

PŘÍPRAVA, TEPELNÁ STABILIZACE A BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ PVA NANOVLÁKEN FUNKCIONALIZOVANÝCH POMOCÍ ANTISEPTICKÝCH LÁTEK

Matěj Holeček

Sekce – PŘÍRODNÍ, HUMANITNÍ A SPOLEČENSKÉ VĚDY

Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií, 2. ročník

Navazující magisterský studijní program – NANOTECHNOLOGIE

Abstrakt: Chronické rány představují značný problém pro současnou medicínu. Často podléhají infekcím, které mohou být pro pacienty i fatální. Velká pozornost je proto věnována vývoji nových typů krytů ran. V tomto ohledu jsou intenzivně studovány polymerní nanovláknenné materiály. Z toho důvodu byla provedena série experimentů zabývajících se přípravou nanovláken z polyvinylalkoholu (PVA) s obsahem antiseptických látek a jejich následnou tepelnou stabilizací (HT). Na základě testů jejich cytotoxicity byly zvoleny obsahy aktivních látek 0,05 hm.%, 0,1 hm.% a 1 hm.%. Materiály připravené pomocí stejnosměrného elektrického zvlákňování byly stabilizovány při zvolených teplotách v intervalu 120–150 °C po dobu 1 h. Materiály s obsahem chlorhexidinu vykazaly antimikrobiální účinky vůči *S. aureus* a *E. coli*, materiály s oktenidinem dále působily také na *P. aeruginosa* a *C. albicans*. Představují tak značný potenciál při vývoji nových funkčních krytů ran s antimikrobiálními vlastnostmi.

Klíčová slova: kryty ran, nanovláknena, polyvinylalkohol, tepelná stabilizace, chlorhexidin, oktenidin

1 Úvod

Kůže plní mnoho životně důležitých funkcí, proto dlouhodobé kožní defekty nejen omezují kvalitu života pacientů, ale mohou vést i k život ohrožujícím stavům. Představují také velmi závažný ekonomický a personální problém pro systémy zdravotní péče. S ohledem na demografické trendy, jako je celkové stárnutí populace a rostoucí výskyt metabolických onemocnění s negativním dopadem na regenerační schopnosti organismu, se očekává nárůst výskytu tohoto typu ran [1]. Chronické rány jsou navíc mnohdy spojené s infekcemi, které jsou častou příčinou úmrtí postižených pacientů, a jejichž léčbu výrazně ztěžuje neustále se zvyšující rezistence mikroorganismů vůči běžně dostupným antibiotikům [2]. Panuje tedy velká snaha zefektivnit způsoby léčby kožních poranění.

Určitou cestu představuje příprava funkčních krytů ran (WD) umožňujících rychlé a účinné zahojení poranění. WD usnadňují proces hojení tím, že udržují optimální prostředí v ráně, chrání ránu před nečistotami a brání vniku patogenů a tím i rozvoji infekce. V tomto ohledu je velká pozornost věnována polymerním nanovláknům, která díky své vláknenné struktuře a vysoké porozitě vykazují výborné vlastnosti pro aplikace v hojení kožních ran [3]. Nanovláknenné materiály mohou být poměrně snadno funkcionalizovány – do jejich struktury mohou být inkorporovány aktivní látky, které jim propůjčí nové vlastnosti a zvýší jejich účinnost v procesu hojení. Příkladem mohou být nanovláknena obohacená o antimikrobiální látky. Ta mohou následně sloužit k prevenci vzniku infekce v ráně, či k léčbě již vzniklých infekcí. Častým úskalím spojeným s aplikací funkcionalizovaných nanovláken, především pokud jsou založeny na po-

lymerech rozpustných ve vodě, je rychlé počáteční uvolňování (označované jako „burst release“). Burst release snižuje dlouhodobou účinnost materiálu a může představovat i zdravotní riziko [4]. Nanovlákná z vodorozpustného polymeru po vložení do vlhkého prostředí rány navíc rychle ztrácejí svou integritu a vlastnosti. Proto bývají takové nanovláknenné materiály před jejich aplikací podrobeny stabilizaci. Principem stabilizace je ve většině případů síťování vedoucí k vytvoření nevazebných interakcí nebo kovalentních vazeb mezi řetězci, které zvyšují jejich soudržnost a brání vstupu rozpouštědla do materiálu [5]. Existuje řada metod využívaných ke stabilizaci nanovláknenných materiálů. Jednou z nich je tepelná stabilizace působením vysokých teplot (HT). Jedná se o relativně jednoduchou fyzikální metodu, která nevyžaduje používání potenciálně toxických síťovacích činidel a nepředstavuje proto riziko při konečné aplikaci materiálu.

Proto byl proveden výzkum zaměřený na přípravu, tepelnou stabilizaci a následné biologické testování nanovláknenných materiálů z polyvinylalkoholu (PVA) s inkorporovanými antiseptickými látkami. Cílem bylo navrhnout vhodné obsahy antiseptických látek v nanovlákněch z PVA a vyzkoušet jejich účinnost vůči vybraným mikroorganismům. Výsledky by mohly rozšířit výběr antimikrobiálních látek použitelných k funkcionalizaci tepelně stabilizovaných materiálů o nové možnosti a posloužit dále při vývoji funkčních krytů ran. Pro přípravu nanovláken byl zvolen PVA s vysokým stupněm konverze (98–98,8 %), který obsahuje velké množství volných hydroxylových skupin umožňujících vznik silných nevazebných interakcí (vodíkových můstků) mezi řetězci polymeru. Tento polymer je tak vhodným kandidátem pro přípravu nanovláknenných materiálů, jež jsou následně podrobeny fyzikální stabilizaci. PVA byl vybrán také pro jeho excelentní vlastnosti, jako je biokompatibilita a absence toxických a karcinogenních účinků. Nanovlákná připravená z PVA navíc vykazují velmi dobrou schopnost absorbovat vlhkost, mají vhodné charakteristiky bobtnání a dobrou propustnost pro kyslík, což z nich činí vhodného kandidáta k vývoji krytů ran [6]. K funkcionalizaci nanovláken byl zvolen chlorhexidin (CHX), jakožto dobře známá a hojně používaná antiseptická látka, a také oktenidin (OCT), který představuje určitou mladší, účinnější a zároveň méně prozkoumanou alternativu k CHX [7].

2 Materiály a metody

2.1 Chemikálie

PVA Mowiol 20-98 (molekulová hmotnost 125 000 g/mol, stupeň konverze 98–98,8 %), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Triton X-100 a metabolický test CCK-8 byly zakoupeny od společnosti Merck (Německo). Směs antibiotik Penicilin/Streptomycin/Amfotericin (ATB) pocházela od Lonza BioWhittaker (Švýcarsko), fetální bovinní sérum bylo získáno od Thermo Fisher Scientific (USA). Chlorhexidin dihydrochlorid (CHX) byl zakoupen od Tokyo Chemical Industry (Japonsko) a oktenidin dihydrochlorid (OCT) od Glentham Life Sciences (Spojené království). Destilovaná voda pro HPLC (dH₂O) pocházela z VWR International (Česká republika), ethanol absolutní (EtOH) z Penta (Česká republika). Müller-Hintonové agar (MHA) byl zakoupen od HiMedia (Indie).

2.2 Testování cytotoxicity

Testování cytotoxicity bylo provedeno jednak s výchozími antiseptiky za účelem nalezení hraničních koncentrací CHX a OCT, od kterých se začnou projevovat jejich cytotoxické účinky.

Dále byla analýza provedena také s připravenými nanovláknennými materiály metodu testování výluhů. Testování a vyhodnocování výsledků bylo prováděno v souladu s normou ČSN EN ISO 10993-5. Roztoky antiseptik k testování byly připraveny zředěním jejich zásobních roztoků pomocí buněčného média. Buněčné médium se skládalo z DMEM s přidavkem 10 % FBS a 1 % ATB. Výluhy z nanovláknenných materiálů byly připraveny inkubací sterilizovaných vzorků nanovláknenných materiálů (ve formě koleček o průměru 14 mm) v 1 ml buněčného média po dobu 24 hodin za standardních kultivačních podmínek (37 °C, 5 % CO₂). K analýze byla použita buněčná linie myších embryonálních fibroblastů NIH-3T3 (pasáž 10, resp. 19). Fibroblasty byly nasazeny do 96jamkových mikrotitračních destiček v koncentraci 10⁴ buněk/jamku a inkubovány po 24 h při 37 °C a 5 % CO₂ (Heracell VIOS 160i CO₂ Incubator, Thermo Fisher Scientific, USA). Po této inkubaci bylo buněčné médium v každé jamce s buněčnou kulturou vyměněno za příslušný roztok koncentrační řady antiseptika (0,01–10 µg/ml), případně za testovaný výluh z nanovláknenného materiálu. Jako negativní kontrola bylo použito buněčné médium, jako pozitivní kontrola 0,5% Triton X-100. Po 24h inkubaci s testovanými roztoky byla buněčná viabilita hodnocena pomocí metabolického kolorimetrického testu CCK-8, přičemž absorbance při 450 nm byla změřena pomocí spektrofotometru (Spark, Tecan, Rakousko).

2.3 Analýza tepelné stability výchozích antiseptických látek

Za účelem ověření tepelné stability antiseptik určených k funkcionalizaci nanovláknenných materiálů byly vzorky CHX a OCT vystaveny teplotě 150 °C po dobu 4 h v laboratorní sušárně (TCF 120 Plus, Chromservis, Česká republika). Po vychladnutí byly vzorky analyzovány pomocí FTIR (Nicolet iZ10, Thermo Fisher Scientific, USA). Infračervená spektra byla porovnána s kontrolními spektry antiseptik bez tepelné zkoušky. Zachování průběhu spekter bylo interpretováno jako důkaz tepelné stability, případné odchylky byly považovány jako ukazatele možných degradačních nebo strukturních změn.

2.4 Příprava nanovláknenných materiálů a jejich tepelná stabilizace

Příprava nanovláknenných materiálů probíhala pomocí stejnosměrného elektrického zvlákňování (Nanospider NS 1WS500U, Elmarco, Česká republika). Zvlákňovací roztoky s 10% koncentrací polymeru byly připraveny rozpuštěním PVA v systému dH₂O/EtOH v hmotnostním poměru 9:1 zahříváním při 90 °C po dobu 6–8 h. V případě roztoků pro přípravu funkcionalizovaných nanovláken byl daný objem vody v rozpouštědlovém systému nahrazen shodným objemem zásobního roztoku CHX (500 µg/ml), respektive OCT (2 mg/ml) v dH₂O tak, aby poměr antiseptika ku polymeru odpovídal kýženému obsahu ve výsledném materiálu. Parametry zvlákňování jsou shrnuty v tabulce 1. Stálá relativní vlhkost a teplota v komoře byla udržována pomocí klimatizační jednotky (NS AC150, Elmarco, Česká republika). Rychlost odtahu podkladové textilie byla upravována dle produktivity roztoku s cílem zajistit srovnatelnou plošnou hmotnost jednotlivých vrstev. Vyrobené nanovláknenné materiály byly dále podrobeny tepelné stabilizaci (HT) při teplotách 120, 130, 140 a 150 °C po dobu 1 h. Pro každou kombinaci podmínek HT byl připraven úsek materiálu. Nanovláknenná vrstva byla oddělena od podkladové textilie a umístěna do skleněné Petriho misky, která byla následně vložena do laboratorní sušárny vytemperované na příslušnou teplotu. Stabilizace probíhala při konstantní teplotě a za atmosférického tlaku. Po uplynutí 1 h byly vzorky vyjmuty ze sušárny a ponechány vychladnout při pokojové teplotě.

Tabulka 1: Parametry elektrického zvlákňování

Parametr		Hodnota
Elektrické napětí elektrod [kV]	Zvlákňovací (struna)	40 až 50
	Sběrná (kolektor)	-10 až -20
Vzdálenost elektrod [mm]		170–185
Průvlak [mm]		0,7–0,8
Odtah textilie [mm/min]		4–13
Odtah struny [mm/s]		2
Rychlost cartridge (dávkování) [s]		1,5–2
Teplota [°C]		20–21,5
Vlhkost [%]		19–20

2.5 Analýza morfologie

Analýza morfologie připravených materiálů byla provedena pomocí skenovací elektronové mikroskopie (VEGA3, Tescan, Česká republika). Vzorky materiálů byly upevněny na kovové terčíky, pokoveny tenkou vrstvou zlata (Q150R S Plus, Quorum Technologies, Spojené království) a pozorovány při urychlovacím napětí 15 kV. Pořízené snímky byly analyzovány pomocí programu ImageJ. Naměřené hodnoty byly dále testovány na normální rozdělení Kolmogorovovým–Smirnovovým testem a dále statisticky zpracovány pomocí softwaru GraphPad Prism 10.4.2 (GraphPad Software, USA). Naměřené hodnoty byly analyzovány s využitím Kruskalova–Wallisova testu.

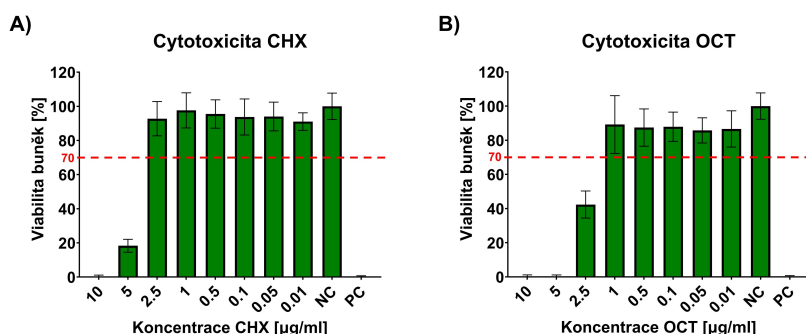
2.6 Analýza antimikrobiálních vlastností

Antimikrobiální účinnost připravených materiálů byla testována diskovou difúzní metodou vůči bakteriálním kmenům *E. coli* CCM 4517, *P. aeruginosa* CCM 1961, *S. aureus* CCM 4516 a kvasince *C. albicans* CCM 8215. Kultury pocházely z České sbírky mikroorganismů (Masarykova univerzita, Brno). Vzorky testovaných materiálů byly připraveny ve formě koleček o průměru 6 mm, které byly vysterilizovány ethylenoxidem. V den testování byla optická denzita bakteriálních inokul připravených z 24 ± 2 h starých kultur upravena na 0,6 McFarland (odpovídá koncentraci $1,5 \times 10^8$ bakterií/ml). Na plotny MHA v Petriho miskách bylo aplikováno vždy 100 μ l inokula, rozetřeno a na inokulovanou plotnu byla následně umístěna kolečka testovaných materiálů (vždy ve dvojici pro každou kombinaci mikroorganismus–materiál). Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 18 ± 2 h pro bakterie, resp. 25 °C po dobu 42 ± 2 h pro kvasinky. Po inkubaci byly změřeny průměry inhibičních zón.

3 Výsledky experimentů

3.1 Cytotoxicita výchozích antiseptických látek

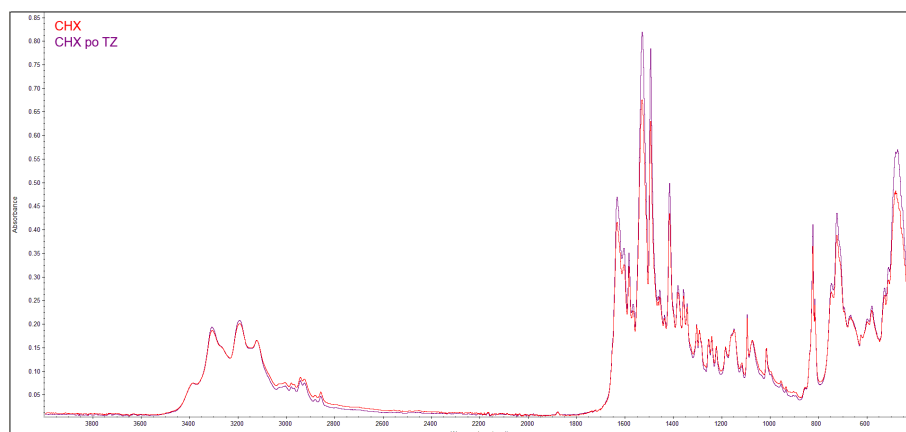
Testování bylo provedeno za účelem nalezení hraničních koncentrací CHX a OCT, které ještě nevykazují cytotoxické účinky vůči eukaryotickým buňkám (myším embryonálním fibroblastům NIH-3T3). Výsledky jsou zpracované ve formě grafů na obrázku 1. Z grafu A) je patrné, že nejvyšší z testovaných koncentrací CHX, která ještě není považována za cytotoxickou, činila 2,5 μ g/ml. V případě OCT byla tato hraniční koncentrace dokonce pouze 1 μ g/ml, viz graf B). Cytotoxické účinky obou antiseptik při koncentracích v řádu jednotek μ g/ml jsou popsány také v literatuře [8, 9]



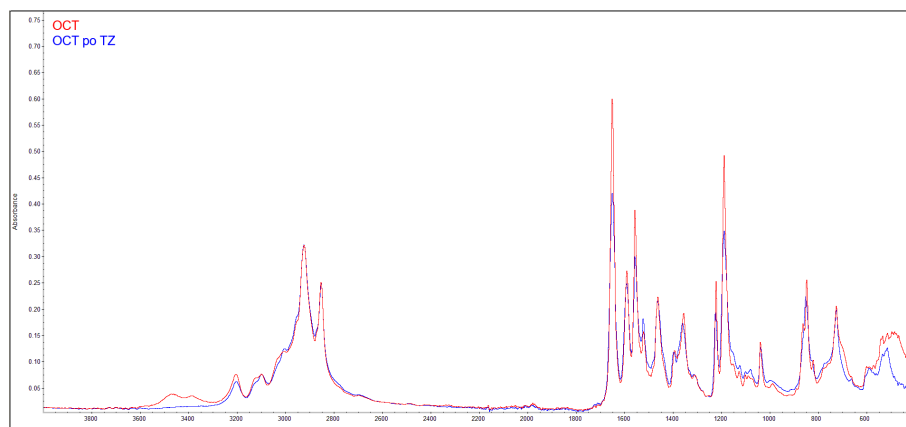
Obrázek 1: Závislost viability myších fibroblastů na koncentraci roztoku A) CHX a B) OCT, NC značí negativní kontrolu, PC značí pozitivní kontrolu, červená přerušovaná čára značí 70% viabilitu buněk (hranice cytotoxicity)

3.2 Tepelná stabilita výchozích antiseptických látek

Aktivní látky CHX a OCT byly v této práci použity k funkcionalizaci nanovláknenných materiálů, které byly následně podrobeny HT při vysokých teplotách. Aby bylo možné předpokládat, že si výsledné materiály zachovají zamýšlené antibakteriální vlastnosti i po vystavení těmto podmínkám, bylo nutné nejprve ověřit tepelnou stabilitu výchozích antiseptik. Na obrázcích 2 a 3 jsou infračervená spektra obou látek před a po teplotní zkoušce. Ve spektrech se nevyskytly významné rozdíly naznačující degradaci. Jediná pozorovaná změna nastala ve spektrech pro OCT. Jak je patrné z obrázku 3, po teplotní zkoušce vymizel slabý absorpční pás v oblasti vlnočtů $3300\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$. Tento pás však nejspíše souvisí s obsahem vlhkosti ve výchozím antiseptiku, která byla působením vysoké teploty během teplotní zkoušky eliminována. Na základě těchto dat je možné předpokládat, že při teplotách do $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ nedochází k degradaci aktivních látek a je proto možné jich využít k funkcionalizaci nanovláken určených k tepelné stabilizaci.



Obrázek 2: Infračervená spektra CHX před a po teplotní zkoušce, TZ značí teplotní zkoušku



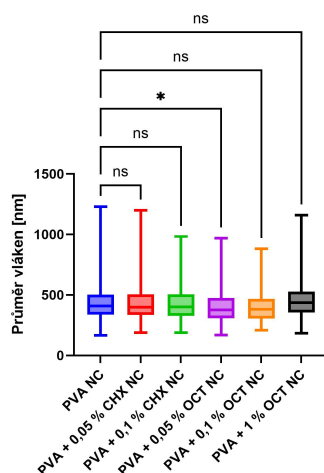
Obrázek 3: Infračervená spektra OCT před a po teplotní zkoušce, TZ značí teplotní zkoušku

3.3 Příprava nanovláknenných materiálů

Příprava nanovláknenných materiálů probíhala pomocí stejnosměrného elektrického zvlákňování. Obsah antiseptik ve funkcionalizovaných materiálech byl zvolen na základě výsledků testování jejich cytotoxicity. Dále byl připraven také materiál s vyšším obsahem OCT (1 hm.%), který sloužil jako pozitivní kontrola pro biologické testování. Značení nanovláken s obsahem aktivní látky bylo zvoleno tak, že označuje teoretický obsah aktivní látky připadající na sušinu materiálu. Tedy název „PVA + 0,05 % CHX“ značí PVA nanovláknna s teoretickým obsahem 0,05 hm.% CHX v sušině. Cílem bylo připravit materiály se srovnatelnou plošnou hmotností. Plošné hmotnosti a střední hodnoty průměrů vláken (AFD) jednotlivých připravených materiálů jsou uvedeny v tabulce 2. Jak je z tabulky patrné, s výjimkou materiálu s 1 % OCT se podařilo připravit nanovláknenné vrstvy s velmi podobnou plošnou hmotností. I přes použití nízké rychlosti odtahu podkladové textilie při přípravě nanovláken PVA + 1 % OCT byla výsledná plošná hmotnost této vrstvy citelně nižší. Z tabulky 2 je dále zřejmé, že AFD materiálů se vzájemně lišily pouze v rámci zjištěných směrodatných odchylek. Při statistickém zpracování naměřených hodnot průměrů vláken byl významný rozdíl v porovnání s nefunkcionalizovaným materiálem zjištěn jen pro PVA + 0,05 % OCT, viz obrázek 4. Rozdíly v produktivitě a AFD mezi jednotlivými materiály nejspíše plynou z variability použitých parametrů zvlákňování (vzdálenost elektroda–kolektor, napětí na elektrodách) a také z různých vlastností (vodivost, viskozita) jednotlivých zvlákňovacích roztoků s odlišnými koncentracemi antiseptik. Tyto faktory totiž ovlivňují průběh zvlákňování a tím také morfologii výsledného nanovláknenného materiálu [10].

Tabulka 2: Střední hodnoty průměrů vláken a plošných hmotností připravených materiálů

Materiál	Střední hodnota průměrů vláken ± SD [nm]	Plošná hmotnost ± SD [g/m ²]
PVA NC	430 ± 140	36 ± 2
PVA + 0,05 % CHX	440 ± 170	34 ± 3
PVA + 0,1 % CHX	430 ± 150	36 ± 8
PVA + 0,05 % OCT	400 ± 130	38 ± 3
PVA + 0,1 % OCT	410 ± 130	35 ± 7
PVA + 1 % OCT	450 ± 150	21 ± 4

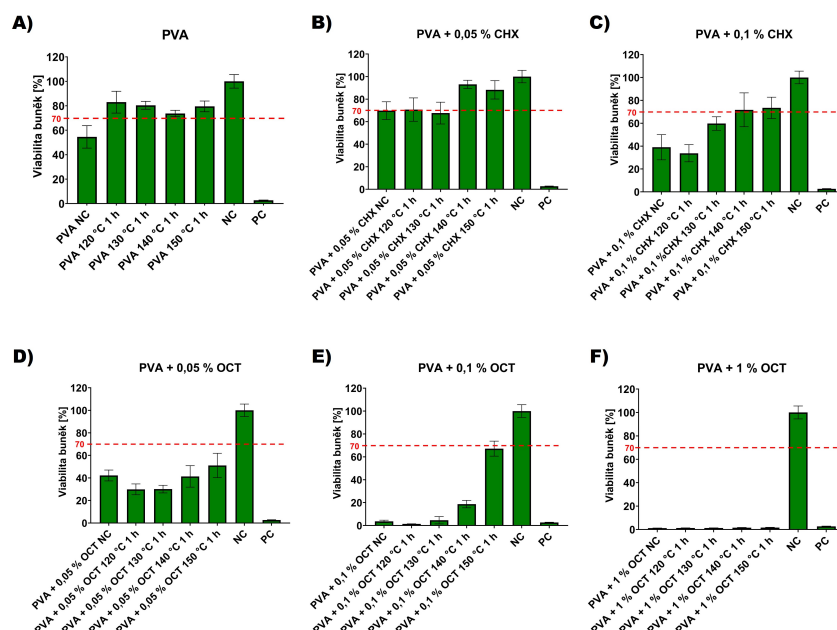


Obrázek 4: Krabicový diagram porovnávající naměřené hodnoty průměrů vláken připravených materiálů, ns značí statisticky nevýznamný rozdíl, hvězdička značí statisticky významnou odchylku (* $p < 0,05$)

3.4 Cytotoxicita nanovláknenných materiálů

Cílem testování bylo zjistit, zda 24hodinová inkubace materiálů v kultivačním médiu vede k uvolnění takového množství antiseptika, které by mohlo vyvolat cytotoxický účinek na myši fibroblasty NIH-3T3. Výsledky experimentu jsou shrnuty v grafech na obrázku 5. Pro funkcionalizované materiály byly hodnoty buněčné viability nad hranicí cytotoxicity zjištěny pouze pro výluhy z nanovláken PVA + 0,05 % CHX stabilizovaných při teplotách 140 a 150 °C po dobu 1 h, viz graf B) na obrázku 5. U všech ostatních materiálů obsahující antiseptika vykazovaly výsledné výluhy cytotoxické účinky. Teoretický obsah antiseptika v inkubovaných vzorcích činil 2,7 µg pro nanovláknena s 0,05 hm.% antiseptika a 5,4 µg pro nanovláknena s 0,1 hm.%, tedy koncentrace aktivní látky ve výluhu mohla dosáhnout maximálně 2,7 µg/ml, respektive 5,4 µg/ml. Pro cytotoxicitu CHX byla zjištěna hraniční koncentrace 2,5 µg/ml. To by znamenalo, že v případě nanovláken PVA + 0,05 % CHX se z nestabilizovaného materiálu a materiálů stabilizovaných při 120 a 130 °C uvolnila drtivá většina přítomného antiseptika a teprve HT při 140 a 150 °C zajistila snížení uvolňování. Avšak k celkovým účinkům výluhu nejspíše přispívá také cytotoxicita samotného PVA (viz dále). Pro OCT byla jako nejvyšší necytotoxická koncentrace zjištěna hodnota 1 µg/ml, což vysvětluje obecně nižší hodnoty buněčné viability než u materiálů s CHX se srovnatelným obsahem antiseptika. Výluhy ze vzorků PVA + 1 % OCT mohly obsahovat koncentraci antiseptika až 54 µg/ml, což představuje více než padesátinásobek hraniční koncentrace pro cytotoxicitu. Proto byla viabilita u výluhů z těchto vzorků ve všech případech nulová.

Výluh z nestabilizovaných PVA nanovláken vykazoval cytotoxické účinky, viz graf A) na obrázku 5, přestože materiál neobsahoval žádnou aktivní látku. Výluhy ze stabilizovaných nefunkcionalizovaných nanovláken cytotoxické nebyly, avšak i u nich byl zaznamenán pokles buněčné viability oproti negativní kontrole. Tento jev by mohl souviset s velkým specifickým povrchem nanovláknenných materiálů, díky kterému mohou adsorbovat esenciální komponenty buněčného média a také s PVA rozpuštěným ve výluhu, který zvyšoval viskozitu roztoku a mohl tak omezovat efektivní difuzi živin skrze médium. Zásadní složky kultivačního média, jako růstové faktory, hormony a další látky, se poté nedostaly k buňkám a došlo ke vzniku falešně pozitivních výsledků cytotoxicity. Dalším možným mechanismem je degradace řetězců PVA během elektrického zvlákňování, což vede ke vzniku fragmentů s nízkou molekulovou hmotností. Ty-



Obrázek 5: Srovnání viability myších fibroblastů inkubovaných v extraktech z nanovláknenných materiálů A) bez aktivní látky, B) s 0,05 % CHX, C) s 0,1 % CHX, D) s 0,05 % OCT, E) s 0,1 % OCT, F) s 1 % OCT; NC značí negativní kontrolu, PC značí pozitivní kontrolu, červená přerušovaná čára značí 70% viabilitu buněk (hranice cytotoxicity)

to fragmenty se při inkubaci v buněčném médiu uvolňují a mohou negativně ovlivnit viabilitu buněk [11]. Stabilizace materiálu snižuje jeho rozpustnost. Ze vzorků po HT se tak mohlo uvolňovat méně případných nízkomolekulárních fragmentů, což by vysvětlovalo menší účinky stabilizovaných PVA nanovláken na viabilitu buněk.

3.5 Antimikrobiální vlastnosti nanovláknenných materiálů

Nanovláknenné materiály byly analyzovány také z hlediska jejich antimikrobiálních vlastností. Účinky nestabilizovaných materiálů a materiálů po HT při 150 °C po dobu 1 h vůči vybraným mikroorganismům byly otestovány pomocí diskové difúzní metody. Výsledky testování, tedy naměřené velikosti inhibičních zón pro jednotlivé materiály, jsou shrnuty v tabulce 3. Ne-funkcionalizované vzorky podle očekávání nevykazovaly žádnou aktivitu. Materiály obsahující CHX působily proti *S. aureus* a *E. coli*, nikoliv však proti *P. aeruginosa* a *C. albicans*. To je patrně způsobeno vyšší odolností druhé zmíněné dvojice mikroorganismů vůči CHX. Vyšší obsah CHX v materiálu vedl k větším inhibičním zónám, zatímco u nanovláken po HT byl zaznamenán pokles velikosti inhibičních zón, pravděpodobně z důvodu pomalejšího uvolňování antiseptika. Materiály s OCT vykazovaly širší spektrum účinku, včetně aktivity vůči *P. aeruginosa* a *C. albicans*. Vyšší účinnost OCT dokládají také údaje v literatuře [7]. Na druhou stranu, inhibiční zóny u *S. aureus* a *E. coli* byly menší než u vzorků s odpovídajícím obsahem CHX, přestože by OCT měl být účinnější i vůči této dvojici bakterií [12]. Průměry inhibičních zón byly nižší dokonce i pro vzorky s 1 hm.% OCT. Tento rozpor může souviset s hydrofobním charakterem OCT, který omezuje jeho rovnoměrnou difuzi v agarovém médiu. Nedocházelo proto ke vzniku lineárního ani logaritmického vztahu mezi velikostí inhibiční zóny a koncentrací testovaných látek. Výsledky diskové difúzní metody tak slouží spíše jako kvalitativní ukazatel antimikrobiální aktivity vůči danému mikroorganismu. Pro kvantitativní srovnání účinnosti by bylo nutné využít diluční metody umožňující spolehlivé stanovení minimálních inhibičních koncentrací.

Tabulka 3: Velikost inhibičních zón v mm $\pm$ SD pro testované nanovláknenné materiály, NC značí materiál bez stabilizace, HT značí tepelnou stabilizaci 150 °C 1 h, - označuje nepřítomnost inhibiční zóny

Mikroorganismus → Materiál ↓	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
PVA NC	-	-	-	-
PVA HT	-	-	-	-
PVA + 0,05 % CHX NC	9,3 $\pm$ 0,2	10,5 $\pm$ 0,4	-	-
PVA + 0,05 % CHX HT	8,6 $\pm$ 0,4	9,2 $\pm$ 0,2	-	-
PVA + 0,1 % CHX NC	10,7 $\pm$ 0,5	12,2 $\pm$ 0,6	-	-
PVA + 0,1 % CHX HT	9,8 $\pm$ 0,2	10,7 $\pm$ 0,5	-	-
PVA + 0,05 % OCT NC	6,3 $\pm$ 0,0	6,7 $\pm$ 0,5	-	6,5 $\pm$ 0,0
PVA + 0,05 % OCT HT	6,3 $\pm$ 0,0	6,6 $\pm$ 0,3	-	6,5 $\pm$ 0,0
PVA + 0,1 % OCT NC	6,3 $\pm$ 0,1	7,1 $\pm$ 0,7	6,5 $\pm$ 0,0	7,0 $\pm$ 0,0
PVA + 0,1 % OCT HT	6,4 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,6	6,2 $\pm$ 0,0	7,0 $\pm$ 0,0
PVA + 1 % OCT NC	7,5 $\pm$ 0,4	9,0 $\pm$ 0,0	7,2 $\pm$ 0,6	10,0 $\pm$ 0,5
PVA + 1 % OCT HT	7,5 $\pm$ 0,4	9,3 $\pm$ 0,2	7,3 $\pm$ 1,2	10,3 $\pm$ 0,3

4 Závěr

Podarilo se nalézt vhodné obsahy antiseptik CHX a OCT v nanovláknenných materiálech z PVA a prokázat, že jsou tyto aktivní látky použitelné k funkcionalizaci materiálů určených k HT. Pro CHX se jako vhodná ukázala koncentrace 0,1 hm.% na sušinu materiálu. Stabilizované materiály sice vykazovaly mírné cytotoxické účinky, do těch se však promítal také vliv PVA a samotný obsah antiseptika by k cytotoxicitě vést nemusel. Materiál účinně potlačoval růst *E. coli* a *S. aureus*. Obsah CHX v testovaném vzorku nebyl dostatečný k inhibici růstu *P. aeruginosa* ani *C. albicans*, avšak minimální inhibiční koncentrace uváděné pro tyto mikroorganismy v literatuře několikanásobně převyšují nalezenou hraniční koncentraci pro cytotoxicitu CHX. Příprava materiálu s obsahem CHX, který by nevedl ke vzniku cytotoxických výluhů a zároveň by vykazoval účinky vůči této dvojici mikroorganismů, tak z principu není možná. OCT vykazoval vyšší cytotoxicitu než CHX, což se promítlo i do cytotoxicity výluhů z nanovláken s OCT. Pro nanovláknena s OCT lze tak jako vhodnou doporučit koncentraci aktivní látky 0,05 hm.%. Materiály s tímto obsahem OCT inhibovaly růst *E. coli*, *S. aureus* a na rozdíl od nanovláken s CHX také *C. albicans*, nicméně nedokázaly potlačit růst *P. aeruginosa*. Příprava nanovláknenných materiálů s širokospektrálními antimikrobiálními účinky, které by zároveň nezpůsobovaly toxicitu pro eukaryotické buňky, tedy stále představuje značnou výzvu. Přesto připravené materiály mají významný potenciál při vývoji funkčních krytů ran. Především by se mohly uplatnit jako kryty sloužící k prevenci vzniku infekce v ráně.

Literatura

1. SEN, Chandan K.; GORDILLO, Gayle M.; ROY, Sashwati; KIRSNER, Robert; LAMBERT, Lynn; HUNT, Thomas K.; GOTTRUP, Finn; GURTNER, Geoffrey C.; LONGAKER, Michael T. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair and Regeneration*. 2009, roč. 17, č. 6, s. 763–771. ISSN 1067-1927. Dostupné z DOI: 10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x.

2. SIDDIQUI, Abdul R.; BERNSTEIN, Jack M. Chronic wound infection: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*. 2010, roč. 28, č. 5, s. 519–526. ISSN 0738081X. Dostupné z DOI: 10.1016/j.clindermatol.2010.03.009.
3. ZHANG, Yanzhong; LIM, Chwee Teck; RAMAKRISHNA, Seeram; HUANG, Zheng-Ming. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2005, roč. 16, č. 10, s. 933–946. ISSN 0957-4530. Dostupné z DOI: 10.1007/s10856-005-4428-x.
4. HUANG, Xiao; BRAZEL, Christopher S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2001, roč. 73, č. 2-3, s. 121–136. ISSN 01683659. Dostupné z DOI: 10.1016/S0168-3659(01)00248-6.
5. ARIMA, T.; HAMADA, T.; MCCABE, J.F. The Effects of Cross-linking Agents on Some Properties of HEMA-based Resins. *Journal of Dental Research*. 1995, roč. 74, č. 9, s. 1597–1601. ISSN 0022-0345. Dostupné z DOI: 10.1177/00220345950740091501.
6. JATOI, Abdul Wahab; OGASAWARA, Hiroshi; KIM, Ick Soo; NI, Qing-Qing. Polyvinyl alcohol nanofiber based three phase wound dressings for sustained wound healing applications. *Materials Letters*. 2019, roč. 241, s. 168–171. ISSN 0167577X. Dostupné z DOI: 10.1016/j.matlet.2019.01.084.
7. KOBURGER, T.; HUBNER, N. – O.; BRAUN, M.; SIEBERT, J.; KRAMER, A. Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010, roč. 65, č. 8, s. 1712–1719. ISSN 0305-7453. Dostupné z DOI: 10.1093/jac/dkq212.
8. HIDALGO, E; DOMINGUEZ, C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicology in Vitro*. 2001, roč. 15, č. 4-5, s. 271–276. ISSN 08872333. Dostupné z DOI: 10.1016/S0887-2333(01)00020-0.
9. KLAUE, Antoine; MARALDI, Matteo; PIVIALI, Camilla; MOSCATELLI, Davide; MORBIDELLI, Massimo. Encapsulation of octenidine hydrochloride into bioresorbable polyesters for extended antimicrobial activity. *European Polymer Journal*. 2020, roč. 138, s. 109987. ISSN 00143057. Dostupné z DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109987.
10. BONAKDAR, Mahboubeh Ahmadi; RODRIGUE, Denis. Electrospinning: Processes, Structures, and Materials. *Macromol.* 2024, roč. 4, č. 1, s. 58–103. ISSN 2673-6209. Dostupné z DOI: 10.3390/macromol4010004.
11. PATHAN, Saif G.; FITZGERALD, Lisa M.; ALI, Syed M.; DAMRAUER, Scott M.; BIDE, Martin J.; NELSON, David W.; FERRAN, Christiane; PHANEUF, Tina M.; PHANEUF, Matthew D. Cytotoxicity associated with electrospun polyvinyl alcohol. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2015, roč. 103, č. 8, s. 1652–1662. ISSN 1552-4973. Dostupné z DOI: 10.1002/jbm.b.33337.
12. SEDLOCK, D M; BAILEY, D M. Microbicidal activity of octenidine hydrochloride, a new alkanediylbis[pyridine] germicidal agent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1985, roč. 28, č. 6, s. 786–790. ISSN 0066-4804. Dostupné z DOI: 10.1128/AAC.28.6.786.