

Bakteriální osídlování polymerních povrchů a jejich redukce

Lucie Vyškovská

Bakalářská práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství polymerů
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie VYŠKOVSKÁ**
Osobní číslo: **T10871**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Bakteriální osídlování polymerních povrchů a jejich redukce**

Zásady pro vypracování:

Zpracujte přehled dosavadního stavu poznání v oblasti bakteriálního osídlování polymerních povrchů, tvorby biofilmu na polymerních površích a metod pro redukci tohoto jevu. Zaměřte se na antimikrobiální sloučeniny na bázi nisinu a jejich použití pro antimikrobiální modifikace polymerů. V rámci experimentální práce připravte polymerní kompozit na bázi vodorozpustný polymer - nisin a charakterizujte jeho antibakteriální vlastnosti.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1)Sawan, S.P., Manivannan, G. Antimicrobial/Anti-infective Materials, Technomic publishing Co. Inc. Basel, 2000

2)Wong, J, Y., Brozino J.D. Biomaterials, CRC press, Boca Raton 2007

3)Časopisecké a knižní zdroje dostupné prostřednictvím knihovny UTB ve Zlíně

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Vladimír Sedlařík, Ph.D.

Centrum polymerních materiálů

Datum zadání bakalářské práce:

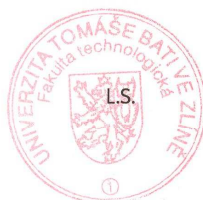
11. února 2013

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2013

Ve Zlíně dne 11. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Vyškovská Lucie

Obor: Polymerní materiály a technologie

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně^{24.5.2013}.....

..........

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydávalečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlázení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užíje-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlíádne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato práce mapuje současný stav poznání problematiky bakteriálního osídlování polymerních povrchů a metod vedoucích k redukci tohoto negativního jevu. V teoretické části práce jsou shrnuty základní informace týkající se využití polymerů ve zdravotnických aplikacích. Na základě dostupné literatury jsou dále popsány principy vlastního bakteriálního osídlování polymerních povrchů a metod vedoucích k jeho redukci. Pozornost je také věnována přírodnímu antibiotiku nisinu a jeho derivátům, které mají potenciál pro využití jako antimikrobiální aditiva některých polymerů. Experimentální část je věnována přípravě a testování antibakteriálních vlastností polyvinylalkoholových filmů modifikovaných přírodním nisinem. Antibakteriální účinnost vzorků byla charakterizována proti Gram pozitivním (*Staphylococcus aureus*) i Gram negativním (*Escherichia coli*) bakteriálním kmenům. Výsledky ukazují vysokou antibakteriální účinnost proti *Staphylococcus aureus*, zatímco růst *Escherichia coli* byl ovlivněn v menším rozsahu.

Klíčová slova: nisin, antimikrobiální vlastnosti, polymer, biomateriál, bakteriální adheze

ABSTRACT

This thesis maps the current state of the art of bacterial colonization of polymer surfaces and methods reducing the occurrence of this negative phenomenon. The theoretical part summarises basic information concerning the medical use of polymers. Principles of bacterial colonization of polymer surfaces and methods of their reduction are described later on based on the available literature. Attention is also paid to a naturally occurring antibiotic nisin and its derivatives that might be potentially used as antimicrobial additives of some polymers. Experimental part of this thesis is focused on preparation and testing antimicrobial properties of polyvinyl alcohol films modified by natural nisin. Both Gram positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram negative (*Escherichia coli*) bacterial strains were utilized to challenge the antimicrobial efficacy of the samples. The results show a high effectiveness in case of *Staphylococcus aureus* whereas the growth of *Escherichia coli* bacteria was slightly influenced.

Keywords: nisin, antimicrobial properties, polymer, biomaterial, bacterial adhesion

Touto cestou bych ráda poděkovala doc. Ing. Vladimíru Sedlaříkovi, Ph.D., za odbornou pomoc a cenné připomínky během tvorby této bakalářské práce.

Ve výzkumné části se mnou spolupracovala Martha Andrea Merchan, M.Sc. - za což jí patří rovněž mé vřelé poděkování.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 POLYMERY V MEDICÍNĚ	11
2 BAKTERIÁLNÍ OSÍDLOVÁNÍ POVRCHŮ.....	17
3 REDUKCE BAKTERIÁLNÍHO OSÍDLOVÁNÍ.....	25
4 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY NA BÁZI NISINU.....	30
II PRAKTICKÁ ČÁST	35
STANOVENÍ CÍLŮ PRÁCE.....	36
5 MATERIÁLY A METODY	37
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	45
ZÁVĚR	50
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	60
SEZNAM OBRÁZKŮ	62
SEZNAM TABULEK.....	63

ÚVOD

Masový rozvoj v oblasti syntézy polymerů a jejich aplikací nastal hlavně až ve 2. polovině 20. století. Polymery si však za poměrně krátkou dobu vydobily nezastupitelné postavení v našem každodenním životě, kde jsou vyžívány ve významné míře v celé řadě odvětví. Důvodem toho jsou jejich dobré fyzikální i mechanické vlastnosti, dobrá zpracovatelnost, dostupnost i cena ve srovnání s dřevem, sklem či kovy.

Potravinářský průmysl anebo zdravotnictví jsou dnes již výrazně závislé na polymerech, jako na materiálové základně. V potravinářství hrají polymery významnou roli v oblasti obalů. Zdravotnictví by se dnes bez polymerních zdravotnických prostředků neobešlo.

V průběhu praktického používání polymerních výrobků se však objevily negativa, které výrazně omezují využitelnost a přidanou hodnotu těchto materiálů. Jejich nevýhoda tkví v nízké rezistenci proti mikrobiální kolonizaci, které může mít za následek velké škody na zdraví uživatelů polymerních obalů či zdravotnických prostředků.

Jednou z možností řešení tohoto problému je relevantní modifikace polymerních matic příslušnými biologicky aktivními přísadami (tzv. antimikrobiálními činidly), které omezí interakce mezi polymerním povrchem a mikroorganismy.

Tato práce se zaměřuje na popis problematiky mikrobiálního osídlování polymerních povrchů a antimikrobiální modifikace polymerů. Experimentální část se soustředí na ověření antibakteriální účinnosti nisinu jako modifikátoru polyvinylalkoholové matrice. Pro testování byli zvoleni zástupci jak Gram pozitivního (*Staphylococcus aureus*) i Gram negativního (*Escherichia coli*) bakteriálního kmene.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYMERY V MEDICÍNĚ

Polymer lze definovat jako velkou molekulu – makromolekulu, složenou z opakujících se jednotek, merů [1]. Existuje hned několik důvodů značného rozšíření polymerů. Prvním z nich je samotné ekonomické hledisko. Suroviny potřebné ke zhotovení polymerů jsou poměrně levné, jejich výroba tedy není příliš nákladná. Dalším aspektem jsou materiálové atributy, přičemž tyto látky vykazují velmi dobré elektroizolační vlastnosti a vysokou odolnost vůči korozi. Díky těmto poznatkům jsou schopny nahrazovat klasické materiály (keramika, sklo, porcelán, kůže, aj.) a tím řešit problematiku nových aplikací. Polymery mají nepochybně i své záporné vlastnosti. Jedná se především o zacházení s odpady, opravy těchto materiálů, ale i použitelnosti, která je omezována teplotní a tvarovou deformovatelností [2].

Zpravidla bývají klasifikovány do třech základních skupin [3]:

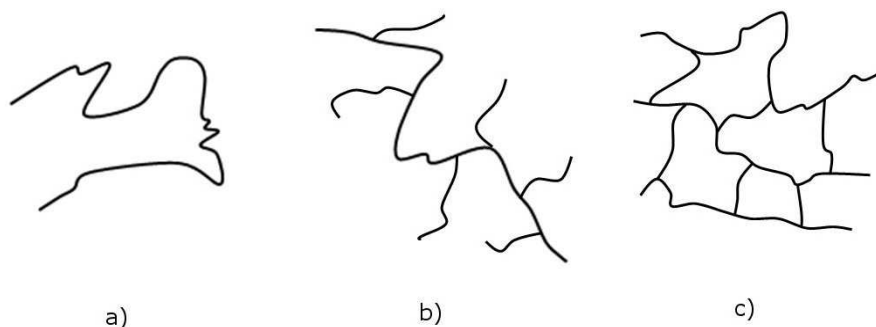
- a) **Termoplasty** – výhodou tohoto druhu polymeru je především v jeho opakované tavitelnosti. Se zvýšenou teplotou se roztaví a po ochlazení přechází do tuhého stavu.
- b) **Termosety** – jsou silně síťované polymery, které bývají často nepoddajné a velmi pevné. Oproti termoplastům nemohou být opakovaně taveny.
- c) **Elastomery (kaučuky)** – vykazují elastomerní vlastnosti. Působením síly dochází k jejich deformaci a následného navrácení do původního stavu.

Polymery mohou být přírodní, ale také syntetické. Typickým příkladem přírodního polymeru je celulóza, pryskyřice, nebo kaučuk. I když je jejich zastoupení v mnoha aplikacích potřebné, v současnosti se spíše využívají syntetické makromolekulární látky. Mohou vznikat třemi následujícími způsoby [3,4]:

- **Polymerací** – dochází k reakci monomerních jednotek na lineární nebo síťované polymery. Během tohoto děje nedochází ke vzniku vedlejších produktů, nýbrž ke vzniku polymeru.
- **Polykondenzací** – dochází ke sloučení dvou odlišných monomerů (vznik kopolymeru) nebo pouze jednoho monomeru, přičemž vzniká produkt – homopolymer. Při této reakci dochází k odštěpování nízkomolekulárních látek (nejčastěji vody) za vzniku polykondenzátu.

- **Polyadici** – dochází k reakci dvou odlišných monomerů, přičemž každý z nich obsahuje alespoň dvě reaktivní skupiny. Zde nedochází k odštěpení vedlejšího produktu. Vzniklý polymer se nazývá polyadukt.

Podle konfigurace v makromolekule se polymery dělí do tří základních skupin – lineární, rozvětvené, síťované (Obrázek 1).



Obrázek 1 Schematické naznačení struktury lineární (a), rozvětvené (b) a zesíťované polymerní struktury

Použití výrobků z polymerů je v dnešní době již neodmyslitelně spjata i se zdravotnictvím, přičemž medicína klade značné požadavky na výrobky vytvořené z polymerů. Vůbec největší důraz se klade na takové materiály, které dlouhodobě přicházejí do kontaktu s krví. Podle Lymana, musí polymerní materiál využívaný pro medicínskou praxi, splňovat následující vlastnosti [5]:

- Maximální čistota;
- Správné chemické, fyzikální a mechanické vlastnosti pro danou funkci;
- Udržení vlastností i tvaru v průběhu sterilizace;
- Nesmí docházet ke změnám jeho vlastností v dlouhodobém styku s biologickým prostředím;
- Nesmí negativně působit na imunitní systém organismu (zánět, alergie);
- Nesmí být karcinogenní;
- Nesmí způsobovat ovlivňovat funkčnost krve (trombóza).

Nutno podotknout, že i přes snahu výzkumníků není možné všechny tyto kritéria u polymerních materiálů splnit. Přesto se určité typy polymerů blíží požadovaným parametrům.

Polymerní biomateriály

Biomateriál lze definovat jako jakýkoliv syntetický, či přírodní materiál, který lze využít k náhradě nebo obnově funkce postižené tkáně. Biomateriály se začaly vyrábět jako náhrada měkkých a tvrdých tkání, jež byly porušeny patologickým procesem. Jak bylo zmíněno, pro tyto materiály jsou kladeny značné požadavky. Hlavním kritériem se vyznačuje jejich netoxičnost a biokompatibilita. Důvod, proč se využívají v odvětví medicíny a farmacie, je především v jejich vlastnostech – vytváří mechanickou podporu, elektrickou izolaci, biokompatibilitu a také přenos terapeutického léku. Proto se velké množství polymerů využívá v medicínských zařízeních u ortopedických, zubních a kardiovaskulárních implantátů. Bývají odvozovány od přírodních zdrojů (přírodní polymery a jejich deriváty) nebo ze syntetických organických procesů (syntetické polymery) [6].

Určité typy polymerních materiálů (jak přírodního, tak i syntetického původu) jsou navrženy tak, aby byly po určité době resorbovány organismem, do kterého byly implantovány (např. chirurgické nitě). Odbouratelné materiály musí splňovat poměrně vysoké biokompatibilní nároky. Jedním ze základních kritérií je vylučování toxických kontaminantů s postupným rozkladem polymeru, přičemž nesmí vyvolávat žádné reakce v lidském organismu. Popularita těchto biologicky rozložitelných materiálů se za posledních 25 let neustále zvyšuje především v ortopedii a tkáňovém inženýrství [7].

V následující části jsou popsány polymery, využívané v medicínské praxi. Ať už se jedná o polymer syntetický nebo přírodní, musí splňovat následující charakteristiky, které také závisí na jejich aplikaci [8]:

- povrchy musí mít takové vlastnosti, aby podporovali buněčnou adhezi, proliferaci a diferenciaci (v případě implantátů);
- stabilitu popřípadě kontrolovatelnou rychlost degradace;
- snadná zpracovatelnost do trojrozměrného tvaru;
- dobré mechanické vlastnosti, schopné odolávat namáháním v daných aplikacích.

Syntetické polymery pro medicínské využití

Syntetické makromolekulární sloučeniny se připravují z nízkomolekulárních látek. V současnosti nahrazují poměrně v rozsáhlém množství přírodní polymery z důvodu vlastností, které nelze nacházet u materiálů přírodních. Ve většině případů jsou dostupné a levné [4].

Z praktického hlediska se výroba polymerních medicínských materiálů vyznačuje těmito základními charakteristikami [9] :

- zpracování se provádí lisováním, vytlačováním a máčením do potřebných tvarů a velikostí;
- vyvolání co nejnižší imunitní odpovědi organismu;
- lehká modifikovatelnost vlastností pro potřebnou aplikaci.

Využitelnost těchto polymerů spočívá v široké škále medicínských aplikací, díky jejich biokompatibilitě a vhodným mechanickým vlastnostem [10]. Přesto nelze předpokládat, že se pro přípravu zdravotnických prostředků budou využívat všechny druhy syntetických polymerů (Tabulka 1). Principiálně se mohou tyto polymery členit na dva typy [11, 12]:

- **degradabilní** – lze také jako biologicky rozložitelné polymery. Tyto biomateriály jsou atraktivní díky jejich schopnosti rozkládat a vylučovat se (popř. vstřebávat) z organismu bez odstranění či chirurgické revize. Pokud dochází k tomuto ději, pak nesmí být odpadní produkt toxický pro organismus. Při vytváření těchto odbouratelných materiálů je nutné dbát na základní kritéria spočívající v eliminaci zánětlivých reakcí a vhodné mechanické vlastnosti, pro jejich zamýšlené použití. Otázkou je, jak rychle dochází k rozkladu těchto materiálů. Mezi typické příklady biodegradabilních materiálů patří kyselina mléčná (PLA) a kyselina polyglykolová (PGA). Všechny tyto částečně krystalické polymery jsou poměrně křehké a tuhé. Jejich pletené vlákna dokáží vytvářet stehy. Právě z PLA a PGA byl vytvořen vůbec první odbouratelný syntetický steh.
- **nedegradabilní** – vytváří mechanickou podporu pro tkáň. Typickými nedegradabilními polymery jsou polymethylmetakrylát, polyuretan, polyethylen, polyethylentereftalát, polysiloxany aj. Vyznačují se především vysokou molekulovou hmotností a mohou se označovat také jako bioinertní. Jednotlivé polymery mají využití

v jiných částech medicíny, z důvodu rozdílnosti mechanických vlastností. Tyto polymery se často využívají k výrobě totálních endoprotéz kyčelního kloubu (polymethylmetakrylát), ale mohou být také součástí cévních protéz ve formě povlaku (polytetrafluorethylen). Široké využití mají především polysiloxany. Jejich výhoda spočívá ve vysoké chemické stabilitě a nereaktivnosti, uplatňují se proto v gelech, mazadlech a pěnách.

Tabulka 1 Příklady syntetických polymerů využívaných v medicínské praxi:

Polymer	Využití
Polyethylen (PE)	trubice katetrů, netkané textilie, nádoby, obalový materiál, sondy
Polypropylen (PP)	obaly, šicí materiál, injekční stříkačky, obalový materiál, náhrady prsních článků
Polytetrafluorethylen (PTFE)	kanyly, katetry, povlak na stentech
Polymethylmetakrylát (PMMA)	kostní a zubní cement, nitrooční čočky, dentální výplně, krevní pumpy
Polyvinylchlorid (PVC)	krevní vaky, mimotělní krevní trubičky, rukavice
Polydimethylsiloxan (PDMS)	implantáty, katetry, umělé šlachy, umělé srdce, hadice
Polyethylentereftalát (PET)	umělé šlachy, vazy a cévy, chirurgické síťoviny
Polycarbonát (PC)	kontaktní čočky, injekční stříkačky
Polyamid	krycí textilie, ochranné folie, šicí materiál
Systémy na bázi vodorozpustných polymerů např. PVA, polyvinylpyrolidon, kys. Polyakrylová	kostní štěpy, tmely, nosič léků, lepidla

Přírodní polymery pro medicínské využití

Tyto polymery bývají často biologicky rozložitelné. Časový rozsah degradace je možný od několika týdnů až po měsíce, čemuž odpovídá jejich molekulární struktura. Mezi hlavní znaky úspěšné aplikace tohoto druhu polymerů se řadí především biokompatibilita a také zmiňovaná biologická rozložitelnost [8].

Přírodní polymery mají určité výhody oproti polymerům syntetickým. Jejich přednosti spočívají ve schopnosti lepšího, přirozenějšího povrchu pro adhezi buněk. Mají větší schopnost podpory buněčné diferenciaci. Nevýhodou přírodních polymerů je jejich snaha rychle se přetvořit v těle na produkty o nižší molekulové hmotnosti (příklady přírodních polymerů – Tabulka 2) [9].

Typickým přírodním polymerem v biomedicínských aplikacích (zejména v tkáňovém inženýrství) je kolagen – polymer tvořený ze strukturní primární bílkoviny. Do podvědomí vědců se dostal pro jeho schopnost biokompatibility. I přes to lze říci, že kolagen může vyvolat imunogenní reakci organismu po implantaci [8]. Derivátem kolagenu je atelokolagen, který se využívá v lékařství (krevní koagulační bavlňená tkanina, zubní, kostní výplňový materiál) a kosmetice. Atelokolagen je molekula kolagenu (kolagen I typu), kterému byly pomocí pepsinu odštěpeny telopeptidy. Tento typ kolagenu se využívá jako nosič terapeutického léku díky jeho nízké imunogenicitě a dobré rozpustitelnosti ve vodě [13].

Tabulka 2 Přírodní polymery využívané v medicínských aplikacích:

<i>Polymer</i>	<i>Využití</i>
Kolagen	hojení ran
Chitosan	hojení ran, nosič léků
Kyselina hyaluronová	hojení ran bez vzniku jizev, hojení popálenin, léčba osteoartrózy

2 BAKTERIÁLNÍ OSÍDLOVÁNÍ POVRCHŮ

Bakterie jsou jedním z nejvíce přizpůsobivých organismů na Zemi. Jsou schopny žít planktonicky, nebo se seskupují do společenství, čímž vytváří tenkou vrstvu na pevných strukturách. Existuje mnoho pohledů jak charakterizovat dané osídlování mikroorganismů [14]. Mezi biology se zpravidla setkáváme s názorem, že biofilm je „*aktivní biologická vrstva složená z mikroorganismů (bakterií, řas, hub, prvoků, mnohobuněčných) a jejich extracelulárních produktů, která je přichycena na povrchu nejrůznějších podkladů, které jsou v kontaktu s vodou...*“ S vývojem vědní disciplíny se jednotlivé definice však neustále mění [15].

Samotné prvopočátky mikrobiologie sahají již do dob druhé poloviny 17. století. Jedním z prvních vědců, který studoval mikroskopický život, byl Holanďan Antonie van Leewenhoek. Proslavil se sestavováním daných typů mikroskopů, jejichž prostřednictvím (roku 1684) zpozoroval seskupení mikroorganismů v zubním plaku. Dalším významným vědcem v oblasti mikrobiologie je považován Němec Robert Koch (1843 – 1910), jenž začal izolovat a studovat jednotlivé bakterie. Na základě tohoto poznatku úspěšně položil základy pro studium a léčbu mnoha závažných onemocnění. Jednalo se především o tuberkulózu a antrax, které byly v daném období považovány za největší hrozbu pro lidstvo. Na základě výjimečných poznatků obdržel Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu v roce 1905. Až v roce 1940 dokázali vědci H. Heukelekian a A. Heller popsat uspořádání bakterií tak, jak v dnešní době označujeme biofilm. V pozdních desetiletích 20. století začala být studie biofilmů seriózní vědeckou činností [16].

Biofilm je velkým problémem jak pro průmyslové a přírodním odvětví, tak v medicínských aplikacích. Pro bakterie jsou přirozeným vodním prostředím potoky, vodstva, odpadní vody a průmyslové organické odpady. V těchto podmínkách biofilmy vytvářejí a způsobují problémy, ať už ve znečišťování povrchů, či korozi daných materiálů [14]. V průmyslu vytváří početné problémy ve znečišťování nejrůznějších povrchů, na nichž se tvoří. Příkladem usazování bakteriálního biofilmu, lze uvést problematiku související s odporem lodního trupu, na něž se řasy usazují. Odpor je způsoben tvořícím se biofilmem, který vytváří turbulenci protékající kapaliny a tím zužuje světlost potrubí. Není ale pravdou, že biofilmy mají pouze záporné vlastnosti. V odvětví biotechnologie, čištění vod, či bioremediaci je naopak přítomnost biofilmů nezbytná [15].

V současné době se výzkumníci v odvětví biotechnologie zabývají bakteriemi jako producenty elektřiny. O výrobu elektrického proudu se snaží vědec Grant Burgess z Newcastle University. Zmíněný elektrický proud probíhá v bakteriálních palivových článcích, které lze označit jako tzv. bioelektrochemické systémy. Principem výroby elektřiny určitými druhy bakterií spočívá v biokatalytické oxidaci organických sloučenin. Pokud se v těchto palivových článcích bude upravovat složení bakteriálních biofilmů, může dojít k významnému zvýšení produkce takto vzniklé elektřiny [17].

Zcela samostatnou, podstatnou a v dnešní době nejvíce studovanou otázkou je výskyt biofilmů v medicíně [15]. Hlavním problémem je osídlování bakterií na polymerních zdravotnických prostředcích zaváděných do lidského těla. Jedná se zvláště o kanyly, katétry, cévky, kardiostimulátory, implantáty (kovové, plastové) aj. Ovšem biofilmy se nevyskytují jen na cizích tělesech aplikovaných do lidského těla, vhodné podmínky utvářejí také sliznice a výstelky dutin [14].

Mezi nejčastější bakterie, které dokáží vytvářet biofilmy, patří [18]:

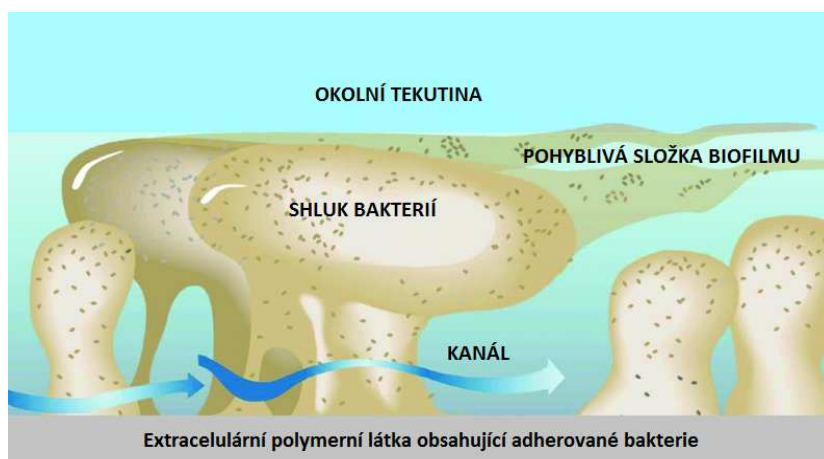
- *Staphylococcus epidermidis*,
- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Escherichia coli*,
- *Enterococcus faecalis*,
- *Staphylococcus aureus*.

Je tedy možné se zabývat otázkou, proč jsou právě tyto biofilmy tak nebezpečné pro lidské zdraví. Jelikož jsou bakterie v biofilmu rezistentní vůči antibiotikům, dochází tím k problémům spojené s léčbou pacienta. Mohou tedy vytvářet chronické infekce krevního oběhu, záněty až sepse organismu. Při zkoumání jednotlivých struktur biofilmů nestačí pouze běžné optické mikroskopie, proto využíváme fyzikální a fyzikálně chemické metody. Například konfokální laserový mikroskop umožňuje snímat rastrovací technikou biofilm, čímž umožní jeho zobrazování sekcí a následné složení struktury. Snímáním lze také získat v časových sekvencích záznam o aktuálním stavu biofilmu [15].

Charakteristika bakteriálního biofilmu

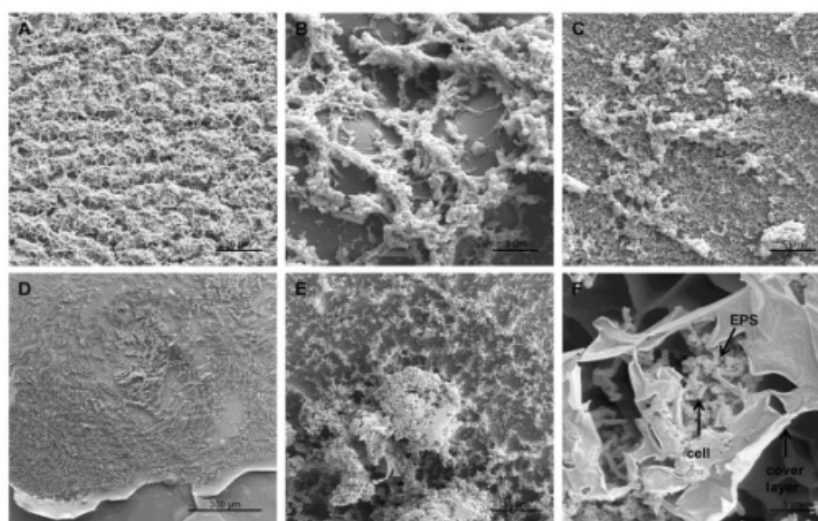
Složení biofilmu může být tvořeno jedním, ale i více bakteriálních kmenů. Přesto četnější společenství bakterií je v přirozeném klimatu obvyklejší. Z této skutečnosti lze vysoudit, že právě tyto biofilmy mají složitější stavbu než biofilmy se zastoupením pouze

jediného bakteriálního druhu. Skladba bakteriálního biofilmu nezávisí pouze na dostupnosti živin, ale důležitou úlohu sehrává také kyslík a vlastnosti okolního prostředí (pH, hydrodynamické síly aj.) Jeho skladba není homogenní, avšak je vytvářena velkým množstvím z agregátů a dutin. Vznikají spletné kanálky, jež jsou vzájemně propojovány. Bakterie tedy dokáží adherovat na daný povrch a tím vytvářet mikrokolonie biofilmu, vzniká tak houbovitý, popř. kuželovitý tvar (viz. Obrázek 2) [19].



Obrázek 2 Schématické znázornění komplexní struktury biofilmu, která umožňuje jeho šíření po povrchu a zajištění transportu nutrientu [20]

Na následujícím obrázku lze vidět strukturu biofilmu, zobrazená metodou SEM. Jednotlivé snímky jsou pořízeny pod různým zvětšením.



Obrázek 3 Detailní zachycení biofilmů pomocí skenovacího elektronového mikroskopu [21]

Struktury biofilmů závisí na fyzikálních (např. transport substrátu) a biologických faktorech (např. rychlost konverze substrátu). Tím lze předpokládat, že tvorba biofilmu závisí na interakci mezi transportem látek a procesy jejich konverze. Heterogenní a porézní strukturu bude mít takový biofilm, který je silně limitován difuzí. Oproti tomu kompaktní a homogenní biofilm bude takový, u něhož je hlavním znakem konverze substrátu. Jestliže se jedná o vyzrálý biofilm, pak jeho struktura bude heterogenní [15].

Jak bylo zmíněno, důležitým faktorem pro biofilm, je jeho samotná tloušťka. Její závislost se vztahuje na míře dostupnosti živin. Rozsah tloušťky se pohybuje v rozmezí od několika jednotek do stovek mikrometrů. K transportu živin napomáhá elektrický náboj, který je rozdílný u každé vrstvy biofilmu [19].

Bakteriální biofilm je elastický a v proudu tekutin se dokáže šířit po svém povrchu. Pokud je působení proudu kapaliny silné, pak se tento povrch dokáže rozšiřovat po podložkách a vyhledat dosud neobsazená místa. Jestliže ale pružnost nedokáže udržet pevnost daného biofilmu, dochází k částečnému odloučení. V případě dostatku živin, toto „vlnění“ na povrchu zcela vymizí a objeví se až při jejich nedostatku. Tento jev je prokazatelný na glukóze, která byla zdrojem energie právě u daných biofilmů. Uvedená okolní tekutina tedy dokáže doručit důležité organické i anorganické látky a odvádět katabolity ven z bakteriálního biofilmu [14].

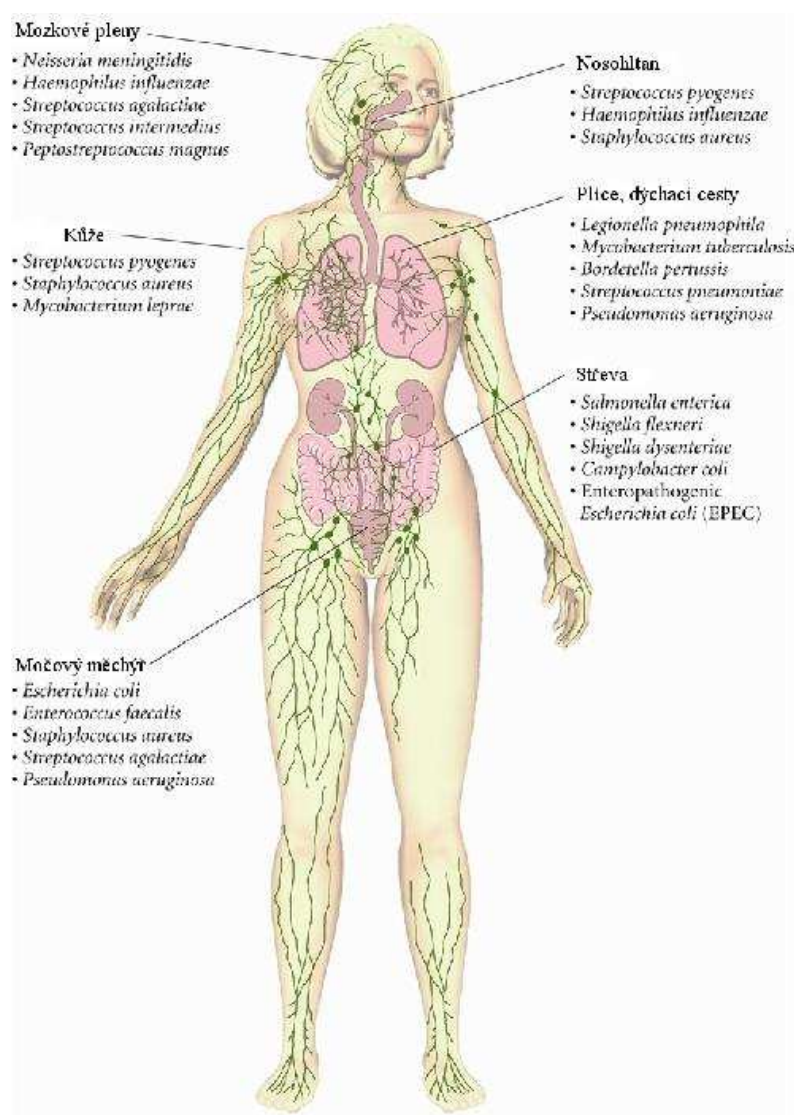
S rychlostí proudění okolní kapaliny je spojena hustota bakteriálního biofilmu. Je možné tedy předpokládat, že pokud dochází k růstu biofilmu při vyšší rychlosti proudu kapaliny, pak bude strukturně hustší, oproti takovému, který roste při nižších rychlostech toku. Díky této podmínce lze konstatovat, že právě hustší biofilmy jsou lépe odolné k vyššímu smykovému tření. Tento vztah je přisuzován následkem vyšší rychlosti toku proudění. Přesto zápornou vlastností kompaktních biofilmů je především nižší efektivní difuzivita. Důsledek nižší difuzivity spočívá právě v jeho heterogenitě. Nepochybně samotná difuzivita je velmi důležitá pro život mikroorganismů, z důvodu transportu živin mezi jednotlivými shluky buněk [15].

Následky bakteriálního osídlení polymerních povrchů

Bakterie, jež se vyskytují ve formě biofilmu, jsou poměrně velkou hrozbou pro lidské zdraví. Dokáží způsobovat celou řadu chronických onemocnění z důvodu jejich rezistence [15]. Vědci poukazují, že až 80 % infekcí v těle člověka jsou způsobeny právě bakteriemi

biofilmu oproti planktonickým bakteriím. Mikroorganismy se nacházejí na nejrůznějších površích polymerních materiálů v medicíně (centrální žilní katetr, mechanické srdeční chlopně, apod.) [22]. Nelze opomenout, že pokud se bakterie nacházejí ve formě biofilmu, mají zvýšenou virulenci. Nejenže dokáže bakteriím lépe adherovat na povrch materiálu, ale také má obranou funkci proti imunitnímu systému a rezistenci vůči antibiotikům (ATB) [15].

Na následujícím obrázku jsou vyobrazeny nejčastější typy patogenních bakterií působící na lidské tělo (Obrázek 4).



Obrázek 4 Patogenní bakterie nacházející se v lidském těle [23]

Tyto patogenní bakterie dokáží vytvářet různé druhy onemocnění. Mezi nejzávažnější řadíme [14, 15]:

- a) zánět endokardu
- b) cystická fibróza
- c) zánět pobřišnice
- d) zánět kostní dřeně
- e) zánět středního ucha

Bakterie ve formě biofilmu bývají často spjaty s nozokomiálními infekcemi. Na základě hrubých odhadů se předpokládá, že z 65 % jsou právě biofilmy zodpovědné za šíření nozokomiálních nákaz [24].

Negativa spojená s bakteriálním osídlováním

Jak bylo zmíněno, nozokomiální nákazy jsou častým problémem v nemocničních zařízeních [22]. Ve vyspělých zemích je množství nakažených lidí 5-10 % při hospitalizaci. Pokud jsou pacienti na odděleních jednotek intenzivní péče (JIP) tyto procenta se zvyšují na 15-40 %. Pojem nozokomiální nákaza je chápána mnoha způsoby. Podle Centra pro kontrolu a prevenci nemocí (Centers for Disease Control and Prevention = CDC) je chápána jako: „ *Lokalizovaná reakce organismu na přítomnost infekčního původce nebo jeho toxinu, která nebyla přítomna v inkubační době v čase přijetí do nemocniční péče.*“ Nejčastější doba před vypuknutím bakteriální infekce bývá 48 hodin. Nicméně se v určitých případech posuzuje inkubační doba individuálně podle typu původce [24].

V dnešní době se vědci stále snaží zabránit tvorbě biofilmu a tím i nozokomiálním nákazám. Podle amerického článku výzkumný tým z Pasteurova institutu vytvořil molekulu na bázi složitěho sacharidu, který má zabránit tvorbě aglomerátů biofilmů. Tento cukr byl aplikován do kultivačního média bakterie, jež vytváří zánětlivé onemocnění močových cest. Pokud byla aplikována na materiály – sklo, plasty, dokáže zabránit velkému množství patogenních bakterií [25]. Běžně se využívají i jiné metody zabraňující tvorbě bakterií. Typickým příkladem je dezinfekce a sterilizace. Dezinfekce využívá dezinfekčních prostředků, jež dokáží odstranit původce infekcí. Tyto účinné látky jsou závislé především na teplotě, koncentraci a době působení. Jestliže se využívá metody sterilizace, dochází k záhubě veškerých mikroorganismů vysokou teplotou v podobě vodní páry, či suchého horka [26].

Rezistence bakterií vůči antibiotikům

I když ATB jsou vytvářeny živými organismy, jejich působení je zaměřeno především na poškození mikroorganismů. Dokáží porušovat syntézu buněčných stěn, cytoplazmatickou membránu, metabolismus nukleových kyselin, bílkovin aj. [27]. Tedy nejvýznamnější úlohou je poškození patogenních původců, přičemž nesmí být porušeny buňky lidského organismu [26]. Přesto určité druhy mikroorganismů mají antimikrobiální účinky. Jedná se především o houby, aktinomycety a bakterie [27]. Tato rezistence bakterií je získávána buďto přirozenou (primární) nebo získanou formou. Jestliže se jedná o primární rezistenci, pak tato bakterie nenesé žádné zásahové místo pro ATB. Lze tedy říci, že tyto bakterie jsou rezistentní už před setkáním s daným typem antimikrobiální látky. Oproti tomu získaná rezistence vzniká na základě genetických přenosů, popř. důsledkem mutací. Díky tomuto faktoru dokáže být bakterie po určité době vzdorující pro původně zneškodňující ATB [28].

Lze však konstatovat, že rezistence bakterií ve formě biofilmu je až tisícinásobně větší oproti bakteriím planktonickým [14]. Aby mohlo docházet k eliminaci zralého biofilmu, je potřeba dosáhnout mnohonásobně vyšší lokální koncentrace antibiotik, než je potřebné u profylaktického podávání ATB [15].

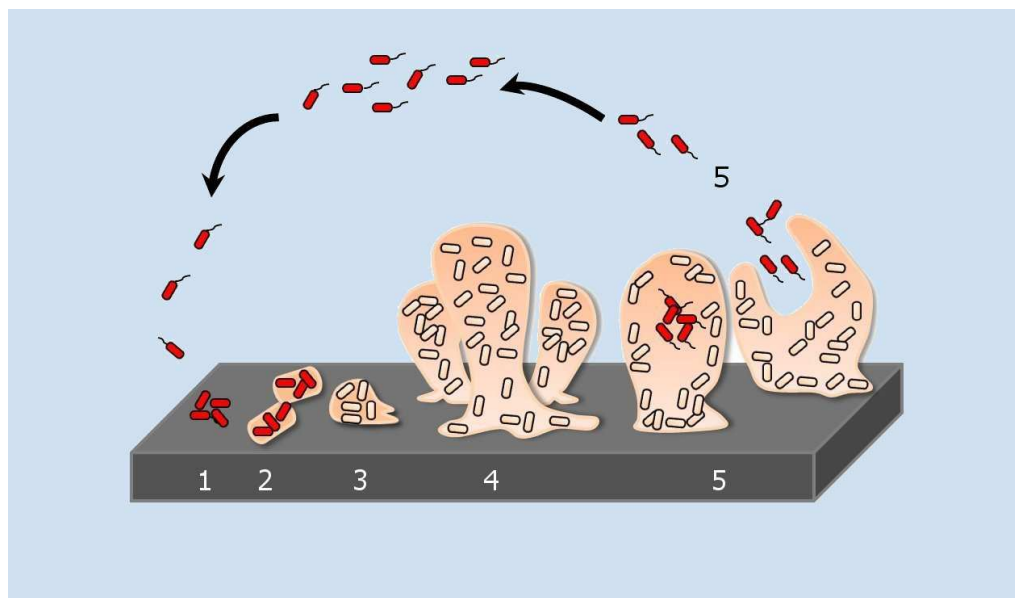
Fáze vývoje bakteriálního biofilmu

Vývoj bakteriálního biofilmu lze rozdělit do pěti základních částí [14]:

- 1) **Atrakce** – v této fázi dochází k přitahování planktonických buněk k danému materiálu z důvodu nedostatku živin.
- 2) **Adheze** – přichytávání bakterií na organické látky pomocí adhezinů (aktivní molekuly bílkovin, glykopeptidů, nebo polysacharidů), čímž následně dochází ke změně fenotypu.
- 3) **Primární biofilm** – na podkladu vzniká množení adherovaných buněk. Produkuje se polysacharid, který je až stokrát těžší než bakteriální buňky, jež ho produkuje.
- 4) **Sekundární biofilm** – z produkce polysacharidu vzniká matrix, který drží buňky pohromadě. Zde vzniká spleť kanálků a mikrokolonií.

- 5) **Disperze** – v posledním kroku probíhá odtrhávání a rozptýlení buněk bakterií z biofilmu, tyto bakterie se navrací zpět do planktonického stavu. Jejich úloha spočívá v další kolonizaci povrchů.

Tento děj je vyobrazen na následujícím obrázku:



Obrázek 5 Fáze vývoje bakteriálního biofilmu

3 REDUKCE BAKTERIÁLNÍHO OSÍDLOVÁNÍ

Mikroorganismy jsou neustále vystavovány celou škálou nepříznivě působících faktorů. Mezi nejčastější příčiny lze řadit již zmíněnou teplotu, záření, nedostatek živin a vody, popřípadě nevhodné pH. Lze konstatovat, že množství usmrcených buněk závisí jak na síle působení faktoru, tak na době jeho působení. I přes negativní vliv těchto faktorů nelze definitivně ukončit adhezi bakterií na daném povrchu. [29].

Dosud nebyl vytvořen žádný materiál, který by zcela dokázal zabránit tvorbě biofilmů. Z tohoto důvodu je snahou modifikovat takový typ povrchu, který dokáže eliminovat adhezi bakterií. Proto je nutné při tvorbě modifikovaného polymeru zohledňovat několik základních kritérií [29, 30]:

- vlastnosti polymeru (chemické, fyzikální);
- výběr antimikrobiálního agens (toxicita, mikrobiální kontaminace, způsob aplikace, vlastnost činidla);
- charakter prostředí (teplota, vliv záření, vliv pH).

Podmínkou pro usmrcení mikrobů je nutnost působení nepříznivého faktoru. Pokud faktor působí na dané mikroby jen pozvolna, nejprve dochází ke snižování množení bakterií, a jejich následnému odumírání. První fázi tohoto mechanismu lze označovat jako *bakteriostázu*, jedná se o vratný děj, uskutečňující se během působení chemických prostředků. Ve druhém stádiu naopak dochází k nevratnému ději, přičemž postupně odumírají mikroby konstantní rychlostí. Postupné odumírání těchto mikrobů se zpomaluje z důvodu aktivity odolnějších jedinců [29].

Způsob zabránění adheze

Základní principy zabránění tvorby bakterií na povrchu polymeru, lze řadit do čtyř základních kritérií:

- změna volné povrchové energie bez použití chemikálií;
- přímá depozice chemikálií na povrchu polymeru;
- navázání chemikálií na povrch polymeru pomocí mediátoru;
- přímá inkorporace antimikrobiálních látek do polymeru.

Změna volné povrchové energie bez použití chemikálií

V této modifikaci se nevyužívá účinku žádné antimikrobiální látky, nýbrž dochází k pouhým transformacím polymerních povrchů. V tomto případě se jedná o změnu volné povrchové energie, která je podmíněna třemi základními veličinami – kontaktním úhlem, povrchovým napětím a hydrofobicitou/ hydrofilitou [15].

Hydrofilní substrát má poměrně značný vliv na přilnavost hydrofobních bakterií. Typickým hydrofilním povrchem je sklo a nerezavějící ocel, které mají vysokou volnou povrchovou energii. Rozdílný je u hydrofobní povrch, na který se adherují hydrofilní bakterie, jehož volná povrchová energie je nízká. Rozsáhlé studie zabývající se povrchovými úpravami udávají, že právě jednou ze zásadních rolí pro snížení adheze bakterií je samotná hydrofobita povrchu [30, 31].

Povrchovou energii lze analyzovat různými metodami. Vůbec nejčastějším typem je měření pomocí Youngovi rovnice [14]:

$$\gamma_{BC} - \gamma_{AB} = \gamma_{AC} \cdot \cos \theta \quad [1]$$

Přičemž konstantní úhel je dán výslednicí sil: γ_{BC} je volná energie na rozhraní pevné a plyné fáze, γ_{AB} označuje volnou energii na rozhraní pevné a kapalně fáze, γ_{AC} rozhraní plyné a kapalně fáze. Zde platí vztah – pokud je vysoká povrchová energie, pak konstantní úhel spolu s povrchovým napětím je nízký (tzn. vodou smáčivý povrch), tímto znakem se bude tedy vyznačovat povrch hydrofilní. V opačném případě jde o vodou nesmáčivý – hydrofobní povrch.

Přímá depozice chemikálií na povrchu polymeru

Tento princip je oproti zbylým metodám poměrně nenáročný a hojně se využívá v odvětví medicíny. V tomto mechanismu dochází k aplikaci antibakteriálního nátěru na zdravotnické povrchy. Principem tohoto produktu je eliminace bakterií s vyloučením plísní a řas. Lze tedy předpokládat, že se dá těmito antimikrobiálními vrstvami pokrýt celé zařízení provozů (př. stěny, skříně, pracovní plochy) [32]. Základní složkou této disperze bývají akrylové, pryskyřicové hmoty s přídavkem stříbra. Důvodem, proč se začalo stříbro využívat poměrně v hojném počtu, je kladné působení na adhezi a růst bakterií danými funkcemi [33]:

- zabraňuje dělení buněk;
- brání buněčnému mechanismu;
- brání transportu výživných látek.

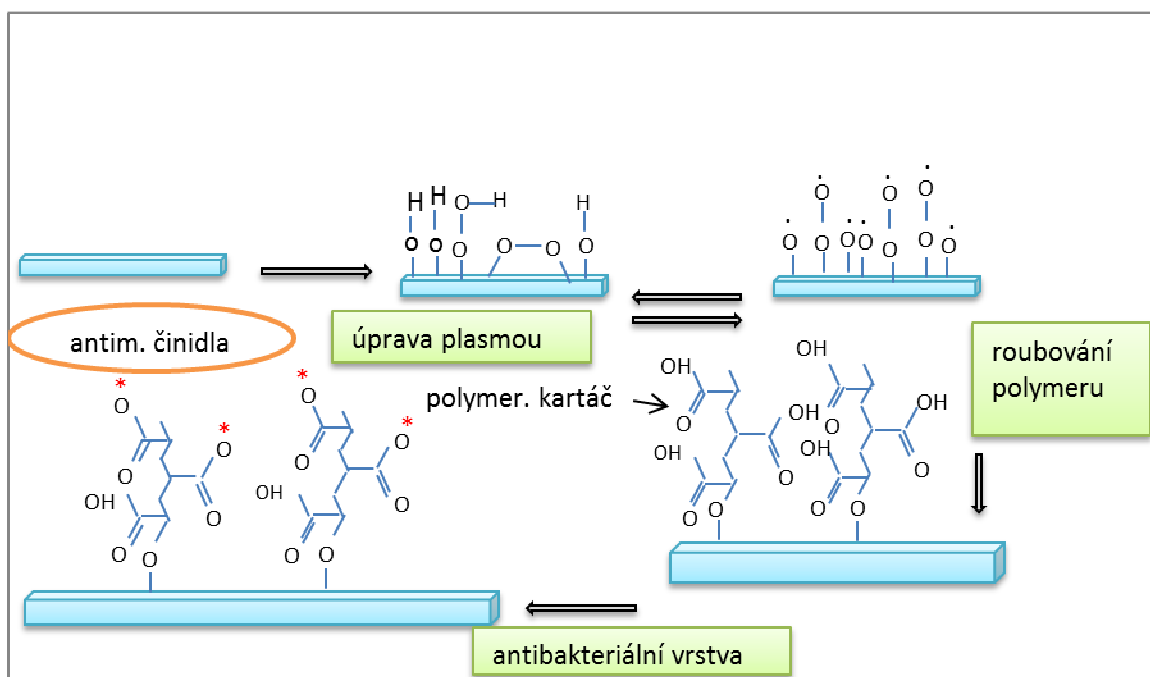
Dokáže tedy zaopatřit povrch před 150 druhy bakterií, z něhož neúčinněji (99 %) dokáže chránit před rody *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* [33, 34].

Značnou nevýhodou těchto nátěrových hmot je především v jejich krátkodobé účinnosti a rychlé vstřebatelnosti. Proto se vědci snaží vytvořit takový materiál, jenž dokáže těmto nepříznivým vlivům zabránit.

I. Hvízdalová publikovala práci pod názvem „Titosan – antimikrobiální povrch ke zlepšení hygieny v potravinářském průmyslu“, zveřejněnou v roce 2011, jejímž cílem bylo vytvořit pomocí nanotechnologie jiný druh antimikrobiálního polymerního nátěru. V tomto nátěru se vyskytuje složka oxidu titaničitého jako fotokatalyzátoru a polyaminosacharidu – chitosanu. Značnou výhodou takto vzniklé disperze je nejen antimikrobiální účinek, ale také mechanické i chemické odolnosti, včetně dlouhodobé funkčnosti takto ošetřeného povrchu [32].

Navázání antimikrobiální sloučeniny na povrch polymeru pomocí mediátoru

Pokud nedochází k navázání antimikrobiální látky na polymer, jako tomu bylo v předešlém případě, postupuje se metodou navázání, přičemž je nutno využívat mediátor. Mezi vhodný typ mediátoru se může řadit kyselina akrylová. Navázání antimikrobiální látky na povrch polymeru začíná v okamžiku, kdy proběhne aktivace povrchu pomocí vhodného mediátoru (např. kyselina akrylová). Poté dochází k naroubování řetězců kyseliny na povrch polymeru. Tím vzniká hustá struktura polymerního kartáče, na nějž se dokáže připevnit pomocí karboxylové skupiny antimikrobiální látka, působící proti nežádoucím mikroorganismům [35, 36]. Tento děj je vyjádřen na následujícím obrázku.



Obrázek 6 Modifikace povrchu pomocí mediátoru

Přímá inkorporace antimikrobiálních látek do polymeru

Tento způsob modifikace je v současnosti poměrně často využíván. Polymerní matrice bývají dvojího typu. Mohou vznikat z termoplastů, od nichž se zavádí název termoplastické matrice, nebo jsou vytvářeny z reaktoplastů, nesoucí pojmenování matrice reaktoplastové. Mezi nejčastější polymery pro tvorbu termoplastických polymerních matic se řadí polyamidy, polyethyleny, polypropyleny, polykarbonáty, styren – akrylonitril acetáty a další. Mezi reaktoplasty jsou řazeny různé typy pryskyřic (polyesterové, epoxidové, melaminové a siloxylové). Princip této modifikace spočívá v zabudování antimikrobiálních přísad do objemu polymeru [37].

Mezi nejčastější zakomponovaná aditiva v polymeru se řadí stříbro (Ag). Elementární stříbro respektive stříbrné ionty jsou velmi dobře známé v medicíně, odvětví preventivní a léčebné péče. Vyznačují se poměrně vysokou toxicitou proti mikroorganismům, ale také zdravotní nezávadností pro organismus člověka. Lze tedy konstatovat, že tento druh suroviny má ochrannou funkci jak na vnější, tak na vnitřní straně povrchu polymeru [38]. V nedávných studiích bylo zjištěno, že inhibiční účinek proti bakteriálním kmenům mají nanočástice stříbra, díky svému vysokému specifickému povrchu. Tímto znakem dokáží daleko lépe zvýšit efektivitu bakteriocidního a fungicidního účinku. Příkladem může být silná antibakteriální aktivita kompozitu tvořeného z polymerní matrice a právě vestavěných

nanočástic bromidu stříbra. Účinek nanočástic se projevil vhodným působením proti gram-pozitivním (G+), tak i gramnegativním (G-) bakteriím. Poměrně často jsou užívány, jako součást stehů při šití ran. Díky jejich inhibičnímu účinku dochází k eliminaci možné infekce ran [39].

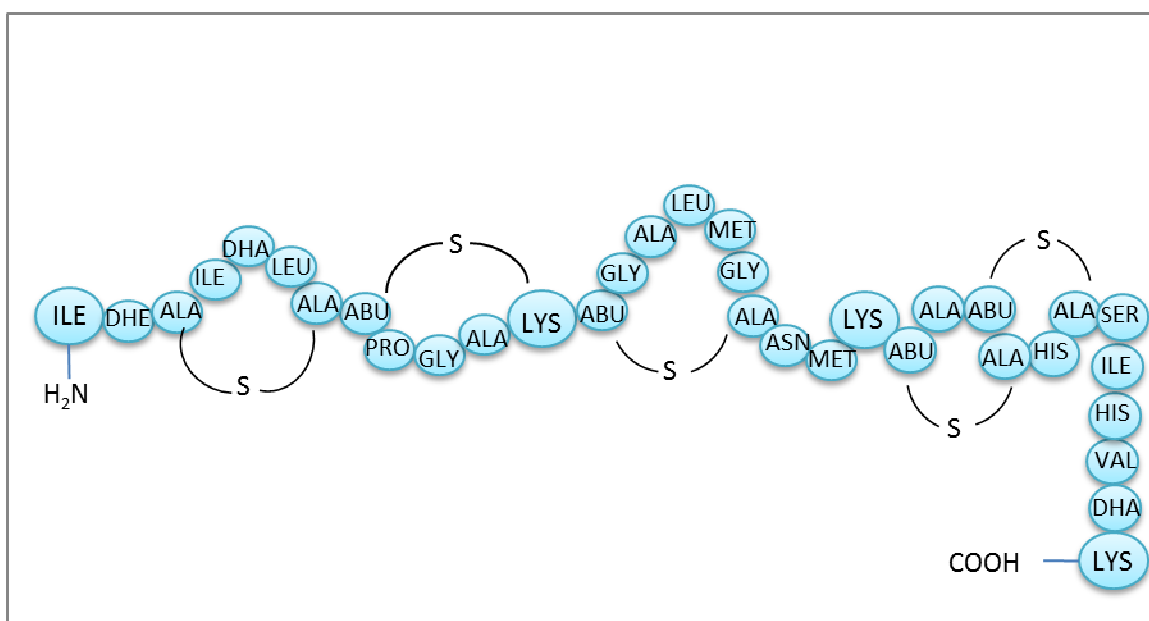
Antimikrobiální látky v polymerní matrici nemusí být nutně pouze sloučeniny Ag, ale mohou být uvedeny také další alternativy. Aditiva bývají tvořena jak organickými tak anorganickými sloučeninami. Pokud v antimikrobiální látce se nacházejí anorganické sloučeniny, zahrnují kovové biocidy, u nichž je typickým příkladem kromě stříbra také zinek. Mezi organické složky se pak řadí chitosan, fenolové sloučeniny, alkoholy, aminy, minerální sloučeniny (ionty kovů, oxidů) aj. [30, 40].

4 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY NA BÁZI NISINU

V této kapitole je řešena problematika týkající se nisinu jako antimikrobiální látky využívající se především v potravinářském průmyslu. Přesto novými studiemi lze brát v potaz, že využití tohoto peptidu bude i jako antimikrobiální činidlo na polymerních površích popř. pro léčbu tumorů. V dalších částech kapitoly jsou vyobrazeny podobné struktury využívající se jako antimikrobiální látky.

Nisin

Nisin je znám poměrně krátkou dobu. Nicméně za tento čas je jeden z nejvíce probádaných bakteriocinů. Právě díky jeho vlastnostem je využíván ve více než padesáti zemích světa. Za první badatele, kteří odhalili existenci této látky, jsou považováni Whitehead a Riddet (roku 1933) [41]. Z potravinářského hlediska je tato látka velice potřebným a užitečným antibiotikem. Producentem vzniklé směsi polypeptidů jsou mléčné bakterie rodu *Streptococcus lactis* [42]. Složení nisinu bylo zjištěno pomocí metody papírové chromatografie, přičemž se zjistilo, že je tvořen 34 opakujícími se aminokyselinovými zbytky (glycin, alanin, valin, leucin, izoleucin, prolin, lysin, kyselinou asparagovou, histidin, methionin a serin). Veškeré aminokyseliny jsou uspořádány do pěti cyklických struktur, propojených thioetherovými můstky (viz. Obrázek 7) [41, 43].



Obrázek 7 Struktura nisinu

Hlavní využití tohoto peptidu se uplatňuje u konzervace mléčných potravin, kde dovede potlačovat reprodukci klostridií. Osvědčil se také v inhibici rozvoje řady grampozitivních bakterií. Mezi tyto bakterie patří především *Bacillus*, *Clostridium* a *Listerie* [44]. Výjimkou může být takový případ, kdy dochází k jeho smísení spolu s chelatačním činidlem. Zde nedochází pouze k odstranění grampozitivních bakterií, ale také bakterií gramnegativních. V případě spór a účinku nisinu proti nim výsledek není příliš dobrý. Je vědecky prokázáno, že působením zvýšené teploty na dané spóry, dochází k jejich poškození a v tomto okamžiku účinek nisinu výrazně stoupá. Neúčinný je tedy pouze u kvasinek a plísní [43].

Mechanismus účinku proti mikroorganismům spočívá v narušování cytoplazmatické membrány, vpravením účinných molekul nisinu. Tímto krokem dochází k vytváření pórů, čímž se mění propustnost cytoplazmatické membrány. Následně se eliminuje příjem aminokyselin (AMK), vylučují se z příslušné buňky metabolity, adenosintrifosfát (ATP) a také ionty. Konečným stádiem je buněčná smrt bakterií [45].

Z hlediska vzhledu je bílým krystalickým práškem, dobře rozpustným ve vodných okyselených roztocích, chloroformu a etanolu. Je také poměrně dobrou termostabilní látkou. Lze ho zahřívat do 95 °C. Pokud dochází k jeho zpracování, jeho nejvhodnější hodnota pH se pohybuje od 2 – 4 [41].

Pokud se tento druh bakteriocinu bude nacházet v potravinových produktech, pak musí být označován podle nařízení komise evropské unie pod názvem E 234 [46].

Účinek nisinu v medicíně

V současné době se tento druh antibiotika nevyužívá pouze v odvětví potravinářském, ale začal se poměrně v hojném množství využívat i pro medicínské aplikace.

Předchozí výzkumy prokázaly, že antimikrobiální peptidy jako nisin může adsorbovat na povrchu polymeru a ještě si udržet dostatečnou aktivitu pro potlačení patogenních bakterií. Právě proto vznikají nové preklinické studie zabývající se nisinem jež dokáže tvořit jakousi oporu pro implantabilní materiály, a tím eliminovat nežádoucí účinky spojené s infekcemi v organismu. Výzkumníci zkoumali aplikační techniky nisinu *in vitro*, aby našli metodu, která je nejvíce efektivní a praktická pro použití na biomedicínské implantáty *in vivo*. Především byla zkoumána schopnost nisinu zachovat si svou činnost *in vivo*, když je umístěný

na implantátech v krevních cévách, nebo v horních cestách dýchacích (tracheostomické hadice, katetry z PVC). Jednotlivé zavádění implantátů a testování probíhalo na ponících a ovcích. Bylo zjištěno, že nisinová aktivita na daných implantátech byla udržena po dobu delší než 5 hodin, ale kratších než 1 týden intravenózních katétrů umístěných v krčních žilách ovcí [47].

Budoucí možné uplatnění směřuje i do onkologické terapie. Jeho účinek zjistili vědci Univerzity v Michigenu, kde pracují na výzkumu zpomalení, či úplného zastavení spinocelulárních nádorů v oblasti hlavy a krku. Základ úspěchu spočívá prakticky ve dvou formách. První částí je, že nisin dokáže zpomalit buněčnou proliferaci, nebo buněčnou smrt nádoru pomocí aktivace proteinu nazývaného CHAC1 v nádorových buňkách. U druhého způsobu nisin působí takovým účinkem, kdy vytvoří póry na membráně nádorových buněk, které následně umožňují příliv vápníku a následného usmrcení buňky. Nutno ale také zmínit, že tento peptid neaktivuje zdravé buňky, ale jen ty škodlivé [48, 49]. Na následujícím snímku lze vidět působení nisinu na růst nádorů.



Obrázek 8 Snímek srovnávající velikost jednotlivých nádorů bez (nahore) a s účinkem nisinu (dole). Uvedeno v publikaci: „Common food preservative may slow, even stop tumor growth“. [49]

Použitelnost nisinu v praxi

Úřad pro kontrolu potravin a léčiv = FDA (Food and Drug Administration) je vládní agentura Spojených států amerických zabývající se ne jenom léčivy a potravinami, ale také – kosmetikou, doplňky stravy, vakcínacemi, zdravotnickými prostředky aj. Právě tato agentura, jež vznikla v roce 1906, nahlásila nisin jako antimikrobiální látku, kterou lze využívat v potravinářském odvětví. Díky tomuto schválení získal nisin GRAS, což je označení pro takové potraviny, které nejsou považované za nebezpečné pro spotřebitele. Veškeré přídatné látky dodávající se do potravin musí projít schválením FDA. Pokud není schválena odbornými pracovníky ústavu jako nezávadná, pak jí nutno brát jako potenciální látku ohrožující organismus člověka.

Pokud nisin je obsažen v potravinách musí splňovat následující charakteristiky:

- Prodlužování trvanlivosti potravin;
- Účinnost v širokém rozmezí pH;
- Udržování chuti potravin;
- Potlačování G+ bakterií v potravinách.

Množství nisinu v potravinách by neměl překračovat hodnoty 20 – 200 mg/ l roztoku. Hodnota je odvislá od jednotlivých druhů potravin. V současnosti se ale také nisinem zabývá Společný výbor experimentů pro potravinářská aditiva (Joint Experiment Committee on food Additives = JECFA), který vyhodnotil přijatelný denní příjem nisinu od 0 – 33 jednotek/ kg tělesné hmotnosti.

Výbor odborníků z WHO v roce 1969 označili nisin, jako vhodnou přídatnou látku do potravin. Co se týče EU nisin je schválen jako přísada pouze do určitých druhů potravin, přičemž vždy musí být označen na výsledném produktu pod názvem E 234 [50, 51].

Antimikrobiální látka bisin

Látka, která je chemicky velmi podobná nisinu se nazývá bisin. Tímto peptidem začíná zcela nová studie na Univerzitě v Minesotě. Právě zde vyzoroval výzkumný pracovník Daniel O'Sullivan z oddělení potravinářské vědy a výživy tento peptid, jež se získává jako vedlejší produkt z bakterií vyskytujících se v tlustém střevě. Podstata vzniku

spočívá díky bifidobakteriím, které pozbývají části DNA, již nepotřebné ve své kultuře. Jedním z těchto částí je už zmíněné lantibiotikum bisin [52].

Jeho značnou výhodou oproti antimikrobiálním látkám rodu lantibiotik je v tom, že dokáže odstraňovat grampozitivní bakterie typu *E. Coli*, *Salmonela* a *Listeria*. Současná studie spočívá v zjištění, zda může být tato látka využívána zejména jako konzervační přísada v masných, mléčných a vaječných výrobcích. Vzhledem k tomu, že bisin má velmi podobnou chemickou strukturu jako nisin, nebude muset docházet k farmakologickým zkouškám. Jako přirozeně se vyskytující peptid nepředstavuje zdravotní rizika spojená s negativními dopady na lidské zdraví. Pozadu nezůstává ani jako antimikrobiální peptid pro farmaceutický průmysl. Využití bisinu by mohlo vést jako varianta antibiotik pro léčbu bakteriálních infekcí. Důvodem je značný antiadherentní účinek proti bakteriím, a tím vedoucí k eliminaci, až úplnému zabránění tvorbě bakteriálních infekcí (MRSA) [53].

Nutný krok, aby se bisin mohl využívat v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, spočívá ve vytvoření peptidu v laboratorním prostředí. Jelikož negativem tohoto konzervantu je v neschopnosti vytvoření bifidobakterií v jiném prostředí, než ve střevech organismu [52].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

STANOVENÍ CÍLŮ PRÁCE

Polymery jsou velmi využívané složky v nejrůznějších odvětvích. Dokázaly nahradit širokou škálu zdravotnických materiálů – pomůcky pro kontakt s tkání (injekční stříkačky), obalové materiály, či implantáty. Nicméně i tyto materiály se potýkají s negativním působením bakterií, které mohou mít fatální následky pro organismus člověka. Proto se v dnešní době vytváří nejrůznější modifikace, které dokáží toto mikrobiální osídlování odstranit, nebo alespoň co nejvíce eliminovat.

Na základě literární rešerže byly stanoveny tyto cíle v praktické části:

- Vytvořením antimikrobiální polymerní matrice s účinnou látkou nisin;
- Sledování a zhodnocení antimikrobiálního působení této polymerní matrice u jednotlivých druhů bakterií (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*).

5 MATERIÁLY A METODY

Použité materiály

Polymerní matrice byla tvořena polyvinylalkoholem (PVA 8 – 88 od firmy Fluka – Analytical, Česká republika). PVA je jediným z řad vinylových polymerů, který je schopen se rozpustit ve vodě. Jeho rozpustnost je závislá na relativní molekulové hmotnosti a stupni hydrolyzy. Čím je relativní molekulová hmotnost větší, tím rozpustnost tohoto polymeru slábne. Co se týče závislosti PVA na teplotě, je poměrně termostabilní (při 140 °C jsou jeho vlastnosti nezměněny). Až při opakovaných hodnotách zahřívání (160 °C) se jeho zabarvení mění na tmavě hnědou. Pokud se k této teplotě přidá i zvýšený tlak, pak je tvrdou látkou, kterou lze obrábět. Uplatnění získal v průmyslu při výrobě folií, filmů a obalovin. Vzhledem k vnitřní stavbě molekul ho lze také využít pro výrobu syntetických vláken. Základní parametry PVA 8 – 88 jsou vyobrazeny v následující tabulce 3. [54, 55].

Přípravky, využitě pro tvorbu antimikrobiální polymerní matrice, byly následující:

- Nisin – 2,5 % denaturovaná substance z *Lactococcus lactis* (firma Sigma Aldrich, Dánsko)
- 37 % HCl (dodavatel IPL, Uherský Brod)
- PVA 8 – 88 (výrobce Fluka, Sigma Aldrich, Česká republika)

Tabulka 3 Základní hodnoty PVA 8 – 88 použité pro polymerní matrici

Parametry	Hodnoty [jednotka]
Molární hmotnost	67 000 [hm %]
Viskozita (4 % roztoku)	7 – 9 [mPa.s] / 20 °C
Hydrolyza	86,7 – 88,7 [mol %]

Příprava vzorků

Vytvoření PVA filmu bylo provedeno v několika následujících krocích. V prvním kroku bylo naváženo na analytických vahách množství nisinu umístěné ve skleněných kádinkách o hmotnosti:

- 0,0025 g;
- 0,005 g;
- 0,008 g;

Což odpovídá koncentraci 0,5; 1 a 1,6 hm % vztaženo na hmotu PVA.

Do jednotlivých navážek byly přidány 2 ml ze zásobního roztoku HCl (0,01 mol) a následně došlo k přefiltrování přes injekční filtr. Tímto krokem se zamezilo nečistotám v roztoku, jež by negativně ovlivňovaly konečné výsledky. K takto přefiltrovaným vzorkům se přidalo 10 ml 5% roztoku PVA 8 – 88 za pomoci analytických vah a celý objem se nechal míchat na míchačce 10 – 15 min. Dalším krokem bylo vložení rozmíchaných vzorků do ultrazvukové lázně, která měla odstranit bublinky tvořící se v roztoku (10 min). Po tomto procesu se daný vzorek přelil do plastové Petriho misky. Konečnou fází bylo uložení takto vzniklých vzorků na 3 dny do inkubátoru při teplotě 30 °C.

Takto vytvořené vzorky posloužily pro následný diluční test, který určil, zda účinnost antimikrobiální látky nisin, je vhodný pro zkoumané kmeny bakterií.

Použité bakteriální kmeny

Byly sledovány dva druhy bakteriálních kmenů. Jednalo se o grampozitivní bakterie – *Staphylococcus aureus* a gramnegativní bakterie – *Escherichia coli*.

Staphylococcus aureus

S. aureus je začleněn do kmene *Staphylococcus*. V medicínské praxi ho lze také nazvat jako tzv. „zlatý stafylokok“. První zmínka o této bakterii sahá do roku 1880, kde byl nalezen Alexandrem Ogstonem v hnisající operační ráně pacienta [56]. I když je známo až čtyřicet druhů Stafylokoka, mezi nejzávažnější patogeny pro lidský organismus se řadí *S. epidermis* a *S.saprophytical*. *S. aureus*. Je grampozitivní bakterie, velikostí (0,1 μm) a tvarem označující kok. Je také fakultativně anaerobní, nepohyblivý, který nedokáže vytvářet

spory. Pokud se tato bakterie nachází na určitém povrchu, může se vyskytovat samostatně nebo ve dvojicích popř. v anomálních shlucích [57].

- **Antigenní struktura *Staphylococcus aureus***

Antigenní stavba této bakterie se skládá z několika částí. Buněčná stěna bakterie je tvořena z peptidoglykanu, kyseliny teichoové a proteinu - A. Peptidoglykan obsahuje na jednotlivých zbytcích N – acetylmuramovétetrapeptidy. Tyto molekuly jsou spojovány vždy pentaglycinovými můstky. Nejpodstatnější částí antigenní účinnosti bakterie je polysacharid – A. Na jeho složení se podílí právě teichoové kyseliny. Jeho funkce spočívá v adhezi na kůži daného organismu. Poslední složkou je protein – A, který je nejvýznamnější bílkovinou. Je obsažen ve většině bakteriálních kmenů. Jeho činností je schopnost reakce s Fc – fragmentem imunoglobulinů, přičemž chrání bakterii před navázáním antimikrobiální látky [58].

- **Patogenita *Staphylococcus aureus***

Více než 20% populace světa dokáže tuto bakterii přenášet, aniž by organismu hrozilo nebezpečí. Tento kmen dokáže dobře splynout s kůží či sliznicemi člověka. Nevytváří žádné nežádoucí účinky do té doby, než dojde ke změně (poruše) odolnosti organismu. V této chvíli může být poměrně nebezpečný pro kůži i vnitřní orgány. Dokáže vytvářet zánětlivé onemocnění kůže a orgánů vedoucí k sepsi organismu. Je také nežádoucí v potravinářském průmyslu, z důvodu možného vzniku otravy [58]. K otravám organismu dochází, pokud hodnota koncentrace stafylokoka v potravě činí od 10^5 až 10^7 / g. Samotná otrava vzniká namnožením bakterie s následným vypouštěním vytvořených enterotoxinů. Největší výskyt byl nalezen v cukrářských výrobcích, u nichž se inkubační doba pohybuje v rozmezí 1 – 6 hodiny [56, 59].

Jestliže dojde ke kontaktu bakterie se zánětem, pak se Stafylokok dostává krevním řečištěm do nejrůznějších míst organismu. Tím vznikají tzv. metastatická pyogenní ložiska, která zapříčiňují onemocnění typu – endokarditida, meningitida, absces jakéhokoliv orgánu, či osteomyelitidu [57].

S. aureus je jedním z největších hrozeb nozokomiálních infekcí. Jako příklad lze uvést Spojené státy americké, kde tvoří až 500 000 nákaz u pacientů bez ohledu na nemocniční oddělení. Léčba je poměrně složitá jako i u dalších bakterií z důvodu rezistence na ATB

(Penicilin, Oxacilin). Nejčastější léčba spočívá v užívání betalaktamových, nebo makrolidových (erytromycin) ATB. I když dochází k rezistenci na penicilin, jeho účinek lze zvýšit kombinací s aminoglykosidy [56, 60].

- **kultivace**

Stafylokoky velmi dobře rostou v rozmezí teplot 7 – 46 °C. Optimální hodnoty živné půdy by měly dosahovat pH 4,2 – 9,3. Na agarrech dokáží tvořit kulaté a hladké kolonie se zabarvením do žluta. Jejich růst může zlepšovat také přítomnost soli v 10 – 15 % obsahu. Pokud nemají ve své přítomnosti dostatečné množství kyslíku, využívají pro svou existenci glukózu. Jedná se především o organismy, které využívají ke svému životu organické látky [57, 61].

Escherichia coli

E. coli je dobře známá jako gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Lze konstatovat, že právě tato bakterie získala prvenství ve vypořádání konjugace a také ve výměně genetického materiálu. *E. coli* je produktivní ve zkvašování sacharidů, přičemž dokáže za přítomnosti dostatečného množství vody a plynů tvořit kyseliny typu – mléčné, pyrohroznové, octové a mravenčí. Díky této funkci lze bakterii nacházet jako patogen v nejrůznějších potravinách, popřípadě ve vodě. [58] Je také nazývána jako modelový organismus, jelikož bývá využíván v řadě fyziologických, biochemických a genetických výzkumech [62].

Tento mikrob se vyznačuje velikostí od 1 – 3 μm. Pod mikroskopem bývá vypořádán v jednotlivém seskupení, popř. ve dvojicích za sebou. Jeho pohyb je uskutečňován pomocí peritrichních bičků [60].

- **Patogenita**

Jako podmíněná patogenní bakterie dokáže vytvářet řadu onemocnění, i přes to, že se běžně nachází v gastrointestinálním traktu člověka. Napomáhá především syntéze vitamínů a udržuje celkovou rovnováhu mikroorganismů ve střevní sliznici. Pokud působí patogenně, lze rozdělovat přidružené onemocnění na dva typy [58, 62]:

- **Extraintestinální trakt** – onemocnění močových cest, sepse organismu, infekce ran, hnisavé procesy.

- **Intestinální trakt** – infekce doprovázené průjmy. Toto průjmové onemocnění bývá podmíněno čtyřmi následujícími typy *E. coli*:
 - **Enteropatogenní (EPEC)** – známá především u novorozenců, jež postihuje epiteliální části střev, což má negativní dopad na dehydrataci organismu. U dospívajících a dospělých jedinců nedochází k žádné infekci. S tímto druhem onemocnění se potýkají především v rozvojových zemích, ovšem známy jsou také případy v Evropě.
 - **Enterotoxigenní (ETEC)** – tento druh *E. coli* vyvolává problémy dětem i dospělým. Při vstupu do gastrointestinálního traktu osidluje tenké střevo prostřednictvím proteinových fimbrií. Nejčastější lokalizace ETEC je především v tropickém podnebí (Mexiko, Egypt).
 - **Enteroinvazivní (EIEC)** – u tohoto projevu infekce vykazuje *E. coli* stejný proces patogenity jako *Shigela*. Proces spočívá v zabudování bakterie do buněk organismu, čímž dochází k jejich množení. Dokáží vyvolávat tzv. dyzenterický syndrom.
 - **Enterohemoragické (EHEC)** – tento typ *E. coli* působí patogenním produktem verotoxinem na svalovinu tlustého střeva dětí. Velké nebezpečí spočívá v tzv. hemoragické kolitidě (krvácející zánět tlustého střeva). S tím je spojen hemolyticko – uremický syndrom projevující se poškozováním cévních stěn ledvin. Infekce se často spojuje s kontaminovaným masem.

Antibiotikum lze účinně využít pouze u enterobakteriálních onemocnění. Při průjmovém onemocnění způsobeném *E. coli* nedochází k efektivní léčbě antibiotiky, dochází však pouze k nepatrnému zkrácení doby infekce. I když antibiotika dokáží porušit strukturu bakterie, narušují rovněž běžnou mikroflóru střev. Z nejčastěji využívaných ATB pro mimostřevní onemocnění se řadí - ampicilin, cefalotin, ofloxacin, kotrimoxazol aj. [58].

- **Kultivace**

Enterobakterie osídlují mimo sliznice střev také většinu půd. Pokud jsou tyto bakterie získávány z chorobných materiálů, pak jejich mohou být opouzdřeny. V laboratorních podmínkách vyrůstají na obvyklých živných půdách, nebo na krevním agaru za přítomnosti kyslíku. Vytváří tak málo pravidelné struktury s hladkými okraji. Teplota vhodná k jejich růstu se pohybuje od 10 – 46 °C, přičemž optimum je 37 °C [61].

Testování antimikrobiálních vlastností bakterie

- **Sterilizace**

Sterilizace je nedílnou součástí pracovního postupu v laboratořích, jelikož může docházet ke kontaminacím materiálu a tím i k negativním dopadům na výzkumnou část. Proto se jednotlivé pomůcky před samotnou činností nechávají ať už chemicky, či fyzikálně vysterilizovat. Po potřebné mechanické očištění je lze označovat jako pomůcky sterilní (tj. materiál bez osázení mikroorganismy, včetně spór). Každý tento postup vyžaduje několikahodinovou přípravu před samotným použitím. Při práci s materiály typu Petriho misek, zkumavek aj. nelze také opomenout, že důležitost se přikládá na jejich samotnou manipulaci. Jedná se především o zákaz otevírání Petriho misek a zkumavek mimo flow box z důvodu možné kontaminace (vzduch) odlišnými mikroorganismy.

V této práci musely být výše uvedené pomůcky vysterilizovány pomocí autoklávu a horkovzdušnou sterilizací za požadovaných teplot. Skleněné zkumavky a Petriho misky se nechaly 2 h sterilizovat při 170 °C. Látky Nutrient Broth a demiH₂O prošly autoklávovacím procesem při teplotě 150 – 160 °C po dobu 2 h.

- **Příprava kolonie *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli***

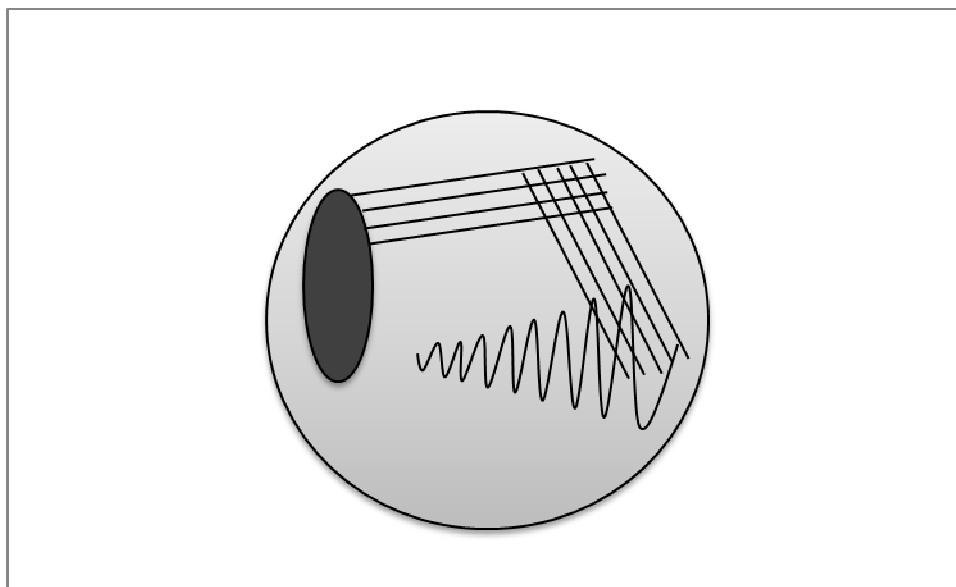
Před samotným testováním byla vypěstována zcela nová kolonie Stafylokoka a *E. coli*. Nápomocny tomu byly předešlé kolonie:

- *Staphylococcus aureus* – CCA 4516 (5x) (Česká sbírka mikroorganismů, Brno)
- *Escherichia coli* – CCM 4517 (6x) (Česká sbírka mikroorganismů, Brno)

Poté se nechaly vzniklé kolonie inkubovat 1 den při teplotě 37 °C.

Principem tvorby nové bakteriální kolonie byla metoda křížového roztěru. Na samotném začátku bylo nutno vysterilizovat 3 kličky plamenem (žhání). Jedna z takto opracovaných kliček se používá na odběr původní kolonie, přičemž do nové Petriho misky s vytvořeným agarem se nanese bakterie v podobě oválné pecky. Následně byla využita druhá sterilní klička pro roztěr rovnoběžných čar vycházejících z vytvořené pecky na agaru. Třetí klička se také využila na tvorbu dalších čar, které jsou kolmé na předchozí čáry osázené bakterií. Posledním krokem bylo vytvoření klikaté čáry procházející posledními čarami, ze které byly odebrány bakterie pro testování. (Obrázek 9) Správnost postupu se zjistí

po denní inkubaci, kdy na jednotlivých nakultivovaných částech vznikají nové linie bakterie.



Obrázek 9 Postup křížového roztěru

- **Příprava polymerních matic**

Za pomoci analytických vah byla každá koncentrace polymerní matrice nastřížena o hmotnosti cca 0,2 g na tenké pásky. Přesné navážky lze vidět v následující Tabulce 4 a 5:

Tabulka 4 Navážky přesného množství polymerní matrice SA

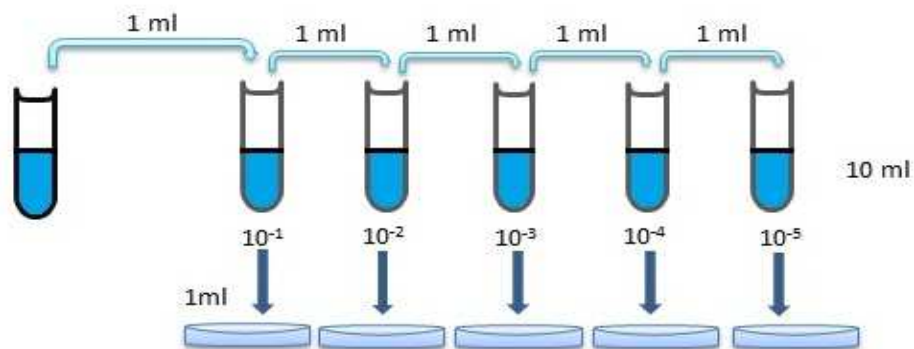
Koncentrace nisinu	0,5 [hm. %]	1 [hm. %]	1,6 [hm. %]
Navážka 1 [g]	0,2178	0,2080	0,2085
Navážka 2 [g]	0,2022	0,2085	0,2170
Navážka 3 [g]	0,2205	0,2246	0,2070

Tabulka 5 Navážky přesného množství polymerní matrice *E. Coli*

Koncentrace nisinu	0,5 [hm. %]	1 [hm. %]	1,6 [hm. %]
Navážka 1 [g]	0,2181	0,2040	0,2263
Navážka 2 [g]	0,2144	0,2086	0,2086
Navážka 3 [g]	0,2078	0,2214	0,2091

- **Diluční test**

Testy byly prováděny v prostředí bakteriální suspenze (10^8 CFU) obsahující Nutrient Broth (výrobce Hi – Media, Mumbai), ke kterému bylo přidáno známé množství polymerního filmu. Tento systém byl následně kultivován po dobu 2 h při teplotě 37 °C. Po kultivaci byly vzorky podrobeny desetinnému měření (viz. Obrázek číslo 10) až ke koncentraci 10^{-7} . Následně byla stanovena a vypočtena hodnota CFU v daných vzorcích (Obrázek 10) po 24 h kultivaci. Vypočtené hodnoty byly pozorovány se slepým pokusem (systém s čistým PVA).



Obrázek 10 Schéma dilučního testu

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pomocí experimentální části byly zjištěny data, která mají prokázat účinnost antimikrobiální látky nisin, přítomné v polymerní matrici o jednotlivých koncentracích a zda jeho účinnost se vztahuje na G- a G+ bakterie.

V následujícím textu jsou prezentovány výsledky, které je nutno chápat spíše jako předběžné. Pro bližší ověření získaných poznatků je nutno provést opakovaná stanovení, které z časových důvodů nebylo možno zahrnout do této práce.

Zhodnocení výsledků pomocí experimentální rovnice

Tato rovnice určuje efektivitu antibakteriální aktivity PVA filmu u jednotlivých vzorků [63]:

$$EAA = \frac{N_o - N_s}{N_o} \cdot 100 [\%] \quad [2]$$

Příčemž:

- N_o – počet přeživších bakterií ve vzorku bez přítomnosti nisinu
- N_s – počet přeživších bakterií s přítomností nisinu

Výsledné počty EAA jsou vyobrazeny v následující tabulce:

Tabulka 6 Vypočtená účinnost EAA z rovnice č. 2 pro různé koncentrace nisinu:

EAA [%]	0,5 hm. %	1 hm. %	1,6 hm. %
SA	82	99	100
<i>E. coli</i>	59	56	62

Následující rovnice se využívá jako matematický model udávající experimentální data [64] :

$$EAA = EAA_{\max} \cdot (1 - e^{-kc}) \quad [3]$$

Příčemž:

- EAA_{\max} – maximální účinnost antimikrobiální látky nisin [%]

- K – konstanta účinnosti [g/ mg]
- EEA – účinnost antibakteriální aktivity použitých vzorků [%]
- c – koncentrace nisinu [mg/ g]

Rovnice EEA udává účinnost antimikrobiální aktivity použitých vzorků, která se má blížit 100%. Tato hodnota je důležitá pro experimentální praxi z důvodu, jak velký poměr nisinu je nutno dodat do polymerní matrice, aby se celková účinnost blížila 100%.

Účinnost konstanty K je důležitým faktorem pro určení, zda efektivita nisinu je pro jednotlivé bakterie dostatečná, či nikoliv. Je zde uplatnitelné pravidlo, že čím vyšší bude konstanta, tím celková účinnost nisinu bude také větší. Oproti tomu je zřejmé, zda bude konstanta K nižší, i účinnost se snižuje. Efektivnost u G- a G+ bakterií bude proto různá. Konstanta K bude vždy vyšší u grampozitivních bakterií, o čemž se lze přesvědčit v následující tabulce:

Tabulka 7 Vypočtené hodnoty EAA_{max} a K z rovnice č. 3 pro testované kmeny bakterií

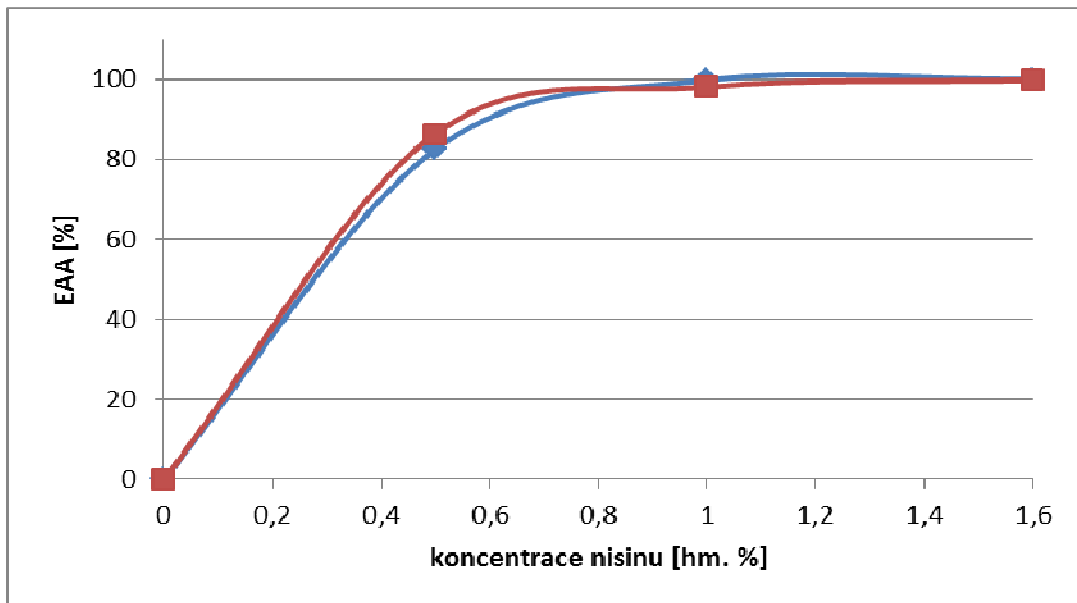
Bakterie	EAA_{max} [%]	K [g/ mg]	R^2
SA	100	0,7	0,998
E. Coli	59	0,2	0,996

Z následující tabulky lze určit, že účinnost EAA_{max} a konstanta K bude pro grampozitivní bakterii vysoká, kdežto efektivita u *E. coli* je téměř o polovinu nižší. Tím je patrné, že stejné množství nisinu obsaženém v polymerní matrici nebylo stejně efektivní. Proto je nutno zvýšit koncentraci nisinu pro bakterii *E. coli*, aby EAA_{max} bylo co nejvíce blížící se 100%. Čili EAA_{max} určuje kolik nisinu je nutno přidat aby efektivita byla co nejvyšší.

Grafické znázornění experimentálních dat

Pomocí experimentální rovnice a zjištěných dat byly sestaveny grafy označující celkovou účinnost antimikrobiální látky nisin v jeho jednotlivých hmotnostech:

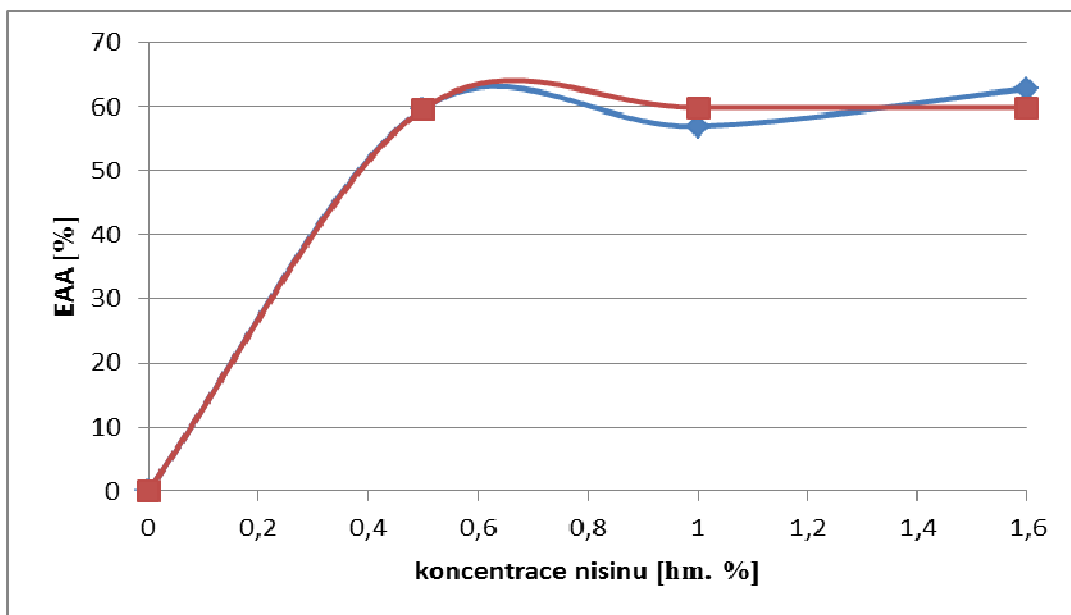
- *Staphylococcus aureus*:



Obrázek 11 Procentuální účinnost nisinu na SA

Jak lze vidět u následujícího grafu, na *Staphylococcus aureus* jakožto grampozitivní bakterii, nisin působí v koncentraci 1,6 hm. % se stoprocentní účinností. Se snižujícím se poměrem hmotnosti efektivita nisinu klesá. Jasným příkladem tomu je koncentrace 0,5 hm. %, kdy efektivita je 82 %.

- *Escherichia coli*:



Obrázek 12 Procentuální účinnost nisinu na *E. coli*

Oproti SA lze zhodnotit, že účinnost nisinu je podstatně nižší. Z vyplývajícího grafu je možno pozorovat efektivitu, která se pohybuje v hodnotách 60 %, což je hodnota, která je až o 40 % nižší oproti účinnosti na SA. U koncentrace 1,6 hm % je účinnost nejvyšší a pohybuje se v hodnotách 62 %.

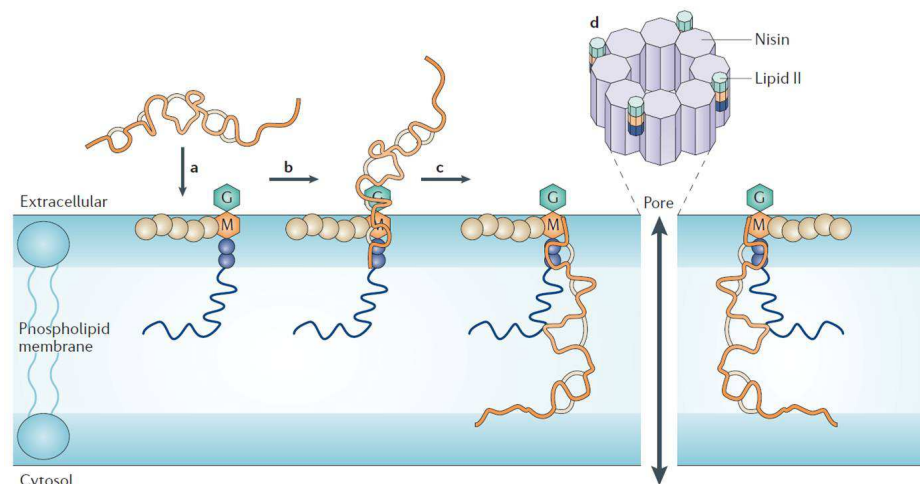
Princip účinnosti nisinu

Na otázku proč je účinnost nisinu větší u grampozitivních bakterií a s ním hodnoty rovnice – K a EEA_{max} , je zodpovězeno především z důvodu rozdílnosti buněčných stěn jednotlivých bakterií. Hlavním faktorem je složitější uspořádání buněčné stěny gramnegativních bakterií oproti bakteriím grampozitivním.

I když SA má silnější buněčnou stěnu tvořenou peptidoglykany, stěna *E. coli* je poměrně složitější (tvořena podílem peptidoglykanů a lipidosacharidy).

Oproti běžným lanthibiotikům, které dokáží působit u G+ bakterií na peptidoglykany, účinek nisinu spočívá v narušování cytoplazmatické membrány za účelem vytvoření pórů pro jeho snadnější proniknutí do buňky.

Jak bylo popsáno v teoretické části 4. 1., nisin funguje na principu rozpoznání peptidoglykanového prekurzoru lipidu (lipid I). Tato antimikrobiální látka pomocí N – konce dokáže reagovat s lipidem II, který následně vytváří póry na buněčné stěně. Poté bez problému nisin proniká do buňky bakterie. Přičemž dochází k eliminaci příjmu AMK a iontů. Tímto způsobem může eliminovat rozmnožování bakterií, nebo jejich plné zahubení (Obrázek 13).



Obrázek 13 Účinnost nisinu na G+ bakterie [65]

V případě účinku nisinu na G- bakterie, není možné tento postup narušení membrány využít. Jev je především podmíněn vyšší odolností k permeabilitě buněčné membrány. U G- bakterií se vnější část vztahuje k cytoplazmatické membráně a peptidoglykanové vrstvě. Tato asymetrická membrána obsahuje v jejím vnitřním obalu glycerolfosfolipidy, přičemž vnější membrána je tvořena lipopolysacharidovými jednotkami. Ty jsou tvořeny z lipidové části a komplexu heteropolysacharidu s aniontovým nábojem. Principem membrány je dosažení těsné vrstvy, jež je tvořena hydrofilním povrchem. Jelikož nebude takto vzniklý povrch propouštět hydrofobní látky, pak ani nisin jakožto hydrofobní molekula nemůže procházet do buněčné struktury [66, 67].

I přes to v dnešní době se vyskytují spisy o nisinu, který dokáže interagovat s chelatačními činidly (např. kyselina etylendiamintetraoctová - EDTA) a tím způsobuje kvalitnější účinek proti G- bakteriím. Působení spočívá v přilnutí EDTA na Mg^{2+} nebo Ca^{2+} , které jsou lokalizovány na buněčné membráně. To má za následek destabilizace membrány, čímž dojde k možnosti přestupu nisinu přes peptidoglykan [68].

ZÁVĚR

Podstatou této bakalářské práce bylo bližší seznámení s bakteriálním osídlováním polymerních povrchů a eliminaci nepříznivých dopadů na lidské zdraví.

Osídlování polymerních biomateriálů je značný problém v oblasti zdravotnictví. Důvodem je dobrá adherence bakterií shluknutých do tzv. biofilmu, oproti bakteriím planktonním. Jak bylo uvedeno v teoretické části, možná odstranění jsou prováděna pomocí změn povrchových energií bez využití chemikálií, inkorporací antimikrobiálních látek do polymeru, popř. zaváděním chemikálií na struktury daného materiálu. I když dosud není vytvořen materiál, který by na povrchu nebyl obsazován bakteriemi, jsou vytvořeny materiály, které se snaží adhezenci značně eliminovat.

Mezi antimikrobiální látky, které jsou efektivní proti jednotlivým bakteriálním kmenům, patří antibiotikum nisin. V této práci byla vyobrazena účinnost nisinu především v odvětví potravinářském kde se vyznačuje jako konzervant označovaný pod názvem E 234. Z toho důvodu bylo v experimentální části zjišťováno, jakým způsobem dokáže nisin působit ve formě (v jednotlivých koncentracích) polymerní matrice na jednotlivé druhy G+ i G- bakterií.

Pomocí dilučního testu bylo zjištěno, že různé koncentrace nisinu inkorporací v PVA filmu působí na bakterie (G+, G-) odlišným účinkem. Podstatou práce bylo nalézt maximální účinnost nisinu v co nejmenším dodávaném množství. O nejvyšší účinnosti lze hovořit u G+ bakterie *Staphylococcus aureus*, kdy množství 1,6 hm % nisinu je dostačující pro rozrušení struktury této bakterie. Naopak u *Escherichia coli* není možno využít tuto koncentraci z důvodu neefektivnosti účinku (60 %).

Nevhodnost použití antimikrobiální látky nisin pro G- bakterie je dáno především buněčnou strukturou, jež se vyznačuje svou hydrofilností. Jelikož nisin je hydrofobní látkou nedokáže přes buněčnou stěnu prostupovat. V tomto případě je pak pro antimikrobiální modifikaci polymerů vhodná kombinace nisinu s chelačním činidlem.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MEISSNER, Bohumil a Václav ZILVAR. *Fyzika polymerů: struktura a vlastnosti po-lymerních materiálů*. 1. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1987, 306 s.
- [2] MLEZIVA, Josef a Jaromír ŠŇUPÁREK. *Polymery: výroba, struktura, vlastnosti a použití*. 2. přeprac. vyd. Praha: Sobotáles, 2000, 537 s. ISBN 8085920727.
- [3] GÄRTNER, Harald. *Kompendium chemie: vzorce, pravidla a principy - úlohy a jejich řešení - periodická soustava prvků - výkladový slovník*. Vyd. 1. Praha: Euro-media Group - Knižní klub, 2007, 542 s. ISBN 978-80-242-2012-3.
- [4] PACÁK, Josef. *Úvod do studia organické chemie*. Vyd.1. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1982.
- [5] BEDNÁŘ, Bohumil, Vrastislav FLEMR a Bohumil KRATOCHVÍL. *Nové materiály: stručná informace o vlastnostech a použití*. Praha: VŠCHT, 1991, 208 s. ISBN 8070800984.
- [6] LYU, SuPing a Darrel UNTEREKER. Degradability of Polymers for Implantable Bio-medical Devices. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2009, roč. 10, č. 9, s. 4033-4065 [cit. 2013-03-21]. ISSN 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms10094033. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/10/9/4033/>
- [7] DAVIS, J. *Handbook of materials for medical devices*. Materials Park, OH: ASM International, 2003, 341 s. ISBN 08-717-0790.
- [8] RAMALINGAM, Murugan, Seeram RAMAKRISHNA a Serena BEST. *Biomaterials and stem cells in regenerative medicine*. Boca Raton, FL: Taylor, 2012, 546 s. ISBN 978-143-9879-252.
- [9] SHALABY, Shalaby W a Karen J BURG. *Absorbable and biodegradable polymers*. Boca Raton: CRC Press, c2004, 289 s. ISBN 0849314844.

- [10] DE MORAES PORTO, Isabel Cristina Celerino. Polymer Biocompatibility. *Polymerization*. InTech, 2012-09-12. DOI: 10.5772/47786.
- [11] ULERY, Bret D., Lakshmi S. NAIR a Cato T. LAURENCIN. Biomedical applications of biodegradable polymers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 2011-06-15, roč. 49, č. 12, s. 832-864. ISSN 08876266. DOI: 10.1002/polb.22259. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/polb.22259>
- [12] HENCH a Julian R. JONES. *Biomaterials, artificial organs and tissue engineering*. Editor Larry L Hench, Julian R Jones. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2005, 284 s. ISBN 18-557-3737-2.
- [13] WYSOCKI, Tomasz, Izabela SACEWICZ, Magdalena WIKTORSKA a Jolanta NIEWIAROWSKA. Atelocollagen as a potential carrier of therapeutics. [online]. 2007, s. 646-654 [cit. 2013-04-17]. ISSN 1732-2693. Dostupné z: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=516082>
- [14] SCHINDLER, Jiří. *Ze života bakterií*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2008, 143 s., [16] s. obr. příl. ISBN 978-80-200-1666-9.
- [15] RULÍK, Martin. *Mikrobiální biofilmy*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011, 447 s. ISBN 978-80-244-2747-8.
- [16] CUNNINGHAM, Alfred B., John E. LENNOX a Rockford J. ROSS. *Biofilms*. [online]. 2001-2010 [cit. 2013-03-20]. Dostupné z: <http://www.hypertextbookshop.com/biofilmbook/v004/r003/contents/chapters/chapter001/section003/green/page001.html>
- [17] ZHANG, Jinwei, Enren ZHANG, Keith SCOTT a J. Grant BURGESS. Enhanced Electricity Production by Use of Reconstituted Artificial Consortia of Estuarine Bacteria Grown as Biofilms. *Environmental Science* [online]. 2012-03-06, roč. 46, č. 5, s. 2984-2992 [cit. 2013-03-21]. ISSN 0013-936x. DOI: 10.1021/es2020007. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es2020007>

- [18] MAHAMI, T. Biofilm-associated infections: public health. *International research journal of microbiology* [online]. 2011, roč. 2, č. 10, s. 375-381. ISSN 2141-5463. Dostupné: <http://interesjournals.org/IRJM/Pdf/2011/November/Mahami%20and%20Adu-Gyamfi.pdf>
- [19] SCHINDLER, Jiří. Mikrobiální biofilm. *Přírodovědecký časopis Vesmír*. [online] 2001, roč. 80, č. 4, s. 203. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <http://www.vesmir.cz/clanek/mikrobialni-biofilm>
- [20] COSTERTON, William, Richard VEEH, Mark SHIRTLIFF, Mark PASMORE, Christopher POST a Garth EHRLICH. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2003-11-15, roč. 112, č. 10, s. 1466-1477 [cit. 2013-05-24]. DOI: 10.1172/JCI20365. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/20365>
- [21] RANDLER, Claudia, Rutger MATTHES, Andrew J MCBAIN, Bernd GIESE, Martin FRAUNHOLZ, Rabea SIETMANN, Thomas KOHLMANN, Nils-Olaf HUBNER a Axel KRAMER. A three-phase in-vitro system for studying *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation upon hydrogel contact lenses. *BMC Microbiology* [online]. 2010, roč. 10, č. 1, s. 282- [cit. 2013-05-24]. DOI: 10.1186/1471-2180-10-282. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/282>
- [22] Biofilm bacteria [online]. *The Marshall Protocol Knowledge Base*. [cit. 2013-03-21]. Dostupné z: <http://mpkb.org/home/pathogenesis/microbiota/biofilm>
- [23] Gram-Negative Bacteria. *Pathogen Profile Dictionary* [online]. 2010 [cit. 2013-03-24]. Dostupné z: <http://www.ppdictionary.com/gnbac.htm>
- [24] SAS, Igor. Nozokomiální infekce a infekce multirezistentními organismy v podmínkách intenzivní péče. *Postgraduální medicína* [online]. 2010, s. 116. ISSN 1212-4184.

- [25] Biofilms and nosocomial infections: a riposte, at last?. *Institut Pasteur* [online]. 2006 [cit. 2013-05-28]. Dostupné: <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/en/press/press-releases/2006/biofilms-and-nosocomial-infections-a-riposte-at-last>
- [26] LANGE-ERNST, Maria-Elisabeth. *Antibiotika: omyly a pravda: šance, rizika, alternativy*. Olomouc: Fontána, 2005, 141 s. ISBN 80-733-6202-3.
- [27] ROSYPAL, Stanislav, Karel HOĐÁK, Theodor MARTINEC a Miloslav KOCUR. *Obecná bakteriologie*. Vyd. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1981.
- [28] BRYERS, James D. Medical biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2008-05-01, roč. 100, č. 1, s. 1-18 [cit. 2013-03-21]. ISSN 00063592. DOI: 10.1002/bit.21838. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.21838>
- [29] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2., přepr. vyd. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 80-868-5000-5.
- [30] YAM, Kit L. *The Wiley encyclopedia of packaging technology*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley, c2009, ix, 1353 p. ISBN 04-700-8704-8.
- [31] SAWAN, Samuel P. a Gurusamy MANIVANNAN. *Antimicrobial/anti-infective materials: principles, applications, and devices*. Lancaster, Pa.: Technomic Pub. Co., c2000, xvi, 346 p. ISBN 15-667-6794-6.
- [32] HVÍZDALOVÁ, Iva. Titosan - antimikrobiální povrch ke zlepšení hygieny v potravinářském průmyslu. [online] *Agro navigátor*. 2011, roč. 91, č. 8, s. 34-37. ISSN 0015-363X. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=154&ch=13&typ=1&val=114419>
- [33] Antibakteriální nátěry. *Johnstone´s* [online]. 2011 [cit. 2013-03-24]. Dostupné z: http://www.johnstones.cz/gallery/katalog_microbarr_anti_bacterial_cz.pdf
- [34] Antibakteriální nátěry. *POLYTEX* [online]. © 2010 [cit. 2013-02-15]. Dostupné z: <http://www.barvy-polytex.cz/antibakterialni-natery/>

- [35] ASADINEZHAD, Ahmad, Igor NOVÁK, Marián LEHOČKÝ, František BÍLEK, Alenka VESEL, Ita JUNKAR, Petr SÁHA a Anton POPELKA. Polysaccharides Coatings on Medical-Grade PVC: A Probe into Surface Characteristics and the Extent of Bacterial Adhesion. *Molecules*. 2010, roč. 15, č. 2, s. 1007-1027. ISSN 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules15021007.
- [36] ASADINEZHAD, Ahmad, Igor NOVÁK, Marián LEHOČKÝ, Vladimír SEDLAŘÍK, Alenka VESEL, Ita JUNKAR, Petr SÁHA a Ivan CHODÁK. A Physicochemical Approach to Render Antibacterial Surfaces on Plasma-Treated Medical-Grade PVC: Irgasan Coating. *Plasma Processes and Polymers*. 2010-06-22, roč. 7, č. 6, s. 504-514. ISSN 16128850. DOI: 10.1002/ppap.200900132.
- [37] BAREŠ, Richard A. *Kompozitní materiály*. Vyd. 1. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1988.
- [38] DALLAS, Panagiotis, Virender K. SHARMA a Radek ZBOŘIL. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: Classification, synthetic paths, applications, and perspectives. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2011, roč. 166, 1-2. DOI: 10.116/j. cis.2011.05.008.
- [39] DAS, A. a R. ALAGIRUSAMY. *Technical textile yarns: industrial and medical applications*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 2010. ISBN 978-184-5695-491.
- [40] FINK, Johannes Karl. *A concise introduction to additives for thermoplastic polymers*. Salem, Mass.: Scrivener Pub., 2010, 267 s. ISBN 978-047-0609-552.
- [41] DOLEŽÁLEK, Jiří. *Mikrobiologie mlékárenského a tukařského průmyslu*. Vyd. 1. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1962, 545 s.
- [42] VODRÁŽKA, Zdeněk, Blanka KRÁLOVÁ a Vladislav ŠÍCHO. *Potravinářská biochemie*. 2., dopl a přeprac. vyd. Praha: SNTL, 1981, 360 s.

- [43] BLACKBURG a Beth P. GOLDSTEIN. Léčivo určené k léčbě infekce způsobené multidrogově - rezistentními kmeny stafylokoka, streptokoka nebo enterokoka [patent]. Česká republika. CZ 290578 B6. Uděleno 2002. Zapsáno 1996. Dostupné z: <http://spisy.upv.cz/Patents/FullDocuments/290/290578.pdf>
- [44] STANCOVÁ, Vlasta. Účinnější nisinová antibiotika. *Gate2biotech* [online]. [cit. 2013-03-21]. ISSN 1802-2685. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/ucinnejsi-nisino-va-antibiotika/issn/>
- [45] HANUŠOVÁ, Kristýna a Jaroslav DOBIÁŠ. Obaly s antimikrobní aktivitou. *Packaging: Odborný časopis pro obaly, logistiku a transport*. 2009, roč. 13, č. 2, s. 42-45. Dostupné z: <http://www.packagingcz.cz/magazine/packaging0209/WebSearch/page0043.html>
- [46] EU. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 257/2010. In: 2010. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:080:0019:0027:CS:PDF>
- [47] BOWER, C.K, J.E. PARKER, A.Z. HIGGINS, M.E. OEST, J.T. WILSON, B.A. VALENTINE, M.K. BOTHWELL a J. MCGUIRE. Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion: in vitro and in vivo evaluation of nisin-treated implantable materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2002, roč. 25, č. 1, s. 81-90 [cit. 2013-03-21]. ISSN 09277765. DOI: 10.1016/S0927-7765(01)00318-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776501003186>
- [48] JOO, Nam E., Kathryn RITCHIE, Pachiyappan KAMARAJAN, Di MIAO a Yvonne L. KAPILA. Nisin, an apoptogenic bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHAC1. *Cancer Medicine* [online]. 2012, roč. 1, č. 3, s. 295-305 [cit. 2013-03-21]. ISSN 20457634. DOI: 10.1002/cam4.35. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cam4.35>
- [49] BAILEY, Laura. Common food preservative may slow, even stop tumor growth. University of Michigan [online]. 2012 [cit. 2013-03-21]. Dostupné z: <http://www.ns.umich.edu/new/releases/20945-common-food-preservative-may-slow-even-stop-tumor-growth>

- [50] JONES, Eluned, Victoria SALIN a Gary W. WILLIAMS. Nisin and the market for commercial bacteriocins. [online]. 2005 [cit. 2013-05-24]. Dostupné z: <http://afccrc.tamu.edu/publications/PublicationPDFs/CP%2001%2005%20Nisin%20Report.pdf>
- [51] LACROIX, Christophe. *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation*. Oxford, UK: Woodhead, 2010. ISBN 978-184-5696-696.
- [52] SPECHT, Sara. Long Live the King. University of Minnesota [online]. [cit. 2013-03-21]. Dostupné z: http://www.cfans.umn.edu/Solutions/Spring2012/Long_Live_King/index.htm
- [53] Eternal sandwiches - or the end of MRSA?. Notch Communications [online]. 19.8.2011 [cit. 2013-05-24]. Dostupné: <http://www.notchcommunications.co.uk/blog/2011/08/eternal-sandwiches-or-the-end-of-mrsa>
- [54] PECH, Jaroslav. *Výroba plastů*. Vyd. 1. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1977, 164 s.
- [55] SEDLAŘÍK, Vladimír, Tsermaa GALYA, Igor EMRI a Petr SAHA. Structure and conditioning effect on mechanical behavior of poly(vinyl alcohol)/calcium lactate biocomposites. *Polymer Composites*. 2009, roč. 30, č. 8, s. 1158-1165 [cit. 2013-04-30]. DOI: 10.1002/pc.20672.
- [56] LYELL, Alan. Alexander Ogston, micrococci, and Joseph Lister. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 1989, roč. 20, č. 2, s. 302-310 [cit. 2013-04-24]. DOI: /10.1016/S0190-9622(89)70035-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962289700359>
- [57] BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha: Marvil, 1996, 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
- [58] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

- [59] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008, 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1.
- [60] VAŘEJKA, František, Oldřich MRÁZ a Jiří SMOLA. *Speciální veterinární mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1989, 258 s. ISBN 802090042x.
- [61] ROZSYPAL, Stanislav. *Obecná bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1981, 749 s.
- [62] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. české vyd. Praha: Galén, c2005, xv, 654 s. ISBN 80-7262-341-9.
- [63] SEDLAŘÍK, Vladimír, Tsermaa GALYA, Jana SEDLAŘÍKOVÁ, Pavel VALÁŠEK a Petr SÁHA. The effect of preparation temperature on the mechanical and antibacterial properties of poly(vinyl alcohol)/silver nitrate films. *Polymer Degradation and Stability*. 2010, roč. 95, č. 3, s. 399-404 [cit. 2013-05-28]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2009.11.017.
- [64] SEDLARIK, Vladimir, Tsermaa GALYA, Jana SEDLARIKOVA, Pavel VALASEK a Petr SAHA. The Effect of Hydrolysis Degree on the Properties of Antibacterial Polymeric Films Based on Poly(vinyl alcohol) and Zinc Sulphate for Biomedical Applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2010, roč. 21, č. 11, s. 1421-1440 [cit. 2013-05-30]. DOI: 10.1163/092050609X12517858243742.
- [65] KUPIERS, Oscar. SYNMOD. *SYNBIOSAFE* [online]. 2007 [cit. 2013-04-28]. Dostupné z: <http://www.synbiosafe.eu/index.php?page=synmod>
- [66] HELANDER, Ilkka M a Tiina MATTILA-SANDHOLM. Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2000, roč. 60, č. 2-3, s. 153-161 [cit. 2013-05-24]. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00307-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816050000307X>

- [67] ASADINEZHAD, Ahmad, Igor NOVÁK, Marián LEHOCKÝ, Vladimír SEDLAŘÍK, Alenka VESEL, Ita JUNKAR, Petr SÁHA a Ivan CHODÁK. An in vitro bacterial adhesion assessment of surface-modified medical-grade PVC. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010, roč. 77, č. 2, s. 246-256 [cit. 2013-05-28]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.02.006.
- [68] RAHMAN, M. A., M. S. ISLAM a M. M. ALAM. Numerical Solutions of Volterra Integral Equations Using Laguerre Polynomials. *Journal of Scientific Research* [online]. 2012-05-01, roč. 4, č. 2, [cit. 2013-05-09]. DOI: 10.3329/jsr.v4i2.9407. Dostupné z: <http://www.banglajol.info/index.php/JSR/article/view/9407>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PLA	Kyselina mléčná
PGA	Kyselina polyglykolová
PVC	Polyvinylchlorid
PE	Polyethylen
PP	Polypropylen
PTFE	Polytetrafluorethylen
PMMA	Polymethylmetakrylát
PDMS	Polydimethylsiloxan
PET	Polyethylentereftalát
PC	Polykarbonát
SEM	Rastovací elektronová mikroskopie
ATB	Antibiotikum
JIP	Jednotka intenzivní péče
CDC	Centers for Disease Control
Ag	Stříbro
ATP	Adenosintrifosfát
AMK	Aminokyselina
WHO	Světová zdravotnická organizace
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
NaCl	Chlorid sodný
PVA	Polyvinylalkohol
HCl	Kyselina chlorovodíková
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
G+	Gram pozitivní bakterie

G-	Gram negativní bakterie
EPEC	Enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemoragická <i>Escherichia coli</i>
CFU	Počet bakterií tvořící kolonie
JECFA	Joint Experiment Committee on food Additives

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schematické naznačení struktury lineární (a), rozvětvené (b) a zesíťované polymerní struktury.	12
Obrázek 2 Schématické znázornění komplexní struktury biofilmu, která umožňuje jeho šíření po povrchu a zajištění transportu nutrientu	19
Obrázek 3 Detailní zachycení biofilmů pomocí skenovacího elektronového mikroskopu.....	19
Obrázek 4 Patogenní bakterie nacházející se v lidském těle	21
Obrázek 5 Fáze vývoje bakteriálního biofilmu.....	24
Obrázek 6 Modifikace povrchu pomocí mediátoru	28
Obrázek 7 Struktura nisinu	30
Obrázek 8 Snímek srovnávající velikost jednotlivých nádorů bez (nahore) a s účinkem nisinu (dole).	32
Obrázek 9 Postup křížového roztěru.....	43
Obrázek 10 Schéma dilučního testu.....	44
Obrázek 11 Procentuální účinnost nisinu na SA	47
Obrázek 12 Procentuální účinnost nisinu na E. coli	47
Obrázek 13 Účinnost nisinu na G+ bakterie	48

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Příklady syntetických polymerů využívaných v medicínské praxi:	15
Tabulka 2 Přírodní polymery využívané v medicínských aplikacích:	16
Tabulka 3 Základní hodnoty PVA 8 – 88 použité pro polymerní matrici	37
Tabulka 4 Navážky přesného množství polymerní matrice SA.....	43
Tabulka 5 Navážky přesného množství polymerní matrice E. Coli.....	44
Tabulka 6 Vypočtená účinnost EAA z rovnice č. 2 pro různé koncentrace nisinu:.....	45
Tabulka 7 Vypočtené hodnoty EAA_{max} a K z rovnice č. 3 pro testované kmeny bakterií.....	46