Obr. 25: *Acinetobacter baumannii* ⁶³



Obr. 26: Celulitida měkkých tkání způsobená *A. baumannii* ⁶⁴

Jedná se o oportunní patogen způsobující nozokomiální infekce ran, sepse, infekce močových a dýchacích cest. Je rezistentní proti většině antimikrobiálních látek, většina infekcí může být léčena kombinací karbapenů, colistinu, polymyxinu B a ampicillinu. ^{41, 43, 65}

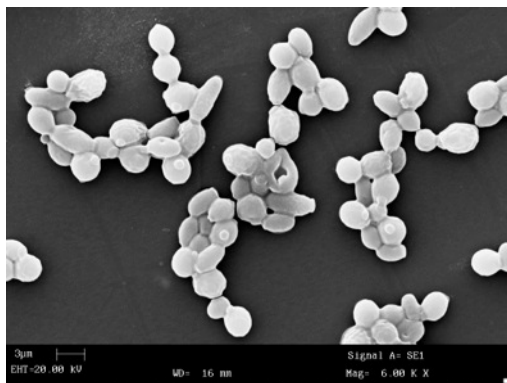
2.4. Kvasinky

Kvasinky jsou malé jednobuněčné houby, které se hojně vyskytují v přírodním prostředí, jsou také přítomny u všech teplokrevných zvířat. Jedná se o jednoduchou eukaryotní buňku živící se cukrem, vylučující alkohol a oxid uhličitý.

Jsou hojně využívány v potravinářství, avšak mají tendenci znehodnocovat potraviny. Některé druhy jsou patogenní pro člověka a vyvolávají mykotická onemocnění.^{43,49}

2.4.1. *Candida albicans*

Jedná se o kvasinku z rozsáhlého rodu *Candida*, tvořící šedobílé kolonie s kvasinkovým zápachem. Běžně se nachází v půdě a v exkrementech zvířat, ale také u 20 % lidí v hltanu, pohlavních orgánech, tlustém střevě nebo na kůži.



Obr. 27: *Candida albicans*, kvasinkové buňky⁶⁶



Obr. 28: Orální kandidóza⁶⁷

Jedná se o typický patogen způsobující okolo 70 % všech plísňových infekcí. Významným faktorem virulence je tvorba zárodečných klíčků a schopnost adherence k epiteliálním buňkám. Je původcem kandidózy, která se může projevit jak podrážděním kůže, tak fatálním systémovým onemocněním. Způsobuje onemocnění hrtanu, vaginy, zažívacího traktu a na kůži, obvykle se projevuje u novorozenců a oslabených jedinců. U žen, které užívají antibiotika nebo jsou těhotné, může způsobit vulvovaginální kandidózu. Infekce krve, je nejzávažnější onemocnění vyvolané tímto organismem, obvykle se projevuje u chronicky oslabených pacientů. Léčí se antimykotickými prostředky.^{41,43}

2.5. Metoda sol-gel

Metoda sol-gel je chemická metoda určená pro výrobu nekovových materiálů. Lze ji charakterizovat jako speciální proces výroby skla a keramiky, který probíhá při nižších teplotách (např. příprava křemičitého skla pomocí sol-gel metody probíhá při teplotách 600-1000 °C). Materiály vyráběné a charakterizované pomocí metody sol-gel mají zcela unikátní vlastnosti a získaly široké uplatnění. V současnosti se metoda používá zejména v materiálovém inženýrství pro tvorbu tenkých vrstev a speciálních materiálů (organicko-anorganické materiály, nanokompozity).⁶⁸⁻⁷⁰

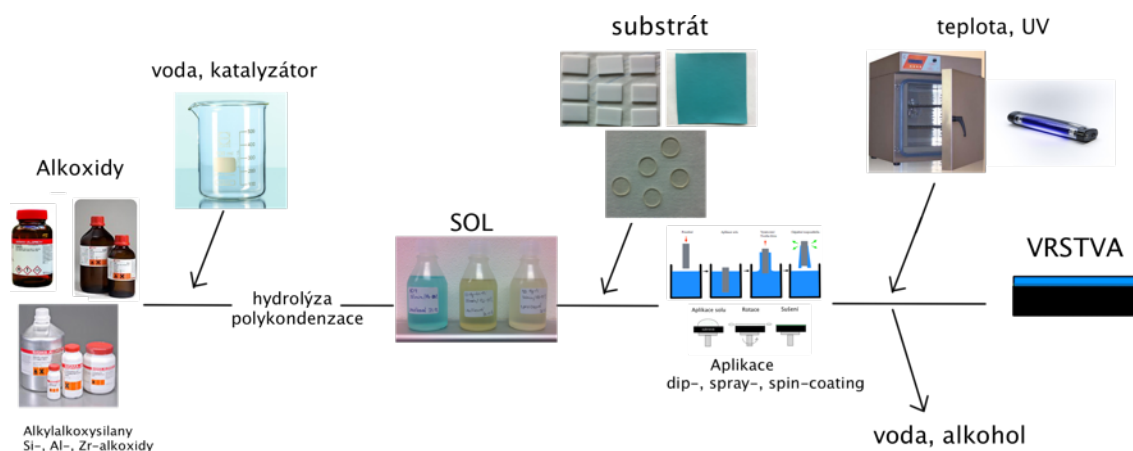
2.5.1. Charakteristika metody

Metoda sol-gel je založena na homogenizaci výchozích složek ve formě roztoku, jejich převodu na sol (tekutý koloidní roztok) a následně na gel. Avšak metodou sol-gel označujeme i příbuzné postupy, bez ohledu na přítomnost gelu. Obvykle vycházíme z alkoxidů nebo vodných solů oxidů. V závislosti na volbě výchozí látky dochází k různým typům zpracování.

Pokud vycházíme z alkoxidů, je nutné látky převést pomocí hydrolýzy a polykondenzace na sol. V případě použití vodných solů oxidů už ze solu vycházíme. Obvykle soly rozdělujeme podle typu kapaliny, kterou obsahují, na hydrosoly (obsahují vodu) a organosoly (obsahují organickou kapalinu).

Sol je převeden na gel, pomocí vlhkosti a dokončení polykondenzace nebo v druhém případě destabilizací pomocí změny pH. Gely jsou pevné elastické látky tvořené polymerní sítí, která tvoří kostru systému, a kapalnou částí obsaženou v pórech nebo kanálech sítě. Vlastnosti gelů jsou závislé na chemickém složení a hmotnostním rozdělení obou částí (kapalné a pevné).

Po odpaření rozpouštědla vzniká xerogel, následným tepelným zpracováním, či fotopolymerací vznikají např. vrstvy, vlákna, monolity, prášky....⁶⁹

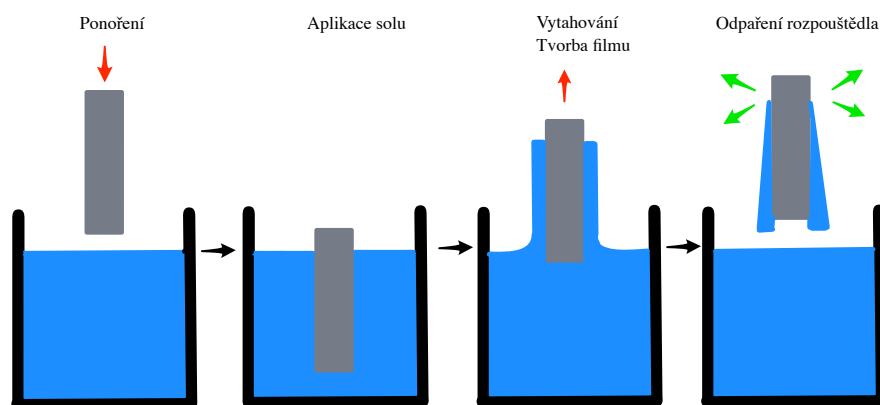


Obr. 29: Schéma přípravy hybridních vrstev pomocí metody sol-gel.

2.5.2. Techniky aplikace solů

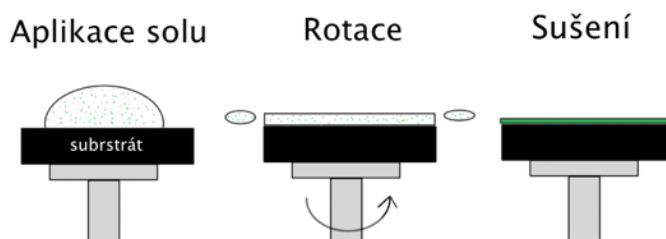
Pro nanášení vrstev na substráty existuje celá řada technik, které jsou vybírány podle tvaru a typu substrátu. Pro výrobu i výzkum se nejčastěji používají techniky dip-coating nebo spin-coating. Existují však i jiné techniky uplatňované především ve výrobních procesech (flow-coating, spray-coating).

Dip-coating (obr. 30) neboli technika vytahování je jednou z nejběžnějších metod nanášení solů na substrát. Substrát je nejprve ponořen do solu a následně konstantní rychlostí vytahován. Na substrátu vzniká díky hydrolytickým a polykondenzačním reakcím vrstva, v určitých případech vzniká chemická vazba mezi substrátem a solem. Následně dochází k odpařování rozpouštědla z povrchu a tvorbě gelu. Změnou rychlosti vytahování dochází ke změně tloušťky vrstvy. Touto technikou se nanášejí vrstvy o velikostech 15-150 nm, v případě silnějších vrstev dochází k odlupování. Lze takto připravit vrstvy i substráty o větších rozměrech.



Obr. 30: Technika dip-coating

Technika spin-coating (obr. 31) neboli technika odstřeďování se běžně používá na ploché substráty. Na přichycený rotující substrát je nanesen sol, který se pomocí odstředivých sil rovnoměrně rozprostře po povrchu. Kvalita a tloušťka vrstvy závisí na solu a proudění vzduchu. Touto metodou vznikají rovnoměrné vrstvy tloušťky 15-300 nm. Nevýhodou metody je omezená velikost substrátu.



Obr. 31: Technika spin-coating

Spray-coating technika spočívá v nanášení vrstvy pomocí sprejování. Tato technika se využívá pro nanášení vrstev na nerovnoměrné substráty. Využívá se především pro svou vysokou rychlost nanášení a efektivní využití solu, nevýhodou je nerovnoměrnost nanesené vrstvy.

Flow-coating neboli nalevání solu, na substrát je nalévána rovnoměrná vrstva solu. Výhodou této metody je možnost nanášení na zakřivené a velké plochy substrátu. Obvykle je doplněna metodou spin-coating, aby se předešlo nerovnoměrnostem v pokrytí.

Capillary-coating byla vyvinuta pro přesné nanášení vrstev za využití veškerého solu. Technika spočívá v nanášení vrstev pomocí válce.^{68, 71}

2.6. Hybridní materiály

Názvem hybridní materiály označujeme mnoho různých druhů materiálů, obvykle složených s organické a anorganické složky. Složky mohou být v materiálu vázané dvěma typy vazeb. První skupinu tvoří materiály obsahující slabé vazby mezi svou organickou a anorganickou fází (van der Waalsovy vazby, vodíkové můstky), druhou skupinu tvoří materiály, které mají organickou a anorganickou fázi spojenou silnou chemickou vazbou (kovalentní). Hybridní materiály lze připravit sol-gel metodou s využitím různých typů prekurzorů (2.6.1.).

Hybridní materiály se vyskytují pod různými názvy jako je ORMOSILs (organically modified silicates), ORMOCERs (organically modified ceramics), CERAMERs (ceramic polymers) nebo POLYCERAMs (polymeric ceramic materials).^{70, 72, 73}

2.6.1. Prekurzory používané pro přípravu hybridních materiálů

Prekurzory používané k syntéze hybridních materiálů, lze rozdělit do čtyř základních skupin.

První skupinou jsou jednoduché křemičité alkokidy, které tvoří silikátové sítě s kovalentními vazbami Si–O–Si. Jedná se například o tetraethylorthosilikát (TEOS).

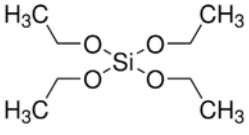
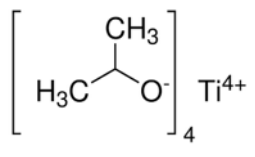
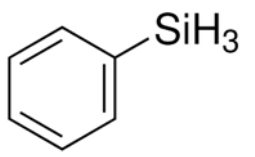
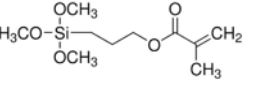
Druhým typem prekurzorů jsou heterokovy neboli alkokidy obsahující atomy jiných kovů než křemíku (Al, Zr, Ti, Sn,...) Během reakce dochází ke vzniku kovalentních vazeb typu Si–O–kov. Toho se využívá především ke zvýšení zesílení a tím změně tuhosti či velikosti pórů. Mezi nejčastěji používané heterokovy patří isopropoxid titanu (IPTI) a isopropoxid hliníku.

Třetím typem jsou prekurzory na bázi alkylalkoxilanů s nereaktivními organickými skupinami (fenyl, methyl). Uplatňují se zde vazby Si–C. Protože nereaktivní skupiny nepodléhají dalším reakcím, ovlivňují výsledný materiál pouze svou přítomností, mají například vliv na povrchové chování materiálů.

Poslední skupinou jsou alkylalkoxysilany s reaktivními organickými skupinami (methakryloyl, epoxy, vinyl). I zde se uplatňují vazby Si–C. Volné organické funkční skupiny jsou však schopny dále specificky reagovat. Lze na ně navazovat další chemikálie, nebo je působením UV či jiného katalyzátoru polymerovat.

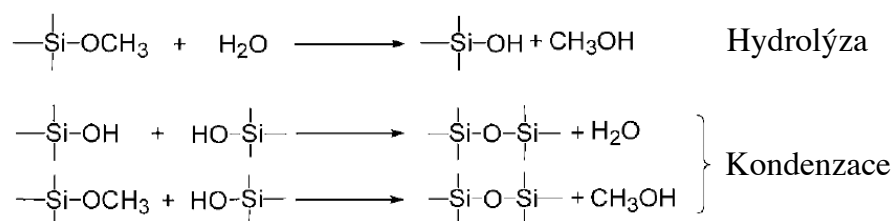
Alkylalkoxysilany jsou obecně teplotně stabilní látky. Velkou nevýhodou látek s vazbou C-O-Si je jejich hydrolyzace v přítomnosti vody. Na rozdíl od této vazby je kovalentní vazba Si-C odolná proti hydrolyze a je tak zachována i ve výsledném produktu.⁷²⁻⁷⁴

Tabulka 6: Příklady struktur prekurzorů používaných pro syntézy anorganických a hybridních materiálů⁷²

Typ I.	Typ II.	Typ III.	Typ IV.
			
tetraethylorthosilikát	isopropoxid titanu	fenylsilan	3-(trimethoxysilyl)propyl methakrylát

2.6.2. Příprava hybridních materiálů pomocí metody sol-gel

Přípravu hybridního materiálu můžeme rozdělit do dvou kroků. V prvním kroku se tvoří anorganická síť. Reakce se skládá ze dvou současně probíhajících dějů (obr. 32). Prvním krokem je hydrolyza C-O-Si vazeb, následovaná polykondenzací vznikajících Si-O-H a Si-O-R (R=alkyl) vazeb.^{74, 82} Uvedené reakce jsou velmi dobře popsány v řadě odborných publikací.^{69-71, 73} Změnou výchozích podmínek, jako je pH, množství vody, chemické složení směsi, rozpouštědlo, teplota, můžeme řídit velikost a tvar vznikajících makromolekul a tím vlastnosti připravovaného solu.⁷²



Obr. 32: Schéma sol-gel reakce⁷⁰

Druhým krokem syntézy je tvorba organické sítě, zpravidla se používají tzv. kompatibilní materiály (materiály patřící do první skupiny, vznikají slabé interakce s anorg. sítí). Pokud použijeme takové materiály dojde k rozprostření polymeru v silikátové síti a vzniku homogenní směsi. Používají se například polymery s amidovou funkční skupinou, kde vznikají vodíkové můstky mezi amidovou a silanovou skupinou. Dále polyuretany, polyiminy, polykarbonáty, ale také polymery s fenylovou skupinou.⁷⁴

Materiály, kde vzniká kovalentní vazba (tzv. druhá skupina), připravujeme obvykle organickým zesíťováním během tvrzení, kdy podle typu výchozí látky a zvoleným podmínkám dochází k tvorbě lineárního nebo 3D polymeru. Při těchto reakcích se používají tzv. telechelické polymery (polymery s vysokým polymeračním stupněm a stejnými reaktivními koncovými skupinami) nebo polymery obsahující alkylalkoxysilanovou skupinu, jako je 3-aminopropyltrimethoxysilan, 3-trimethoxysilyl propylmethakrylát (TMSPM) a další.^{70,74}

2.6.3. Vlastnosti hybridních materiálů

Hybridní materiály silně ovlivňují vlastnosti substrátu, jako je tvrdost, flexibilita, hydrofobicita/hydrofilicita, index lomu atd. Většina těchto vlastností závisí na poměru anorganické a organické části v hybridním materiálu. Vlastnosti lze snadno kontrolovat a vhodně upravovat.⁷⁰

2.6.3.1. Adheze a mechanické vlastnosti

Hybridní materiály mají různé vlastnosti v závislosti na zvolených výchozích materiálech, díky tomu jsou schopné se přizpůsobit různým typům substrátů. Anorganická složka zajišťuje materiálu tvrdost, chemickou odolnost a teplotní stabilitu, zatímco organická složka zajišťuje flexibilitu, odlehčenost, adhezi a tvorbu filmu. Je důležité zvolit vhodnou kombinaci těchto složek tak, aby nedošlo ke zhoršení mechanických vlastností a zároveň se zabránilo tvorbě trhlin. Většina hybridních materiálů vykazuje dobré adhezní vlastnosti k substrátům jako je sklo, keramika, polymery s vhodnými funkčními skupinami a kovy. Mechanické vlastnosti hybridních materiálů jsou zkoumány měřením Youngova modulu pružnosti a měřením odolností proti otěru.^{70,72}

2.6.3.2. Hydrofobicita / hydrofilicita hybridních materiálů

Jednoduchou úpravou hybridních materiálů (vrstev) lze získat hydrofobní vlastnosti. Hydrofobicitu získáme přidáním dlouhých alkylových řetězců uhlovodíků. Vzniklé vysoké povrchové napětí zabraňuje smáčení povrchu. Látky zajišťující tyto vlastnosti se mohou po čase vymýt, čemuž můžeme zabránit kovalentním navázáním látek během sol-gel syntézy. Hydrofobní látky se v praxi používají především pro svoji snadnou omyvatelnost. Vzhledem k tomu, že výrazně snižují adhezi mikroorganismů k povrchu, používají se ve zdravotnictví jako prevence proti růstu biofilmu.^{72,75}

Hydrofilních vlastností lze dosáhnout například imobilizací hydrofilního polymeru (PEG) na povrch hybridního materiálu. Dalším způsobem přípravy hydrofilního materiálu je fyzikální absorpce hydroxylových skupin nebo karboxylových kyselin, či jejich solí.^{75,76} Velké uplatnění

mají hydrofilní materiály v biomedicínských aplikacích, kde vhodná hydrofilicita zvyšuje adhezi a proliferaci buněk.⁷⁷

2.6.4. Antibakteriální povrchy (vrstvy)

Nejčastěji používanou a zkoumanou metodou pro dosažení antimikrobiálních vlastností je modifikace povrchů. Antibakteriální povrchy jsou schopny omezit přichycení a růst buněk. Povrchy můžeme rozdělit podle jejich účinků na bakterie na dva základní typy. Prvním typem povrchu je povrch bránící znečištění, tento typ brání nebo předchází přichytávání bakterií. Druhým typem je povrch baktericidní, který bakterii zahubí.

Povrchy mohou být buď přírodní, přírodou inspirované nebo umělé. Mezi přírodní povrchy patří např. lotosové listy, žraločí kůže, hmyzí křídla aj. Umělé povrchy dělíme podle způsobu přípravy (tabulka 7) na povrchy s povrchovou úpravou (např. polymeraci, funkcionalizaci, úpravu plazmou) a na povrchy upravené vrstvami (např. hybridní vrstvy s antimikrobiálním účinkem).³⁸

Hybridní antibakteriální vrstvy se obvykle připravují pomocí metody sol-gel, která umožňuje do sítě zabudovat různé typy látek s antimikrobiálním účinkem. Vrstvy se často dopují nanočásticemi nebo ionty s inhibičními účinky na mikroorganismy, stříbrem (Ag^0 , Ag^{+I}), zlatem (Au^0), mědí (Cu^0 , Cu^{+I} , Cu^{+II}), zinkem (Zn^0 , Zn^{+II}) a oxidem titaničitým.⁷⁸⁻⁸⁰

Celá řada studií se věnuje antibakteriální účinnosti jednotlivých iontů a nanočástic. U hybridních antibakteriálních vrstev, které byly připraveny ze solí dusičnanů (Ag, Cu, Zn) dopovaných do methyltriethoxysilanu (MTEOS), výsledky prokázaly, že vrstva dopovaná Ag^{+I} vykazuje nejvyšší antibakteriální účinek, následovaná vrstvou dopovanou kationty Zn^{+II} a jako nejméně účinná se ukázala vrstva s kationty Cu^{+II} .⁸⁰ Stříbrem dopované hybridní vrstvy ve vodném roztoku uvolňují Ag^{+I} , které způsobuje baktericidní efekt. Kationty Ag^{+I} mohou interagovat s PG buněčnou stěnou, bakteriální DNA v cytoplasmě a bakteriálními proteiny nezbytnými pro životně důležité procesy bakteriální buňky.⁸¹

Vlastností antibakteriálních vrstev se využívá v celé řadě zdravotnických aplikací (ošetření katetrů, implantátů, dýchacích přístrojů), kde je potřeba zabránit výskytu nozokomiálních infekcí a zvyšující se rezistenci bakterií.⁷⁸⁻⁸⁰

Tabulka 7: Přehled současných antibakteriálních povrchů ³⁷

Postup			Antibakteriální efekty	
			Baktericidní	Proti bakteriálnímu znečištění
Povrchové vrstvy			stříbrem, kvarterními amonniovými sloučeninami, fluoridovými ionty, antibiotiky nebo <i>N,N</i> -dimethyl-2-morpholinonem dopované vrstvy	hydroxyapatitové vrstvy, vrstvy z oxidu titaničitého nebo zwitteriontové karboxybetainové vrstvy
Povrchové modifikace	Povrchová chemie	Povrchová polymerace	kovalentní vazby, hydrofobní polykationtové nebo kvartérní ammoniové soli: poly(vinyl- <i>N</i> -hexylpyridinium), <i>N</i> -alkylovaný poly(ethyleneimin)	
		Povrchová funkcionalizace a derivatizace	kvarterní amoniové soli, <i>N,N</i> -dimethyldodecylammonim bromid, fosfonium, sulfonium, jedno-stěnné uhlíkaté nanotrubičky, alkylované polyethyleniminy	cyklické uhlovodíkové zbytky, katalytické řetězové polymerace, polyethylen glykol, zwitteriontové polymery
	Povrchové struktury		nanovzorované struktury křídel cikády	žraločí kůže, listy lotosu nebo kolokázie, mikro- a nanovzorované umělé povrchy

3. Použité experimentální metody

3.1. Modifikace povrchu plazmou

Plazma je ionizovaný plyn „čtvrté skupenství hmoty“, přestože je kvazineutrální je silně vodivá. Vzniká odtržením elektronu z elektronového obalu atomu plynu nebo roztržením molekuly plynu (ionizace). Existují dva typy plazmy, plazma pracující v podtlaku <1,3 kPa a plazma pracující při atmosférických tlacích.

Plazma v nízkých tlacích je typem plazmy pracující v podtlaku a je generována pomocí zdroje založeného na ostřelování elektrony nebo mikrovlnným zářením. Pro tvorbu plazmy se používají, v závislosti na požadavcích a využití plazmy, inertní plyny, O₂, N₂, F₂ nebo uhlovodíkové a organosilikátové plyny. Jedním z nejdůležitějších využití plazmy je úprava povrchových vlastností materiálu, tato úprava probíhá v několika monomolekulárních vrstvách nebo implementací hlouběji do povrchu materiálu, kdy dochází k výrazné změně povrchové energie a chemické struktury povrchu.

Úprava vzorků plazmou probíhala na přístroji LA 400 (SurfaceTreat) ve firmě SurfaceTreat a.s. v Turnově (Ing. Adam Pazourek, Ph.D.). Úprava vzorků proběhla pomocí plazmy generované mikrovlnným zdrojem při tlaku 100 Pa, jako podpůrný plyn byl použit vzduch o průtoku 100 sccm. Vzorky byly umístěny na rotační disk s otáčkami 10 ot.min⁻¹ o průměru 200 mm, ve vzdálenosti 180 mm od hlavy.

3.1.1. Metoda sol-gel

Metoda sol-gel byla blíže popsána v kapitole 2.5.1. Postup přípravy solů zahrnoval rozpuštění alkylalkoxysilanů a dusičnanů solí v propan-2-olu (99,97%). Přidáním stanoveného množství vody a kyseliny proběhly hydrolyzační a polykondenzační reakce za vzniku solu. Výsledný sol byl nanesen na substráty pomocí metod dip-coating, spray-coating a flow coating. Po nanesení solu na substrát proběhlo zpracování tepelnou polymerací nebo fotopolymerací.

Pro nanášení vrstev metodou dip-coating bylo použito komerční tažné zařízení firmy Microton s regulovanou rychlostí tažení v 8 krocích v rozmezí 1 až 20 cm.min⁻¹. Tepelná polymerace vrstev byla prováděna v sušárně s přirozenou cirkulací vzduchu (Memmert), pro fotopolymeraci byla použita zářivka Philips special (Actinic BL F15T8, oblast záření UV-A, rozsah 315-400 nm).

3.1.2. Měření distribuce a velikosti částic

Měření velikostní distribuce částic v disperzních soustavách pomocí koloidních analyzátorů je založeno na dynamickém rozptylu světla (DSL). Jedná se o měření Brownova pohybu částic v závislosti na velikosti částic, menší částice se pohybují rychleji než větší částice. Měření

vychází z osvětlení částic laserem a následnou analýzou fluktuací intenzity v rozptýleném světle. Podobnost dvou signálů se po určité době zpracovává pomocí korelátoru, který měří závislost signálů v čase. U malých částic, které se pohybují rychleji, dojde k dřívějšímu rozkladu (poklesu) korelační funkce, než u částic větších, které se ovlivňují (jsou dostatečně blízko u sebe) po delší dobu. Korelační funkce se následně využije k výpočtu velikosti částic.⁸² K měření distribuce a velikosti částic byl použit přístroj Zetasizer Nano ZS – ZEN3601 (Malvern) s červeným laserem (632,8 nm) na LCS CXI TUL (Ing. Jana Turečková, Ph.D.), s polystyrenovými kyvetami (absorpce materiálů 0,01).

3.1.3. Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie (IR spektroskopie) je spektroskopická metoda založená na absorpci infračerveného záření molekulami testované látky. Toto záření má větší vlnovou délku a nižší energii, než viditelné a UV záření. Jedná se o část elektromagnetického záření o vlnové délce $7,8 \cdot 10^{-7}$ m až $10 \cdot 10^{-4}$ m a vlnočtu 10000 cm^{-1} až 10 cm^{-1} . IR spektroskopie využívá charakteristických změn vibračních, rotačních stavů molekul, iontů a kovalentních vazeb, které vyvolává absorpce záření o vlnové délce λ odpovídající energii příslušných přechodů. Záření ostatních vlnových délek projde látkou beze změny. Výsledné IR spektrum odpovídá různým typům vibračních přechodů.^{83, 84}

Měření reflexních IR spekter bylo provedeno na přístroji FT-IR Spectrometer Nicolet™ iS™10 (Thermo Scientific™) na CXI TUL (Ing. Jana Müllerová, Ph.D.). Na spektrometru byla použita metoda ATR nástavce s krystalem z Ge. U kapalných vzorků bylo měření provedeno po odpaření rozpouštědla, u pevných vzorků byly vrstvy měřeny na hliníkové fólii.

3.1.4. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM), využívá k tvorbě obrazu pohybující se svazek elektronů, je jednou ze 2 základních el. mikroskopií. Jako zdroj elektronů se využívá autoemisní nebo žhavená katoda. Při dopadu primárního elektronového svazku na vzorek umístěný ve vakuu dochází k interakci elektronů se vzorkem a vzniku různých typů signálů. Pro tvorbu obrazu v SEM se používají různé druhy elektronů a jejich detektorů. Změna intenzity signálu dopadajícího na detektor se projeví změnou jasů odpovídajícího bodu na obrazovce. U SEM vznikají dva základní typy kontrastu. Prvním typem je kontrast topografický vznikající při zobrazení sekundárních elektronů (SE), jejichž účinnost emise závisí na úhlu dopadu primárních elektronů. Druhým typem je kontrast chemický, který vzniká při zobrazení zpětně odražených elektronů (BSE), jejichž intenzita závisí na protonovém čísle prvku. Vzorky zobrazené v běžném detektoru SE musí být vodivé, toho lze dosáhnout naprašováním vodivé vrstvy kopírující povrch.⁸⁵

U SEM lze využít detekce charakteristického RTG ze vzorku. Jedná se o spojení RTG spektroskopické metody a zobrazovací metody k určení lokálního chemického složení vzorku, tzv. elektronová mikroanalýza. Emitované RTG z vybraného místa se detekuje různými druhy spektrometrů (vlnově disperzní analýza (WDA), energiově disperzní analýza (EDA)), za vzniku charakteristického spektra, které slouží k určení složení.⁸⁶

Pro sledování kvality a morfologie vrstev byl použit rastrovací elektronový mikroskop ULTRA Plus (Carl Zeiss) s mikroanalytickým EDS systémem Silicon Drift Detector 20mm² (SDD) – X-Max^N (OXFORD Instruments) na KMT FS TUL (Ing. Pavel Kejzlar, Ph.D.). Vodivost vzorků byla zajištěna naprášením zlaté vrstvičky (3 nm) pomocí kombinované naprašovačky QR150R (Quorum Technologies) s iontově odpařovacím systémem SEM Mill model 1060 (Fischione).

3.1.5. Testování uvolňování iontů

Emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) je metoda využívaná k chemické prvkové analýze kapalných vzorků. Ty jsou pomocí zamlžovače převedeny na jemný aerosol, který je nosným plynem (Ar) vnášen do hořáku, kde je v proudu Ar pomocí radiofrekvenčního generátoru a cívky tvořena indukční plazma. V indukční plazmě, která dosahuje vysokých teplot, dojde k odpaření aerosolu, rozpadu chemických vazeb přítomných molekul, volné atomy jsou excitovány nebo ionizovány. Záření emitované excitovanými valenčními elektrony tvoří čárovou emisi, která představuje analytický signál, záření ostatních částic tvoří pásovou nebo spojitou emisi.⁸⁷

Hmotnostní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je analytická metoda sloužící ke stanovení stopových množství prvků obsažených ve vzorku. Stejně jako u ICP-OES je vzorek převeden do velmi jemného aerosolu a ionizován pomocí plazmy. Plazma poté vstoupí do expanzní komory, kde se vytváří paprsek ionizovaných částic, který vstupuje do spektrometru. Zde je urychlen do kvadrupólového separátoru, který v závislosti na napětí umožní průchod iontu v závislosti na náboji a hmotnosti. Protože se napětí mění v řádu ms, lze celé spektrum proměřit v několika s. Prošlé ionty následně dopadají na detektor, kde je jejich signál zesílen, vzniklý elektronový tok je dále zpracováván. Výsledkem měření je hmotnostní spektrum.⁸⁸

Vzorky textilií byly vytřepávány ve vyhřívané třepačce (Memmeret). Ionty Ag^{+I} byly analyzovány na ICP-OES Optima 2100DV (PerkinElmer), ionty Cu^{+II}, Zn^{+II}, Ti^{+IV} byly analyzovány na ICP-MS Nexion 300D (PerkinElmer) na LCS CXI TUL (Ing. Petr Parma).

3.1.6. Testování antibakteriálních a antimykotických účinků vrstev

Antimykotické účinky byly testovány na kvasince *Candida glabrata* (CCM 8270). Antibakteriální účinky byly testovány na bakteriálních kmenech *Escherichia Coli* (CCM 2024), methycilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) (CCM 4223) a *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 1959). Uvedené kmeny byly zakoupeny z České sbírky mikroorganismů, kategorie B, Přírodovědecké fakulty MU Brno. Pro růst a testování kvasinky byl použit Agar *Candida albicans* Chromogenic (Oxoid). Pro růst a testování bakteriálních kultur byl použit krevní agar Columbia agar (Bio-Rad).

♦ AATCC metoda 147 (kvalitativní)

Metoda kvalitativního hodnocení antibakteriálních látek, která je vhodná pro G⁺ i G⁻ bakterie. Hodnocení účinku se provádí tak, že se zhodnotí růst kmenu pod vzorkem, případně halo zóna (inhibiční zóna vzniklá působením antimikrobiálních látek).

Na Petriho misky byly vyočkovány mikrobiální kmeny, na které byly umístěny testované vzorky. Takto připravené misky byly inkubovány v termostatu (Memmert) při 37,5 °C/ 24 hod.²

♦ AATCC metoda 100 (kvantitativní)

Pomocí této kvantitativní metody je hodnocen faktor redukce, který udává procentuální snížení naočkované koncentrace bakterií. Výsledkem testu je počet znovuoobnověných bakteriálních kolonií.

Na vzorky v plastových kontejnerech byly naočkovány mikrobiální kultury. Následně byly vzorky umístěny do termostatu (Memmert) a inkubovány při 37,5 °C/ 24 hod. Poté byly vzorky doplněny fyziologickým roztokem a vytřepány na přístroji Vortex Genius 3 (IKA). Ze vzniklého roztoku byla část odebrána a rozprostřena na agaru. Otevřené Petriho misky byly opět umístěny do termostatu, kde byly ponechány po dobu 5 min, dokud nedošlo k odpaření přebytečného fyziologického roztoku a následně byly zavřeny a ponechány inkubovat při 37,5 °C/ 48 hod.¹

♦ Metoda inhibice

Testované vzorky s nanesenou mikrobiální suspenzí byly ponechány na běžném světle nebo ozařovány pod zářivkou Philips special (Actinic BL F15T8, oblast záření UV-A, rozsah 315-400 nm). Následně byly vzorky kultur ve stanovených časových intervalech vyočkovány na Petriho misky, umístěny do termostatu (Memmert) a inkubovány při 37,5 °C/ 24 hod. Tato metoda byla vyvinuta na CXI TUL Doc. Mgr. Irenou Lovětínskou Šlamborovou, Ph.D. a Mgr. Veronikou Zajícovou, Ph.D.

4. Experimentální část

4.1. Příprava výchozích solů

4.1.1. Použité chemikálie a postup přípravy solů

K přípravě solů byly použity chemikálie uvedené v tabulce (příloha 8.1.). Veškeré chemikálie byly použity v dodaném stavu. Pro inertní atmosféru byl používán suchý dusík (Linde).

V experimentální části práce byly připraveny tři typy solů (sol 1, sol 2, sol AD9), které se lišily obsahem iontů přechodných kovů. Všechny soly byly připraveny stejnou syntézou s rozdílným množstvím chemikálií.

♦ Sol 1 (Ag^{I} , Ti^{IV}):

Prvním typem připraveného solu byl sol s obsahem iontů Ag^{I} a Ti^{IV} . Sol byl připraven v inertní atmosféře N_2 bez přístupu světla. Do předem N_2 vysušené a naplněné dvojhrdlé baňky byl ve propan-2-olu (339,6 mmol) za stálého míchání teflonovým magnetickým míchadlem (600 rpm) rozpuštěn AgNO_3 (0,71 mmol) za vzniku pravého roztoku. Následně byly do baňky přidány přes septum TEOS (9,45 mmol), TMSPM (4,21 mmol), MMA (8,41 mmol) a přisypáno 100 mg (0,41 mmol) BPO. Směs byla ponechána za stálého míchání (500 rpm) při pokojové teplotě po dobu 30 min, dokud nedošlo k rozpuštění BPO. Poté byl do směsi při zvýšených otáčkách (600 rpm) přidán připravený roztok destilované H_2O (19,43 mmol), 2 M HNO_3 (10,84 mmol) a propan-2-olu (339,6 mmol). Po přidání roztoku došlo k vypnutí N_2 , avšak inertní atmosféra v baňce zůstala zachována. Vzniklá směs byla při zvýšených otáčkách (600 rpm) míchána při pokojové teplotě po dobu 20 min (hydrolýza a částečná polykondenzace vazeb $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$). Jako poslední složka byl do směsi přes septum přidán IPTI (2,22 mmol). Celá směs byla při pokojové teplotě míchána (500 rpm) po dobu 12 min. Následně byla směs zahřívána (92 – 98 °C na olejové lázni pod zpětným chladičem, při této teplotě byl sol udržován za varu po dobu 35 min (předpolymerace organické části TMSPM a MMA). Připravený sol byl ochlazen pod tekoucí vodou a uschován v PE lahvičce na tmavém místě.

♦ Sol 2 (Ag^{I} , Zn^{II} , Ti^{IV}):

Druhý typ připraveného solu obsahoval ionty Ag^{I} , Zn^{II} a Ti^{IV} . Při přípravě byl použit stejný postup jako u solu 1. Po vzniku pravého roztoku (339,6 mmol IPA + 0,71 mmol AgNO_3), byly do baňky přidány prekurzory TEOS (8,96 mmol), TMSPM (4,21 mmol), MMA (8,41 mol), ke kterým bylo přisypáno (0,41 mmol) BPO. Po rozpuštění BPO (30 min, 500 rpm), byl do směsi přidán předem připravený roztok destilované H_2O (15,54 mmol), 2 M HNO_3 (10,84 mmol), propan-2-olu (339,6 mmol) s $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,5 mmol). Po 20 min míchání (600 rpm) byl do směsi přidán IPTI (2,22 mmol). Následně byla stejně jako u syntézy solu 1 za varu provedena předpolymerace, ochlazení a uskladnění solu.

◆ Sol AD9 (Ag^{I} , Cu^{II} , Zn^{II} , Ti^{IV}):

Poslední typ připraveného solu obsahoval ionty Ag^{I} , Cu^{II} , Zn^{II} a Ti^{IV} . Při přípravě byl použit stejný postup jako u solů 1 a 2. Po vzniku pravého roztoku (339,6 mmol IPA + 0,67 mmol AgNO_3), byly do baňky přidány prekurzory TEOS (8,512 mmol), TMSPM (4,21 mmol), MMA (8,41 mmol), ke kterým bylo přisypáno (0,41 mmol) BPO. Po rozpuštění BPO (30 min, 500 rpm), byl do směsi přidán předem připravený roztok H_2O (19,43 mmol), 2 M HNO_3 (10,84 mmol), propan-2-olu (339,6 mmol) s $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,37 mmol) a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,38 mmol). Následně byl do směsi přidán IPTI (2,22 mmol). Nakonec byla stejně jako u syntézy solu 1 a 2 provedena předpolymerace varem, ochlazení a uschování solu.

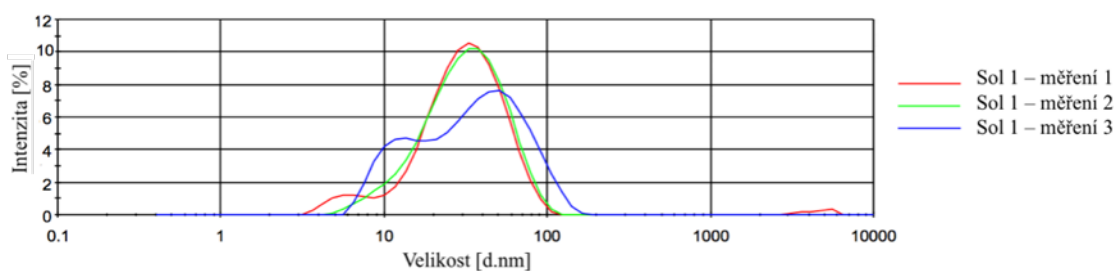


Obr. 33: Připravený sol AD9, sol 2, sol 1

4.1.2. Distribuce velikosti částic v solu

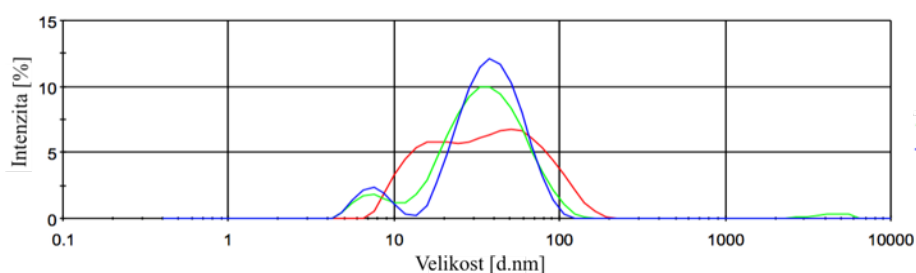
Do polystyrenové kyvety určené pro měření distribuce velikosti částic bylo umístěno 1,5 ml připraveného solu přefiltrovaného přes nylonový filtr s póry o velikosti 0,45 μm . Roztok byl měřen při teplotě 25 °C. Stejný postup byl proveden u všech 3 typů solů.

Velikost částic (makromolekul) v koloidním roztoku solu 1 se pohybovala v rozmezí od 5 nm do 110 nm, průměrný Z-average částic byl 25,3 nm. Z grafu 1 lze usoudit, že částice v solu byly stabilní, pouze občas došlo ke shluku částic, který však výrazně neovlivnil průměrný Z-average částic. První dvě měření měla maximální intenzitu v okolí 35 d.nm, u prvního měření se nacházelo maximum ještě v 6 d.nm, ale jeho intenzita byla zanedbatelná oproti hlavnímu maximu. Intenzita třetího měření měla dva hlavní píky, nižší maximum v 12,6 d.nm dosahující přibližně poloviny intenzity píku prvního měření a vyšší přibližně 8% pík, který měl maximum v okolí 50 d.nm.



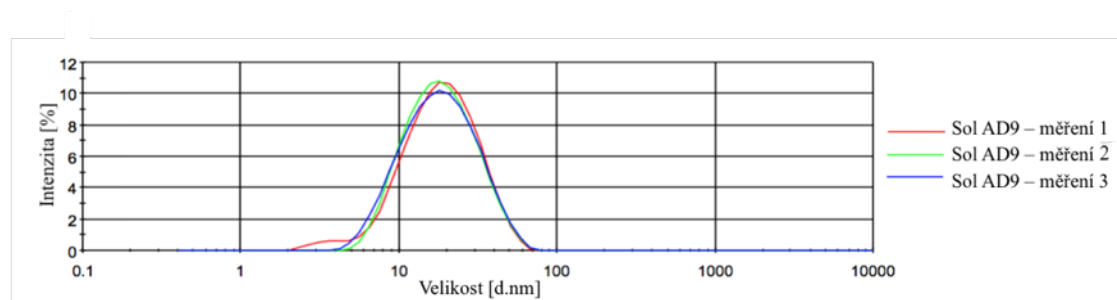
Graf 1: Velikostní distribuce částic v solu 1 podle intenzity

Velikost částic v solu 2 (graf 2), se pohybovala ve stejném rozmezí jako v případě solu 1. Průměrná velikost částic byla mírně větší, Z-average 27,9 nm. Stejně jako u předchozího případu, velikost částic nebyla konstantní a v průběhu měření docházelo ke shlukování částic, jejichž konečná velikost se pohybovala okolo 40 d.nm. U všech měření byly zaznamenány dvě maxima. V prvním měření byly intenzity maxim téměř shodné a nacházely se v 16,5 a 58 d.nm. Druhá dvě měření byla velmi podobná, jejich nižší pík v oblasti 7,5 d.nm dosahoval pouze 2,5% intenzity. Druhý pík měl mírně nižší intenzitu u měření 2, avšak obě maxima se nacházela v okolí 40,5 nm.



Graf 2: Velikostní distribuce částic v solu 2 podle intenzity

U solu AD9 se velikost koloidních částic pohybovala v rozmezí od 4 nm do 95nm. Z grafu 3 je patrné, že průměrná velikost byla nižší než u předchozích dvou solů, Z-average byl u solu AD9 15,6 nm. U solu nedocházelo v průběhu měření k agregaci částic. Všechna tři měření byla velmi podobná. Hlavní maximum dosahující přibližně 10% intenzity se nacházelo v okolí 20,5 d.nm, pouze u prvního měření se v okolí 3 d.nm objevil zanedbatelný pík dosahující pouze 1% intenzity. Z korelačních dat (příloha 8.2.) získaných při měření a použitých pro přepočet velikosti je patrné, že získaná data byla podobná pro všechna měření.



Graf 3: Velikostní distribuce částic podle intenzity

Z šířky všech získaných píků je patrné, že molekuly v solech nedosahují pouze jedné velikosti, ale jejich velikost se pohybuje od několika jednotek nm do stovek nm, což odpovídá představě o postupné polykondenzaci a tvorbě makromolekul o různém polymeračním stupni v průběhu varu solu a v době jeho uskladnění. Přítomnost iontů kovů obsažených v solu, by mohla mít částečný vliv na polymeraci a výslednou velikost makromolekul. Podobná distribuce velikosti částic u všech tří solů dokazuje reprodukovatelnost syntézy a vznik makromolekul velmi podobných velikostí. Agregace molekul u prvních dvou solů mohla být způsobena například vzdušnou vlhkostí, která podporuje polykondenzaci a je žádoucí po nanesení vrstvy, kdy dochází k tvorbě gelu. Při skladování, kdy je sol uzavřen, k těmto reakcím nedochází.

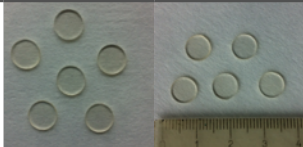
4.2. Studium vlastností připravených hybridních vrstev

4.2.1. Substráty použité pro nanášení vrstev

Pro práci bylo použito 6 typů vzorků používaných ve zdravotnictví vyrobených z polymerních materiálů (tabulka 8). Byly testovány jednorázové operační roušky z netkané textilie od firmy Hartmann (vz. 1, 2), používané při operacích pro krytí pacienta. Dále PVC disky (vz. 3) určené pro testování materiálu, ze kterého jsou vyráběny katetry, části PVC katetru (vz. 5), destičky z PMMA (vz. 4) a latexové rukavice (vz. 6).

Tabulka 8: Seznam použitých vzorků

Číslo vz.	Název	Složení	Firma	Výrobek	Forografie
1	ABD-COMFORT	3 vrstvy: 1. viskóza (savá povrchová vrstva) 2. PE fólie (nepropustná vrstva) 3. PP NT (vnitřní vrstva)	Hartmann	Jednorázové operační roušky	
2	ABD-PROTECT NEU ACE	2 vrstvy: 1. PP NT (savá povrchová vrstva) 2. PE fólie (nepropustná vrstva)	Hartmann	Jednorázové operační roušky	

Číslo vz.	Název	Složení	Firma	Výrobek	Forografie
3	PVC disk	PVC	Fakultní nemocnice u Sv. Anny Brno	Katetr	
4	Plexisklo	PMMA	Lanit Plast	Deska	
5	Katetr	PVC	B-Brown	Močový katetr	
6	Rukavice Latex Sempercure	přírodní latex	Sempermed	Rukavice	

Pro FT-IR analýzy byla použita hliníková fólie.

4.2.2. Předúprava substrátů před nanášením vrstev

♦ Vzorky 1 a 2

Netkaná textilie z PE, PP a viskózy (vz. 1) a netkaná textilie z PE a PP (vz. 2) byly opakovaně po dobu 10 min smáčeny v čistém IPA (odmaštění vzorku). Po vyjmutí byly textilie ponechány na vzduchu, dokud nedošlo k odpaření zbývajcího IPA, následně byly vzorky ponechány v sáčkách (bezprašné prostředí). Den před upotřebením byl vz. 2 povrchově upraven plazmou po dobu 30 s a opět uschován v sáčku.

♦ Vzorky 3, 5 a 6

PVC disky (vz. 3) o průměru 7 mm a výšce 1 mm, PVC močový katetr (vz. 5.) a prsty z latexových rukavic (vz. 6.) byly odmaštěny po dobu 5 min v čistém IPA. Po vyjmutí byly vzorky ponechány na vzduchu, dokud nedošlo k odpaření zbytku IPA a až do upotřebení uchovány v sáčkách. Den před použitím byly vz. 3. a 5. povrchově upraveny plazmou po dobu 60 s a opět uschovány v sáčkách.

♦ Vzorek 4

PMMA destičky o rozměru (2,5×7,5 cm) byly omyty jarem a několikrát destilovanou vodou. Poté byly ponořeny do kádinky s IPA, na závěr byly ponořeny do čistého IPA, kde byly ponechány po dobu 5 min. Destičky byly před upotřebením uchovány v čistém IPA.

4.2.3. Optimalizace doby polymerace

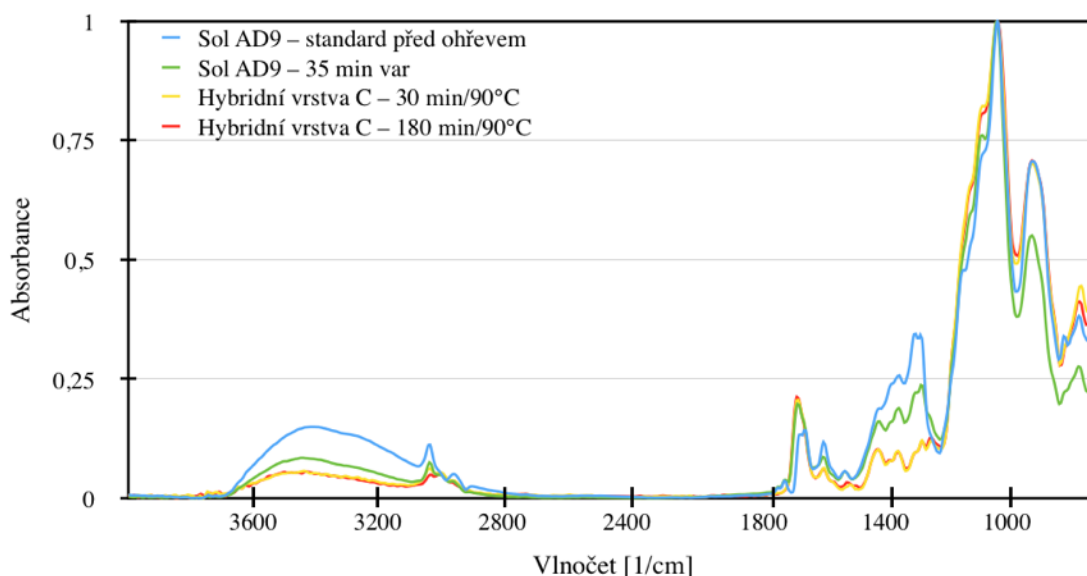
Pro vznik kvalitní hybridní vrstvy, která je mechanicky odolná, je nutné vrstvy tepelně zpracovat. Některé polymery jsou však teplotně málo odolné (PVC, PE, NBR), z tohoto důvodu je nutné použít pouze teplotu kolem 90 °C. Experimentálně byla zjištěna doba nutná

k dokončení hlavní části polymerace při 90 °C je 30 min, kdy dojde k rozložení BPO a hlavnímu úbytku počtu dvojných vazeb, avšak změny a zhutňování vazeb probíhá při zahřívání i po dobu 180 min. Dále jsou hybridní vrstvy označeny písmenem podle typu výchozího solu (tabulka 9).

Tabulka 9: Označení hybridních vrstev

	Sol 1	Sol 2	Sol AD9
Hybridní vrstva	A	B	C

Při přípravě solu bylo pomocí injekční stříkačky přes septum odebráno 5 ml roztoku před ohřevem a dalších 5 ml po 35 min varu solu. Připravený sol byl nanesen metodou dip-coating ($15 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$) na odmaštěné hliníkové destičky ($2 \times 2 \text{ cm}$), ty byly ponechány volně na vzduchu (30 min), poté byly nanesené vrstvy tepelně upraveny po stanovenou dobu (30, 60, 90, 120, 150, 180 min) při 90 °C. Odebrané vzorky a připravené vrstvy byly analyzovány pomocí FT-IR spektroskopie.



Obr. 34: FT-IR spektrum solu AD9 a hybridní vrstvy C v závislosti na délce tepelného zpracování

Pomocí FT-IR spekter lze dobře sledovat změny probíhající v solu při předpolymeraci a při následné tepelné úpravě. Na obrázku 34 jsou vybraná spektra solu AD9 po přidání všech výchozích sloučenin (sol AD9 – standard před ohřevem), po uplynutí doby varu (sol AD9 – 35 min var) a vrstev tepelně upravených při 90 °C po dobu 30 min, (hybridní vrstva C – 90 °C/ 30 min), a po dobu 180 min (hybridní vrstva C – 90 °C/ 180 min). Ze obrázku 34 je patrné, že dochází ke změnám ve všech oblastech spektra. Charakteristické vibrace a přiřazení IR pásů je uvedeno v tabulce 10. Ke změnám ve všech oblastech spektra docházelo také u solu 1, hybridní vrstvy A a solu 2, hybridní vrstvy B (příloha 8.3.). Protože se ve spektru

nevyskytoval pás, jehož intenzita by se neměnila, byl pro normalizaci spekter zvolen pás valenčních vibrací Si–O–Si (cca 1140 cm⁻¹), který podléhal nejmenším změnám.

Tabulka 10: Přiřazení vibračních pásů v FT-IR spektru charakteristickým vazbám

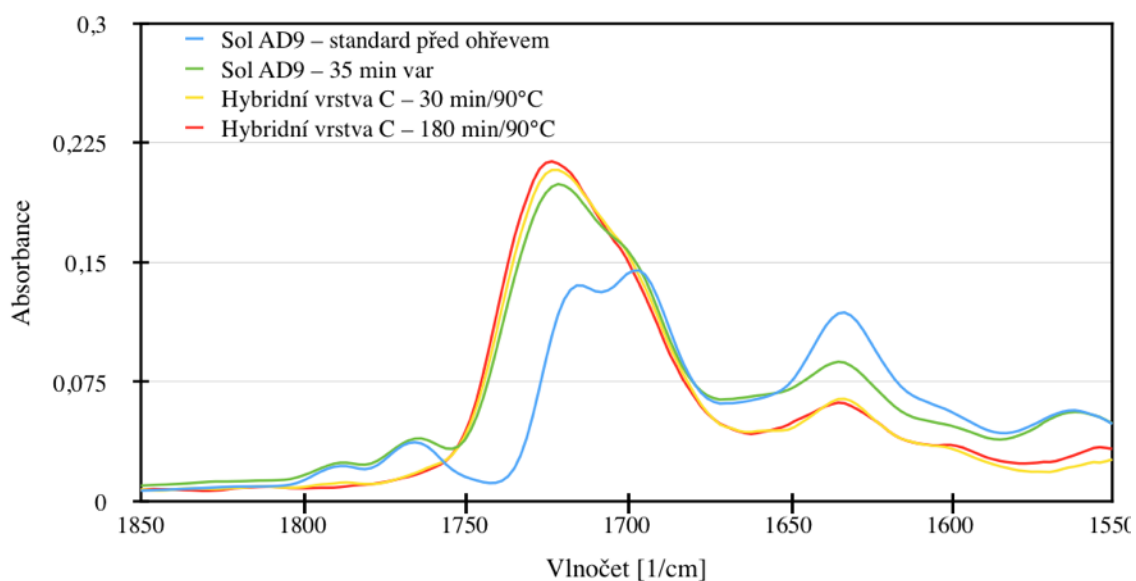
Vlnočet [cm ⁻¹]	Popis vazeb
cca 3400	valenční vibrace -O–H vazeb
cca 2980	valenční vibrace asymetrické -C–H vazby (–CH ₃)
cca 2950	valenční vibrace asymetrické -C–H vazby (–CH ₂ –)
cca 2930	valenční vibrace symetrických -C–H vazeb (–CH ₃)
cca 2890	valenční vibrace symetrických -C–H vazeb (–CH ₂ –)
1787 a 1767	valenční vibrace -C=O vazeb (BPO)
cca 1695 – 1730	valenční vibrace -C=O vazeb (MMA, TMSPM)
cca 1633	valenční vibrace -C=C- vazeb (MMA, TMSPM)
cca 1500 – 650	skeletální vibrace („finger print“)
cca 1250 – 750	valenční vibrace Si–O–Si

Na přehledných spektrech (obr. 34, příloha 8.3.) jsou dobře identifikovatelné pásy -O–H (3400 – 3650 cm⁻¹) charakteristické pro hydrolyzované alkoxyasilanové skupiny a IPA. Při polykondenzaci TMSPM, která nastává v průběhu varu a posléze absorpcí vzdušné vlhkosti, a zároveň při odpařování IPA dochází k poklesu pásu. Tyto změny jsou však těžce interpretovatelné, protože ze solů bylo před změřením nutné odpařit rozpouštědlo. Množství zbylého rozpouštědla, které může zůstat zabudované v gelu, a doba polykondenzace se poté projevila na intenzitě pásu. Ze spekter je patrné, že u všech typů hybridních vrstev nedochází ke změnám intenzity pásu v průběhu tepelné polymerace. Avšak i po 180 min tepelné polymerace se ve vrstvách nacházejí -O–H vazby, což je způsobeno sférickým efektem vznikajících makromolekul, který brzdí polykondenzační reakce a brání vzniku Si–O–Si vazeb. V oblasti spektra 1850–1550 cm⁻¹ (obr. 35, příloha 8.3.1.), jsou dobře identifikovatelné 2 vibrační pásy příslušící vazbě -C=O z BPO (1787 a 1767 cm⁻¹), dále dvojitý valenční vibrační pás vazby -C=O (1695 – 1730 cm⁻¹) a pás valenčních vibrací -C=C- (cca 1633 cm⁻¹) odpovídající měnícím se methakrylátovým skupinám.

Pokles intenzity pásu odpovídající vazbě -C=O z BPO, potvrdil rozpad iniciátoru důležitého pro dokončení radikálové polymerace solů. Ze spekter je patrné, že u všech 3 solů nedošlo k rozložení veškerého iniciátoru, který se používá v přebytku, v době varu solů, ale až po nanesení vrstvy během prvních 30 min tepelné polymerace vzorku. BPO iniciuje reakce především v N₂ atmosféře, na vzduchu reaguje s kyslíkem, což způsobuje zpomalení iniciace. Po rozpadu BPO dochází k další iniciaci pouze teplem, která probíhá při 90 °C výrazně pomaleji než při vyšších teplotách.

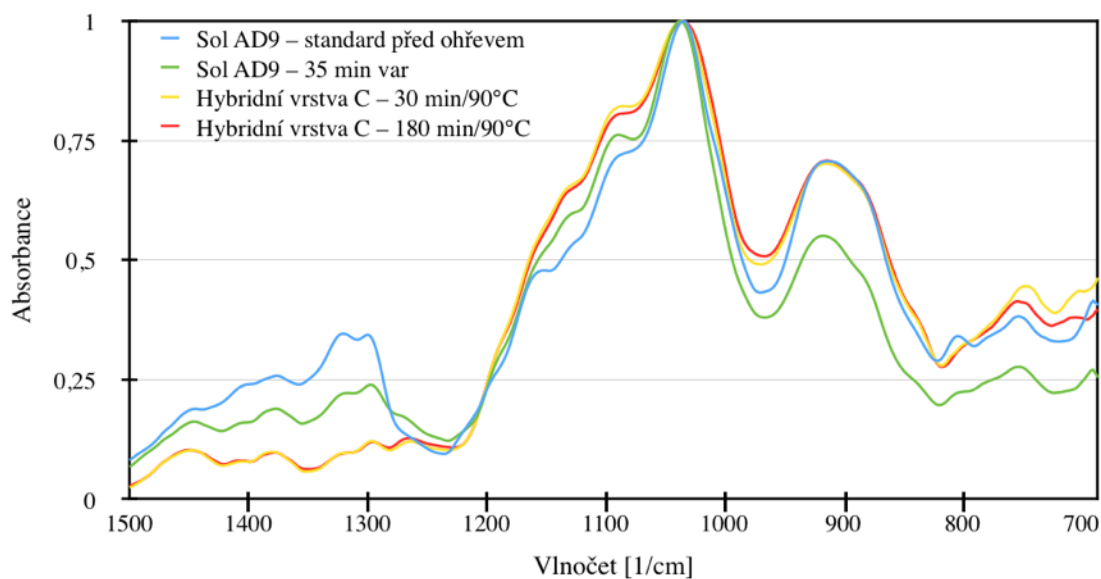
Pomalejší iniciace se projevuje u časové závislosti intenzity pásu odpovídajícího -C=C- vazbám, která určuje úbytek těchto vazeb během polymerace solu. Ze spekter lze usuzovat, že v době varu, kdy dochází k iniciaci pomocí BPO, dojde ke zpolymerování části dvojných vazeb a viditelnému poklesu intenzity pásu. Dále je patrné, že poté už k velkému úbytku vazeb nedochází a že nedojde k úplnému rozložení všech dvojných vazeb.

Změny probíhající v pásech charakteristických pro skupiny -C=O (karbonyl) z MMA a TMSPM, nejsou jednoznačně interpretovatelné, avšak odráží změny probíhající ve vznikající makromolekule. Ze spekter je patrné, že probíhající změny jsou téměř identické u prvních dvou typů solů a mírně se liší u solu AD9. U všech tří typů dochází k výrazné změně intenzity, tvaru a polohy pásů v době varu solu, kdy dochází k úbytku jednoho typu (cca 1695 cm^{-1}) karbonylu ve prospěch druhého typu (cca 1715 cm^{-1}), jejichž intenzity jsou před varem velmi podobné. K mírnému nárůstu intenzity karbonylu druhého typu dochází i v průběhu tepelné polymerace. Ze spekter je patrné, že u vrstev A a B dochází k výraznějším změnám v průběhu tepelné polymerace, výsledné pásy jsou užší a vyšší než u vrstvy C, převládá zde karbonyl druhého typu. Toto chování vzniklých vrstev je pravděpodobně způsobeno rozdílnými typy reakcí probíhajícími při funkcionalizaci anorganické sítě, která je částečně tvořena TEOS, a polymerací organické části TMSPM a molekul MMA. V ideálním případě dochází ke spojování methakrylátových skupin z TMSPM, které se nacházejí vedle sebe. Avšak může také docházet k reakcím TMSPM a MMA, následnému napojení tohoto prodlouženého konce na další methakrylátovou skupinu TMSPM, nebo k napojení jiné methakrylátové skupiny z MMA a až poté k napojení na TMSPM. Dále může docházet k samostatným reakcím mezi molekulami MMA.



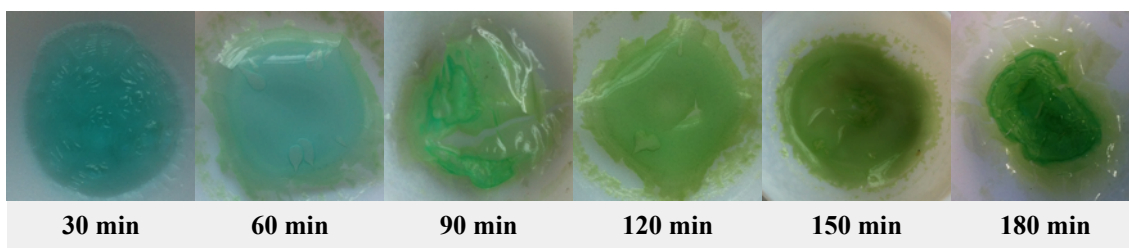
Obr. 35: Detail FT-IR spektra solu AD9 a hybridní vrstvy C v závislosti na délce tepelného zpracování – pásy -C=O ; -C=C-

Oblast spekter 1500–700 cm^{-1} (obr 36, příloha 8.3.2.) odpovídá nejednoznačně interpretovatelným valenčním vibracím Si–O–Si a skeletálním vibracím, které jsou charakteristické pro danou látku. Jejich poloha i intenzita však ukazuje na plynulé změny ve struktuře makromolekul. Ze skeletálních vibrací je patrné, že v průběhu tepelné polymerace dochází k ustálení změn probíhajících ve vznikající struktuře. Hybridní vrstva C se změnami v průběhu tepelné polymerace a vzniklou strukturou mírně liší od vrstev A a B, u kterých jsou změny ve struktuře výraznější. Tyto rozdíly ve struktuře odpovídají představě rozdílné funkcionalizace anorganické sítě zmíněné výše.



Obr. 36: Detail FT-IR spektra solu AD9 a hybridního vrstvy C v závislosti na délce tepelného zpracování – skeletální pásy; pásy Si–O–Si

Na teflonové misky bylo injekční stříkačkou umístěno 10 ml připraveného solu, poté byly misky umístěny do sušárny s proudícím vzduchem a tepelně stabilizovány (30, 60, 90, 120, 150, 180 min) při 90 °C.



Obr. 37: Změny hybridního materiálu C během tepelné polymerace při 90 °C

V průběhu tepelné polymerace dochází k výrazným mechanickým a barevným změnám u hybridních materiálů (obr. 37, příloha 8.4.). U hybridního materiálu C byla dominantní barva Cu^{II} iontů, které hydratované jsou blankytně modré (4.1.1 – obr. 33). Při tepelné polymeraci docházelo k přechodu z modré do světle zelené (90 min) až tmavě zelené barvy (180 min). Toto chování je způsobeno barvou bezvodých iontů, které jsou bezbarvé až nazelenalé.

U vzorku polymerovaného po dobu 180 min, je patrná koncentrace iontů Cu^{+II} ve středu, to je pravděpodobně způsobeno vysrážením měďnatých iontů. Při polymeraci se také projeví barevné změny stříbra, jehož ionty postupně mění barvu na světle žlutou, popřípadě na tmavě žlutou až hnědou pokud dojde k vysrážení stříbra. Tyto charakteristické změny jsou patrné také u hybridního materiálu A a B (příloha 8.4.). Z chování hybridních materiálů A a B, které je velmi podobné, je patrné, že barevné změny neovlivňují ionty zinku, které jsou přítomny v solech 2 i AD9.

4.2.4. Nanosení, dokončení polymerace a vznik hybridní vrstvy

Po nanosení vrstvy na vzorek je nutné ponechat vrstvu na vzduchu, kdy dojde k odpaření rozpouštědla (IPA) a k absorpci vzdušné vlhkosti, která dokončí hydrolýzu alkoxy-silanových skupin. Dokončením polykondenzačních reakcí vznikne gel, který je měkký a málo odolný. Gel je nutné na podkladu zafixovat tepelnou polymerací popřípadě fotopolymerací. Při fixaci dochází ke zhutnění anorganické sítě a dokončení polymerace organických vazeb.

Podle typu materiálu bylo nutné zvolit různé typy aplikace solu. Textilní materiály (vz. 1 a 2) byly ponořeny do solu naředěného 1:3 IPA, kde byly ponechány po dobu 60 s, poté byly vzorky vytaženy a položeny na filtrační papír, kde byl odsát přebytek solu. Na PVC disky (vz. 3) byl ze vzdálenosti 30 cm rozstříkovačem nastříkán koncentrovaný sol. U vzorků z PMMA a PVC katetru (vz. 4, 5) byla použita metoda dip-coating, vzorky byly ponořeny do koncentrovaného solu po dobu 30 s a poté vytaženy rychlostí 4 $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$. Prsty z latexových rukavic byly nataženy na válce o objemu 25 ml a ponořeny do 30 ml solu naředěného IPA (1:3) s přídavkem 3 ml 1% Irgacuru 819 v IPA (fotoiniciátor), kde byly ponechány po dobu 60 s a poté vytaženy.

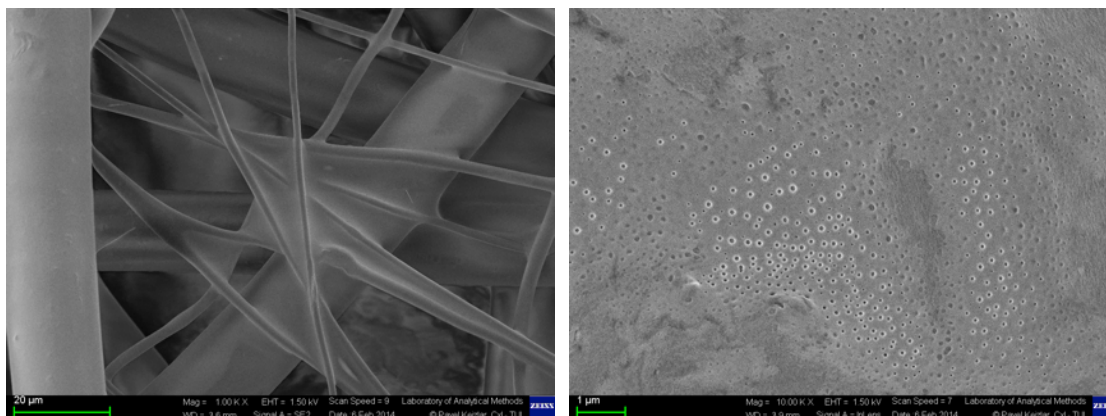
Všechny vzorky byly ponechány na vzduchu 30 min při laboratorní teplotě. Vzorky textilií a PMMA byly následně tepelně polymerovány při 90 °C/ 60 min. Vzorky z PVC, které jsou méně tepelně odolné, byly tepelně zpracovány při 83 °C/ 180 min. Latexové rukavice byly zpracovány fotopolymerací 30 min pod UV-A lampou.

4.2.5. Kvalita povrchu připravených vrstev – SEM

Hybridní vrstvy perfektně kopírovaly povrch materiálů. Na materiálech z PMMA nebo katetru z PVC byla pozorovatelná rozdílná propustnost světla, která je způsobena změnou indexu lomu materiálu s nanesenou hybridní vrstvou. V mikroskopu byly vrstvy dobře pozorovatelné pokud došlo k jejich porušení, nebo pokud obsahovaly viditelné póry.

U vz. 1 z PP, PE a viskózy (obr. 38) došlo k rovnoměrnému obalení vláken a v místech jejich spojení k tvorbě můstků – tenké blanky z hybridního materiálu. U vz. 2 z PP a PE, který byl před nanesením vrstvy upraven plazmou, je ze snímků (obr. 38) patrné, že nedošlo k rovnoměrnému nanesení vrstvy. V místech s dostatečným nánosem vrstvy je patrná vysoká

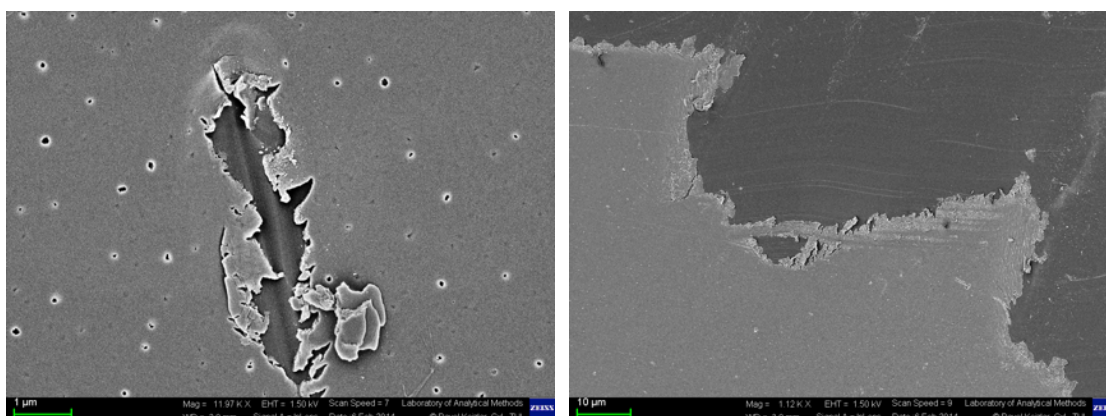
porozita vzniklého hybridního materiálu. Póry, které se tvoří při uvolňování rozpouštědla z vrstvy, dosahují průměru od 20 nm do 120 nm.



Obr. 38: Hybridní vrstva C na textilních vzorcích

vz. 1 (90 °C/ 60 min, vlevo); vz. 2 (90 °C/ 60 min, vpravo)

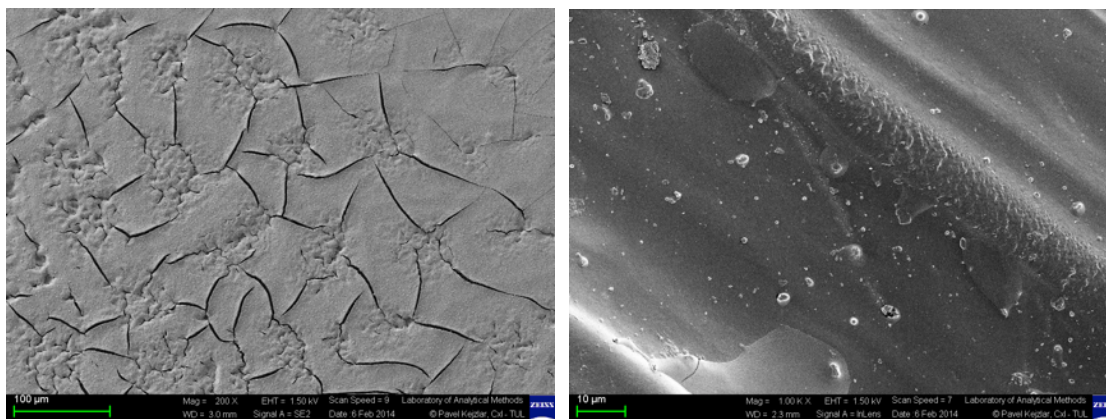
Z obrázku 39 je patrné, že vrstva dokonale kopíruje povrch PMMA a zalévá povrchové škrábance. Vrstva je dobře identifikovatelná v místě poškození nebo na konci tahu. Ve vrstvě jsou, stejně jako u vz. 2 přítomny póry, které mají průměr od několika nm do 100 nm.



Obr. 39: Hybridní vrstva C na PMMA

(vz. 4 – 90 °C/ 60 min) vpravo detail úmyslně poškozené vrstvy, vlevo detail konce vrstvy)

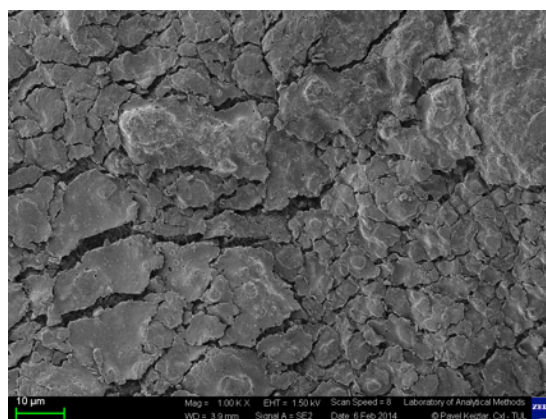
Hybridní vrstva nanesená na materiálech z PVC nebyla rovnoměrná. V případě PVC disku, na který byl sol nanesen spray-coatingem, došlo k vytvoření silné vrstvy a jejímu popraskání v průběhu polymerace. Z obrázku 40 je patrné, že nedošlo k rovnoměrnému nanesení vrstvy, ale k tvorbě ostrůvků s vyšší koncentrací vrstvy. U vrstvy na katetrech nanesené metodou dip-coating nedošlo k popraskání vrstvy, avšak stejně jako u předchozího vzorku došlo k nerovnoměrnému nanesení. Z obrázku je patrné, že vrstva neměla dokonalou adhezi k povrchu a docházelo k tvorbě bublin.



Obr. 40: Hybridní vrstva C na vzorcích z PVC

vz. 3 (83 °C/ 180 min, vlevo); vz. 5 (83 °C/ 180 min, vpravo)

Ze snímku latexové rukavice je patrné, že vrstva je znatelně poškozena. To je způsobeno příliš velkým nánosem solu a elasticitou vzorku. Vzhledem k velké tloušťce hybridní vrstvy dochází při manipulaci k jejímu popraskání.



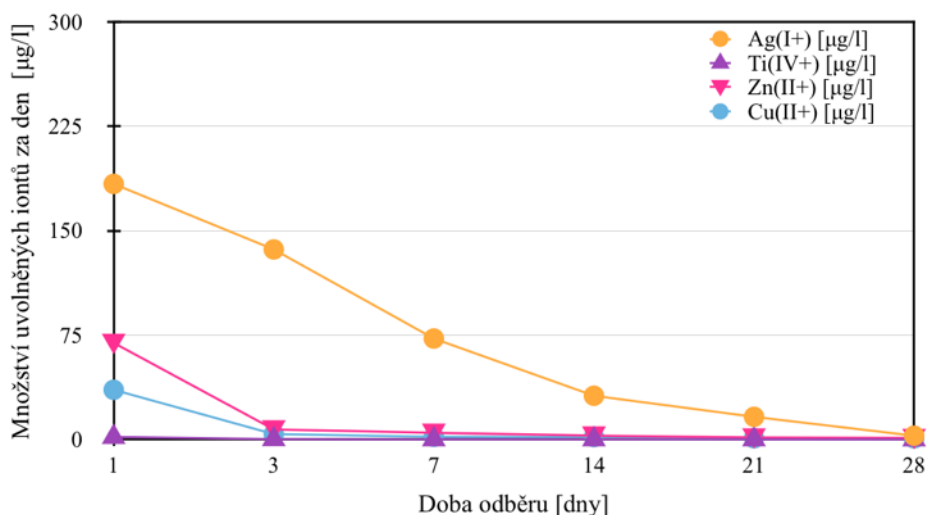
Obr. 41: Hybridní vrstva C na latexové rukavici (vz. 6 – fotopolymerace UV-A/ 30 min)

4.2.6. Uvolňování iontů z povrchu

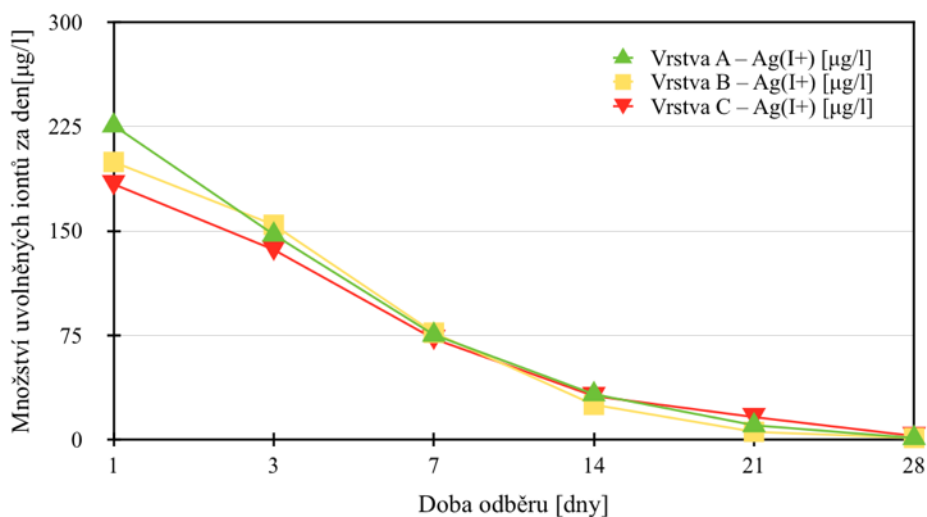
Uvolňování iontů z hybridních vrstev A, B a C bylo testováno na vrstvách nanesených na textiliích (vz. 1 a 2). Vzorky o rozměrech 3×3 cm byly umístěny do zkumavek s 15 ml deionizované vody. Zkumavky byly umístěny na třepačku a třepány při pokojové teplotě po stanovenou dobu, poté byly přefiltrovány a filtrát byl analyzován. Vzorky byly opětovně zality stejným objemem vody a umístěny na třepačku. Stejný postup byl opakován u všech odběrů.

V tabulkách (příloha 8.5.1. - 8.5.6.) je uvedeno množství iontů přítomných v odebraném vzorku, pro větší přehlednost byly do grafů vyneseny hodnoty přepočítané na množství iontů uvolněných za den. Z grafů závislosti množství uvolněných iontů za den na datu odběru (graf 4 - 7, příloha 8.5) je patrné, že u obou textilií vlivem morfologie povrchu a kvalitou vzniklé vrstvy probíhalo uvolňování rozdílně.

U vzorku 1 došlo k postupnému uvolnění iontů Ag^+ . Nejvíce Ag^+ iontů se uvolnilo první den třepání, posléze došlo přibližně k lineárnímu poklesu množství uvolněných iontů. Toto chování je způsobeno nižším množstvím iontů, které se mohou z vrstvy uvolnit. Z grafu 4 je patrné, že uvolňování iontů Ag^+ probíhalo u všech tří vrstev stejně a i po třech týdnech třepání bylo ve vzorku přítomno Ag^+ . Tento jev svědčí o vysoké kvalitě vrstev na vzorku. Uvolnění největšího množství zbylých iontů (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ti^{4+}) proběhlo hned první den třepání vzorku, poté došlo k prudkému poklesu uvolněných iontů. Ionty se však uvolňovaly po celou dobu třepání.



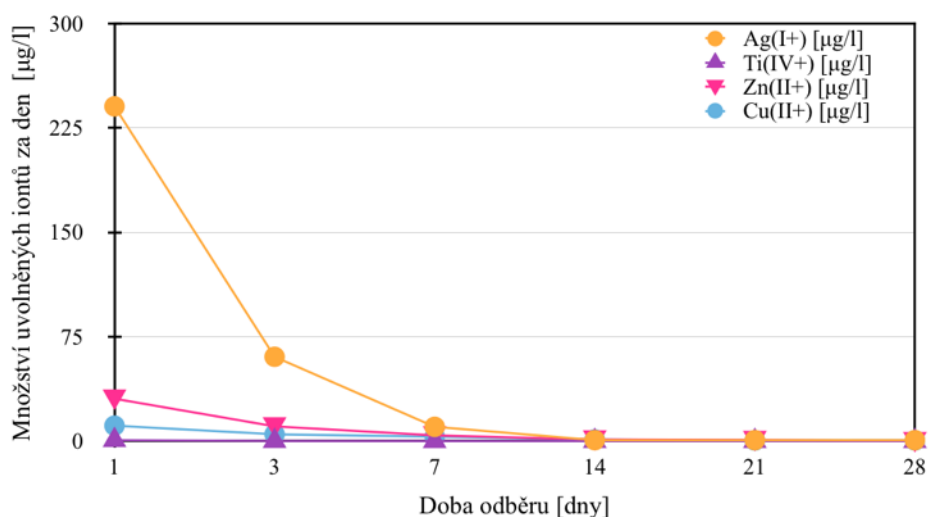
Graf 4: Množství uvolněných iontů za den vytřepávání z hybridní vrstvy C nanesené na vz. 1



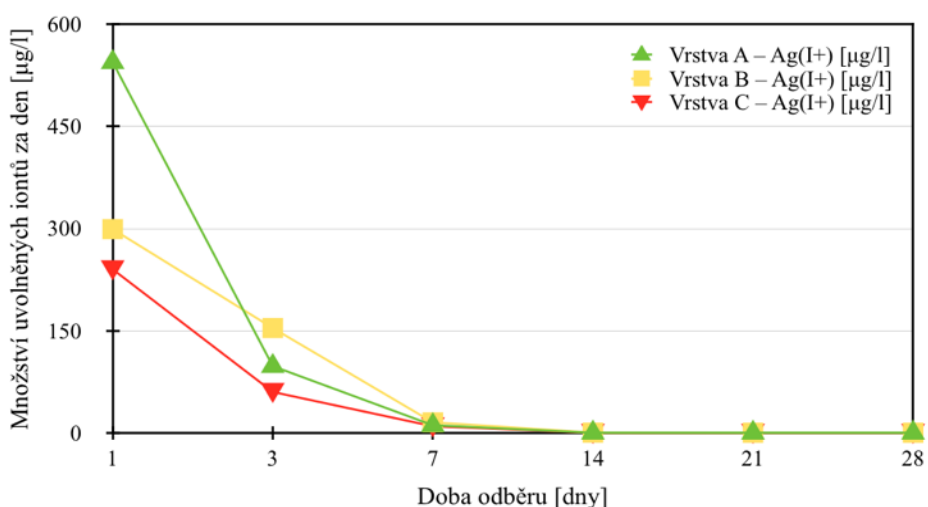
Graf 5: Množství uvolněných iontů Ag^+ za den vytřepávání z různých typů hybridní vrstvy nanesených na vz. 1

I u vz. 2 došlo k největšímu uvolnění Ag^+ iontů první den třepání, poté nastal strmý pokles množství uvolněných iontů na den, který byl způsoben nedostatečným počtem iontů, jenž by se z vrstvy mohly uvolnit. Znatelně rychlejší uvolnění iontů Ag^+ v prvních dnech třepání mělo za následek úplné vyčerpání stříbra během prvních 7 dní, poté už docházelo k uvolňování pouze

zanedbatelného množství. Z grafu 7 porovnávajícím množství uvolněných iontů Ag^+ podle typu solu je patrné, že uvolnění proběhlo u všech typů vrstev do 7 dní třepání. Avšak celkové množství uvolněných Ag^+ iontů se liší, to je způsobeno nerovnoměrným nanesením vrstvy pozorovaným v mikroskopu (4.2.5. – obr. 38). U iontů Cu^{2+} , Zn^{2+} a Ti^{4+} proběhlo uvolnění velmi podobně jako u iontů Ag^+ , kdy došlo k většímu vyčerpání iontů v prvních třech dnech a poté k uvolnění pouze velmi malého množství.



Graf 6: Množství iontů uvolněných za den vytřepávání z hybridní vrstvy C nanesené na vz. 2



Graf 7: Množství uvolněných iontů Ag^+ za den vytřepávání z hybridní vrstvy A, B a C nanesených na vz. 2

4.2.7. Chemická odolnost hybridních vrstev

Chemická odolnost hybridních vrstev C, byla testována proti běžně používaným dezinfekčním činidlům v různé koncentraci. Pro testování byly zvoleny 2 typy materiálu v závislosti na testovaných dezinfekcích. Na textilních materiálech byla testována odolnost vůči dezinfekci pokožky, se kterou by mohly materiály s hybridní vrstvou na operačním sále přijít do kontaktu

přenosem z pokožky pacienta popřípadě doktora. Dezinfekční prostředky používané pro úklid ploch byly testovány na vrstvě nanesené na PMMA.

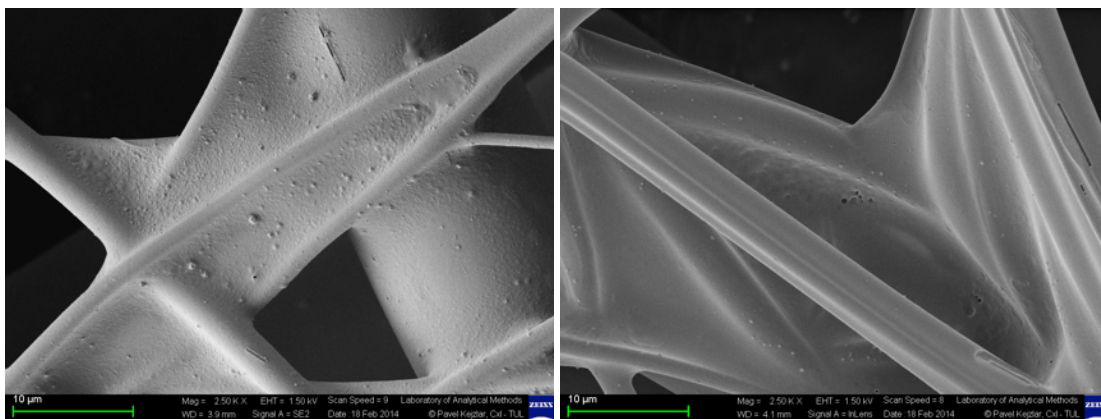
Pro testování byly zvoleny dva typy dezinfekcí pokožky od firmy B-Braun. První testovaným výrobkem byl Softasept používaný pro dezinfekci pokožky pacienta, druhým výrobkem byla dezinfekce Promanum určená pro dezinfekci rukou před chirurgickými zákroky. Oba výrobky obsahují účinné látky propan-2-ol a ethanol, jsou baktericidní, fungicidní a virucidní. Doba expozice prostředku na pokožce se pohybuje od 15 s do 90 s.

Jako vzorové dezinfekce ploch byly zvoleny 3 běžně dostupné komerční prostředky a vodní pára. *Formosan Bau*, produkt italské firmy Millebolle POINT, který se běžně používá v nemocnicích, avšak výrobce neuvádí jeho přesné složení. Druhým použitým prostředkem byl *Sanytol univerzální čistič*, dezinfekční prostředek od stejnojmenné firmy, obsahující účinnou látku didecyl(dimethyl)ammonium chlorid, která je baktericidní, fungicidní a virucidní, obvykle se používá v koncentrované formě po dobu od 5 až 15 min v závislosti na typu mikroorganismu. Posledním testovaným komerčně vyráběným dezinfekčním činidlem bylo *Savo Original* od firmy Unilever s účinnými látkami NaClO a NaOH, které se běžně používá 10× ředěné.

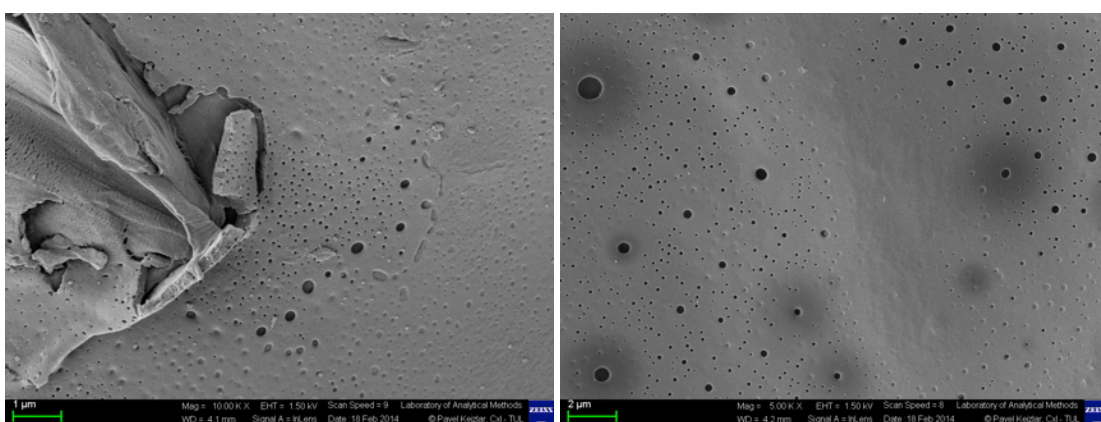
Vzorky o rozměru 2,5×7,5 cm byly ponořeny do 20 ml destilovanou vodou naředěného roztoku dezinfekčního činidla, v případě vodní páry byl vzorek umístěn nad kádinku s vařící vodou. Po uplynutí testované doby (15 min) byly vzorky vyjmuty a opláchnuty destilovanou vodou. U žádného vzorku neproběhla makroskopicky viditelná reakce. Po 3 dnech byly otestovány antibakteriální účinky vrstev (4.3.1., 4.3.3.).

Tabulka 11: Výsledky testů chemické odolnosti hybridní vrstvy C na textilních materiálech

Substrát	Dezinfekce	Ředění	Výsledek
Vz. 1 (PE, PP, viskóza)	SOFTASEPT® N	koncentrát	slabé narušení vrstvy, přítomnost usazenin
		1:4	bez narušení, přítomnost usazenin
		1:9	bez pozorovatelných změn
Vz. 2 (PE, PP)		koncentrát	slabé narušení vrstvy, přítomnost usazenin
		1:4	bez narušení, přítomnost velkého množství usazenin z dezinfekce
		1:9	bez pozorovatelných změn
Vz. 1 (PE, PP, viskóza)	PROMANUM® N	koncentrát	bez pozorovatelných změn
		1:4	bez pozorovatelných změn
		1:9	bez pozorovatelných změn
Vz. 2 (PE, PP)		koncentrát	koncentrace dezinfekce v okolí pórů, zeslabení vrstvy
		1:4	koncentrace dezinfekce v okolí pórů, slabé zeslabení vrstvy
		1:9	bez pozorovatelných změn



Obr. 42: Hybridní vrstva C na textilním vzorku (vz. 1)
vlevo po působení konc. Softasepu; vpravo po působení konc. Promanum

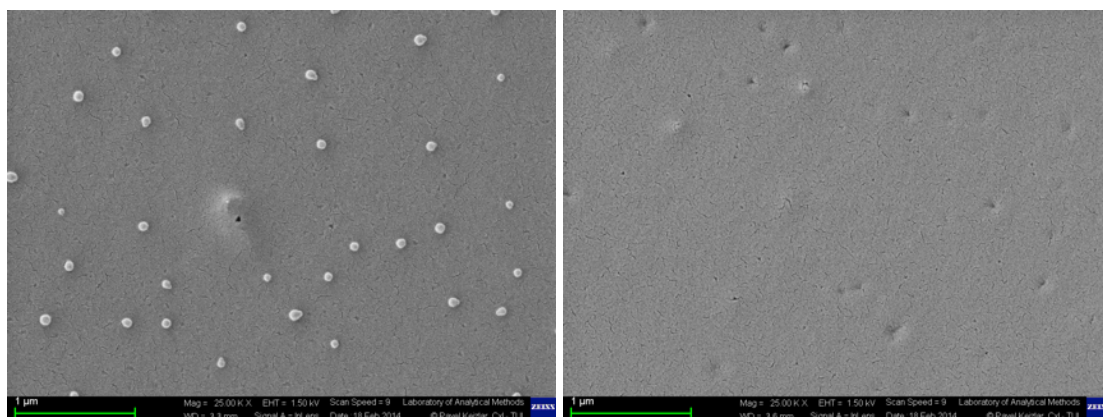


Obr. 43: Hybridní vrstva C na textilním vzorku (vz. 2)
vlevo po působení konc. Softasepu; vpravo po působení konc. Promanum

Ze SEM je patrné, že ačkoliv byly oba dezinfekční prostředky složeny z podobných účinných látek, měly výrazně odlišné působení na vrstvu. Z tabulky 11 je patrné, že vrstvy jsou značně chemicky odolné. Při aplikaci koncentrovaného Softasepu na povrch textilií došlo k mírnému narušení vrstvy, což je patrné především z obrázku 42. Se snižující se koncentrací dezinfekce došlo k mírnějším účinkům činidla a většina vrstev nevykazovala žádné pozorovatelné změny, pouze u vz. 2 došlo u 5× ředěného Softasepu ke shlukům usazenin z dezinfekce v okolí pórů (příloha 8.6.). Dezinfekce Promanum neměla viditelné účinky na vrstvu nanesenou na vz. 1 (obr. 42). Avšak u vz. 2 došlo k nasátí dezinfekce póry a částečnému rozpuštění okolní vrstvy (obr. 43), podobně reagovala i 5× ředěná dezinfekce, která však neměla tak silný účinek (příloha 8.6.), při vyšším ředění už nedošlo k žádné viditelné změně.

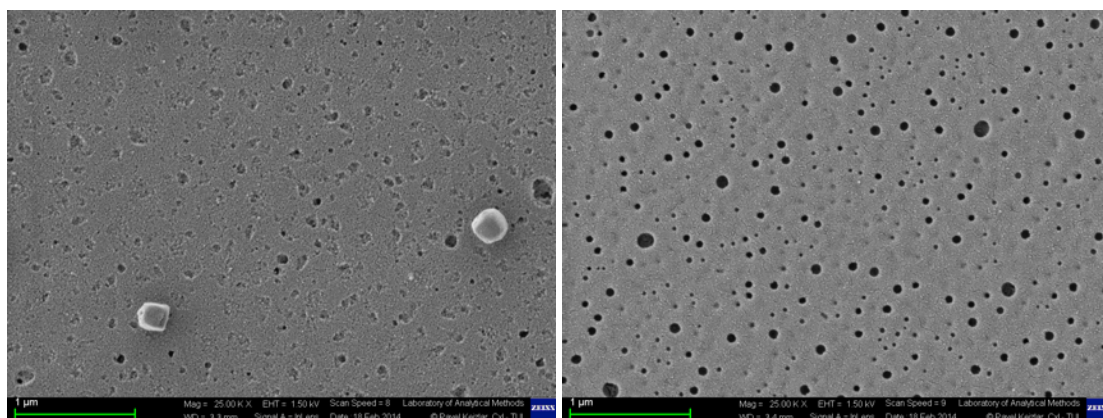
Tabulka 12: Výsledky testů chemické odolnosti hybridní vrstvy C na PMMA

Dezinfekce	Ředění	Výsledek
FORMOSAN BAU	koncentrát	bez narušení, střední počet usazeniny z dezinfekce
	1:4	bez narušení, střední počet usazeniny z dezinfekce
	1:9	bez narušení, vysoký počet usazeniny z dezinfekce
SANYTOL (Univerzální čistič)	koncentrát	bez narušení
	1:4	bez narušení, střední počet usazeniny z dezinfekce
	1:9	bez narušení, vysoký počet usazeniny z dezinfekce
SAVO (proti plísním)	koncentrát	silné narušení vrstvy, vysoký počet usazenin
	1:4	slabé narušení vrstvy, vysoký počet usazenin
	1:9	velmi slabé narušení, vysoký počet usazeniny z dezinfekce
Vodní pára		vysoká porozita vrstvy



Obr. 44: Hybridní vrstva C na PMMA (vz. 4)

vlevo po působení konc. Formosanu; vpravo po působení konc. Sanytolu



Obr. 45: Hybridní vrstva C na PMMA (vz. 4)

vlevo po působení konc. Sava; vpravo po působení vodní páry

Stejně jako u dezinfekcí pokožky i u testování dezinfekcí ploch byla prokázána vysoká chemická odolnost vrstev. Velmi dobrých výsledků bylo dosaženo především u Formosanu

a Sanytolu. U obou prostředků nedošlo k narušení vrstvy (obr. 44) u žádné ze zvolených koncentrací. Se snižující se koncentrací došlo k růstu množství usazenin (příloha 8.6.), to je pravděpodobně způsobeno reakcí látek obsažených v dezinfekci s vodou. Z těchto výsledků lze usuzovat, že Sanytol a Formosan mají podobné chemické složení. U dezinfekce vodní párou došlo k viditelnému zvýšení porozity vrstvy (obr. 45), kdy došlo ke zvětšení pórů přítomných ve vrstvě i vzniku nových pórů. Při aplikaci koncentrovaného Sava, došlo k silnému narušení vrstvy (obr. 45), narušení se snižovalo s klesající koncentrací, u 10× ředěného Sava došlo pouze ke slabému narušení vrstvy. U všech koncentrací docházelo k tvorbě usazenin, pomocí SEM-EDA (příloha 8.6.) bylo určeno, že se jedná o NaClO.

4.3. Antibakteriální a antimykotické účinky hybridních vrstev

Pro testování antibakteriálních a antimykotických účinků vrstev byly zvoleny 3 bakterie a 1 kvasinka. Při výběru bakteriálních kmenů byl podstatný především typ bakterie, její výskyt v nemocničních zařízeních a její patogenita. Z bakterií popsaných v teoretické části práce (2.3.) byly zvoleny dvě běžně se vyskytující (G⁻) tyčinky *E. coli* (anaerobní), *P. aeruginosa* (aerobní) a jeden (G⁺) kok MRSA, všechny bakterie jsou patogenní a mohou vyvolávat nozokomiální infekce. Antimykotické účinky vrstvy byly otestovány na *Candida glabrata* (*C. glabrata*), tato kvasinka patří do stejného rodu jako *Candida albicans* (2.4.1), má velmi podobné vlastnosti a zároveň vykazuje vyšší rezistenci.

Z důvodu předpokladu využití hybridních vrstev v nemocnicích byla pro testování zvolena bakteriální popřípadě mykotická suspenze o koncentraci 10⁵ CFU/ml, která odpovídá vysoce infekčnímu prostředí, v běžném prostředí se vyskytuje až 100× méně bakteriálních kmenů.

Připravené vzorky se lišily typem, vlastnostmi, ale i velikostí, proto byly zvoleny tři metody testování baktericidních a antimykotických účinků (3.1.5). První AATCC metoda 147 (dále metoda kvalitativní)² se běžně používá především pro předběžné testování textilních vzorků, avšak mírně upravená metoda byla vhodná i pro jiné typy materiálů. Dále byla použita AATCC metoda 100 (dále metoda kvantitativní)¹, kterou lze na rozdíl od předchozí metody vyhodnotit kvantitativně počet znovu obnovených bakteriálních kolonií, metoda je opět vhodná pro více typů vzorků. Mezi nejdůležitější metody testování antibakteriálních a antimykotických účinků patří metoda inhibice, která sleduje pokles bakteriálních a mykotických kolonií v čase, je však vhodná pouze pro pevné vzorky o větších rozměrech.

K porozumění získaných výsledků z metody inhibice je podstatné vysvětlení průběhu mikrobiální inhibice, která je popsána takzvanou růstovou křivkou (obr. 46).



Obr. 46: Základní křivka růstu mikrobiální populace

V první fázi takzvané klidové fázi (lag fáze) se bakterie nemnoží příliš rychle, připravují se na růst v novém prostředí. V následující exponenciální fázi (log fáze) dochází k intenzivnímu konstantnímu dělení, jehož rychlost závisí na druhu mikroba, fáze trvá, dokud nedojde k vyčerpání živin. V třetí stacionární fázi nedochází k dělení, ale počet mikrobů je neměnný, dochází k akumulaci toxických produktů. Poslední fází je autolýza neboli odumírání, dochází ke zvýšení počtu odumřelých bakterií, které převažují nad nově vzniklými, může také probíhat sporulace (tvorba klidové fáze), díky které přežijí některé bakterie nepříznivé podmínky.

4.3.1. Postup testování hybridních vrstev

Bakteriální a mykotické kmeny byly po rozmrazení naočkovány na agar na Petriho misku a umístěny do termostatu, kde byly inkubovány 37,5 °C/ 24 hod. Druhý den bylo z namnožených bakterií, popřípadě kvasinky připraveno inokulum (suspenze zárodků mikroorganismu ve fyziologickém roztoku). Pomocí bakteriální kličky byl z agaru odebrán napěstovaný mikroorganismus, který byl ve skleněné zkumavce naředěn sterilizovaným fyziologickým roztokem (6% roztok NaCl) a promíchán na vortexu. Vzniklá hustota suspenze byla změřena pomocí Denzi-La-Metru, který měří hustotu roztoku pomocí optické absorbance, popřípadě naředěna tak, aby se pohybovala mezi 0,9-1,1, optimální hodnota 1,0 v jednotkách Denzi-La-Metru odpovídá koncentraci 10^8 CFU/ml zárodků na 1 ml. Z připraveného koncentrovaného roztoku byla suspenze ředěna na zvolenou výchozí koncentraci (10^5 CFU/ml). Z bakteriální suspenze o koncentraci 10^8 CFU/ml bylo odebráno 100 μ l a zředěno 9,9 ml fyziologického roztoku. Následně proběhlo ředění na koncentraci 10^5 CFU/ml, kdy byl ze vzniklé suspenze o koncentraci 10^6 CFU/ml odebrán 1 ml, který byl doplněn 9 ml fyziologického roztoku. Takto naředěné inokulum bylo použito jako výchozí směs pro všechny testovací metody.

Pomocí metody kvalitativní byly testovány všechny připravené vzorky s hybridní vrstvou i bez vrstvy (standard). Z připraveného inokula byl automatickou pipetou odebrán 1 ml

suspenze, který byl nakápnut na Petriho misku a rozprostřen po celé ploše, poté byl na rozprostřenou suspenzi umístěn vzorek o dané velikosti (2×2 cm; vz. 3 – 1 disk). Petriho misky se vzorky byly umístěny do termostatu a inkubovány při 37,5 °C/ 24 hod. Po uplynutí inkubační doby byly misky vyjmuty, byla určena inhibice v kontaktu a případná průměrná halo zóna vzniklá kolem vzorku.

U metody kvantitativní byl z testování vynechán vz. 4, opět byly testovány všechny typy hybridní vrstvy a vzorek bez vrstvy. Vzorky (vz. 1, 2, 6 – 2×2 cm; vz. 5 – 1×1 cm; vz. 3 – 1 disk) byly umístěny do jednorázových sterilních kontejnerů, následně bylo na povrch vzorku pipetou naočkováno 10 µl výchozího inokula, poté byly kontejnery se vzorky umístěny do termostatu, kde byly ponechány inkubovat 37,5 °C/ 24 hod. Druhý den bylo ke vzorkům přidáno 10 ml fyziologického roztoku, vzorky v kontejneru byly vytřepány na vortexu. Ze zniklých roztoků byl odebrán 1 ml suspenze, který byl rozprostřen po celé ploše agaru. Otevřené Petriho misky s roztokem byly na 5 min umístěny do termostatu tak, aby došlo k zaschnutí přebytečného fyziologického roztoku, poté byly misky zavřeny a ponechány v termostatu inkubovat 37,5 °C/ 48 hod. Po inkubaci byly spočteny obnovené mikrobiální kolonie (jedna kolonie odpovídá jedné obnovené bakterii). Vzorky nebyly před testováním sterilizovány, pokud se při inkubaci objevil jiný bakteriální kmen, než testovaný, nebyl do výsledků započítán.

Metodou inhibice byl hodnocen antimykotický a antibakteriální účinek hybridních vrstev nanesených na PMMA (vz. 4), tento vzorek byl jako jediný vhodný. Na vzorek bylo pipetou nakápnuto 300 µl inokula o koncentraci 10⁵ CFU/ml. Poté byly vzorky ponechány na běžném světle nebo ozařovány UV-A zářením (rozsah 315-400 nm). Ve stanovených časových intervalech (světlo 30, 60, 90, 120, 150 min; UV-A 10, 20, 30, 40, 50 min) bylo automatickou pipetou odebráno 10 µl suspenze, která byla nakápnuta na Petriho misku a rozprostřena kličkou po celé ploše. Misky s odebranou suspenzí byly inkubovány v termostatu 37,5 °C/ 24 hod, po uplynutí uvedené doby byly, pokud to bylo možné, spočítány mikrobiální kolonie.

4.3.2. Inhibice bakteriálního kmene MRSA

Inhibice MRSA je popisována postupně metodou kvalitativní a kvantitativní, kde jsou výsledky pro přehlednost shrnuty do tabulek (příloha 8.7.1., tabulka 13) a doplněna ilustračními fotografiemi nejzajímavějších vzorků. V grafech 8, 9 je popsána inhibice na světle a UV-A záření v závislosti na zvolené hybridní vrstvě. U všech metod je uveden standard, vyčištěný vzorek, který slouží k porovnání antibakteriálních účinků. Protože se v průběhu testování ukázalo, že antibakteriální účinky na kmen MRSA jsou velmi dobré, byla provedena inhibiční metoda také na vzorcích PMMA, na kterých byla testována chemická odolnost proti dezinfekčním přípravkům (4.2.7.). Výsledky jsou uvedeny v grafech 10 a 11, kde je použit jako

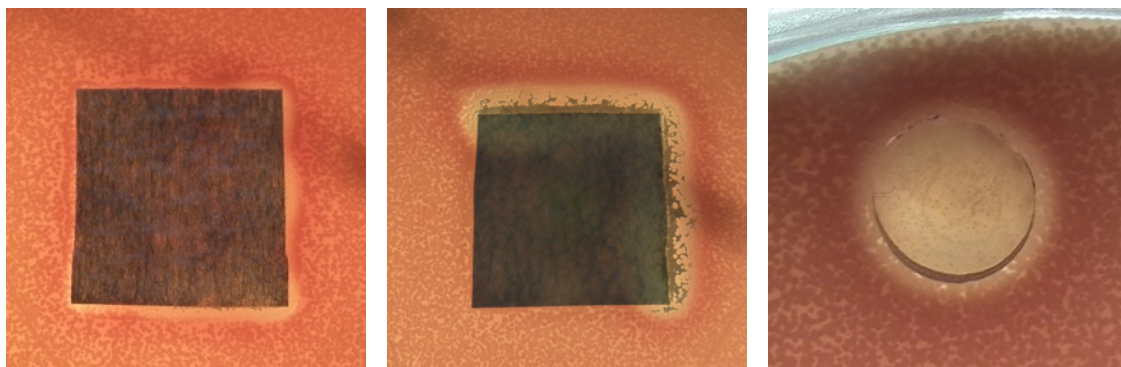
standard PMMA s netestovanou hybridní vrstvou C, vrstvy jsou v grafech rozděleny podle ředění přípravku. Fotografie inhibice na hybridní vrstvě C jsou uvedeny v příloze 8.7.

♦ AATCC metoda 147 (kvalitativní)

Z výsledků uvedených v tabulce (příloha 8.7.1) je patrné, že nejvyšší baktericidní efekt na kmen MRSA má vrstva C, která obsahuje ionty Ag^{I} , Cu^{II} , Zn^{II} a Ti^{IV} , nejnižší efekt má vrstva A, která obsahuje pouze ionty Ag^{I} a Ti^{IV} . U všech testovaných standardů nebyl prokázán antibakteriální efekt.

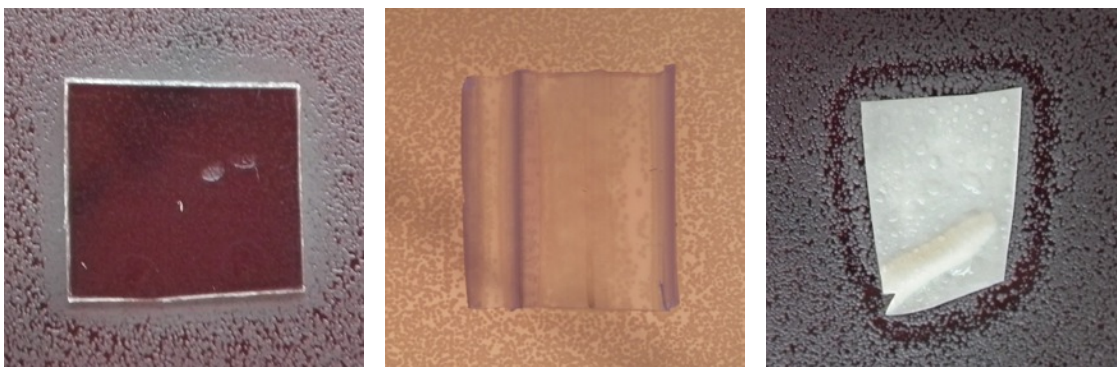
U vz. 1 inhibice a vznik halo zóny proběhl u vrstev B a C, kde se kolem vzorků vytvořila zóna s náznakem inhibice o velikosti 1 mm (obr. 47a). U druhé textilie (vz. 2) byla inhibice u všech tří vrstev výraznější a opět byla nejznatelnější u vrstvy C, kde vznikla čistá halo zóna o velikosti až 3 mm, která se však nacházela pouze v některých částech vzorku (obr. 47b). Toto chování je způsobeno pravděpodobně nerovnoměrným nanesením vrstvy, které bylo pozorováno na snímcích ze SEM (4.2.5. – obr. 38) a projevilo se i při uvolňování iontů do roztoku. U PVC disku (vz. 3) byly antibakteriální účinky prokázány pouze u vzorku s hybridní vrstvou C (obr. 47c).

U vz. 6 byl znatelný počátek inhibice u všech typů hybridních vrstev, z obrázku 48c je patrné, že vzniklá halo zóna obsahuje bakteriální kolonie. U vz. 4 a vz. 5 nebyly prokázány baktericidní účinky. Naopak u vz. 4 došlo ke koncentraci bakterií v okolí vzorku (obr. 48a), což je pravděpodobně způsobeno tím, že PMMA je znám jako biokompatibilní materiál vhodný pro množení buněk a vznik biofilmu.



Obr. 47: Inhibice MRSA kvalitativní metodou

(zleva: a) vz. 1, vrstva B – halo zóna inhibice 1 mm; b) vz. 2, vrstva C – čistá halo zóna ve dvou částech 3 mm; c) vz. 3, vrstva C – halo zóna 1 mm)



Obr. 48: Inhibice MRSA kvalitativní metodou

(zleva: a) vz. 4, vrstva C – koncentrace kolonií v okolí vzorku; b) vz. 5, vrstva A – bez efektu;
c) vz. 6, vrstva C – počátek inhibice, halo zóna obsahuje kolonie 5 mm)

♦ AATCC metoda 100 (kvantitativní)

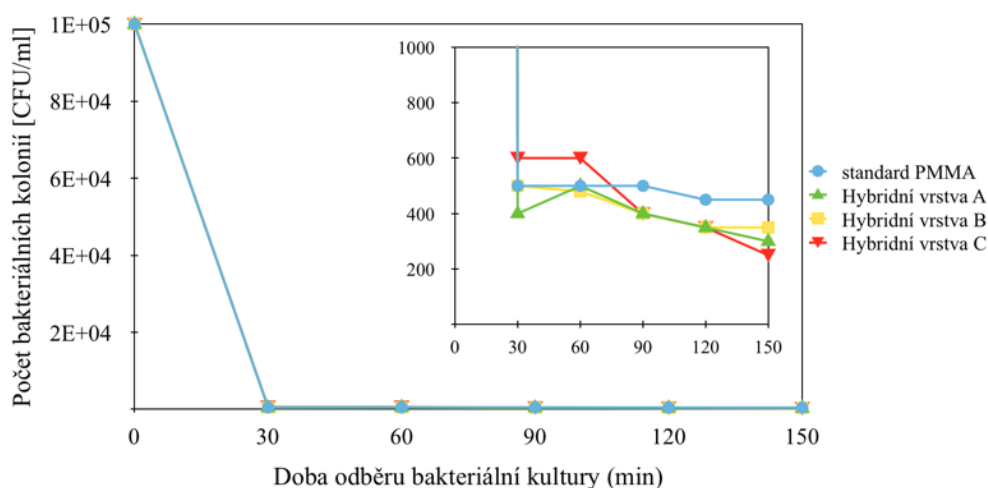
Kvantitativní metoda potvrdila výsledky získané předešlou metodou. Nejvyšší antibakteriální účinky měla hybridní vrstva C, nejnižší vrstva A. Z tabulky 13 je patrné, že i u nejméně účinného solu byl počet obnovených kolonií značně nižší než u standardu bez vrstvy, u vrstvy C byl počet obnovených kolonií přibližně 10× nižší než u standardu. Nejnižší inhibice byla prokázána u vrstev A a B nanesené na vz. 5 a 6, což je ve shodě s kvalitativní metodou, kde nevznikla u vz. 5 žádná halo zóna, v případě vz. 6 vznikl jen náznak.

Tabulka 13: Výsledky inhibice MRSA – kvantitativní metoda

vzorek	1	2	3	5	6
hybridní vrstva	počet kolonií	počet kolonií	počet kolonií	počet kolonií	počet kolonií
Standard	131	137	97	86	108
Vrstva A	31	31	28	30	44
Vrstva B	20	11	4	34	16
Vrstva C	3	11	5	9	12

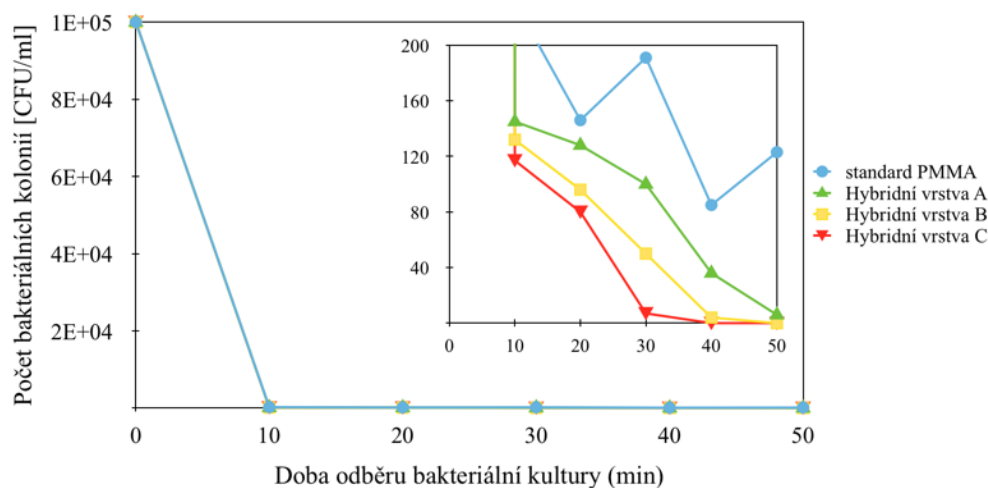
♦ Metoda inhibice

Z grafu 8 je patrné, že u žádné hybridní vrstvy nedošlo k 100% inhibici ani po 150 min působení na světle. Kmen MRSA nejlépe inhibuje vrstva C, kdy došlo k největšímu poklesu mezi 30 a 150 min. Z grafu je patrné, že u standardu nedošlo oproti hybridním vrstvám k počátku inhibice.



Graf 8: Inhibice MRSA na světle v závislosti na použité hybridní vrstvě

Mnohem zajímavějších výsledků bylo dosaženo při ozařování vzorku UV-A zářením (graf 9). Kde počátek inhibice na vrstvách pravděpodobně nastal okamžitě po aplikaci záření, už při prvním odběru byl počet kolonií výrazně nižší než u standardu nebo u běžného světla. Opět bylo prokázáno, že nejvyšší inhibiční účinek má vrstva C, u které nastala 100% inhibice mezi 30 a 40 min, poté už byl agar bez kolonií. U hybridní vrstvy B nastala 100% inhibice v 50 min. U hybridní vrstvy A 100% inhibice nenastala, avšak podle poklesu křivky inhibice lze předpokládat, že by nastala v 60 min záření. Lze tedy říci, že absence jednoho typu iontu, prodloužila dobu inhibice přibližně o 10 min. U standardu inhibice nenastala, ačkoliv je z grafu patrný pokles počtu kolonií, je tento pokles oproti hybridním vrstvám nerovnoměrný a výrazně pomalejší.

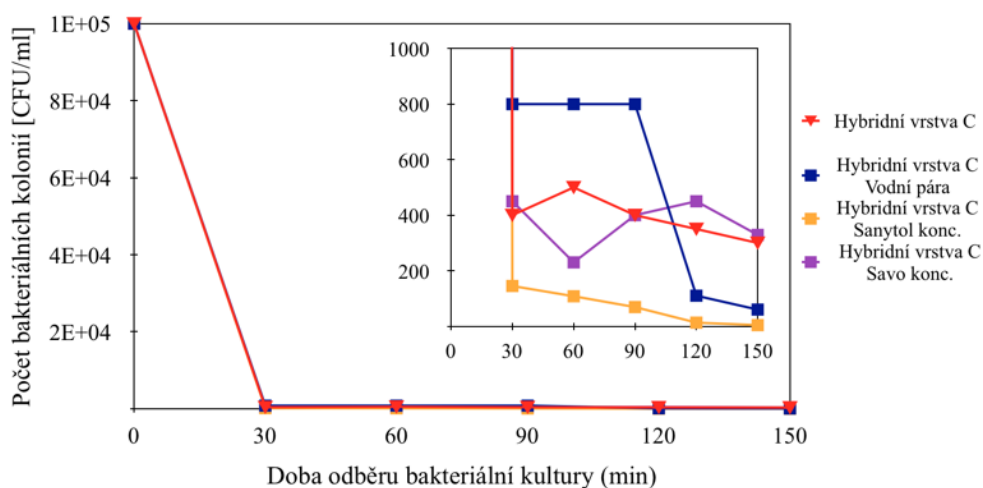


Graf 9: Inhibice MRSA na UV-A záření v závislosti na použité hybridní vrstvě

♦ Metoda inhibice na vzorcích testovaných dezinfekčním činidlem

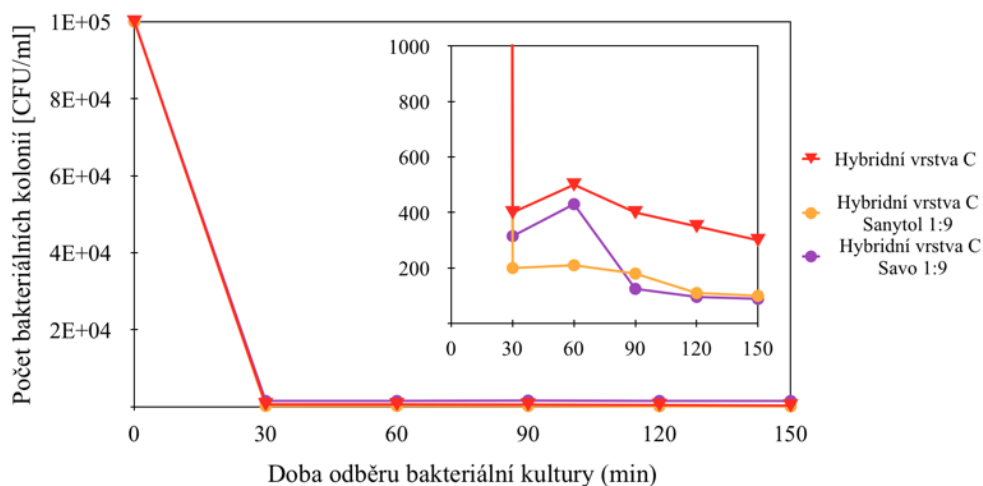
Na hybridní vrstvě C, na které byla testována chemická odolnost proti dezinfekčním přípravkům, byly testovány antibakteriální účinky pomocí metody inhibice na světle.

V grafu 10 je uvedena bakteriální inhibice MRSA na vrstvách ošetřených koncentrovanými přípravky a vodní párou. Nejrychlejší inhibice proběhla u vrstvy C ošetřené koncentrovaným Sanytolem, kdy počátek inhibice nastal do 30 min a 100% inhibice mezi 120 a 150 min, je také patrné, že inhibice byla mnohem rychlejší než u neošetřené vrstvy. Došlo zde pravděpodobně ke spojení účinků účinné látky z dezinfekce (didecyl(dimethyl)ammonium chlorid), která mohla zůstat zabudovaná v pórech vrstvy i přes důkladný oplach, a antibakteriálních vlastností vrstvy. U vrstvy testované koncentrovaným Savem byla inhibice nerovnoměrná a nedošlo k výraznému poklesu kolonií, celkový pokles byl podobný jako u neošetřené vrstvy, nižší inhibice byla pravděpodobně způsobena poškozením vrstvy chemikáliemi obsaženými v přípravku (4.2.7.). Poslední vrstva uvedená v grafu byla ošetřena vodní parou, počátek inhibice nastal mezi 90 a 120 min, avšak do 150 min nedošlo ke 100% inhibici.



Graf 10: Inhibice MRSA na světlo na hybridní vrstvě C ošetřené koncentrovanými dezinfekčními prostředky a vodní párou

U obou ředěných přípravků (graf 11) byl průběh velmi podobný, zatímco u vrstvy ošetřené Sanytolem inhibiční efekt poklesl, což bylo pravděpodobně způsobeno nižší koncentrací účinné látky obsažené v dezinfekci. U vrstvy ošetřené ředěným Savem proběhl velmi podobný pokles jako u ředěného Sanytolu, počátek inhibice nastal mezi 60 a 90 min. U ředěného Sava došlo k výrazně lepší inhibici než u koncentrátu, to bylo způsobeno pravděpodobně tím, že ředěný přípravek nepoškodil vrstvu a ta si zachovala své vlastnosti. Inhibice byla u obou vrstev ošetřených ředěným přípravkem lepší než u vrstvy neošetřené.



Graf 11: Inhibice MRSA na světle na hybridní vrstvě C ošetřené 10x ředěnými dezinfekčními prostředky

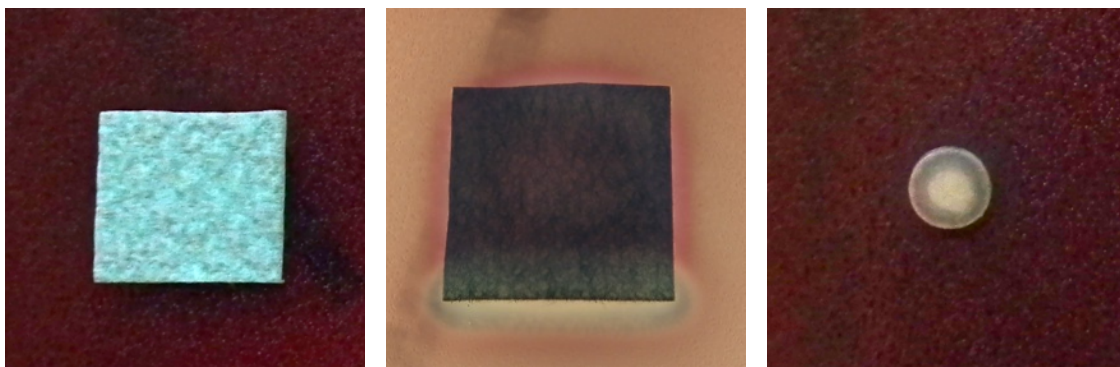
4.3.3. Inhibice bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa*

Stejně jako v předchozím případě jsou výsledky testování *P. aeruginosa* metodou kvalitativní a kvantitativní uvedeny v tabulkách (příloha 8.8.1., tabulka 14). Nejzajímavější výsledky jsou zobrazeny na obrázcích 49, 50. V grafech 12, 13 jsou uvedeny výsledky inhibiční metody hybridních vrstev na PMMA. Fotografie inhibice na hybridní vrstvě A jsou uvedeny na obr. 51 a v příloze 8.8. Kromě všech tří typů hybridních vrstev byly pro porovnání opět otestovány standardy bez vrstvy. Inhibiční metoda nebyla provedena na vzorcích ošetřených dezinfekčními činidly.

♦ AATCC metoda 147 (kvalitativní)

Z výsledků uvedených v tabulce (příloha 8.8.1.) je patrné, že *P. aeruginosa* je mnohem méně citlivá na inhibici pomocí iontů obsažených v hybridních vrstvách. Žádná z uvedených vrstev neměla u testů kvantitativní metodou vyšší inhibiční efekt než jiná. Také u žádného ze standardů se neprokázal inhibiční efekt.

U vz. 1 nebyl prokázán antibakteriální efekt, pouze u hybridní vrstvy C byl v okolí vzorku náznak hemolýzy (obr. 49a). U vz. 2 proběhla částečná inhibice a tvorba halo zóny u všech typů vrstev vždy v jedné části vzorku, opět se projevil nerovnoměrný nános vrstvy (4.2.5.), největší halo zóna (2 mm) se vytvořila u vrstvy C (obr. 49b). U vrstev nanesených na PVC disk (vz. 3) nebyl prokázán inhibiční efekt (obr. 49c). V případě vz. 4 a 6 byla v kontaktu u všech typů vrstev patrná hemolýza (obr. 50), u vz. 5 proběhla částečná inhibice u vrstvy B.



Obr. 49: Inhibice *P. aeruginosa* kvalitativní metodou

(zleva: a) vz. 1, vrstva C – náznak hemolýzy kolem celého vzorku; b) vz. 2, vrstva C – náznak halo zóny v jedné části vzorku 2 mm; c) vz. 3, vrstva C – bez efektu)



Obr. 50: Inhibice *P. aeruginosa* kvalitativní metodou

(zleva: a) vz. 4, vrstva C – koncentrace kolonií v okolí vzorku; b) vz. 5, vrstva C – bez efektu; c) vz. 6, vrstva C – v kontaktu hemolýza)

♦ AATCC metoda 100 (kvantitativní)

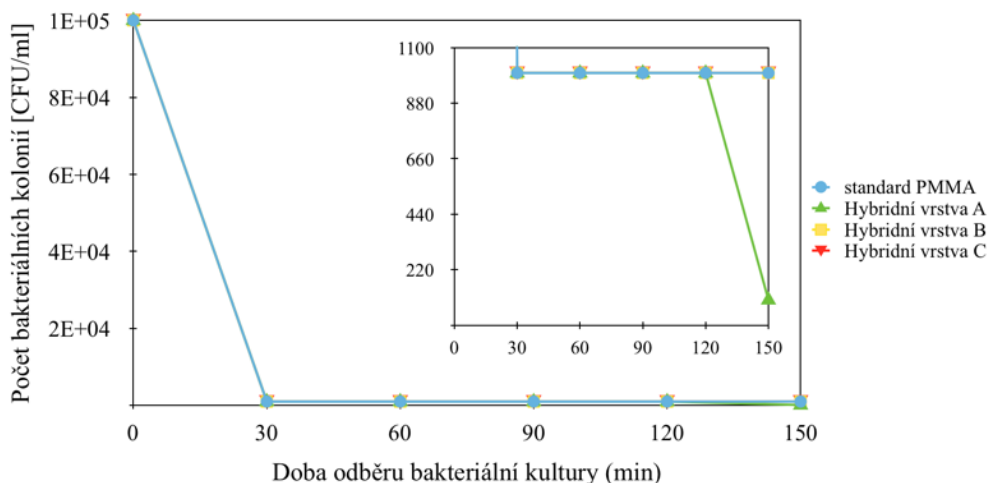
Výsledky antibakteriálních vlastností testované kvantitativní metodou jsou uvedeny v tabulce 14. Lze říci, že kromě inhibice u vz. 5 a 6 upravených vrstvou B, neproběhla žádná výrazná inhibice, což však odpovídá kvalitativní metodě. U ostatních vzorků se pohyboval počet obnovených kolonií od několika desítek až do několika stovek.

Tabulka 14: Výsledky inhibice *P. aeruginosa* – kvantitativní metoda

vzorek	1	2	3	5	6
hybridní vrstva	počet kolonií	počet kolonií	počet kolonií	počet kolonií	počet kolonií
Standard	23	43	102	88	47
Vrstva A	226	87	99	88	125
Vrstva B	231	210	44	8	2
Vrstva C	235	202	230	227	202

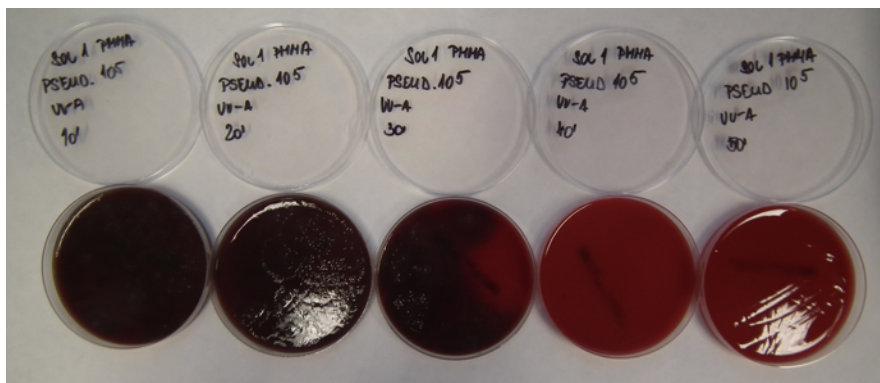
♦ Metoda inhibice

Oproti kvalitativní a kvantitativní metodě bylo pomocí metody inhibice prokázáno, že nejvyšší antibakteriální účinky má vrstva A. Z grafu 12 je patrné, že v průběhu působení vrstvy na světle nedošlo u vrstev B a C k počátku inhibice ani po 150 min. U vrstvy A proběhl počátek inhibice mezi 120 a 150 min, kdy došlo ke strmému poklesu obnovených kolonií (příloha 8.8.).

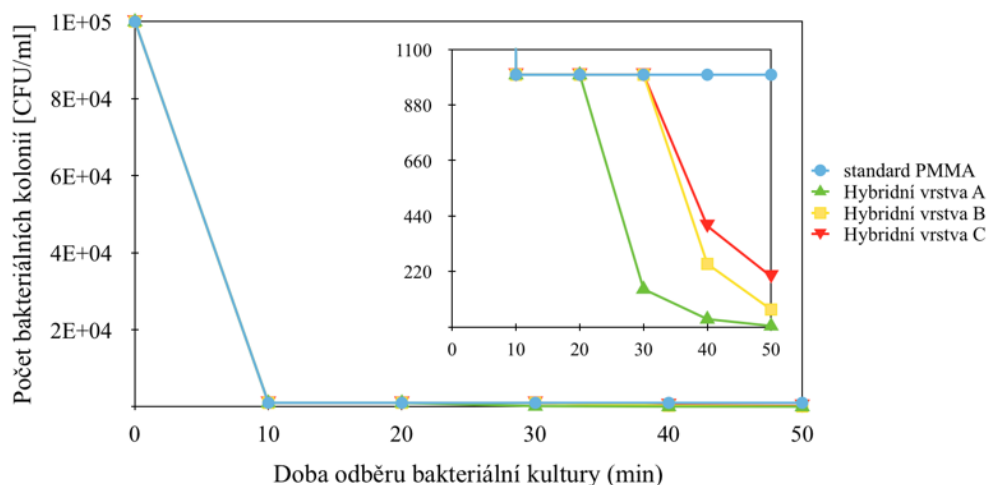


Graf 12: Inhibice *P. aeruginosa* na světle v závislosti na použité hybridní vrstvě

Výsledky inhibice na UV-A záření (graf 13) byly shodné s výsledky inhibice na běžném světle. Počátek inhibice u vrstvy A nastal mezi 20 a 30 min, kdy došlo ke strmému poklesu obnovených kolonií, 100% inhibice nastala po 40 min. U vrstvy B nastala inhibice mezi 30 a 40 min, u vrstvy C pravděpodobně mírně později. U obou vrstev nenastala 100% inhibice, avšak lze předpokládat, že u vrstvy B by došlo ke 100% inhibici do 60 min, a u vrstvy C do 70 min. Z grafu je patrné, že ihned po počátku inhibice dochází k výrazné redukci bakteriálních kolonií a do 30 min nastává 100% inhibice. Toto je dobře pozorovatelné na obr. 51, kde je zobrazena postupná inhibice *P. aeruginosa* na UV-A záření.



Obr. 51: Inhibice *P. aeruginosa* pod UV-A zářením na hybridní vrstvě A



Graf 13: Inhibice *P. aeruginosa* na UV-A záření v závislosti na použité hybridní vrstvě

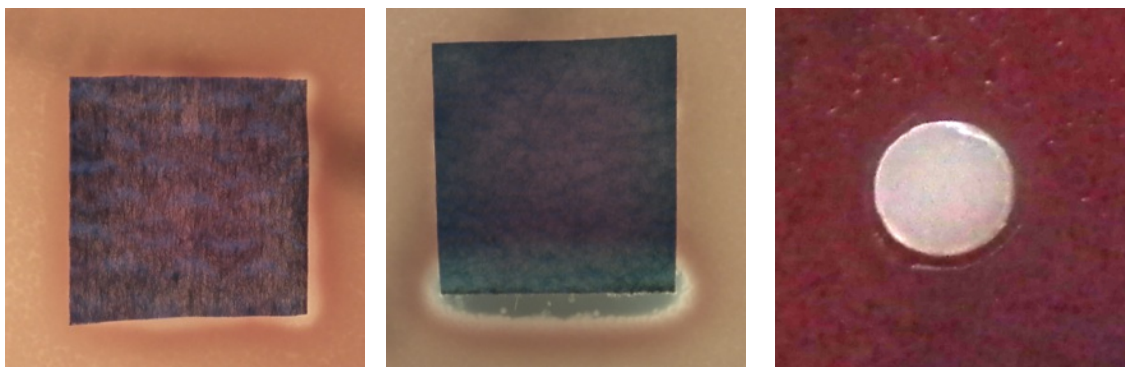
4.3.4. Inhibice bakteriálního kmene *Escherichia coli*

V tabulce (příloha 8.9.1.) jsou uvedeny přehledné výsledky inhibice metodou kvalitativní, které jsou doplněny fotografiemi (obr. 52, 53). Výsledky metody kvantitativní jsou uvedeny v tabulce 15. Výsledky inhibice na světle a na UV-A jsou uvedeny v grafech 14, 15. Stejně jako v případě MRSA i u *E. coli* byla metoda inhibice provedena i pro vzorky testované dezinfekčními prostředky, výsledky pro koncentrované prostředky a vodní páru jsou uvedeny v grafu 16, pro ředěné prostředky v grafu 17. Jako standard byl použit očištěný vzorek bez hybridní vrstvy, u inhibice vzorků ošetřených dezinfekčními prostředky byla jako standard použita hybridní vrstva C. Fotografie inhibice *E. coli* na vrstvě C jsou uvedeny v příloze 8.9.

♦ AATCC metoda 147 (kvalitativní)

I v případě *E. coli* je z výsledků kvalitativní metody patrné, že bakterie je velmi odolná. V případě standardů se ani u *E. coli* neprokázal inhibiční efekt. Nejvyšší antibakteriální efekt vykazovala hybridní vrstva C.

U vz. 1 nebyl u vrstev A a B prokázán antibakteriální efekt, u vrstvy C vznikla ve dvou částech vzorku čistá halo zóna (obr. 52a), je zde však patrný náznak halo zóny i ve zbylých dvou částech vzorku. U vz. 2 byl antibakteriální efekt prokázán u všech typů vrstev, u vrstvy A byl patrný náznak halo zóny o velikosti 5 mm, u vrstev B a C se opět projevila nerovnoměrnost nánosu vrstvy (obr. 52b). U vz. 3 nebyl prokázán antibakteriální efekt (obr. 52c). Kolem PMMA s vrstvou B se vytvořila koncentrace bakterií, oproti tomu u vrstev A a C byl vždy v jedné části patrný náznak halo zóny (obr. 53a). Částečná inhibice byla patrná také u vz. 5 s vrstvou B, u vrstev ze solu A a C se neprokázaly antibakteriální účinky (obr. 53b). Kolem vz. 6 s hybridní vrstvou C vznikla čistá halo zóna o velikosti 5 mm (obr. 53c) u dalších vrstev inhibice neproběhla.



Obr. 52: Inhibice *E. coli* kvalitativní metodou

(zleva: a) vz. 1, vrstva C – čistá halo zóna ve dvou částech vzorku – 1mm; b) vz. 2, vrstva C – čistá halo zóna v jedné části – 3 mm; c) vz. 3, vrstva C – bez efektu)



Obr. 53: Inhibice *E. coli* kvalitativní metodou

(zleva: a) vz. 4, vrstva C – halo zóna v jedné části, obsahuje kolonie – 1mm ; b) vz. 5, vrstva C – bez efektu; c) vz. 6, vrstva C – čistá halo zóna)

♦ AATCC metoda 100 (kvantitativní)

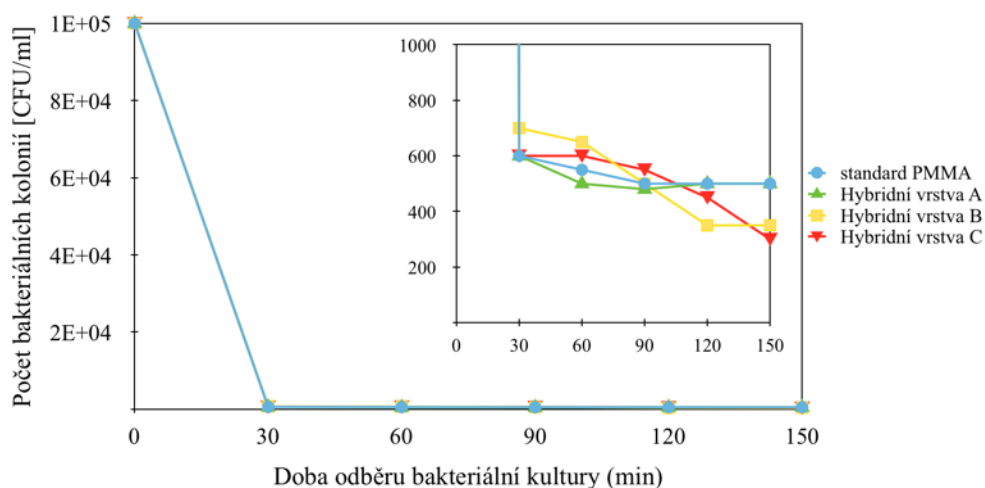
Kvantitativní metoda, jejíž výsledky jsou uvedeny v tabulce 15, byla průkaznější než metoda kvalitativní. Z tabulky je patrné, že oproti předchozí metodě se ukázala jako nejvíce účinná vrstva A, což by odpovídalo výsledkům inhibice *P. aeruginosa*, kdy došlo k poklesu obnovených kolonií u všech vzorků a nebylo obnoveno více než 10 kolonií. U hybridní vrstvy B nebyly výsledky tak průkazné, k poklesu kolonií došlo pouze u 3 vzorků. Podobných výsledků bylo dosaženo také u hybridní vrstvy C.

Tabulka 15: Výsledky inhibice *E. coli* – kvantitativní metoda

vzorek	1	2	3	5	6
hybridní vrstva	počet kolonií	počet kolonií	počet kolonií	počet kolonií	počet kolonií
Standard	115	20	13	17	5
Vrstva A	1	9	3	7	2
Vrstva B	5	19	4	8	26
Vrstva C	6	13	18	9	9

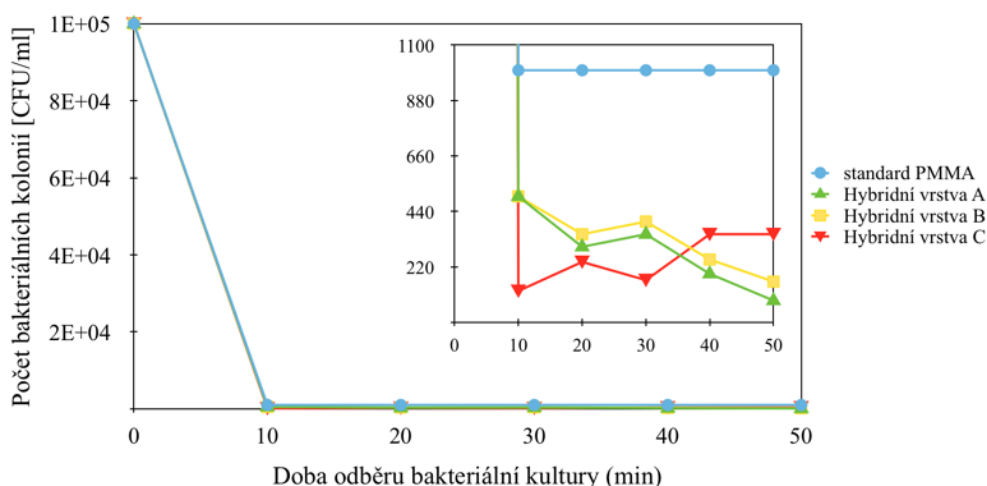
♦ Metoda inhibice

Výsledky metody inhibice uvedené v grafu 14 se shodovaly s výsledky kvalitativní metody, kde se jako nejúčinnější jevila vrstva C. Z grafu je patrné, že u žádné vrstvy nedošlo k výraznější inhibici. Počátek inhibice nejdříve nastal u vrstvy B, poté došlo k rovnoměrné inhibici. Mezi 60 a 90 min nastal počátek inhibice u vrstvy C. Počátek inhibice nenastal u standardu ani u vrstvy A.



Graf 14: Inhibice *E. coli* na světle v závislosti na použité hybridní vrstvě

Při použití UV-A záření (graf 15) byl inhibiční efekt podobný jako u kvantitativní metody. Nejúčinnější inhibici měly vrstvy A a B, kde efekt nastal okamžitě po aplikaci UV-A záření a už po 10 min byl počet kolonií výrazně nižší než u standardu. Ačkoliv ani u jedné z vrstev nenastala 100% inhibice, byl zřetelný pokles obnovených kolonií, v 50 min se oproti 10 min obnovila pouze 1/4 kolonií. U vrstvy C, byla počáteční inhibice nejsilnější, ale posléze došlo k obnově více kolonií, stejné chování bylo prokázáno i při opakovaném testu. U standardu počátek inhibice nenastal, zároveň byl počet obnovených kolonií výrazně vyšší než u vzorků s vrstvou.

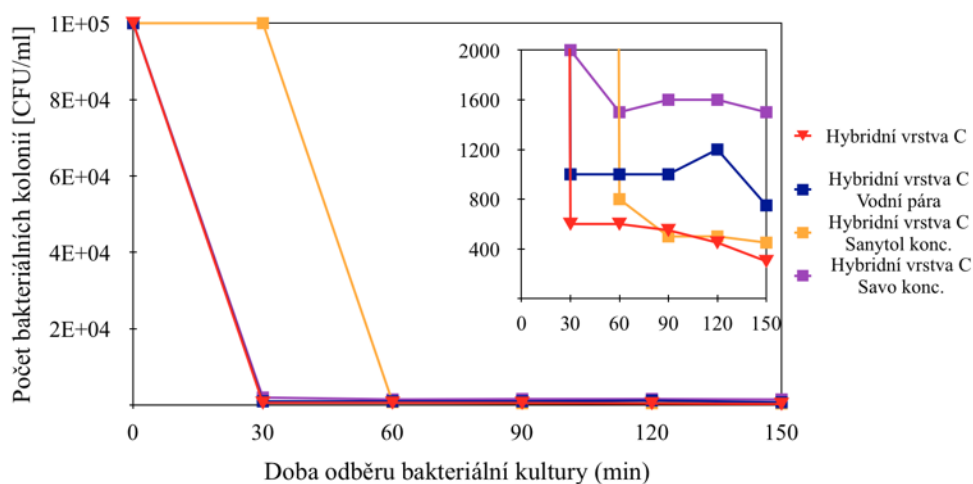


Graf 15: Inhibice *E. coli* na UV-A záření v závislosti na použité hybridní vrstvě

♦ Metoda inhibice na vzorcích testovaných dezinfekčním činidlem

U *E. coli* byla metodou inhibice na světle testována změna působení hybridní vrstvy C nanesené na PMMA a ošetřené koncentrovanými, popřípadě ředěnými dezinfekčními prostředky nebo vodní parou.

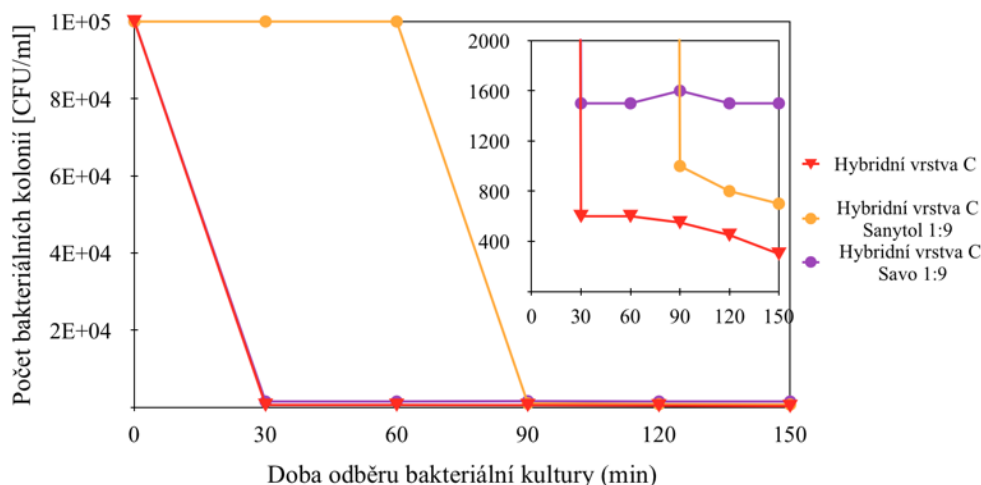
Z grafu 16 je patrné, že velmi podobné výsledky jako u standardu s neošetřenou vrstvou C byly prokázány i u vrstvy ošetřené koncentrovaným Sanytolem, kde počátek inhibice nastal mezi 30 a 60 min, po 30 min byl zaznamenán mírný pokles baterií. Výrazně horší inhibice nastala u vrstvy ošetřené vodní párou, kde počátek inhibice nastal až mezi 120 a 150 min. U vrstvy ošetřené koncentrovaným Savem inhibice vůbec nezačala, což bylo pravděpodobně způsobeno silným poškozením vrstvy (4.2.7 – obr. 45).



Graf 16: Inhibice *E. coli* na světle na hybridní vrstvě C ošetřené koncentrovanými dezinfekčními prostředky a vodní párou

V případě ředěných přípravků (graf 17) byla výsledná inhibice velmi podobná. U vrstvy ošetřené Sanytolem došlo k počátku inhibice mezi 60 a 90 min, do té doby byl na agaru

kompaktní výsev kolonií, poté stejně jako u koncentrátu došlo k mírnému poklesu bakteriálních kolonií. Vrstva ošetřená ředěným Savem se chovala totožně jako vrstva ošetřená koncentrátem, nedošlo k počátku inhibice.



Graf 17: Inhibice *E. coli* na světle na hybridní vrstvě C ošetřené 10x ředěnými dezinfekčními prostředky

4.3.5. Inhibice mykotického kmene *Candida glabrata*

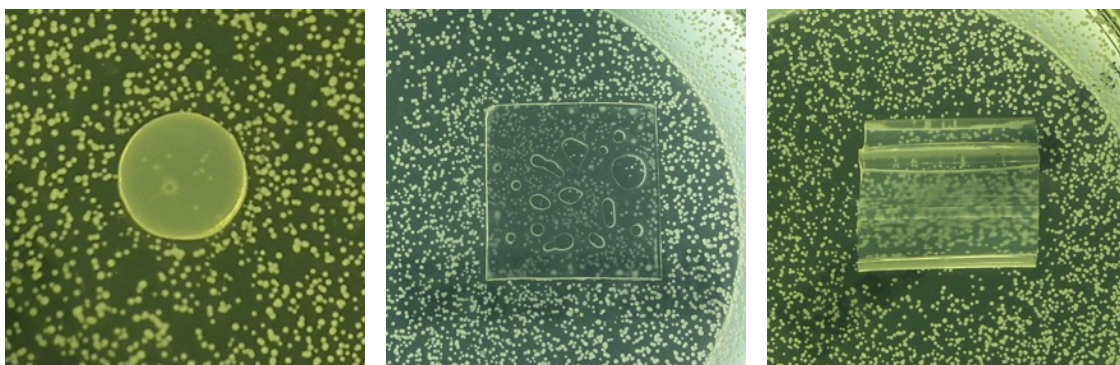
Stejně jako v případě bakteriálních kmenů i u mykotického kmene *C. glabrata* byla provedena kvalitativní a kvantitativní metoda, přehledné výsledky jsou uvedeny v tabulkách (příloha 8.10.1. a tabulka 16), a jsou doplněny ilustrativními fotografiemi. V grafech 18 a 19, jsou uvedeny výsledky inhibiční metody na běžném světle a na UV-A záření, fotografie inhibice jsou uvedeny v příloze 8.10.

♦ AATCC metoda 147 (kvalitativní)

Kvalitativní metoda prokázala vynikající antimykotické účinky u všech typů vrstev a vzorků. Nejúčinnější byla hybridní vrstva C, nejméně účinná byla hybridní vrstva A. U standardů žádné antimykotické vlastnosti prokázány nebyly (obr. 54).

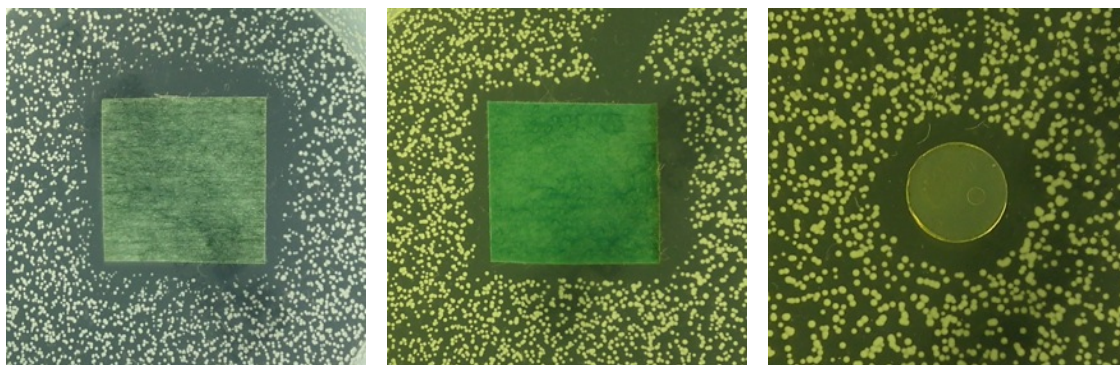
U vz. 1 byla inhibice v kontaktu 100%, u všech vrstev vznikla čistá halo zóna (obr. 55a), která byla největší u vrstvy B. I u vz. 2 byla inhibice v kontaktu 100%, u všech vzorků vznikla čistá halo zóna od 2,75 mm (vrstva C, obr. 55b) do 3,25 mm (vrstva B). 100% inhibice nastala také v případě PVC disku (vz. 3), kde se však nevytvořila halo zóna kolem vzorku s vrstvou A, u vrstev B a C došlo k vytvoření čisté halo zóny, která dosahovala velikostí 2 a 3 mm (obr. 55c). U PMMA došlo ke 100% inhibici v kontaktu (obr. 56a). V případě vrstvy A byla halo zóna čistá, pouze ve 3 směrech, u vrstev B a C byly halo zóny rovnoměrná kolem celého vzorku. U vz. 5 nastala 100% inhibice pouze u vrstvy C (obr. 56b), u vrstvy A byla inhibice 90% a u vrstvy B 80%. Tento jev mohl být způsoben nerovnoměrným povrchem katetru a nerovnoměrným stykem vrstvy s inokulem. Vzniklé halo zóny nebyly rovnoměrné a obsahovaly mykotické

kolonie. I v případě posledního vzorku (vz. 6) nastala 100% inhibice v kontaktu (obr. 56c), avšak u žádného typu vrstvy nevznikla halo zóna.



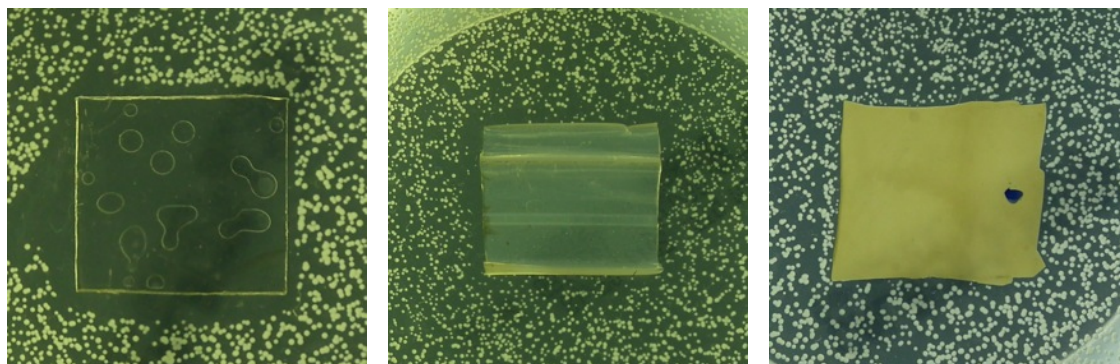
Obr. 54: Inhibice *C. glabrata* kvalitativní metodou

(zleva: a) vz. 3, standard – bez efektu; b) vz. 4, standard – bez efektu; c) vz. 5, standard – bez efektu)



Obr. 55: Inhibice *C. glabrata* kvalitativní metodou

(zleva: a) vz. 1, vrstva C – 100% inhibice, čistá halo zóna 2,5 mm; b) vz. 2, vrstva C – 100% inhibice, čistá halo zóna 2,75 mm; c) vz. 3, vrstva C – 100% inhibice, čistá halo zóna 3 mm)



Obr. 56: Inhibice *C. glabrata* kvalitativní metodou

(zleva: a) vz. 4, vrstva C – 100% inhibice, čistá halo zóna 2,5 mm; b) vz. 5, vrstva C – 100% inhibice, halo zóna 3 směr 2,5 mm, obsahuje kolonie; c) vz. 6, vrstva C – 100% inhibice, bez halo zóny)

♦ AATCC metoda 100 (kvantitativní)

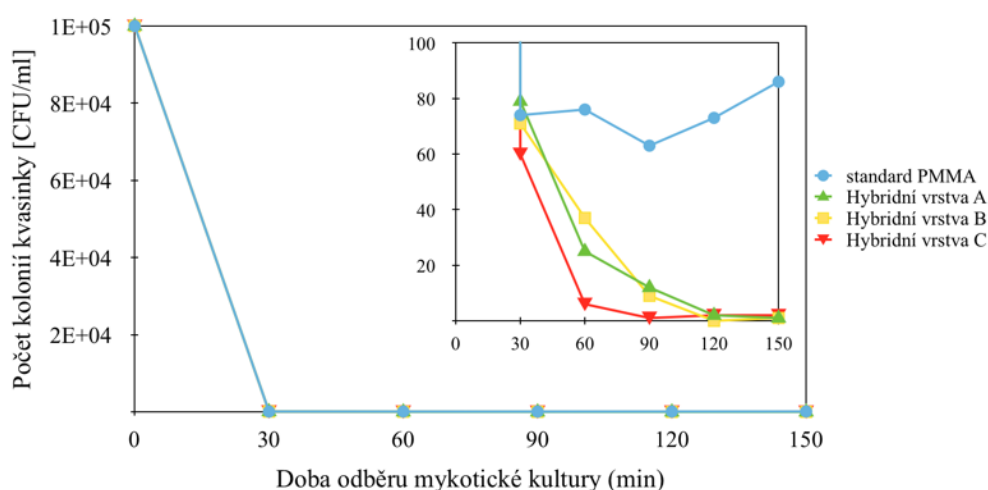
Výsledky kvantitativní metody (tabulka 16) potvrdily výsledky z předchozí metody. V případě vzorků 1 – 5 nedošlo k obnovení žádné kolonie ani u jednoho typu hybridní vrstvy, pouze u vz. 6 došlo k obnovení dvou kolonií u vrstvy A, u zbylých vrstev také nedošlo k obnovení kolonií. Z výsledků je patrné, že v případě vz. 1, 3, 6 nedošlo k obnovení kolonií ani u standardu, pouze v případě vz. 2 a 5 došlo k obnovení 8 kolonií.

Tabulka 16: Výsledky inhibice *C. glabrata* – kvantitativní metoda

vzorek	1	2	3	5	6
hybridní vrstva	počet kolonií	počet kolonií	počet kolonií	počet kolonií	počet kolonií
Standard	0	8	0	8	0
Vrstva A	0	0	0	0	2
Vrstva B	0	0	0	0	0
Vrstva C	0	0	0	0	0

♦ Metoda inhibice

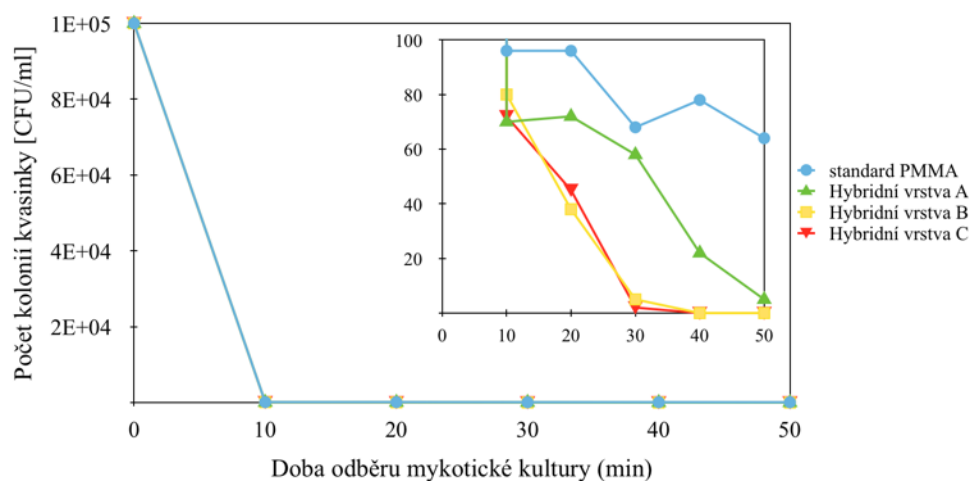
Metoda inhibice (graf 18) na světle potvrdila výsledky získané z kvalitativní a kvantitativní metody, všechny hybridní vrstvy jsou vysoce antimykotické, nejrychlejší inhibiční efekt vykazuje vrstva C. U všech typů hybridních vrstev nastal počátek inhibice mezi 30 a 60 min, u vrstvy C pravděpodobně o něco dříve než u zbylých dvou typů vrstev (A, B), pokles obnovených kolonií u vrstvy C byl největší. Ačkoliv u žádné hybridní vrstvy nenastala 100% inhibice, u vrstvy C se po 60 min (odběry 90 - 150 min) obnovily maximálně 2 kolonie. U vrstev A, B podobný jev nastal po 90 min, kdy také došlo k obnovení maximálně 2 kolonií.



Graf 18: Inhibice *C. glabrata* na světle v závislosti na použité hybridní vrstvě

V případě metody inhibice pod UV-A zářením (graf 19) byly potvrzeny výsledky získané pomocí předchozích metod. Velmi podobné chování vykazovaly vrstvy B a C, u kterých nastal

počátek inhibice mezi 10 a 20 min, 100% inhibice u obou typů vrstev nastala mezi 30 a 40 min. U hybridní vrstvy A nastal počátek inhibice přibližně o 10 min později než u zbylých dvou typů vrstev, zároveň je z grafu patrné, že inhibice byla pomalejší. Ačkoliv 100% inhibice nenastala, lze předpokládat, že by k ní došlo do 60 min.



Graf 19: Inhibice *C. glabrata* na UV-A záření v závislosti na použité hybridní vrstvě

5. Shrnutí výsledků, diskuze

Experimentální část předložené práce se zabývá hybridními vrstvami s antibakteriálními a antimykotickými účinky. Je rozdělena do dvou částí, v první části byly zkoumány vlastnosti připravených solů v závislosti na obsažených iontech a jejich následné zpracování. Druhá část je zaměřena na vlastnosti připravených hybridních vrstev aplikovaných na polymerních materiálech, především pak na jejich chemickou odolnost, uvolňování iontů z vrstev, antibakteriální a antimykotickou aktivitu.

Z FT-IR spekter solů a připravených hybridních vrstev bylo zjištěno, že pro získání dostatečně zpolymerované organické části hybridní vrstvy stačí tepelná úprava při 90 °C/ 30 min. Pro následnou tepelnou polymeraci byla u většiny vrstev na vzorcích zvolena delší doba 90 °C/ 60 min, u PVC vzhledem k doporučením 83 °C/ 180 min. Protože probíhaly změny v celé oblasti FT-IR spektra bylo nutné zvolit vhodný vlnový rozsah pro normalizaci intenzity. Jako nejvhodnější se ukázala oblast Si–O–Si vazeb a skeletálních vibrací, kde v průběhu polymerace docházelo k nejmenším změnám. Pro další testování změn probíhajících ve vznikající vrstvě by však bylo vhodné přidat do solu látku, u které by nedocházelo v průběhu polymerace ke změnám a jejíž vibrační pás by byl vhodný pro normalizaci spektra (např. nepolymerované TMSPM).

Některé ze zvolených polymerních materiálů neobsahovaly vhodné funkční skupiny pro aplikaci vrstvy na povrch substrátu, z tohoto důvodu bylo nutné vzorky vhodně upravit, např. plazmou. Na obrázcích z SEM však bylo patrné, že především u vz. 2, byla úprava plazmou nedostatečná. Z tohoto důvodu by bylo vhodné pro další testy upravit postup přípravy vzorků, např. změnou doby aplikace plazmy nebo solu.

U vzorků z PVC a latexu nebyla nanesená vrstva velmi kvalitní a docházelo ke vzniku prasklin. Uvedený jev mohl být způsoben nevhodnou tloušťkou vrstvy, popřípadě nedostatečnou adhezí k substrátu – docházelo k tvorbě bublin při vypařování rozpouštědla, což ovlivnilo výslednou porozitu hybridních vrstev.

Porozita vrstvy byla patrná na některých typech vzorků viz 4.2.5. Pro následné studium porozity vrstev bylo připraveno několik typů tepelně polymerovaných hybridních vrstev, které byly testovány pomocí BET analýzy. Tato analýza však v našem případě nebyla úspěšná, testované vzorky vrstev nebylo možné důkladně odplynit vlivem uvolňování buď zbytků rozpouštědla, nebo jiných látek.

U testování antibakteriální a antimykotické aktivity bylo dokázáno, že všechny typy vrstev mají inhibiční vlastnosti, především pak na kvasinku *C. glabrata* a bakteriální kmen MRSA. Jako nejúčinnější se jevila podle předpokladů vrstva C obsahující všechny čtyři typy iontů (Ag^+ , Zn^{+II} , Cu^{+II} , Ti^{+IV}). Z časových důvodů nebylo možné testy opakovat v dostatečném množství a zkoumat dlouhodobé účinky vrstev tak, aby byl získán dostatečný a relevantní objem dat.

Pro další testy by bylo vhodné např. zkoumat vliv sterilizace na vlastnosti hybridních vrstev, popřípadě se zaměřit na krátkodobou aktivaci vrstvy pomocí UV-A záření. Dále by bylo vhodné otestovat antibakteriální účinky textilií, především se zaměřit na účinnost vrstvy v závislosti na rychlosti uvolňování iontů.

6. Závěr

- ◆ Bylo zjištěno, že všechny 3 typy připravených solů mají velmi podobnou velikostní distribuci částic, která se v závislosti na délce polymerních řetězců pohybuje od jednotek nm až do stovek nm. Získané výsledky potvrdily možnost reprodukovatelnosti syntézy a také to, že různé typy iontů výrazně neovlivňují velikost vznikajících makromolekulárních řetězců.
- ◆ Výsledky z FT-IR spektroskopie dokazují plynulé změny v solu během varu a poté při tepelné polymeraci hybridní vrstvy. Postupnou polymeraci potvrzují změny v pásu charakteristickém pro -C=C- vazby, kde dochází k úbytku vazeb především v době varu solu, kdy je reakce iniciovaná pomocí BPO. V oblasti -C=O vazeb, dochází k plynulému přechodu jednoho typu karbonylu na druhý, který probíhá při varu solu i během tepelné polymerace. Plynulé změny potvrzuje i oblast pásů charakteristická pro Si-O-Si vazby a skeletální vibrace. Porovnání těchto pásů v závislosti na typu hybridní vrstvy ukázalo, že výsledné vrstvy jsou si velmi podobné, avšak jejich struktura není totožná.
- ◆ Nej kvalitnější vrstva byla nanášena na vz. 1, kde došlo k obalení vláken, avšak nedošlo zde k tvorbě pórů. U plazmou upraveného textilního povrchu z PE a PP (vz. 2) se vytvořila nerovnoměrná silně porézní vrstva. Kvalitní vrstva byla nanášena na PMMA, kde byla patrná pouze při porušení nebo na konci tahu, vrstva byla slabě porézní a v okolí pórů byla viditelná špatná adheze vrstvy. U materiálů z PVC a latexu došlo k nanášení silné nerovnoměrné vrstvy, která obsahovala praskliny a byla bez pórů.
- ◆ Test uvolňování iontů obsažených ve vrstvách nanášených na textilích potvrdil pozorování z mikroskopu. U textilie s obsahem viskózy (vz. 1), kde byla vrstva rovnoměrná a velmi kvalitní, se ionty Ag^+ uvolňovaly postupně po celou dobu testování (28 dní) a celkové množství uvolněných iontů Ag^+ bylo u všech vzorků stejné. Oproti tomu u vrstvy bez viskózy (vz. 2), došlo k uvolnění všech iontů Ag^+ v prvních 7 dnech vytřepávání. Celkové množství Ag^+ se u vzorků výrazně lišilo, různý obsah celkového množství Ag^+ potvrdil nerovnoměrný nános vrstvy na vzorcích.
- ◆ Z výsledků antibakteriální aktivity vyplývá, že hybridní vrstva C dobře inhibuje G^+ kmen MRSA. Méně účinné jsou všechny vrstvy (A, B, C) na G^- tyčinky, u *P. aeruginosa* se z uvedených vrstev se jako nejúčinnější jevila vrstva A, u *E. coli* nebyla žádná z vrstev průkazně výrazně účinnější. Vrstvy na PMMA byly účinné především pod UV-A zářením, kde došlo ke 100% inhibicím kmene MRSA u všech vrstev do 60 min, u *P. aeruginosa* nastal počátek až po 20 - 30 min ozařování, avšak následná inhibice byla velmi rychlá.
- ◆ U vrstev testovaných dezinfekčními činidly, byla účinná vrstva C, která prošla působením koncentrovaným Sanytolem, kde došlo k 100% inhibici kmene MRSA na světle mezi 90 - 120 min, u *E. coli* bylo u této vrstvy dosaženo stejných výsledků jako u neošetřené vrstvy.

Jako nejméně účinná se ukázala vrstva, které prošla působením koncentrovaného Sava, u které bylo na snímcích ze SEM patrné silné poškození vrstvy.

- ♦ Z výsledků antimykotické aktivity vyplývá, že všechny typy vrstev jsou vysoce antimykotické, nejvyšší inhibiční účinek má hybridní vrstva C. Vrstvy vykazují silný inhibiční efekt, jak na běžném světle, kde došlo ke 100% inhibici do 120 min, tak i pod UV-A zářením, kde byly neúčinnější vrstvy B a C, u kterých nastala 100% inhibice mezi 30 a 40 min.

7. Literatura

1. AATCC Test Method 100-2004 – Antibacterial Finishes on Textile Materials, 2004.
2. AATCC Test Method: 147-2004 – Antibacterial activity Assessment of textile materials, 2004.
3. DUCHÁČEK, V. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2011. 276 s. ISBN 978-80-7080-788-0.
4. MCMURRY, J. *Organická chemie*. Brno: VUTIUM, 2007. 1176 pp. s. ISBN 978-80-7080-637-1.
5. Stone Age, Iron Age, Polymer Age. *Journal of Chemical Education*, 1986, 63(9), s. 743.
6. MLEZIVA, J. *Polymery: Výroba, struktura, vlastnosti a použití*. Praha: Sobotáles, 2000. 537 s. ISBN 978-80-8592-072-7.
7. SASTRI, V. R. *Plastics in Medical Devices: Properties, Requirements and Applications*. Elsevier Science, 2010. ISBN 978-08-1552-028-3.
8. HOLMES-WALKER, W. A. *Life-enhancing Plastics: Plastics and Other Materials in Medical Applications*. Imperial College Press, 2004. 217 s. ISBN 9781860945427.
9. RAPRA TECHNOLOGY LIMITED. *Medical Polymers 2006*. Smithers Rapra, 2006. 300 s. ISBN 978-18-5957-580-2.
10. LAMBERT, B. J., TANG, F. W. AND ROGERS, W. J. *Polymers in Medical Applications*. Rapra Technology, 2001. 146 s. ISBN 978-18-5957-259-7.
11. BRONZINO, J. D. *Medical Devices and Systems*. Taylor & Francis, 2006. 1376 s. ISBN 978-14-2000-386-4.
12. SOBHI, H., MATTHEWS, M. E., GRANDY, B., MASNOVI, J., et al. Selecting polymers for medical devices based on thermal analytical methods. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2008, 93(2), s. 535-539.
13. GALATÍK, L. Kde nalezneme plasty v medicíně? *MM Průmyslové spektrum*, 2012, (1), s. 44.
14. ROGERS, W. J. *Sterilisation of Polymer Healthcare Products*. Rapra Technology, 2005. 326 s. ISBN 978-18-5957-490-4.
15. RAMAKRISHNA, S., MAYER, J., WINTERMANTEL, E. AND LEONG, K. W. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Composites Science and Technology*, 2001, 61(9), s. 1189-1224.

16. TIAN, H. Y., TANG, Z. H., ZHUANG, X. L., CHEN, X. S., et al. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science*, 2012, 37(2), s. 237-280.
17. RUZICKOVA, K., COBBING, M., ROSSI, M. AND BELAZZI, T. Preventing harm from phthalates, Avoiding PVC in hospitals. *Health Care Without Harm*, 2004.
18. ROBINSON, J., LOUIS, P. M. S. AND PADMARAJU, A. *Polymer in Medicine*. Polymers Department of Chemical Engineering University at Buffalo-SUNY, 2001.
19. KURTZ, S. M. *UHMWPE biomaterials handbook: ultra high molecular weight polyethylene in total joint replacement and medical devices*. Amsterdam; London: Academic, 2009. 543 s. ISBN 978-0-12-374721-1.
20. RIOS, R., PUERTOLAS, J. A., MARTINEZ-NOGUES, V., MARTINEZ-MORLANES, M. J., et al. Mechanical behavior, microstructure and thermooxidation properties of sequentially crosslinked ultrahigh molecular weight polyethylenes. *Journal of Applied Polymer Science*, 2013, 129(5), s. 2518-2526.
21. ELIAS, H. G. *An introduction to polymer science*. VCH, 1997. 470 s. ISBN 978-35-2728-790-1.
22. LIERDE, S. V. Latest Medical Applications of Polypropylene. *Medical Device Technology*, 2004, (6), s. 33-34.
23. AHMED, S. Radiation tolerant polypropylene finds greater use in medical circles. *Plastics, Additives and Compounding*, 2005, 7(3), s. 38-41.
24. AKRE, J. What Do We Know About Polypropylene? *Mesh Medical Device Newsdesk* [online]. 2012, [cit. 2. 9. 2013]. Dostupné na: <<http://meshmedicaldevicenewsdesk.com/media-reports/what-do-we-know-about-polypropylene-2/>>.
25. ZHAO, X. AND COURTNEY, J. M. *Update on Medical Plasticised PVC*. iSmithers Rapra Publishing, 2009. 120 s. ISBN 978-18-4735-208-8.
26. DEHP Exposure. Braun Melsungen AG [online]. 2013 [cit. 12. 12. 2013]. Dostupné na: WWW: <<http://www.safeinfusiontherapy.com/cps/rde/xchg/hc-safeinfusion-en-int/hs.xsl/15886.html#>>>.
27. THIELEN, T., MAAS, S., ZUERBES, A., WALDMANN, D. L., et al. Mechanical Material Properties of Polymethylmethacrylate (PMMA) for Medical Applications. *Materials Testing*, 2009, 51(4), s. 203-209.

28. VARGAS, K. F., BORGHETTI, R. L., MOURE, S. P., SALUM, F. G., et al. Use of polymethylmethacrylate as permanent filling agent in the jaw, mouth and face regions – implications for dental practice. *Gerodontology*, 2012, 29(2), s. e16-e22.
29. Intenzivní inkubátor Atom Incu-i model 101. Dartin spol. s r. o. [online]. [cit. 7. 9. 2013]. Dostupné na: WWW: <<http://www.dartin.cz/produkty/neonatalni-pece/intenzivni-inkubator-atom-incu-i-model-101.html>>.
30. Cizinci v Česku se nedoplatí za poporodní péči o děti. ZDN [online]. 2012, [cit. 7. 9. 2013]. Dostupné na: <<http://zdravi.e15.cz/denni-zpravy/z-domova/cizinci-v-cesku-se-nedoplati-za-poporodni-peci-o-deti-464655>>.
31. BERTHELOT, P., DIETEMANN, J., FASCIA, P., ROS, A., et al. Bacterial contamination of nonsterile disposable gloves before use. *American Journal of Infection Control*, 2006, 34(3), s. 128-130.
32. SAWYER, J. AND BENNETT, A. Comparing the Level of Dexterity offered by Latex and Nitrile SafeSkin Gloves. *Annals of Occupational Hygiene*, 2006, 50(3), s. 289-296.
33. REITZEL, R. A., DVORAK, T. L., HACHEM, R. Y., FANG, X., et al. Efficacy of novel antimicrobial gloves impregnated with antiseptic dyes in preventing the adherence of multidrug-resistant nosocomial pathogens. *American Journal of Infection Control*, 2009, 37(4), s. 294-300.
34. HUBNER, N. O., GOERDT, A. M., MANNEROW, A., POHRT, U., et al. The durability of examination gloves used on intensive care units. *Bmc Infectious Diseases*, 2013, 13.
35. MOORE, G., DUNNILL, C. W. AND WILSON, A. P. R. The effect of glove material upon the transfer of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to and from a gloved hand. *American Journal of Infection Control*, 2013, 41(1), s. 19-23.
36. CARMONA-RIBEIRO, A. M. AND CARRASCO, L. D. D. Cationic Antimicrobial Polymers and Their Assemblies. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(5), s. 9906-9946.
37. HASAN, J., CRAWFORD, R. J. AND LVANOVA, E. P. Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(5), s. 31-40.
38. MUNOZ-BONILLA, A. AND FERNANDEZ-GARCIA, M. Polymeric materials with antimicrobial activity. *Progress in Polymer Science*, 2012, 37(2), s. 281-339.
39. TIMOFEEVA, L. AND KLESHCHEVA, N. Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(3), s. 475-492.

40. QIAN, L. Y., GUAN, Y., HE, B. H. AND XIAO, H. N. Modified guanidine polymers: Synthesis and antimicrobial mechanism revealed by AFM. *Polymer*, 2008, 49(10), s. 2471-2475.
41. TALARO, K. P. AND CHESS, B. *Foundations in Microbiology*. McGraw-Hill Education, 2011. 834 s. ISBN 978-00-7337-529-8.
42. URBÁŠKOVÁ, P., HRABÁK, J. AND ŽEMLIČKOVÁ, H. Antibiotická rezistence bakterií – hrozba selhání léčby infekcí neustále sílí. 2012, 2. Dostupné na: <<http://www.tribune.cz/clanek/25673-antibioticka-rezistence-bakterii-hrozba-selhani-lecby-infekci-neustale-sili>>.
43. KLABAN, V. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Galén, 2005. 654 s. ISBN 978-80-7262-341-9.
44. SCHINDLER, J. *Ze života bakterií*. Praha: Academia, 2008. 143 s. ISBN 978-80-2001-666-9.
45. KOLÁŘ, M. Vývoj bakteriální rezistence a nová antimikrobní léčiva. *Interní Medicína*, 2007, (5), s. 213-216.
46. IGOR, S. Nozokomiální infekce a infekce multirezistentními organismy v podmínkách intenzivní péče. 2011, 9. Dostupné na: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/nozokomialni-infekce-a-infekce-multirezistentnimi-organismy-v-podminkach-intenzivni-pece-455567>>.
47. SREY, S., JAHID, I. K. AND HA, S.-D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 2013, 31(2), s. 572-585.
48. VOET, D. AND VOET, J. G. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, 2011. ISBN 978-04-7057-095-1.
49. ALBERTS, B. *Základy buněčné biologie*. Praha: Espero Publishing, 2005. 740 s. ISBN 80-902906-2-0.
50. VILLARREAL, M. R., Average prokaryote cell cs. 2008. Dostupné na: WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Average_prokaryote_cell_cs.svg#filehistory>.
51. CARR, J., MRSA SEM 7821 lores. Wikipedia [online]. 2013 [cit. 13. 8. 2013]. Dostupné na: WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:MRSA_SEM_7821_lores.jpg>.
52. MORAN, G., Pictures for Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*. Applied Informatics, Inc. [online]. 2011 [cit. 13. 8. 2013]. Dostupné na: WWW: <<http://trialx.com/curebyte/2012/05/13/pictures-for-methicillin-resistant-staphylococcus-aureus/>>.
53. DE LA MAZA, L. M. *Color Atlas of Medical Bacteriology*. Amer Society for Microbiology, 2004. 316 s. ISBN 978-15-5581-206-5.

54. PALLEN, M. J., NELSON, K. E. AND PRESTON, G. M. *Bacterial pathogenomics*. Washington D. C.: ASM Press, 2007. 453 s. ISBN 978-15-5581-451-9.
55. STEFANI, S., CHUNG, D. R., LINDSAY, J. A., FRIEDRICH, A. W., et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2012, 39(4), s. 273-282.
56. *Escherichia coli*. Wikimedia Commons [online]. 29. 2. 2012 [cit. 14. 8. 2013]. Dostupné na: WWW: <http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php?title=File:Escherichia_coli.jpg>.
57. CARR, J., Image of *Proteus mirabilis*. eol [online]. 25. 11. 2009 [cit. 2013 14. 8.]. Dostupné na: WWW: <http://eol.org/data_objects/3602637>.
58. *Proteus mirabilis*. BioMed Healthcare Technology Cooperative [online]. 4. 8. 2013. Dostupné na: WWW: <<http://www.biomedhtc.org.uk/ProteusMirabilis.htm>>.
59. CHEN, C. Y., CHEN, Y. H., LU, P. L., LIN, W. R., et al. *Proteus mirabilis* urinary tract infection and bacteremia: Risk factors, clinical presentation, and outcomes. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 2012, 45(3), s. 228-236.
60. COKER, C., POORE, C. A., LI, X. AND MOBLEY, H. L. T. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes and Infection*, 2000, 2(12), s. 1497-1505.
61. NELMAN-GONZALEZ, M., Spacebound Bacteria Inspire Earthbound Remedies. NASA Official [online]. 8. 4. 2011. Dostupné na: WWW: <http://www.nasa.gov/topics/shuttle_station/features/pseudomonas.html>.
62. Epidermolysis bullosa and pseudomonas infection. Dermaamin [online]. 1. 3. 2011 [cit. 20. 1. 2014]. Dostupné na: WWW: <http://www.dermaamin.com/site/index.php?option=com_content&view=article&id=433:epidermolysis-bullosa-and-pseudomonas-infection-----&catid=5:e&Itemid=3>.
63. CARR, J., *Acinetobacter baumannii*. Wikimedia Commons [online]. 30. 6. 2010 [cit. 14. 8. 2013]. Dostupné na: WWW: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Acinetobacter_baumannii.JPG>.
64. SEBENY, P. J., RIDDLE, M. S. AND PETERSEN, K. *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. *Clinical Infectious Diseases*, 2008, 47(4), s. 444-449.
65. JORGENSEN, J. H. AND PFALLER, M. A. *A clinician's dictionary of pathogenic microorganisms*. Washington D. C.: ASM Press, 2004. 273 s. ISBN 978-15-5581-280-5.

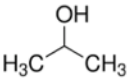
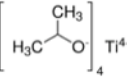
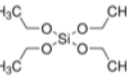
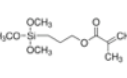
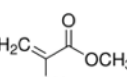
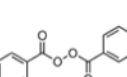
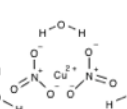
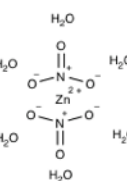
66. Badania, *Candida albicans* - yeast cells - scanning microscopy photo. Uniwersytet Wrocławski - Zakład Biotransformacji [online]. 2009 [cit. 14. 8. 2013]. Dostępne na: WWW: <<http://www.biotrans.uni.wroc.pl/en/galeria,4,badania.html>>.
67. Oral thrush Aphthae *Candida albicans*. PHIL 1217 lores. Wikimedia Commons [online]. 29. 7. 2013 [cit. 14. 8. 2013]. Dostępne na: WWW: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Oral_thrush_Aphthae_Candida_albicans._PHIL_1217_lores.jpg>.
68. BRINKER, C. J. AND SCHERER, G. W. *Sol-gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-gel Processing*. Academic Press, 1990. 928 s. ISBN 978-0-12-134970-7.
69. SCHMIDT, H. *Inorganic-Organic Composites by Sol-Gel Techniques*. Polymer Based Molecular Composites, 1990, 171, s. 3-13.
70. OGOSHI, T. AND CHUJO, Y. Organic-inorganic polymer hybrids prepared by the sol-gel method. *Composite Interfaces*, 2005, 11(8-9), s. 539-566.
71. AEGERTER, A. *Sol-Gel Technologies for Glass Producers and Users*. Springer, 2004. 493 s. ISBN 978-14-0207-938-2.
72. HAAS, K. H., AMBERG-SCHWAB, S., ROSE, K. AND SCHOTTNER, G. Functionalized coatings based on inorganic-organic polymers (ORMOCER (R) s) and their combination with vapor deposited inorganic thin films. *Surface & Coatings Technology*, 1999, 111(1), s. 72-79.
73. KICKELBICK, G. *Hybrid Materials: Synthesis, Characterization, and Applications*. Wiley, 2007. 516 s. ISBN 978-35-2761-048-8.
74. HAAS, K. H. AND WOLTER, H. Synthesis, properties and applications of inorganic-organic copolymers (ORMOCERs (R)). *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 1999, 4(6), s. 571-580.
75. HAAS, K. H., AMBERG-SCHWAB, S. AND ROSE, K. Functionalized coating materials based on inorganic-organic polymers. *Thin Solid Films*, 1999, 351(1), s. 198-203.
76. RATNER, B. D., HOFFMAN, A. S., SCHOEN, F. J. AND LEMONS, J. E. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Elsevier Science, 2004. ISBN 978-00-8047-036-8.
77. KIM, W. AND CHAIKOF, E. L. Recombinant elastin-mimetic biomaterials: Emerging applications in medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010, 62(15), s. 1468-1478.

78. SLAMBOROVA, I., ZAJICOVA, V., KARPISKOVA, J., EXNAR, P., et al. New type of protective hybrid and nanocomposite hybrid coatings containing silver and copper with an excellent antibacterial effect especially against MRSA. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2013, 33(1), s. 265-273.
79. TOKER, R. D., KAYAMAN-APOHAN, N. AND KAHRAMAN, M. V. UV-curable nano-silver containing polyurethane based organic-inorganic hybrid coatings. *Progress in Organic Coatings*, 2013, 76(9), s. 1243-1250.
80. JAISWAL, S., MCHALE, P. AND DUFFY, B. Preparation and rapid analysis of antibacterial silver, copper and zinc doped sot-gel surfaces. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2012, 94, s. 170-176.
81. CHALOUPKA, K., MALAM, Y. AND SEIFALIAN, A. M. Nanosilver as a new generation of nanoprodukt in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28(11), s. 580-588.
82. KVÍTEK, L. AND PANÁČEK, A. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2007. 52 s. ISBN 80-2441-669-7.
83. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody: učebnice základů instrumentálních analytických metod*. Pavel Klouda, 1996. 203 s. ISBN 978-80-9021-550-4.
84. MICHALČÁKOVÁ, I. *Spektroskopické metody charakterizace materiálů (UV/VIS, FTIR)*. Bakalářská práce: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 2008.
85. KUBÍNEK, R., ŠAFÁŘOVÁ, K. AND VŮJTEK, M. *Elektronová mikroskopie – skriptum*. Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. 50 s. ISBN 978-80-244-2739-3.
86. DOLNÍČEK, Z. *Laboratorní metody výzkumu, Skriptum*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2005. 62 s.
87. CAZES, J. *Analytical Instrumentation Handbook*. Taylor & Francis, 2004. 1064 s. ISBN 978-08-4939-039-5.
88. MIHALJEVIČ, M., STRNAD, L. AND ŠEBEK, O. Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii. *Chemické listy*, 2004, 98, s. 123-130.

8. Přílohy

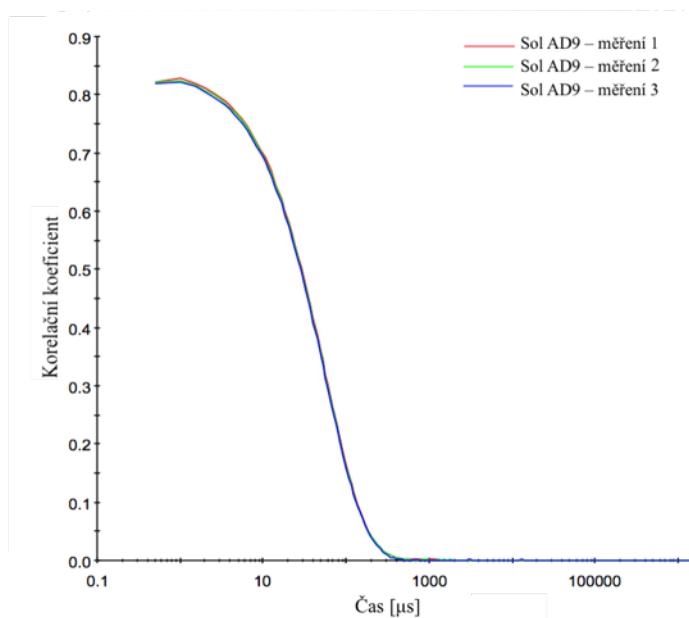
Příloha 8.1.: Použité chemikálie

Tabulka 8.1.1.: Specifikace použitých chemikálií

Zkratka	Systematický název	Výrobce	Struktura	Molární hmotnost [g/mol]	Teplota tání/varu [°C]	Hustota [g/cm ³]
IPA	propan-2-ol (isopropyl alkohol 99,8%)	Penta		60,1	-89,5/82	0,785
IPTI	isopropoxid titanu (titanium(IV) isopropoxide 97%)	Aldrich		284,22	14-17/ 232	0,96
TEOS	tetraethylorthosilikát (tetraethylorthosilicate for synthesis 99%)	Aldrich		208,33	-/ 163-167	0,933
TMSPM	3-(trimethoxysilyl) propyl methakrylát (3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate) 98%)	Aldrich		248,35	-20/190	1,045
MMA	methyl methakrylát (methyl methacrylate 99%)	Aldrich		100,12	-48/100	0,936
BPO	dibenzoyl peroxid (Luperox® A75, 75% remainder water)	Aldrich		242,23	105/-	1,334
Cu(NO ₃) ₂ 3H ₂ O	dusičnan měďnatý trihydrát (copper(II) nitrate trihydrate p.a. ≥ 99-104%)	Sigma- Aldrich		241,6	114/170	2,31
Zn(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	dusičnan zinečnatý hexahydrát (zinc nitrate hexahydrate p.a. ≥ 99,0%)	Sigma- Aldrich		297,49	36/-	2,065

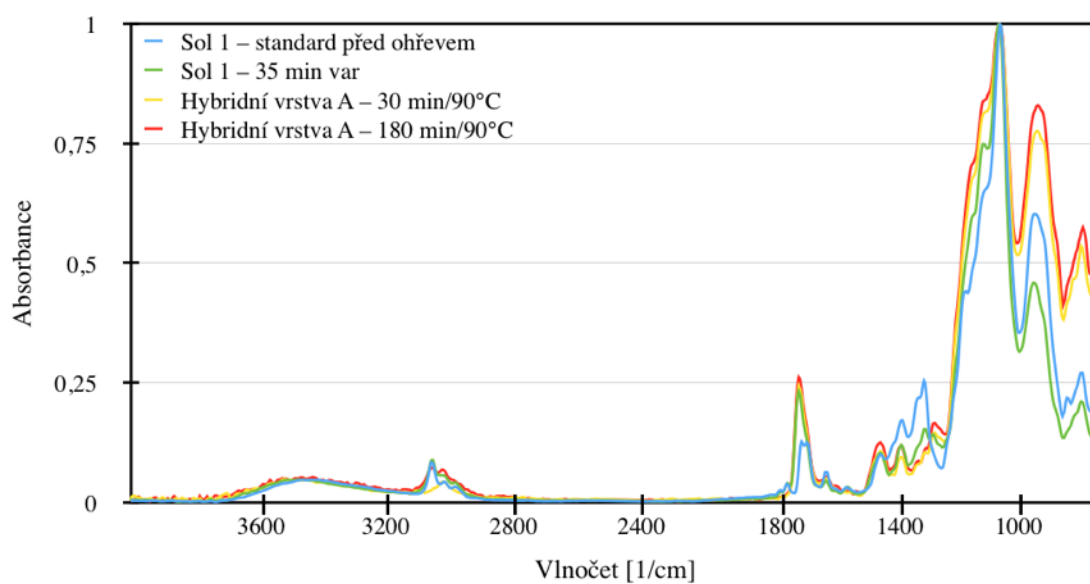
Zkratka	Systematický název	Výrobce	Struktura	Molární hmotnost [g/mol]	Teplota tání/varu [°C]	Hustota [g/cm ³]
AgNO ₃	dusičnan stříbrný p.a. 99,8%	Lach:ner	$\text{Ag}^+ \left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \vdots \\ \text{O}=\text{N}-\text{O} \\ \vdots \\ \text{O} \end{array} \right]^-$	169,83	212/440	4,35
Teploty varu, tání a hustota jsou uvedeny za atmosférického tlaku a při teplotě 25 °C.						

Příloha 8.2.: Korelační data pro sol AD9

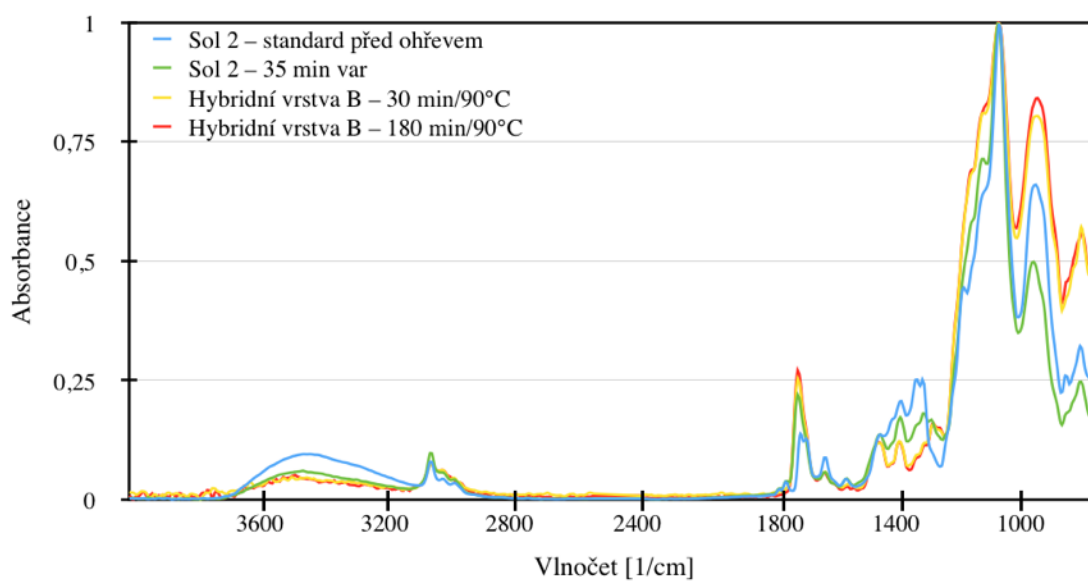


Závislost korelačního koeficientu na čase

Příloha 8.3.: FT-IR spektra: sol 1, hybridní vrstva A; sol 2, hybridní vrstva B

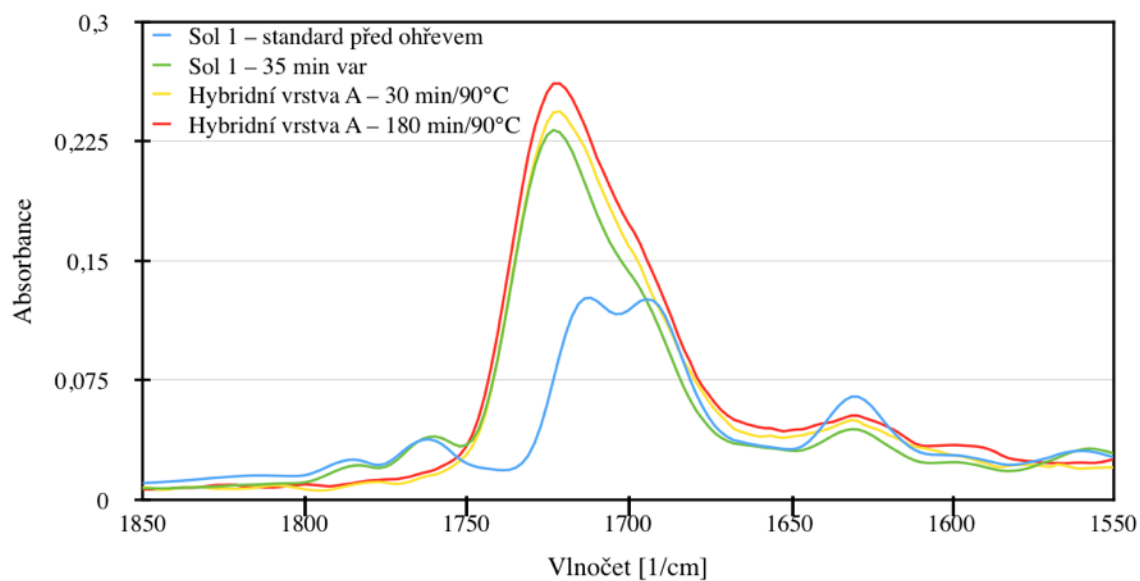


FT-IR spektrum solu 1 a hybridní vrstvy A v závislosti na délce tepelného zpracování

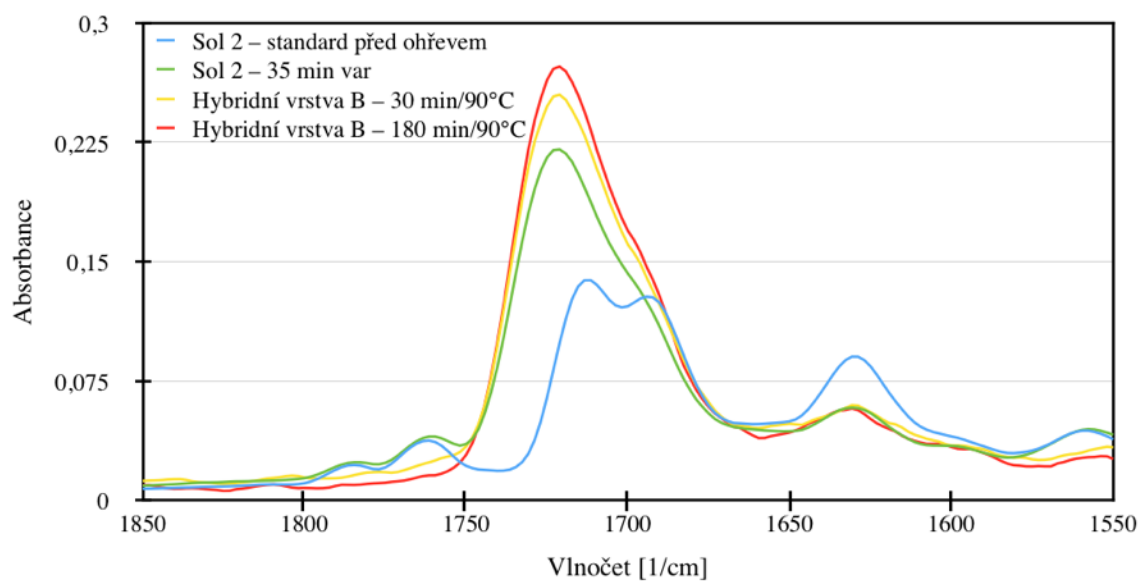


FT-IR spektrum solu 2 a hybridní vrstvy B v závislosti na délce tepelného zpracování

Příloha 8.3.1.: FT-IR spektra – pásy C=O; C=C: sol 1, hybridní vrstva A; sol 2, hybridní vrstva B

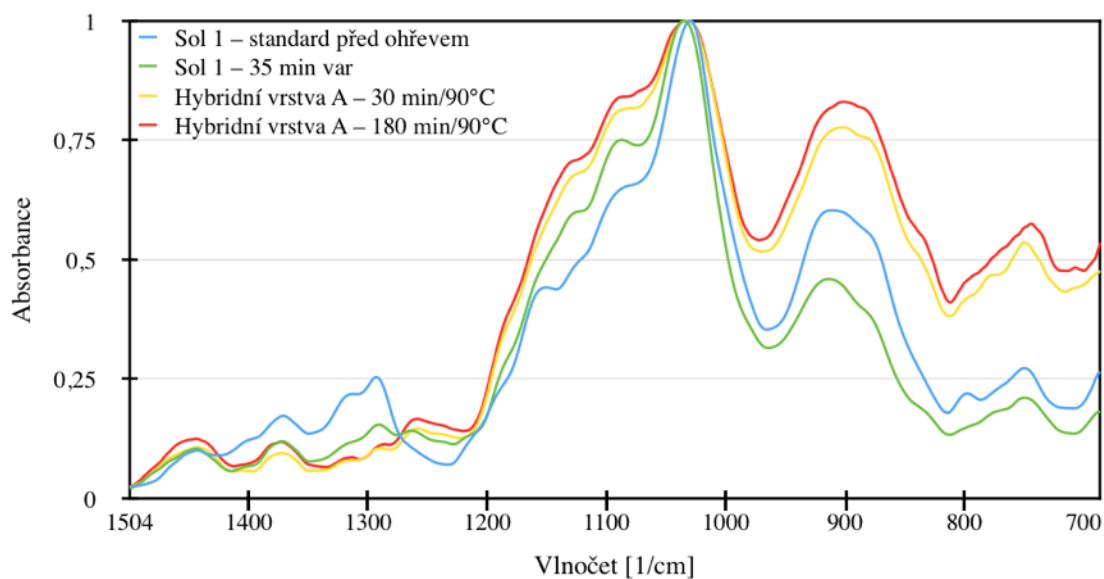


Detail FT-IR spektra solu 1 a hybridní vrstvy A v závislosti na délce tepelného zpracování – pásy C=O; C=C

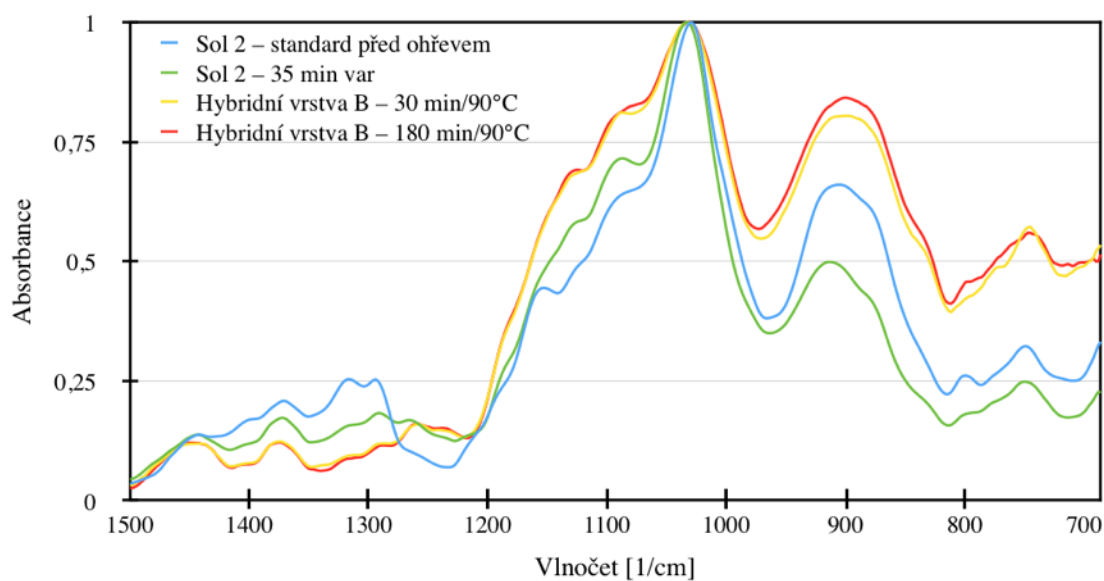


Detail FT-IR spektra solu 2 a hybridní vrstvy B v závislosti na délce tepelného zpracování – pásy C=O; C=C

Příloha 8.3.2.: FT-IR spektra – skeletální pásy; pásy Si–O–Si: sol 1, hybridní vrstva A; sol 2, hybridní vrstva B

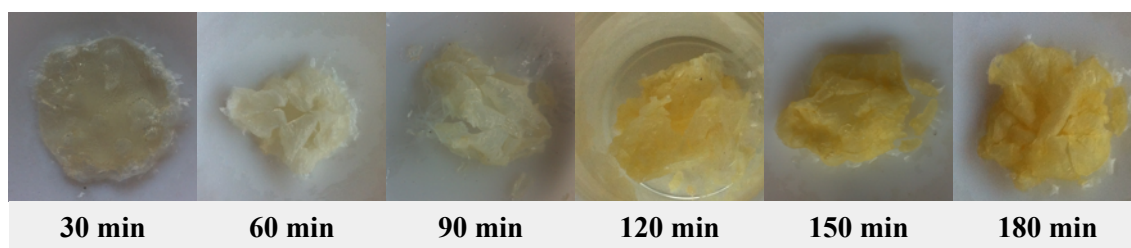


Detail FT-IR spektra solu 1 a hybridní vrstvy A v závislosti na délce tepelného zpracování – skeletální pásy; pásy Si–O–Si

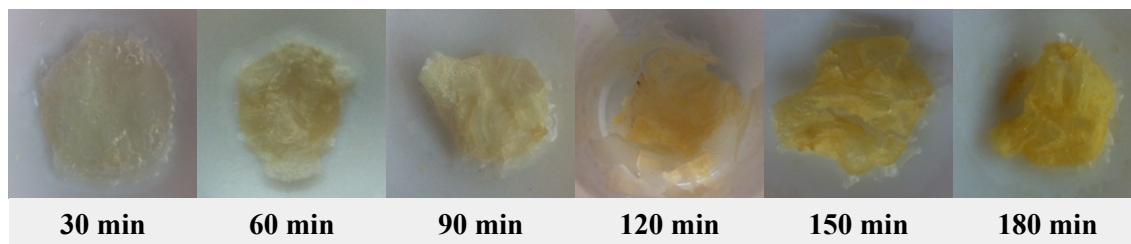


Detail FT-IR spektra solu 2 a hybridní vrstvy B v závislosti na délce tepelného zpracování – skeletální pásy; pásy Si–O–Si

Příloha 8.4.: Barevné změny probíhající při tepelné polymeraci



Změny solu 1 během tepelné polymerace při 90 °C

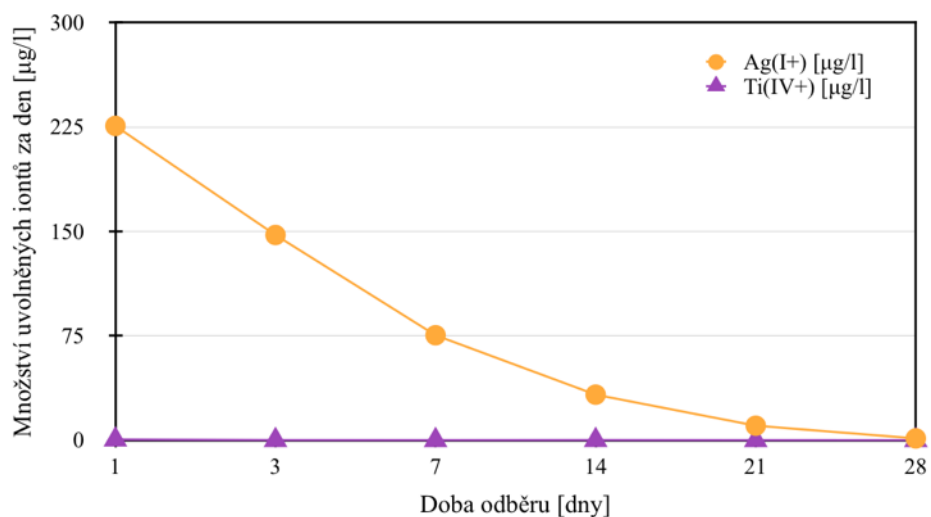


Změny solu 2 během tepelné polymerace při 90 °C

Příloha 8.5.: Uvolňování iontů z povrchu

Tabulka 8.5.1.: Množství uvolněných iontů z hybridní vrstvy A nanesené na vz. 1

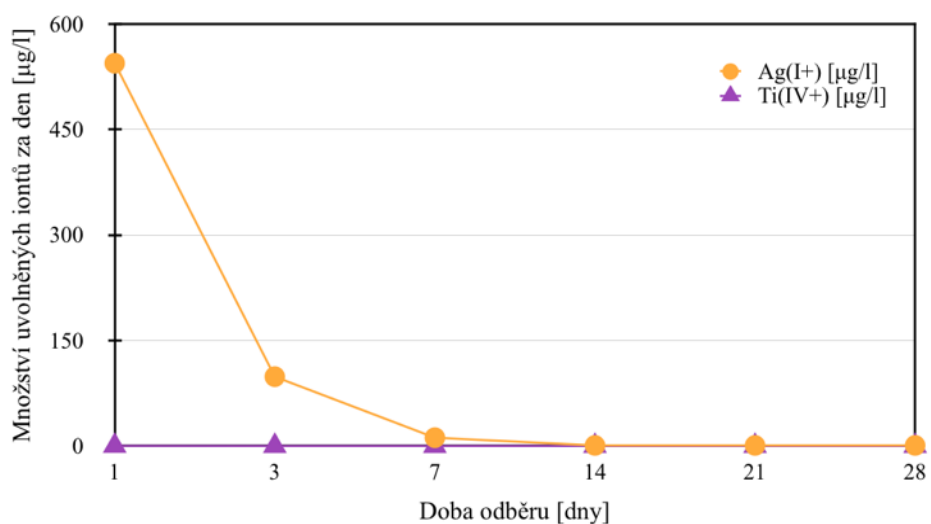
Odběr [den]	Ag ^(I+) [μg/l]	Ti ^(IV+) [μg/l]
1	226	0,51
3	295	0,18
7	302	0,20
14	229	0,85
21	73	0,33
28	9	0,23



Množství uvolněných iontů z hybridní vrstvy A nanesené na vz. 1

Tabulka 8.5.2.: Množství uvolněných iontů z hybridní vrstvy A nanesené na vz. 2

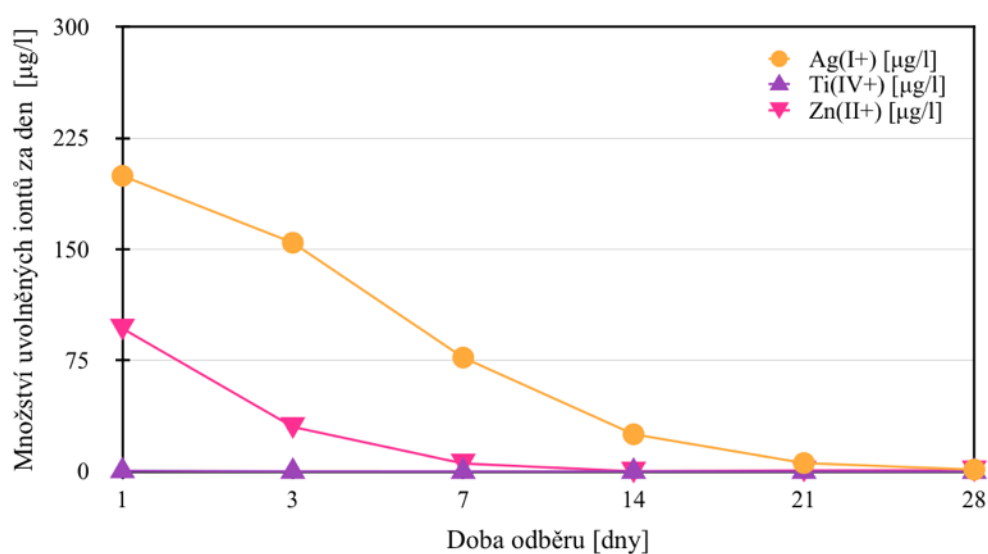
Odběr [den]	Ag(I ⁺) [µg/l]	Ti(IV ⁺) [µg/l]
1	544	0,26
3	197	0,12
7	47,0	0,23
14	5	0,56
21	5	0,30
28	5	0,27



Množství uvolněných iontů z hybridní vrstvy A nanesené na vz. 2

Tabulka 8.5.3.: Množství uvolněných iontů z hybridní vrstvy B nanesené na vz. 1

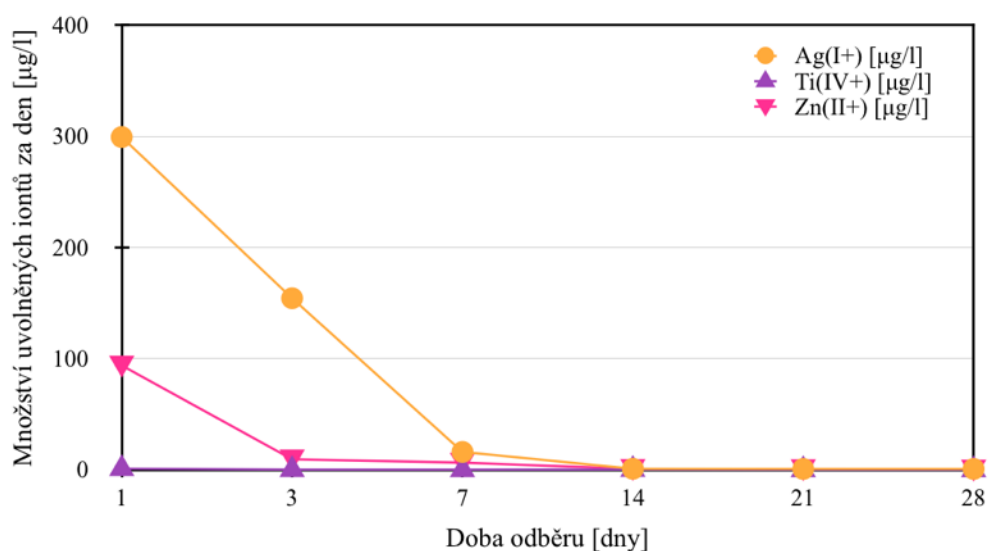
Odběr [den]	Ag ^(I+) [μg/l]	Ti ^(IV+) [μg/l]	Zn ^(II+) [μg/l]
1	199	0,48	96,50
3	309	0,14	60,20
7	307	0,17	21,70
14	176	0,46	0,87
21	40	0,33	5,28
28	9	0,26	6,10



Množství uvolněných iontů z hybridní vrstvy B nanesené na vz. 1

Tabulka 8.5.4.: Množství uvolněných iontů z hybridní vrstvy B nanesené na vz. 2

Odběr [den]	Ag ^(I+) [μg/l]	Ti ^(IV+) [μg/l]	Zn ^(II+) [μg/l]
1	299	1,08	93,80
3	309	0,35	18,80
7	64,1	0,42	25,60
14	6	2,10	5,73
21	<5	0,35	4,39
28	<5	0,21	1,75



Množství uvolněných iontů z hybridní vrstvy B nanesené na vz. 2

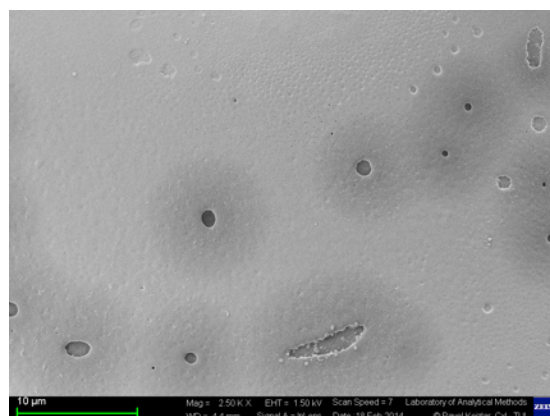
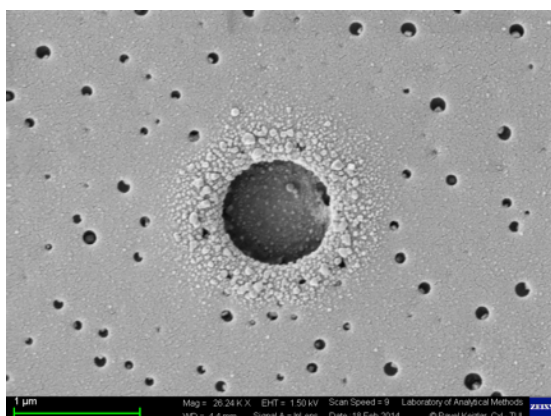
Tabulka 8.5.5.: Množství uvolněných iontů z hybridní vrstvy C nanesené na vz. 1

Odběr [den]	Ag ^(I+) [µg/l]	Ti ^(IV+) [µg/l]	Zn ^(II+) [µg/l]	Cu ^(II+) [µg/l]
1	184	1,87	69,40	35,70
3	273	0,53	14,50	7,78
7	290	0,52	19,30	7,93
14	220	0,95	19,70	12,40
21	114	0,95	10,30	6,56
28	19	0,59	7,91	6,19

Tabulka 8.5.6.: Množství uvolněných iontů z hybridní vrstvy C nanesené na vz. 2

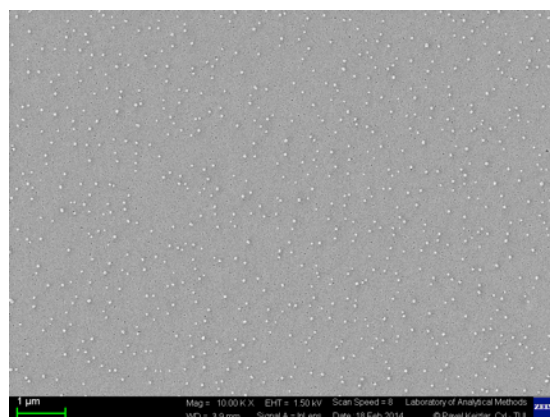
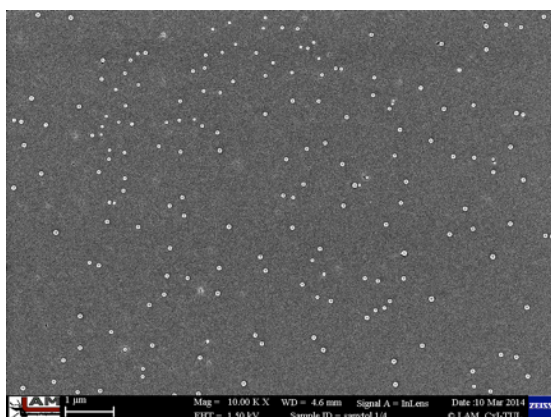
Odběr [den]	Ag ^(I+) [µg/l]	Ti ^(IV+) [µg/l]	Zn ^(II+) [µg/l]	Cu ^(II+) [µg/l]
1	240	0,75	30,50	11,10
3	121	0,22	21,20	9,81
7	41,1	0,23	16,50	12,80
14	<5	0,55	8,34	8,51
21	<5	0,47	5,66	3,34
28	<5	0,34	0,00	3,74

Příloha 8.6.: Chemická odolnost vrstvy



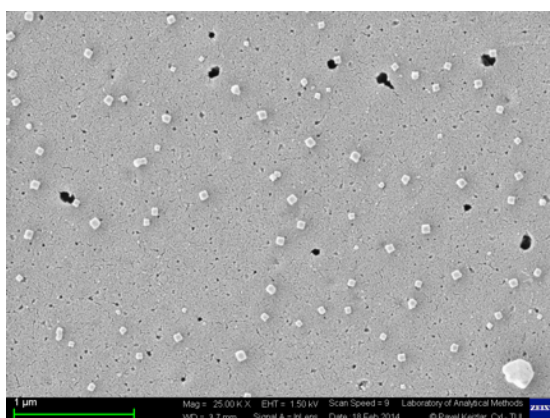
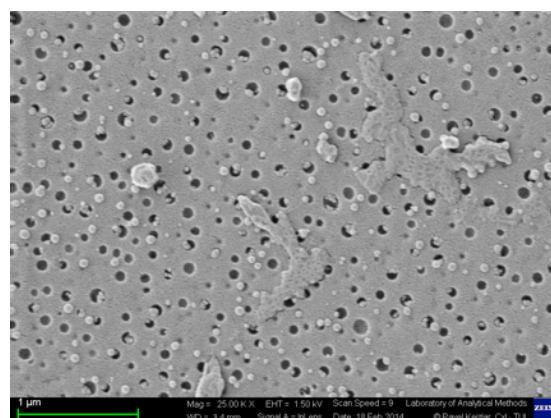
Hybridní vrstva C na textilním vzorku (vz. 2)

*vlevo po působení Softasepu (ředěného 1:4) s viditelnými shluky usazenin v okolí póru;
vpravo působením Promanum (ředěného 1:4) s viditelným zúžením vrstvy v okolí pórů*



Hybridní vrstva C na PMMA (vz. 4)

*vlevo po působení Sanytolu (ředěného 1:4);
vpravo po působení Sanytolu (ředěného 1:9) viditelný růst množství usazenin*

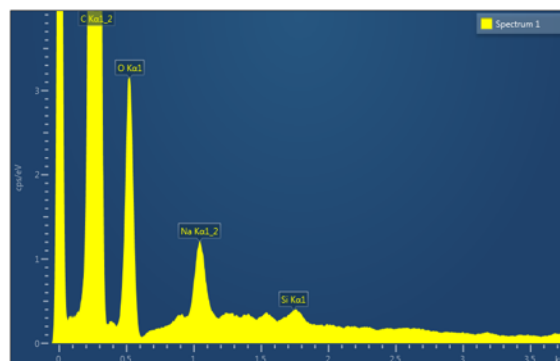


Hybridní vrstva C na PMMA (vz. 4)

vlevo po působení Sava (ředěného 1:4); vpravo po působení Sava (ředěného 1:9)

Příloha 8.6.1.: EDA spektrum usazenin

Prvek	Typ linie	Wt%	Atom %
C	K serie	86.07	89.52
O	K serie	12.35	9.64
Na	K serie	1.36	0.74
Si	K serie	0.22	0.10
Celkem:		100	100



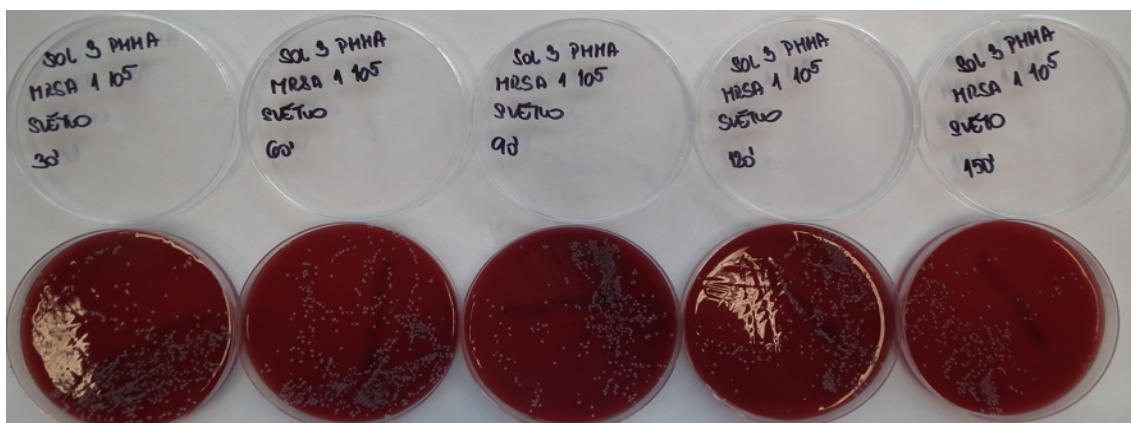
EDA spektrum usazenin na hybridní vrstvě C po působení konc. Sava

(Wt% – hmotnostní zastoupení prvků, Atom % – procentuální zastoupení atomů)

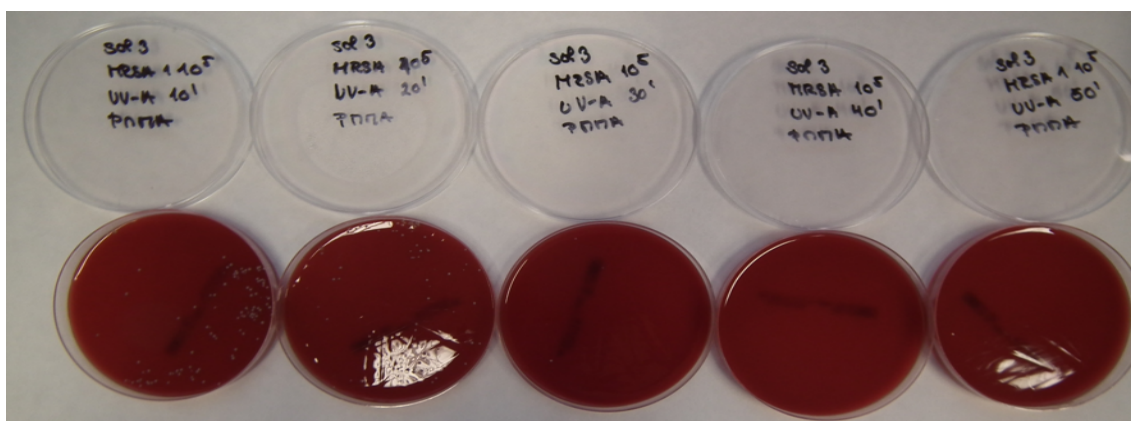
Příloha 8.7.: Inhibice bakteriálního kmene MRSA

Tabulka 8.7.1.: Výsledky inhibice MRSA – kvalitativní metody

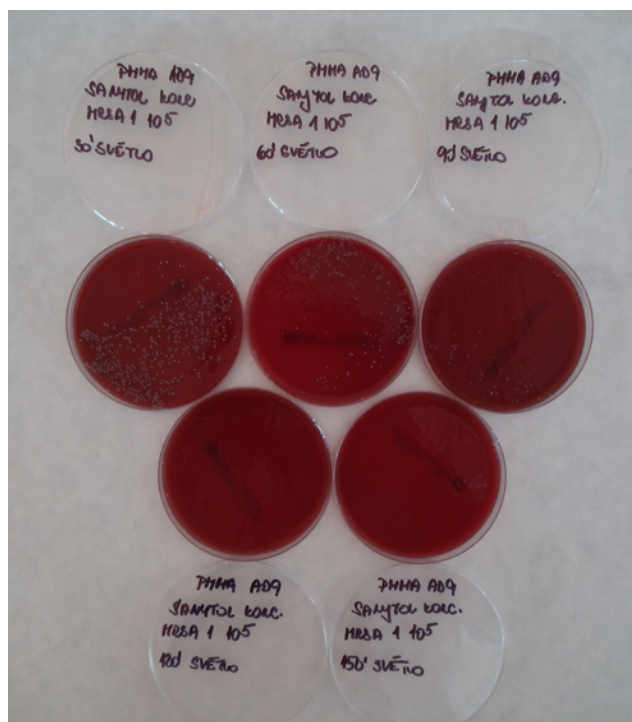
vzorek	hybridní vrstva	Standard	Sol 1	Sol 2	Sol AD9
1	v kontaktu	bez efektu	bez efektu	bez efektu	bez efektu
	halo zóna [mm]	–	–	inhibice – 1	náznak – 1
2	v kontaktu	bez efektu	bez efektu	bez efektu	bez efektu
	halo zóna [mm]	–	ve jedné části – 1	ve dvou částech – 2	ve dvou částech – 3
3	v kontaktu	bez efektu	bez efektu	bez efektu	bez efektu
	halo zóna [mm]	–	–	–	čistá – 1
4	v kontaktu	bez efektu	bez efektu	bez efektu	bez efektu
	halo zóna [mm]	v okolí koncentrace bakterií	v okolí koncentrace bakterií	v okolí koncentrace bakterií	v okolí koncentrace bakterií
5	v kontaktu	bez efektu	bez efektu	bez efektu	bez efektu
	halo zóna [mm]	–	–	–	–
6	v kontaktu	bez efektu	bez efektu	bez efektu	bez efektu
	halo zóna [mm]	náznak inhibice	počátek inhibice, obsahuje kolonie – 4	počátek inhibice, obsahuje kolonie – 2	počátek inhibice, obsahuje kolonie – 5



Inhibice MRSA na světle na hybridní vrstvě C



Inhibice MRSA pod UV-A zářením na hybridní vrstvě C

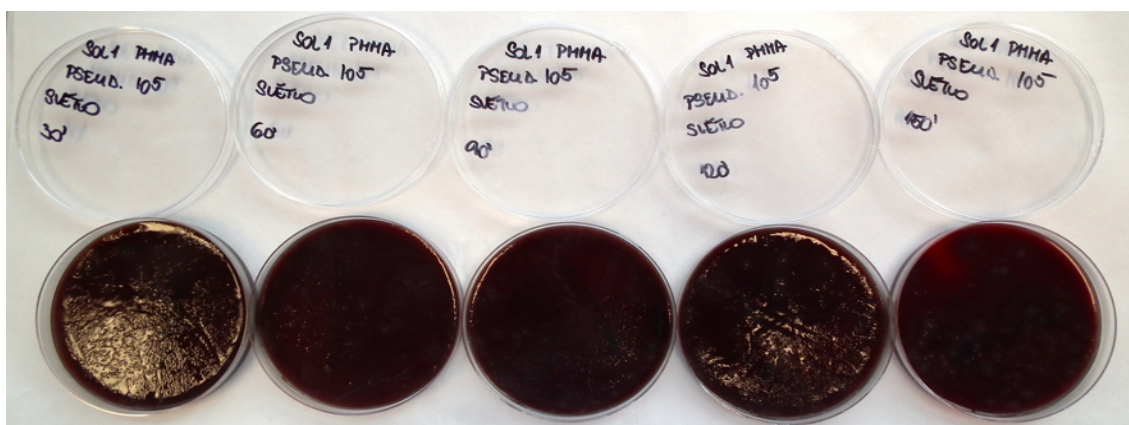


Inhibice MRSA na světle na hybridní vrstvě C ošetřené Sanytolem

Příloha 8.8.: Inhibice bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa*

Tabulka 8.8.1.: Výsledky inhibice *P. aeruginosa* – kvalitativní metody

vzorek	hybridní vrstva	Standard	Sol 1	Sol 2	Sol AD9
1	v kontaktu	bez efektu	bez efektu	bez efektu	bez efektu
	halozona [mm]	–	–	–	náznak hemolýzy kolem celého vzorku
2	v kontaktu	bez efektu	bez efektu	náznak inhibice v jedné části vzorku	bez efektu
	halozona [mm]	–	náznak v jedné části vzorku	náznak v jedné části vzorku	náznak v jedné části vzorku – 2
3	v kontaktu	bez efektu	bez efektu	bez efektu	bez efektu
	halozona [mm]	–	–	–	–
4	v kontaktu	bez efektu	v kontaktu hemolýza	v kontaktu hemolýza	v kontaktu hemolýza
	halozona [mm]	–	–	–	v okolí koncentrace bakterií
5	v kontaktu	bez efektu	bez efektu	částeční inhibice	bez efektu
	halozona [mm]	–	–	–	–
6	v kontaktu	bez efektu	v kontaktu hemolýza	v kontaktu hemolýza	v kontaktu hemolýza
	halozona [mm]	–	–	–	–

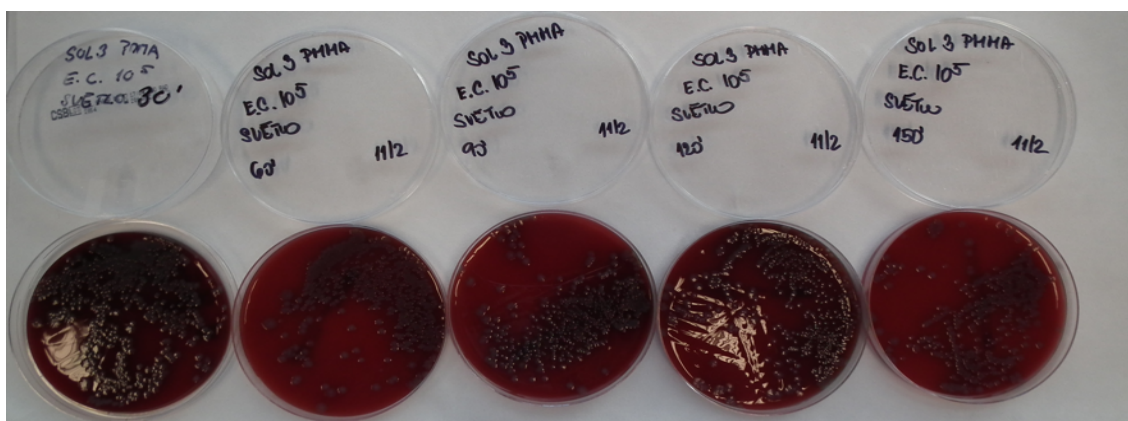


Inhibice *P. aeruginosa* na světle na hybridní vrstvě A ve 150 min dochází ke znatelnému úbytku bakteriálních kmenů

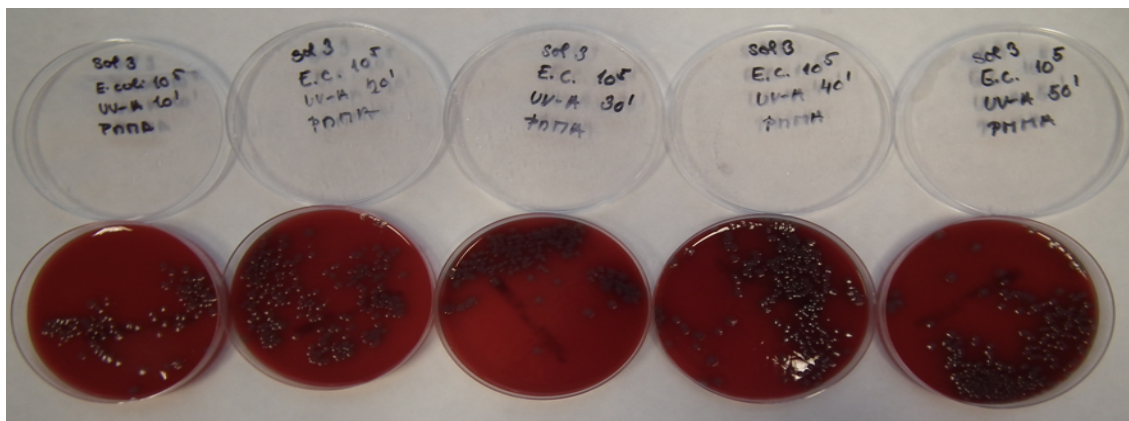
Příloha 8.9.: Inhibice bakteriálního kmene *Escherichia coli*

Tabulka 8.9.1: Výsledky inhibice *E. coli* – kvalitativní metody

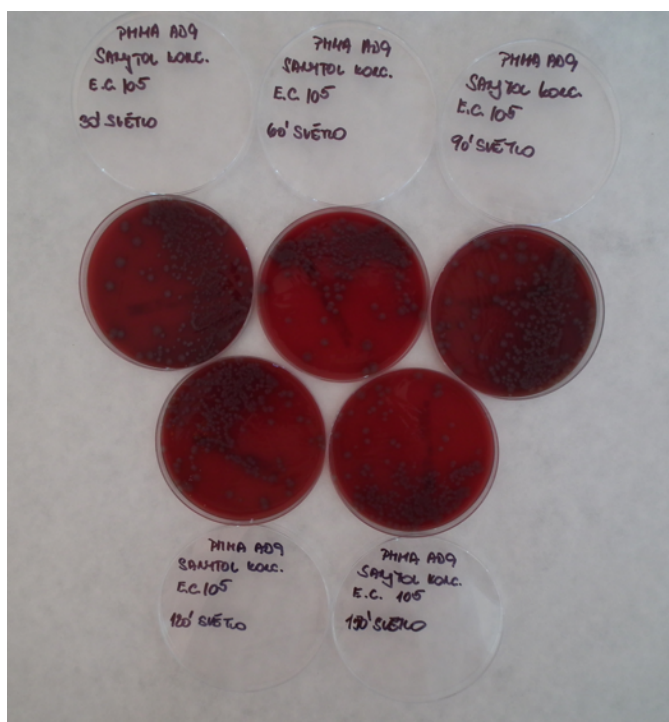
vzorek	hybridní vrstva	Standard	Sol 1	Sol 2	Sol AD9
1	v kontaktu	bez efektu	bez efektu	bez efektu	bez efektu
	halozona [mm]	–	–	–	čistá ve dvou částech vzorku – 1
2	v kontaktu	bez efektu	bez efektu	bez efektu	bez efektu
	halozona [mm]	–	náznak – 5	v jedné části vzorku, obsahuje kolonie – 1	v jedné části vzorku, čistá – 3
3	v kontaktu	bez efektu	bez efektu	bez efektu	bez efektu
	halozona [mm]	–	–	–	–
4	v kontaktu	bez efektu	inhibice v jedné části vzorku	bez efektu	bez efektu
	halozona [mm]	v okolí koncentrace bakterií	v jedné části vzorku	v okolí koncentrace bakterií	náznak v jedné části, obsahuje kolonie – 1
5	v kontaktu	bez efektu	bez efektu	částeční inhibice	bez efektu
	halozona [mm]	–	–	–	–
6	v kontaktu	bez efektu	bez efektu	bez efektu	bez efektu
	halozona [mm]	–	–	–	čistá – 5



Inhibice E. coli na světle na hybridní vrstvě C



Inhibice E. coli pod UV-A zářením na hybridní vrstvě C



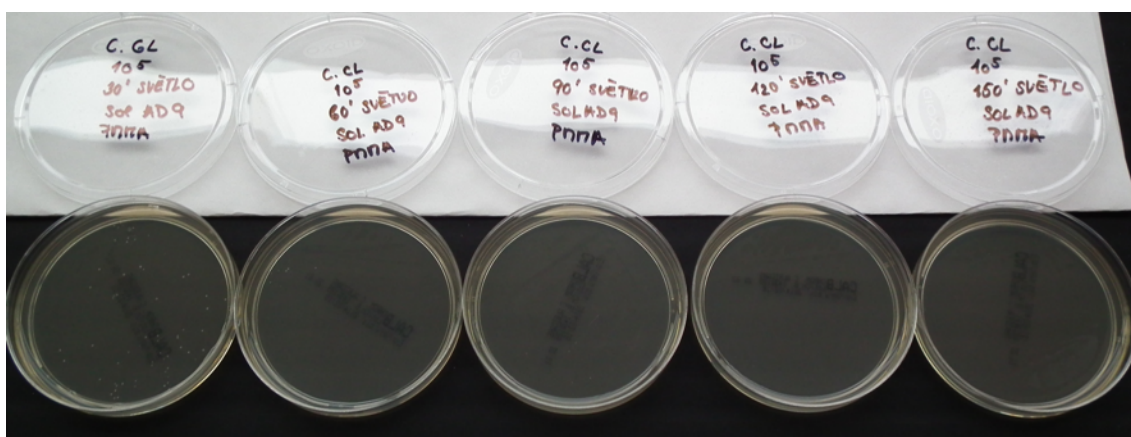
Inhibice E. coli na světle na hybridní vrstvě C ošetřené Sanytolem

Příloha 8.10.: Inhibice mykotického kmene *Candida glabrata*

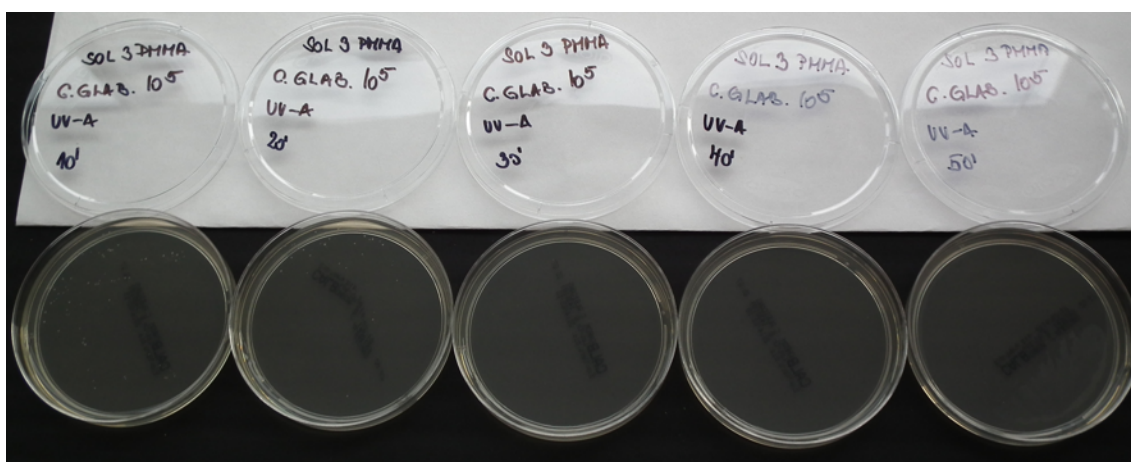
Tabulka 8.10.1: Výsledky inhibice *C. glabrata* – kvalitativní metody

vzorek	hybridní vrstva	Standard	Sol 1	Sol 2	Sol AD9
1	v kontaktu	bez efektu	100% inhibice	100% inhibice	100% inhibice
	halozona [mm]	—	čistá – 2,5	čistá – 3,25	čistá – 2,5
2	v kontaktu	bez efektu	100% inhibice	100% inhibice	100% inhibice
	halozona [mm]	—	čistá – 3	čistá – 3,25	čistá – 2,75

vzorek	hybridní vrstva	Standard	Sol 1	Sol 2	Sol AD9
3	v kontaktu	bez efektu	100% inhibice	100% inhibice	100% inhibice
	halozona [mm]	—	—	čistá – 2	čistá – 3
4	v kontaktu	bez efektu	100% inhibice	100% inhibice	100% inhibice
	halozona [mm]	—	nerovnoměrná – 3 směry čistá – 1,67	čistá – 1,75	čistá – 2,5
5	v kontaktu	bez efektu	90% inhibice	80% inhibice	100% inhibice
	halozona [mm]	—	čistá – 2	nerovnoměrná 1 směry obsahuje mykotické kolonie – 1	nerovnoměrná 3 směry obsahuje mykotické kolonie – 1,5
6	v kontaktu	bez efektu	100% inhibice	100% inhibice	100% inhibice
	halozona [mm]	—	—	—	—



Inhibice C. glabrata na světle na hybridní vrstvě C



Inhibice C. glabrata pod UV-A zářením na hybridní vrstvě C