

# Depozice metforminu a jeho antimikrobiální vlastnosti

Bc. Štěpán Žídek

---

Diplomová práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Štěpán Žídek  
Osobní číslo: T22640  
Studijní program: N0711A130011 Biomateriály a kosmetika  
Forma studia: Prezenční  
Téma práce: Depozice metforminu a jeho antibakteriální vlastnosti

## Zásady pro vypracování

Cílem práce bude depozice metforminu prostřednictvím vícestupňového fyzikálně-chemického procesu na povrch zvoleného syntetického polymerního materiálu. Takto připravený substrát bude dále charakterizován pomocí dostupných metod na UTB a partnerských institucích.

- Vypracujte literární rešerši na zadané téma.
- Deponujte metformin na povrch syntetického polymerního materiálu.
- Charakterizujte výsledné substráty pomocí měření mezního úhlu smáčení a povrchové energie, FTIR, XPS, SEM.
- Analyzujte antibakteriální vlastnosti připravených povrchů.
- Získané výsledky přehledně zpracujte a kriticky vyhodnoťte s ohledem na aplikační možnosti.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Asadinezhad A., Novák I., Lehocký M., Sedlařík V., Vesel A., Junkar I., Sáha P. and Chodák I.: A Physicochemical Approach to Render Antibacterial Surfaces on Plasma-Treated Medical-Grade PVC: Irgasan Coating, Plasma Processes and Polymers, 7 (2010) 504-514.
- [2] Bílek F., Sulovská K., Lehocký M., Sáha P., Humpolíček P., Mozetič M. and Junkar I.: Preparation of Active Antibacterial LDPE Surface Through Multistep Physicochemical Approach II: Graft Type Effect on Antibacterial Properties, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 102 (2013) 842-848.
- [3] Popelka A., Novák I., Lehocký M., Bílek F., Kleinová A., Mozetič M., Špírková M. and Chodák I.: Antibacterial Treatment of LDPE with Halogen Derivatives via Cold Plasma, Express Polymer Letters, 9 (2015) 402-411.
- [4] Ozaltın, K., Lehocký M., Humpolíček P., Veselá D., Mozetič M., Novák I. and Sáha P.: Preparation of active antibacterial biomaterials based on sparfloxacin, enrofloxacin, and lomefloxacin deposited on polyethylene, Journal of Applied Polymer Science. 135 (2018) 46174 (7pp).
- [5] Habib S., Lehocký M., Veselá D., Humpolíček P., Krupa I. and Popelka A.: Preparation of Progressive Antibacterial LDPE Surface via Active Biomolecule Deposition Approach, Polymers 11 (2019) 1704 (15 pp).

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.**  
Centrum polymerních systémů

Datum zadání diplomové práce: **9. února 2024**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.**  
ředitel ústavu

## PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou 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);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### Prohlašuji,

- že jsem na diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta: Štěpán Žídek

.....  
podpis studenta

## ABSTRAKT

Metformin je perorální antidiabetikum, které se běžně používá pro léčbu *diabetes mellitus* 2. typu především u pacientů s nadváhou. V současné době však není metformin spojován pouze s diabetem jako antihyperglykemické léčivo. Zkoumají se jeho možné příznivé účinky při léčbě dalších onemocnění, jako je rakovina, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění, stejně tak jeho antibakteriální nebo antivirové účinky.

Cílem této diplomové práce je depozice metforminu na povrch zvoleného syntetického polymerního materiálu, následná charakterizace připravených substrátů dostupnými metodami a zjistit, zda má metformin potenciál jakožto antimikrobiální činidlo.

Nejprve byl metformin deponován pomocí víceetapového fyzikálně-chemického procesu na polymerní nosič z nízkohustotního polyethylenu (LDPE). Tento proces zahrnoval ošetření povrchu pomocí plazmového výboje, navázání kyseliny akrylové na povrch a EDC, který umožnil navázání aminových skupin metforminu s povrchovými karboxylovými skupinami. Připravené substráty byly charakterizovány pomocí FTIR, měření mezního kontaktního úhlu a povrchové energie, SEM a XPS. K determinaci antibakteriální aktivity připravených povrchů s deponovaným metforminem byly použity kmeny bakterií *Escherichia coli* (CCM 4517) a *Staphylococcus aureus* (CCM 4516), přičemž samotné testování probíhalo podle norem ČSN ISO 22196 a ČSN EN ISO 20743.

Na základě použitým metod bylo prokázáno, že depozice metforminu na povrch LDPE proběhla úspěšně. Stejně tvrzení ovšem neplatí v případě výsledků z antibakteriálního testu. Z toho totiž vyplývá, že metformin prokazuje pouze minimální antibakteriální aktivitu, vůči použitým bakteriálním kmenům. Jediný vzorek, u kterého se naměřila antibakteriální aktivita byl vzorek s koncentrací deponovaného metforminu  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  vůči bakterii *Escherichia coli*. Ze získaných výsledků se dá tedy konstatovat, že využití metforminu jakožto antibakteriálního činidla se zdá být velmi omezené. Nicméně v době odevzdání této práce nebyly k dispozici výsledky z antibakteriálního testu vzorků s vyšší koncentrací deponovaného metforminu a budou tak předmětem dalšího zkoumání.

Klíčová slova: metformin, antibakteriální aktivita, depozice, víceetapový fyzikálně-chemický proces, *diabetes mellitus* 2. typu

## ABSTRACT

Metformin is an oral antidiabetic drug that is commonly used for treating type 2 diabetes mellitus, especially in overweight patients. However, nowadays, metformin is no longer associated only with diabetes as an antihyperglycemic drug. Its possible beneficial effects in the treatment of other diseases such as cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases, as well as its antibacterial or antiviral effects are being investigated.

The aim of this diploma thesis was to deposit metformin on the surface of a selected synthetic polymer material, further characterize the prepared substrate using available methods and determine whether metformin has potential as an antimicrobial agent.

Firstly, metformin was deposited using physico-chemical multistep process onto a polymeric carrier from low-density polyethylen (LDPE). This process involved treating the surface using plasma, bonding of acrylic acid to the surface and EDC, which binds the surface carboxyl groups with metformin amine groups. The prepared substrates were characterized by FTIR, measuring the limiting contact angle and surface energy, SEM and XPS. The bacterial strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were used to determine the antibacterial activity of the prepared surfaces with deposited metformin, and the testing itself was carried out according to ISO 22196 and ISO 20743 standards.

Based on the used methods, it was shown that the deposition of metformin on the LDPE surface was successful. However, the same statement is not true for the results from the antibacterial test. This determined that metformin shows only minimal antibacterial activity against the bacterial strains used. The only sample for which antibacterial activity was recorded was a sample with a deposited metformin concentration of  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  against *Escherichia coli*. Thus, from the results obtained, it can be concluded that the use of metformin as an antibacterial agent appears to be very limited. However, at the time of submission of this thesis, results from the antibacterial test of samples with higher concentrations of deposited metformin were not available and thus will be subject of further investigation.

Keywords: metformin, antibacterial activity, deposition, multistep physical-chemical process, 2. type *diabetes mellitus*

Tímto bych rád poděkoval vedoucímu své diplomové práce doc. Ing. Mariánu Lehockému, Ph.D. za vstřícný přístup a předání cenných rad a informací k danému tématu. Dále bych rád poděkoval Ing. Kateřině Štěpánkové, Ph.D., Ing. Haně Pištěkové, Ph.D. a kolektivu z laboratoře mikrobiologie na CPS a pracovníkům Ústavu fyziky a technologií plazmatu Masarykovy univerzity v Brně, zejména pak RNDr. Monice Stupavské, Ph.D. za pomoc při vypracování praktické části.

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

# OBSAH

ÚVOD .....	10
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>1 METFORMIN .....</b>	<b>12</b>
1.1 PŘÍPRAVA METFORMINU .....	13
1.2 MECHANISMUS PŮSOBENÍ.....	15
1.2.1 <i>Diabetes mellitus</i> 2. typu.....	15
1.2.2 Nežádoucí účinky metforminu .....	16
1.3 DALŠÍ VYUŽITÍ METFORMINU .....	16
1.3.1 Tlumení příznaků stárnutí .....	17
1.3.2 Další nediabetické klinické aplikace .....	17
1.3.3 Metformin jako antimikrobiální činidlo .....	17
1.4 DERIVÁTY METFORMINU .....	18
1.4.1 Metformin hydrochlorid.....	18
1.4.2 Sulfenamidové a sulfonamidové deriváty .....	18
1.4.3 Phenformin .....	19
1.4.4 Imeglimin .....	19
<b>2 ANTIMIKROBIÁLNÍ VLASTNOSTI METFORMINU .....</b>	<b>20</b>
2.1 ANTIMIKROBIÁLNÍ VLASTNOSTI LÉČIV .....	20
2.1.1 Klasifikace antimikrobiálních léčiv .....	20
2.1.2 Mechanismus účinku antibakteriálních léčiv .....	21
2.1.3 Interakce antibakteriálních léčiv .....	22
2.1.4 Antimikrobiální rezistence .....	23
2.2 ANTIBAKTERIÁLNÍ VLASTNOSTI BIGUANIDŮ .....	24
2.2.1 Chlorhexidin.....	25
2.2.2 Alexidin.....	26
2.2.3 Picloxydin .....	27
2.2.4 Polymerní biguanidy.....	27
2.2.5 Antidiabetická léčiva na bázi metforminu .....	28
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>30</b>
<b>3 CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>31</b>
<b>4 MATERIÁLY A ZAŘÍZENÍ .....</b>	<b>32</b>
4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	32
4.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	32
<b>5 DEPOZICE METFORMINU .....</b>	<b>34</b>
<b>6 CHARAKTERIZACE SUBSTRÁTŮ .....</b>	<b>36</b>
6.1 INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE S FOURIEROVOU TRANSFORMACÍ (FTIR) .....	36
6.2 MEZNÍ ÚHEL SMÁČENÍ A POVRCHOVÁ ENERGIE.....	38



6.3	SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE (SEM).....	40
6.4	RENTGENOVÁ FOTOELEKTRONOVÁ SPEKTROSKOPIE (XPS).....	42
6.5	TEST ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY .....	44
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>47</b>
7.1	INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE S FOURIEROVOU TRANSFORMACÍ.....	47
7.2	MEZNÍ ÚHEL SMÁČENÍ A POVRCHOVÁ ENERGIE.....	50
7.3	SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE.....	52
7.4	RENTGENOVÁ FOTOELEKTRONOVÁ SPEKTROSKOPIE .....	56
7.5	TEST ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY .....	58
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>61</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>63</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>71</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>73</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>75</b>

## ÚVOD

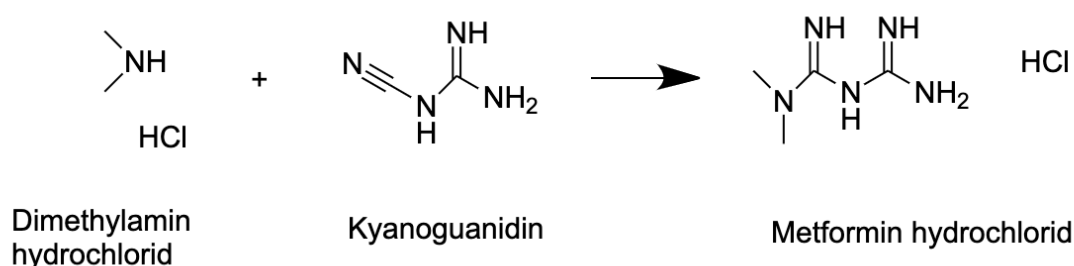
Rezistence vůči antimikrobiálnímu působení léčiv je závažným celosvětovým problémem, který ohrožuje léčbu bakteriálních, virových, plísňových nebo parazitárních infekcí. Příčinou je především nadměrné užívání antibiotik a pomalý vývoj nových antimikrobiálních léčiv. Zavedení nových léků nebo nových kombinací léčiv však přináší naději v boji proti vzniku rezistence u vážných infekčních onemocnění. Jedním z potenciálních řešení je koncept zvrácení rezistence pomocí látek, které nepatří do skupiny antibiotik, pro navrácení původní citlivosti rezistentních mikroorganismů na klasická antibiotika. Dalším možným řešením by bylo přímé omezení využívání současných účinných antibiotik na případy, kdy je to skutečně nutné. To se však dlouhodobě nedaří, a proto je vývoj nových látek s antibakteriálními účinky nezbytný. Stejně tak, je třeba zvážit, zda nevyužít antibakteriální potenciál látek, které již známe a používáme je primárně k jiným účelům.

Tato práce zkoumá antimikrobiální potenciál antihyperglykemického léčiva metforminu. Metformin je antidiabetické léčivo z třídy biguanidů a v současnosti je lékem první volby při boji s *diabetes mellitus* 2. typu. V posledních letech však roste zájem o metformin z hlediska jeho pozitivních účinků při léčbě dalších onemocněních jako jsou rakovina, kardiovaskulární, neurodegenerativní nebo právě zánětlivá onemocnění. Nutno dodat, že vedlejší účinky metforminu jsou velmi omezené a mnohé z nich jsou i žádoucí, např. efekt snižování tělesné hmotnosti u pacientů s nadváhou.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 METFORMIN

Metformin, nebo-li též 1,1-dimethylbiguanid je perorální antidiabetikum patřící do třídy biguanidů, které se běžně používá k léčbě *diabetes mellitus* 2. typu (DM2T), především u pacientů s nadváhou a normální funkcí ledvin [1]. Jedná se o vysoce bazickou molekulu, která byla poprvé syntetizována v roce 1922 z hydrochloridu dimethylaminu a kyanoguanidinu zahříváním (viz Obrázek 1). V roce 1958 byl metformin klinicky zaveden jako antidiabetikum ve Velké Británii a v roce 1995 byl schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv Spojených států amerických [2].



Obrázek 1 Syntéza metforminu (vytvořeno v ChemDraw) [3]

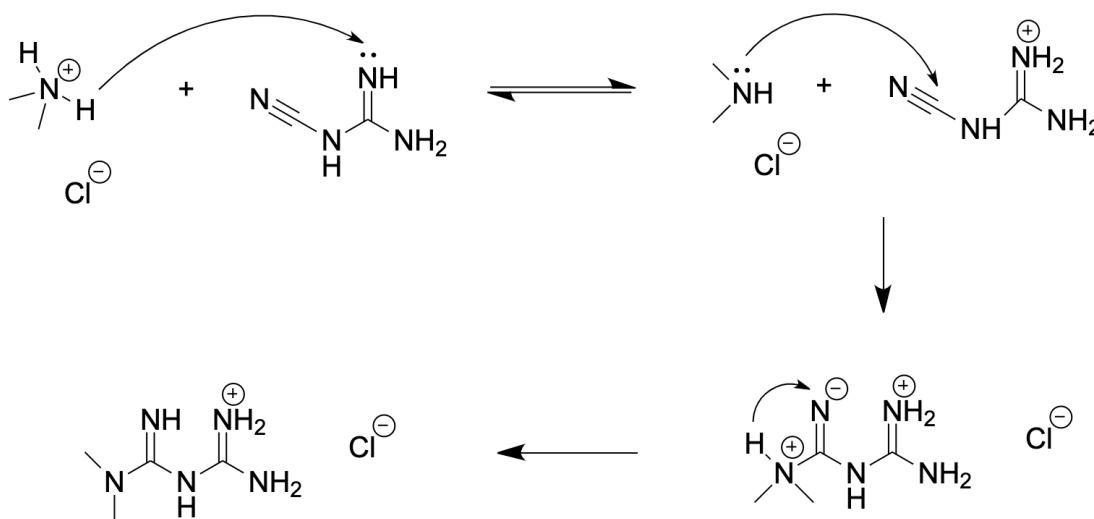
Metformin má postranní řetězec složený ze dvou guanidinových skupin a jedné methylové skupiny. Jedná se tedy o velmi stabilní molekulu, která nereaguje snadno s jinými látkami, a navíc má nízký potenciál vázat se na plazmatické bílkoviny a nízkou lipofilitu. Při fyziologickém pH se vyskytuje hlavně ve formě kationtu (> 99,9 %) a má hydrofilní charakter, který brání jeho propouštění přes lipidové membrány. Proto je jeho pasivní difúze přes buněčnou membránu značně omezená a jeho distribuce tedy závisí hlavně na tkáňově specifických transportérech [4].

Navzdory tomu, že se jedná o jedno z nejstarších perorálních antidiabetik, tak je metformin i v dnešní době první volbou při léčbě DM2T a doporučuje se jej podávat všem nově diagnostikovaným diabetikům ihned po propuknutí onemocnění spolu s dalšími nefarmakologickými opatřeními. Důvodem je kromě jeho nízké ceny i možnost kombinace se všemi dostupnými perorálními antidiabetiky, inkretinovými léky i inzuliny a minimální riziko propuknutí nežádoucích účinků [5]. Vysoká obliba aplikace metforminu je spojována s možností jeho užívání, kdy jde o aplikaci jedné tablety perorálně denně, což je pro pacienty vysoce komfortní.

V současnosti už ovšem není metformin spojován pouze s diabetologií jako antihyperglykemické perorální antidiabetikum. Zkoumá se jeho možný pozitivní vliv při léčbě dalších onemocněních jako jsou rakovina, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění, ale také jeho antibakteriální, antivirové nebo antimalarické účinky [1, 4].

### 1.1 Příprava metforminu

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, metformin se běžně připravuje kondenzací hydrochloridu dimethylaminu a kyanoguanidinu [3]. Nejprve se hydrochlorid dimethylaminu deprotonuje kyanoguanidinem za vzniku guanidinového kationtu (viz Obrázek 2). Dusík dimethylaminu má tak k dispozici volný elektronový pár pro nukleofilní reakci s elektrofilním nitrilovým uhlíkem. Přenosem protonu následně vzniká konečná sůl metforminu [6].



Obrázek 2 Kondenzace hydrochloridu dimethylaminu a kyanoguanidinu  
(vytvořeno v ChemDraw) [6]

Tato reakce se obvykle provádí při vysoké teplotě v uhlovodíkových nebo alkoholových rozpouštědlech. Při použití tohoto postupu se musí brát v úvahu následné odstranění rozpouštědla, aby byla zajištěna čistota konečného produktu, a také bezpečnostní hlediska týkající se ochrany před hořlavými organickými rozpouštědly. Zbytková množství rozpouštědla však nelze z konečného produktu zcela odstranit, což je z toxikologického hlediska klíčové. Je proto žádoucí, aby reakce neprobíhala za přítomnosti organických rozpouštědel.

Vhodnější a bezpečnější metodou je smíchání hydrochloridu dimethylaminu a kyanoguanidinu (reaktanty) s vlhkým hydrochloridem metforminu (produkt) v poměru 1 : 1 až 1,3 : 1-3. Reakce probíhá za teplot nižších než 150 °C. Avšak přidavek hydrochloridu metforminu k reaktantům alespoň v ekvimolárním poměru vyžaduje větší rozměry reaktoru, zvýšený příkon energie a snižuje výstup reakčního produktu ve srovnání s reaktanty. Dále může metformin přiváděný do reakce při zahřívání reakční směsi podléhat degradaci, což vede ke zvýšenému obsahu nečistot obsažených v konečném produktu, které musí být po reakci odstraněny. V neposlední řadě se kromě zvýšených nákladů rovněž významně prodlužuje celá doba reakce.

Optimální postup přípravy metforminu by tedy neměl zahrnovat použití organických rozpouštědel a vyžadovat přidavek hydrochloridu metforminu v ekvimolárním množství. Tohoto postupu bylo dosaženo následujícími kroky: (i) zahřátí směsi hydrochloridu dimethylaminu, kyanoguanidinu a vody v množství od 0 do 20 hm. % a hydrochloridu metforminu v množství od 0 do 50 hm. %, vždy vztaženo na celkovou hmotnost hydrochloridu dimethylaminu a kyanoguanidinu přítomných ve směsi, na teplotu v rozmezí od 70 do 250 °C a udržování teploty v tomto rozmezí po dobu od 0,1 minuty do 20 hodin; (ii) následné ochlazení zreagované směsi a odebrání získaného krystalického hydrochloridu metforminu.

V ideálním případě je směs v průběhu reakce zahřívána minimálně ve dvou stupních. V prvním stupni je zahřívána na teplotu v rozmezí 70 do 120 °C, která se udržuje po určitou dobu, a poté se zahřívá na teplotu v rozmezí od 120 do 250 °C. Kvůli exotermické povaze reakce a procesu krystalizace umožňuje pomalejší nárůst teploty lepší kontrolu nad odvodem tepla z reaktoru. Současně by měly všechny kroky reakce probíhat za konstantního míchání. Výše zmíněný postup popisuje tzv. dávkové zpracování. Tímto termínem se označuje proces, při kterém jsou suroviny smíchány v reaktoru a produkty jsou následně na konci reakce odebrány. Postup přípravy hydrochloridu metforminu může však probíhat také kontinuálně, kdy dochází k nepřetržitému přidávání surovin a odebrání produktu za stejných podmínek, jež byly popsány dříve [3].

## 1.2 Mechanismus působení

Navzdory svému statusu jakožto nejčastěji předepisovaný lék při léčbě DM2T, nejsou mechanismy účinku metforminu na snižování glukózy v krevní plazmě zcela objasněny. Několik studií prokázalo, že metformin účinně zlepšuje udržování glykémie u pacientů s DM2T, a současně díky jeho pozoruhodnému bezpečnostnímu profilu jen výjimečně dochází k hypoglykemii. Antidiabetický účinek metforminu je primárně způsoben inhibicí jaterní glukoneogeneze; mechanismus jeho účinku však zůstává předmětem diskusí [7, 8]. Pro snahu porozumět působení metforminu na snižování hladiny glukózy v krvi, je však třeba nejprve pochopit samotné onemocnění DM2T a jeho příčiny.

### 1.2.1 *Diabetes mellitus 2. typu*

Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je *diabetes mellitus* chronické metabolické onemocnění charakterizované zvýšenou hladinou glukózy v krvi, které časem vede k poškození srdce, cév, očí, ledvin a nervů. DM2T je celosvětově jednou z nejčastějších metabolických poruch a jeho rozvoj je primárně způsoben kombinací dvou hlavních faktorů: nesprávnou sekrecí inzulínu  $\beta$ -buňkami pankreatu a inzulínovou resistencí (IR), tedy omezenou schopností cílových tkání reagovat na inzulín. Inzulín je klíčový anabolický hormon, zodpovědný za regulaci procesu skladování živin. Po příjmu živin dosáhne plazmatická hladina glukózy prahové hodnoty, která stimuluje sekreci inzulínu  $\beta$ -buňkami pankreatu. Za normálních okolností inzulín podporuje příjem sacharidů do klíčových míst a jejich následné skladování. Těmito klíčovými místy jsou tuková tkáň a kosterní svalstvo, v nichž se sacharidy ukládají jako lipidy [9, 10]. Nedostatečná produkce inzulínu pankreatem, nesprávné působení inzulínu nebo kombinace obojího, však vede k následné hyperglykemii, tedy dlouhodobému zvýšení hodnoty glukózy v krevní plazmě [11].

S rozvojem DM2T je také úzce spojena mitochondriální dysfunkce. Mitochondrie jsou buněčné orgány, které využívají uskladněných lipidů k přeměně na energii a jejich snížená funkce je tedy spojena s následným nárůstem ektopického tuku a IR. Jednou z příčin mitochondriální dysfunkce je právě hyperglykémie, která vyvolává nadměrnou tvorbu volných kyslíkových radikálů (ROS) v mitochondriích. Hromadění ROS v mitochondriích je ve skutečnosti jedním z nejvíce diskutovaných jevů, který spojuje mitochondriální dysfunkci s IR [12].

### 1.2.2 Nežádoucí účinky metforminu

Přestože má metformin široké spektrum pozitivních vlivů na lidské tělo, je třeba se zabývat i jeho toxicitou. Nejčastějšími nežádoucími účinky metforminu jsou poruchy gastrointestinálního traktu, jako je průjem, nevolnost, zvracení, plynatost, bolesti břicha a ztráta chuti k jídlu. Tyto nežádoucí účinky jsou pozorovány přibližně u 30 % pacientů a u 5 % pacientů vedou k ukončení léčby. Nežádoucí účinky týkající se GIT však souvisejí především s koncentrací léčiva a jsou přechodné nebo dojde ke snížení intenzity na takovou úroveň, že je pacienti dlouhodobě tolerují. Nežádoucí účinkům lze však předejít především postupným zvyšováním dávky metforminu, která začíná obvykle na 500 mg a až podle tolerance pacienta se postupně zvyšuje (obvykle po 7 až 10 dnech) [4, 13].

Vzácným, ale závažným nežádoucím účinkem metforminu je laktátová acidóza a obvykle se projevuje při chronickém onemocnění ledvin. Termín "laktátová acidóza" se používá k charakterizování přechodně souvisejících příhod acidózy, charakterizované snížením arteriálního pH na méně než 7,35 a hyperlaktatémie, definované jako plazmatická koncentrace laktátu vyšší než  $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Hromadění laktátu může být právě výsledkem působení metforminu na zvýšení cytosolického redoxního potenciálu v jaterních buňkách, který brání využití laktátu pro produkci glukózy. Výskyt laktátové acidózy je ovšem nízký a nemusí být nutně podmíněn podáváním metforminu. Obava z této komplikace bohužel negativně ovlivnila užívání léku, zejména u chronického onemocnění ledvin, které může zhoršit vylučování léku. Další kontraindikace užívání metforminu může být městnavé srdeční selhání a chronické onemocnění jater, které může podporovat hromadění laktátu.

Dlouhodobé užívání metforminu může být také spojeno s biochemickým nedostatkem vitamínu B12, jehož hladina by měla být pravidelně měřena, zejména u pacientů s anémií nebo periferní neuropatií [14, 15].

### 1.3 Další využití metforminu

Inhibice jaterní glukoneogeneze a zvýšení citlivosti buněk na inzulin však nejsou jedinými důvody k aplikaci tohoto léku. V posledních letech je metformin předmětem řady studií týkajících se jeho vlivu na různá nediabetická onemocnění. Jsou zkoumány především jeho benefity při tlumení biologického stárnutí, ale také jeho antimikrobiální nebo antivirové účinky [16, 17]. Některé z těchto studovaných benefitů metforminu jsou shrnuty v následujících kapitolách.



### 1.3.1 Tlumení příznaků stárnutí

Biologické stárnutí je charakterizováno postupnou ztrátou fyziologických funkcí, která je příčinou rozvoje různých chronických onemocnění, včetně metabolických, nádorových, kardiovaskulárních nebo neurodegenerativních poruch. Bylo zjištěno, že metformin zpomaluje stárnutí a má ochranný účinek na zmírnění progresu různých onemocnění souvisejících se stárnutím. Tohoto účinku dosahuje tím, že ovlivňuje klíčové příznaky stárnutí, včetně deregulované detekce živin, ztráty proteostázy, mitochondriální dysfunkce, změněné mezibuněčné komunikace, úbytku telomer, genomové nestability, epigenetických změn, vyčerpání kmenových buněk a buněčné senescence [18, 19].

### 1.3.2 Další nediabetické klinické aplikace

Kromě DM2T našel metformin své místo využití i při léčbě syndromu polycystických ovarií (PCOS), u osob s nealkoholickou jaterní steatohepatitidou (NASH) a nahrazuje také nedostatek bezpečných antiobezitik [17]. PCOS je jednou z nejčastějších endokrinních poruch, která je klinicky charakterizována chronickou anovulací, nadměrnou hladinou androgenů v těle a IR. Stav se vyskytuje u 5 až 10 % žen v reprodukčním věku a přibližně 50 až 70 % pacientek s PCOS je obézní. Ačkoli je pravda, že je účinnost metforminu při léčbě PCOS sporná, tak několik nedávných studií prokázalo, že podávání metforminu zvýšilo koncentraci adiponektinu, což bylo doprovázeno významným zlepšením řady dalších faktorů, jako snížení zánětu a regulace příznaků hyperandrogenismu [20, 21]. Jak už bylo popsáno dříve, hlavním cílovým orgánem metforminu jsou játra. Metformin se až donedávna běžně používal jako lék u osob s NASH, která je silně spojená s celosvětovou epidemií obezity a DM2T. NASH se projevuje zánětem jater, poškozením hepatocytů a zvyšuje riziko vzniku hepatocelulárního karcinomu. V současné době však není metformin doporučován při jakémkoliv onemocnění souvisejícím s nealkoholickým postižením jater. Podle některých nejnovějších výzkumů nejenže metformin nevykazuje žádné významné zlepšení histologického stavu jater, ale také zhoršuje zánět [16, 22].

### 1.3.3 Metformin jako antimikrobiální činidlo

Nedávno popsané antimikrobiální vlastnosti metforminu vedly ke zvýšenému zájmu o jeho roli jakožto nové antimikrobiální látky pro léčbu infekcí nebo obnovení antimikrobiální aktivity již existujících antibiotik proti multirezistentním bakteriím. Antimikrobiální účinky metforminu budou podrobněji popsány v kapitole 2 této práce [23, 24].

## 1.4 Deriváty metforminu

Jelikož už není metformin spojován pouze se svým účinkem jakožto antidiabetikum a roste spektrum jeho využití i v rámci jiných oblastí, tak roste i snaha o modifikace a derivatizace metforminu, které vedou k vyšší účinnosti nebo rozšiřují možnosti použití metforminu. Nové pokročilé deriváty metforminu by mohly být jak účinnější pro léčbu jednotlivých onemocnění, tak i prospěšné pro pohodlí pacienta. V této kapitole jsou shrnuty nejvýznamnější deriváty metforminu a jejich potenciál pro budoucí výzkum. V literatuře jsou však popsány i další deriváty. Rozsah této práce však nedovoluje jejich plný výčet, který by byl doplněn jejich vlastnostmi, neboť nejsou z pohledu antibakteriálních vlastností podstatné.

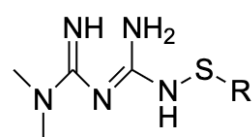
### 1.4.1 Metformin hydrochlorid

Metformin hydrochlorid je v současnosti nejznámějším a nejvíce studovaným derivátem metforminu. Je znám také pod zkratkou metformin XR neboli metformin extended release. Už podle názvu je zřejmá hlavní výhoda tohoto derivátu oproti čisté formě metforminu. Složení XR bylo totiž navrženo tak, aby umožňovalo pozvolnější uvolňování léčiva v hlavním místě absorpce, tj. v horní části gastrointestinálního traktu, čímž se zlepšuje jeho snášenlivost. Díky pozvolnějšímu uvolňování je také komfortnější pro pacienta, a to díky snížené frekvenci podávání léku a výskytu nežádoucích účinků. Nedávné studie sice prokazují, že rozdíl v efektivnosti metforminu a metforminu XR není statisticky významný, ale zároveň potvrzují, že v případě metforminu XR docházelo ke značnému snížení příznaků dyspepsie, tedy trávicích potíží, které se objevují především při chorobách gastrointestinálního traktu [25, 26]. Metformin XR představuje též zvýšený komfort pacienta při jeho administraci. Je totiž podávána jen jedna tableta denně na rozdíl od metforminu, kde je dávkování dvakrát denně.

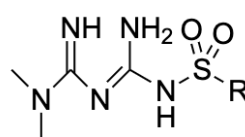
### 1.4.2 Sulfenamidové a sulfonamidové deriváty

Sulfenamidové deriváty byly prvními popsanými deriváty metforminu, které byly připraveny připojením cyklohexylové a fenylové skupiny k základní aminoskupině metforminu prostřednictvím SN-vazby (viz Obrázek 3). Zjistilo se, že především cyklohexyl-sulfenamidový derivát se rychle hromadí v erytrocytech, a poté se pomalu uvolňuje metformin zpět do krevní plazmy. Jednalo se tedy o první formu metforminu s pozvolnějším uvolňováním [27].

Sulfonamidové léky se již dlouhou dobu používají k léčbě různých komplexních onemocnění. Původně byly sulfonamidy vyvinuty jako látky s antibakteriálním účinkem, následně byly používány jako diuretika a protizánětlivé látky. Chemickou strukturu sulfonamidových derivátů můžeme rovněž vidět na Obrázku 3. Léčiva na bázi sulfonamidů byla také široce studována pro své protinádorové, antikonvulzivní, protiplísňové, antioxidantní nebo antidiabetické účinky. Proto má kombinace sulfonamidové struktury s metforminem velký potenciál zvýšit jeho multifunkční vlastnosti a efektivněji léčit různá komplexní onemocnění [27].



Sulfenamidové deriváty  
metforminu



Sulfonamidové deriváty  
metforminu

Obrázek 3 Chemická struktura sulfenamidových a sulfonamidových derivátů metforminu  
(vytvořeno v ChemDraw) [27]

### 1.4.3 Phenformin

Phenformin je další antidiabetický lék ze skupiny biguanidů, který se dříve hojně používal, ale byl omezen kvůli zvýšenému riziku laktátové acidózy. Metformin nahradil phenformin jako první volba pro léčbu DM2T právě díky nízkému riziku tohoto závažného nežádoucího účinku. Nedávné studie ovšem naznačují, že by phenformin mohl v budoucnu hrát významnou roli jako protinádorový a protizánětlivý lék [28, 29].

### 1.4.4 Imeglimin

Imeglimin je novinkou na trhu mezi antidiabetickými léčivy, a ačkoliv se nejedná o biguanid, tak sdílí s metforminem chemickou funkční skupinu. Je prvním z nové třídy léčivých přípravků pro DM2T, které se zaměřují na bioenergetiku mitochondrií, čímž zmírňují inzulinovou rezistenci a zlepšují funkci  $\beta$ -buněk. Kromě toho imeglimin snižuje produkci kyslíkových radikálů a zlepšuje funkci mitochondrií a endoplazmatického retikula, které jsou důležité pro syntézu, modifikaci a transport bílkovin [30, 31].

## 2 ANTIMIKROBIÁLNÍ VLASTNOSTI METFORMINU

Velká řada nedávných studií prokázala, že metformin vykazuje antibakteriální vlastnosti, jak vůči grampozitivním, tak gramnegativním bakteriím. Roste tedy zájem o jeho využití jakožto nové antimikrobiální látky pro léčbu infekcí nebo obnovení antimikrobiální aktivity již existujících antibiotik proti multirezistentním bakteriím [23, 24]. Nejprve je ovšem nutné si popsat obecné vlastnosti antimikrobiálních látek a uvést se do problematiky působení antimikrobiálních léčiv.

### 2.1 Antimikrobiální vlastnosti léčiv

Antimikrobiální léčiva využívají rozdílů ve struktuře a biochemických funkcích hostitelské buňky a parazita. Výrazné strukturní a biochemické rozdíly mezi prokaryotickými a eukaryotickými buňkami dávají antimikrobiálním látkám větší možnosti selektivní toxicity vůči bakteriím než vůči jiným mikroorganismům, jako jsou houby nebo viry [32].

#### 2.1.1 Klasifikace antimikrobiálních léčiv

Antimikrobiální léčiva lze klasifikovat různými způsoby na základě čtyř základních znaků: druhu mikroorganismu, typu bakterie, zda je účinek léčiva bakteriostatický či baktericidní a zda je účinek léčiva časově- nebo koncentračně-dependentní [32].

Antimikrobiální léčiva se obecně dělí podle druhu mikroorganismu, na který působí na antibakteriální, antimykotická a antivirová. Mnohé látky mají však tzv. širokospektrální účinek, tj. působí na více druhů mikroorganismů, např. některá širokospektrální antibiotika hrají neocenitelnou roli v léčbě bakteriálních infekcí. Jejich používání má však i některé nevýhody, a to omezenou selekci, šíření rezistence u více druhů bakterií a škodlivý vliv na mikrobiom pacienta. Proto existují i léky s úzkým spektrem účinku, která inhibují pouze grampozitivní nebo gramnegativní bakterie, zatímco širokospektrální léčiva zasahují jak grampozitivní a gramnegativní bakterie, tak houby, viry nebo protozoa. Toto rozlišení však není vždy absolutní, protože některé látky mohou být účinné především proti grampozitivním bakteriím, ale mohou působit i na některé gramnegativní bakterie [32, 33].

Podle výsledného působení látky na bakteriální buňku můžeme antibakteriální látky na bakteriostatické, které zabraňují růstu nebo množení patogenu a baktericidní které usmrcují patogen. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je potom nejnižší koncentrace látky potřebná k zabránění růstu patogenu. Naproti tomu minimální baktericidní koncentrace (MBC) je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky potřebná k usmrcení patogenu [32].

Antimikrobiální látky jsou často klasifikovány jako časově- nebo koncentračně-dependentní látky v závislosti na jejich farmakodynamických vlastnostech. Časově-dependentní léčiva jsou neúčinnější, pokud koncentrace léčiva zůstává po delší dobu kolem hodnoty MIC. Naproti tomu koncentračně-dependentní léčiva jsou neúčinnější, když koncentrace léčiva překročí MIC o určitý násobek [32, 34].

### 2.1.2 Mechanismus účinku antibakteriálních léčiv

Podle mechanismu účinku můžeme antibakteriální léčiva rozdělit do čtyř hlavních skupin, a to na látky, které inhibují syntézu buněčné stěny, ovlivňují funkce buněčných membrán nebo inhibují syntézu proteinů a nukleových kyselin. Antibakteriální léčiva, která ovlivňují syntézu buněčné stěny zahrnují  $\beta$ -laktamy (penicilíny, cefalosporiny), bacitracin nebo glykopeptidy. Poté, co se takové léčivo naváže na specifické proteinové receptory buněčné stěny bakterie, dochází k rozštěpení enzymů transpeptidázy a karboxypeptidázy, čímž se inhibuje proces transpeptidace, tj. stavby buněčné stěny bakterií.

Léčiva, která inhibují syntézu proteinů lze rozdělit do dalších dvou podskupin, a to na ty, která se váží na 30S nebo 50S ribozomální podjednotku. Léčiva vážící se na 30S (aminoglykosidy, tetracyklíny) způsobují chybná spojená mezi kodony a antikodony při proteosyntéze, vedoucí k produkci proteinů se špatnými aminokyselinami nebo zkrácených proteinů. Tyto nesprávně syntetizované proteiny se následně vkládají do cytoplazmatické membrány, což vede k zániku bakteriální buňky. Do skupiny léčiv vážících se na podjednotku 50S patří makrolidová antibiotika (erythromycin, azithromycin) a lynkosamidy (linkomycin, klindamycin). Ačkoliv se strukturně liší, tak makrolidová antibiotika i lynkosamidy mají podobný mechanismus účinku. Obě skupiny inhibují syntézu proteinů tím, že blokují tvorbu peptidových vazeb mezi specifickými aminokyselinami.

Menší skupinu antibakteriálních léčiv tvoří látky, které narušují buněčné membrány bakterií. Polymyxiny se váží na lipopolysacharidovou složku vnější membrány gram-negativních bakterií a v konečném důsledku narušují jak vnější, tak vnitřní buněčnou membránu a usmrcují bakteriální buňku. Cílení na buněčnou membránu však není selektivní a postihuje tudíž i membrány buněk ledvin a nervového systému. Vzhledem k těmto závažným nežádoucím účinkům a špatnému vstřebávání z trávicího traktu se polymyxiny používají spíše v lokálních antibiotických mastech (např. polymyxin B v léčivém přípravku Neosporin). Naproti tomu skupina lipopeptidových léčiv (daptomycin) se zaměřují na gram-pozitivní bakterie, kde narušují cytoplazmatickou membránu bakteriální buňky.

V neposlední řadě mezi antibakteriální léčiva patří ta, která inhibují syntézu nukleových kyselin. Jejich mechanismus účinku je velmi rozmanitý. Některá zasahují přímo do replikace DNA (metronidazol), některá blokují aktivitu RNA polymerázy (rifampin) a některá selektivně inhibují aktivitu DNA gyrázy (fluorochinolony), enzymu, který je odpovědný za správnou replikaci DNA. Výhodou těchto léčiv je to, že enzymy RNA polymerázy u bakterií jsou strukturně odlišné od enzymů u eukaryot, což umožňuje selektivní toxicitu vůči bakteriálním buňkám. Ještě lepší selektivní toxicitou se vyznačují léčiva, která ovlivňují intermediární metabolismus. Patří mezi ně již zmíněné sulfonamidy nebo trimetoprim. Inhibicí enzymu, který se podílí na tvorbě kyseliny dihydrofolové, sulfonamidy blokují bakteriální biosyntézu kyseliny listové a následně pyrimidinů a purinů potřebných pro syntézu nukleových kyselin. Tento mechanismus účinku zajišťuje bakteriostatickou inhibici růstu proti širokému spektru grampozitivních a gramnegativních patogenů. [32, 35, 36].

### 2.1.3 Interakce antibakteriálních léčiv

Znalost mechanismů účinku různých antimikrobiálních látek umožňuje předvídat jejich vzájemné interakce při jejich kombinovaném použití. Kombinace antimikrobiálních léčiv se nejčastěji používají k zajištění širokospektrálního působení při léčbě kriticky nemocných pacientů. Avšak s dostupností širokospektrých antibakteriálních léčiv se kombinace těchto léčiv používají méně často, s výjimkou specifických účelů. Důvodem jsou také obavy týkající se obtížnosti předpovědi účinku kombinace proti konkrétnímu organismu a nejistotu klinické relevance výsledků *in vitro*. Tento účinek je totiž ve většině případů spíše antagonistické než synergické povahy [32].

Interakce mezi antibakteriálními léčivy můžeme tedy obecně rozdělit do třech kategorií: synergismus, antagonismus a indiference. Synergismus nastává tehdy, když je kombinovaný účinek dvou léků větší než součet jejich jednotlivých účinků. Často se s ním setkáváme, když se společně používají dvě léčiva s různými mechanismy účinku, například  $\beta$ -laktamová antibiotika a aminoglykosidy. Naproti tomu antagonismus nastává, když je kombinovaný účinek dvou léčiv menší než účinek jednoho z nich samostatně. K tomu může dojít, když se kombinují léčiva s podobným mechanismem účinku, například dvě  $\beta$ -laktamová antibiotika. Interakce antibakteriálních léčiv je aditivní nebo indiferentní, pokud se účinky kombinovaných léčiv rovnají součtu jejich nezávislých účinků měřených samostatně [37].

#### 2.1.4 Antimikrobiální rezistence

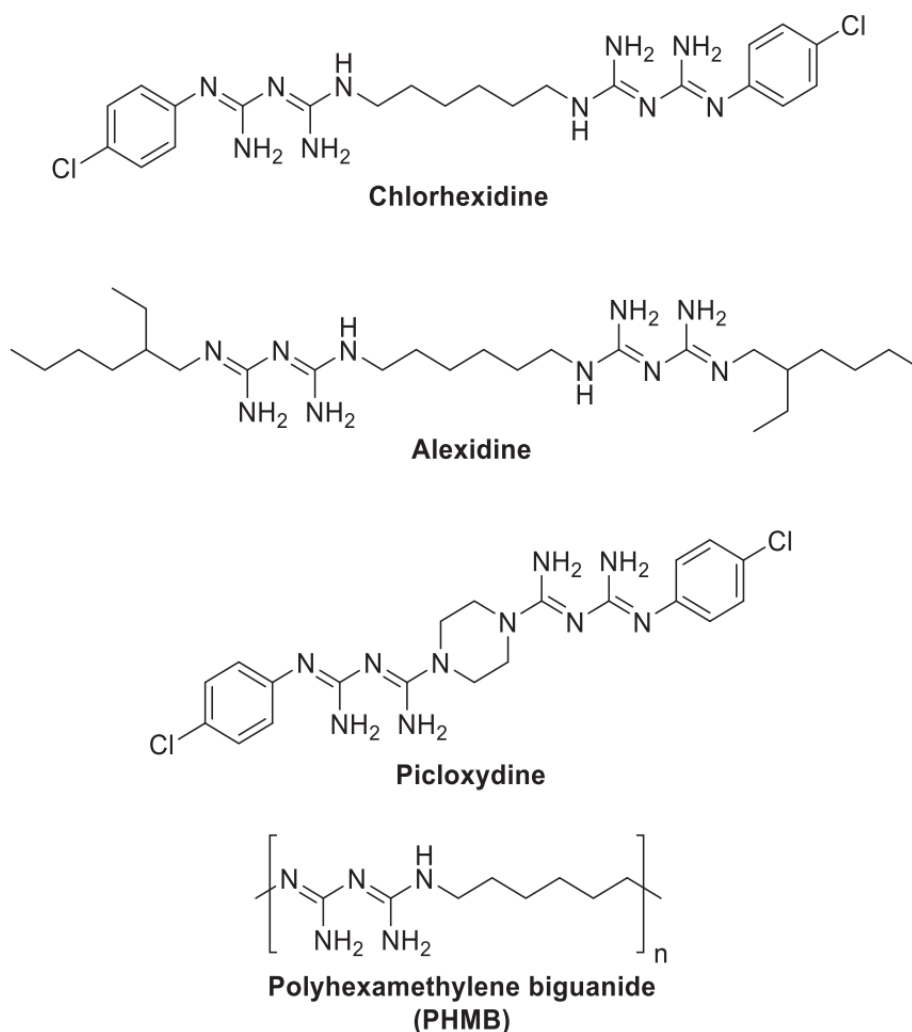
Infekce způsobené kmeny bakterií rezistentními na konvenční antibiotika představují v posledních dekádách stále větší problém. K antimikrobiální rezistenci dochází tehdy, když viry, bakterie, plísňe nebo paraziti nereagují na antimikrobiální léčbu u lidí a zvířat, což umožňuje přežití mikroorganismu v hostiteli. Rychlost, s jakou se u některých bakterií vyvíjí rezistence značně předbíhá pomalý vývoj nových antimikrobiálních léčiv. K odchodu farmaceutických společností z trhu s antimikrobiálními léčivy přispívá několik faktorů, jako jsou složité regulační požadavky, problémy při objevování léčiv a vysoké náklady na vývoj léčiv spolu s nízkou mírou návratnosti investic, kterou antibiotika poskytují ve srovnání s léky pro léčbu chronických onemocnění. Velký problém představují meticilin-rezistentní kmeny stafylokoků a enterokoky rezistentní na vankomycin. Ještě horší je situace u infekcí způsobených některými gramnegativními bakteriemi, jako jsou *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* a *Escherichia coli*, dále rody *Klebsiella* a *Enterobacter*, které jsou občas rezistentní vůči všem antimikrobiálním látkám na trhu [32, 38].

Existuje několik typů antibakteriální rezistence, které můžeme klasifikovat podle jeho mechanismu. Některé bakteriální buňky mají tzv vlastní nebo vrozenou rezistenci, což znamená, že tyto buňky nemají vazebné místo pro specifické antibiotikum, které se tak stává neúčinným. Dále může docházet k enzymatické inhibici nebo inaktivaci antibiotika, snížení intracelulární akumulace antimikrobiální látky pomocí efluxních pump nebo strukturním změnám receptorů pro antimikrobiální látky.

Přístupy při hledání nových antibiotik zahrnují například vývoj analogů stávajících látek; identifikaci nových mechanismů působení na základě biotechnologického přístupu, včetně využití informací získaných ze sekvenování bakteriálního genomu a klonování genů; vývoj antibakteriálních peptidových molekul odvozených z fagocytyjících buněk; kombinace antibakteriálních antibiotik s chemickými látkami vykazující antimikrobiální aktivitu a další [32, 39].

## 2.2 Antibakteriální vlastnosti biguanidů

Biguanidy jsou syntetické chemické sloučeniny odvozené od guanidinu, ve kterých jsou dva guanidinové zbytky spojeny atomem dusíku do vysoce konjugovaného systému. Jedná se o vysoce bazické molekuly, proto jsou k dispozici ve formě solí, většinou hydrochloridových. Biguanidy přitahovaly velkou pozornost již v minulém století a po období útlumu se o ně v posledních letech znovu projevil zájem. Představují významnou třídu terapeutických látek vhodných pro léčbu širokého spektra onemocnění. Terapeutický účinek biguanidů zahrnuje antidiabetické, antimalarické, antivirové a baktericidní působení. V současné době je v USA komerčně dostupných sedm biguanidů a další tři jsou dostupné na jiných národních trzích [40, 41]. Strukturální vzorce nejstudovanějších biguanidů s antimikrobiálními účinky jsou popsány na Obrázku 4.



Obrázek 4 Chemická struktura biguanidů s antimikrobiální aktivitou [41]



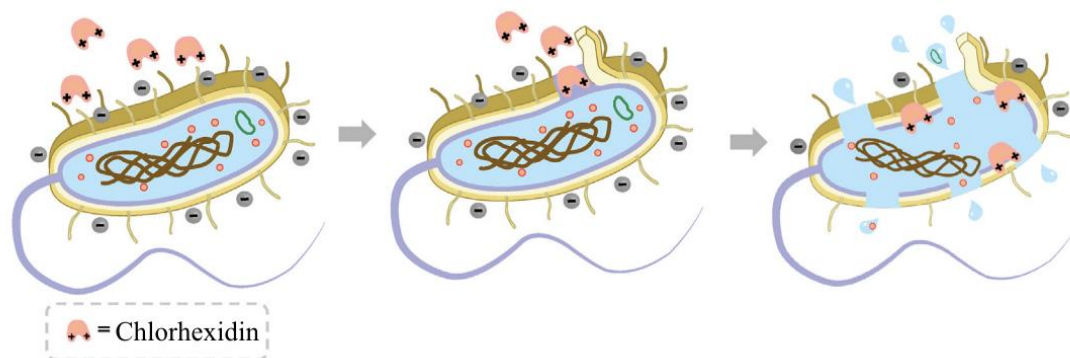
Biguanidy jsou již dlouhou dobu známy svou antimikrobiální aktivitou proti širokému spektru gram pozitivních a gram negativních bakterií, plísní, kvasinek a virů. Antibakteriální působení biguanidových látek je spojováno s kladným nábojem molekuly. Guanidinové sloučeniny mohou být ve vodě ionizovány, čímž získávají kladné náboje, které pak elektrostatickou přitažlivostí interagují se záporně nabitou buněčnou stěnou bakterií, ničí ji a bakterie tak usmrcují. Tento mechanismus působení vylučuje vznik bakteriální rezistence na léčivo, a navíc kladně nabitě guanidinové sloučeniny neinteragují s neutrálními lidskými buňkami, takže mohou selektivně zabíjet bakterie a vykazují tedy nízkou toxicitu pro člověka [42]. V následující části práce jsou popsány antibakteriální vlastnosti vybraných zástupců biguanidů.

### 2.2.1 Chlorhexidin

Chlorhexidin je antiseptická látka používaná především k dezinfekci dutiny ústní k předcházení tvorby zubního plaku, čímž pomáhá v boji proti zubnímu kazu a zánětu dásní. Měl by se však používat s mírou a podle pokynů zubního lékaře, neboť dlouhodobé používání může vést žloutnutí zubů. Svě využití ale nachází i jako složka dezinfekčních prostředků pro domácnost, antiseptických prostředků na kůži/ruce, nemocničních dezinfekčních prostředků a v neposlední řadě také v kosmetice. Jedná se o širokospektrální baktericidní kationické činidlo, jehož mechanismus účinku je zaměřen na poškození bakteriální buněčné membrány elektrostatickými interakcemi kationového chlorhexidinu s aniontovými skupinami v bakteriální lipidové vrstvě, které snižují životaschopnost buněk nebo dokonce končí buněčnou smrtí [43, 44].

Díky jeho účinnosti a bezpečnostnímu profilu je chlorhexidin považován za zlatý standard při chemickém potlačování vzniku zubního plaku a zánětu dásní. Společně s antidiabetickým metforminem, příbuzným biguanidem, patří na seznam základních léčivých přípravků WHO. Při fyziologickém pH je chlorhexidin kladně nabitá molekula vykazující široké spektrum účinku, které zahrnuje bakteriostatické, sporostatické, mykobakteriostatické a baktericidní působení. Nedávné studie navíc ukázaly, že chlorhexidin působí také na kvasinky, prvoky a má i určitou antivirovou aktivitu. Jeho působení zahrnuje dva typy aktivity. Zaprvé inhibuje schopnost adherence mikroorganismů k povrchu, čímž zabraňuje růstu a rozvoji biofilmů. Zadruhé, díky své kationické povaze interaguje chlorhexidin s negativně nabitou buněčnou stěnou bakterií a vykazuje antimikrobiální aktivitu interakcí s lipoproteiny a fosfátovou skupinou přítomnou v membráně. To dále způsobuje zvýšenou permeabilitu a narušení osmoregulace, což vede k úniku nízkomolekulárních složek, jako je

fosfor a draslík. Tento mechanismus působení souvisí především s jeho bakteriostatickou aktivitou a reverzibilnímu poškození buněk při nízké koncentraci. Při vyšších koncentracích vykazuje chlorhexidin baktericidní účinek tím, že silně interaguje s lipidovou dvojitou vrstvou a denaturuje cytoplazmu (viz Obrázek 5). Podobně působí chlorhexidin také na buňky hub. Účinně prostupuje buněčnou stěnou, plazmatickou membránou až do cytoplazmy kvasinek a způsobuje lýzu buněk [40, 41].



Obrázek 5 Mechanismus působení chlorhexidinu [41]

### 2.2.2 Alexidin

Dalším antiseptikem ze skupiny biguanidů je alexidin, který se od chlorhexidinu liší přítomností dvou hydrofobních 2-ethylhexylových skupin na místě chlorofenylů. Tato struktura podporuje jak elektrostatickou adhezi k negativním nábojům buněčných membrán, tak průnik do membránových lipidů. Ve srovnání s chlorhexidinem vykazuje alexidin rychlejší baktericidní aktivitu a způsobuje výrazně rychlejší permeabilizaci bakterií. Při porovnání antibakteriální aktivity docházelo při ošetření buněčných suspenzí stejnými dávkami alexidinu a chlorhexidinu k rychlému uvolnění draselných iontů z cytoplazmy, které bylo v případě alexidinu dokončeno během 5 minut, naopak v případě chlorhexidinu docházelo k uvolňování ještě po 60 minutách. Nicméně kvůli nízké rozpustnosti ve vodě nelze alexidin formulovat ve více než 0,05 % roztoku, zatímco chlorhexidin se jako antiplakový prostředek používá v 0,2 % koncentraci. Tento rozdíl v koncentraci léčiv má za následek větší výslednou účinnost chlorhexidinu oproti alexidinu. Pro zvýšení účinnosti se používá alexidin jako antibakteriální činidlo v kombinaci s chlornanem sodným, jehož výsledná aktivita je srovnatelná s chlorhexidinem [41, 45].

### 2.2.3 Picloxydin

Pikloxydin je další biguanidová sloučenina, ve které jsou dvě para-chlorfenylové části spojeny pevným piperazinovým linkerem. Studie *in vitro* ukázaly, že antibakteriální vlastnosti pikloxydinu jsou srovnatelné s chlorhexidine, a že jejich mechanismus účinku bakteriální buňky je totožný. Podobně jako chlorhexidin a alexidin, i pikloxydin inhibuje schopnost adherence mikroorganismů k povrchu, čímž zabraňuje růstu a rozvoji biofilmů a zabraňuje vzniku zubního plaku. Podobná aktivita je přisuzována shodné kationické povaze těchto biguanidů. V současné době se však pikloxydin používá především v očních kapkách k léčbě keratitidy, při lokální terapii trachomu a jako povrchová dezinfekce [41, 46].

### 2.2.4 Polymerní biguanidy

Chlorhexidin, alexidin a pikloxydin jsou tři základní bisbiguanidové sloučeniny s antimikrobiální aktivitou. Později se však začalo uvažovat nad spojením více fragmentů dohromady a vytvořením polymerních biguanidů. Hlavním představitelem a nejstudovanější sloučeninou z této skupiny je polyhexamethylenbiguanid (PHMB), oligomer s průměrným počtem dvanácti biguanidových jednotek. PHMB je používán jako antiseptikum v mnoha oblastech medicíny, veterinární medicíny, gastronomie a průmyslu, a to především díky nízkému faktoru toxicity, chemické stabilitě a širokospektrálnímu antibakteriálnímu působení. Mechanismus účinku PHMB je podobný jako u dříve popsanych bisbiguanidů. Jelikož je PHMB kationtový polymer, tak interaguje s negativně nabitými fosfolipidy a způsobuje rozpad buněčných membrán, což postupně vede ke zvýšené propustnosti, ztrátě integrity a buněčné smrti. Současně však neovlivňuje elektroneutrální lipidy, což vysvětluje jeho nízkou toxicitu k lidským buňkám. Interakce PHMB s fosfolipidy je nespecifická, proto polymerní biguanidy působí proti širokému spektru mikrobů, včetně grampozitivních a gramnegativních bakterií, bakterií vytvářejících plaky a biofilmy, sporulujících bakterií a některých hub. Navzdory těmto výčtům pozitivních vlastností stále nebyl plně schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v USA (FDA) a jeho použití je omezeno pouze na některé aplikace, zejména v obvazech na rány k ošetření různých typů ran, jako jsou pooperační incize, proleženiny, vředy a popáleniny. Schválen zůstává tedy pouze chlorhexidin, který lze používat pro většinu klinických účelů. Oproti chlorhexidinu však PHMB vykazuje nižší minimální inhibiční koncentrace (MIC) a rychlejší účinek působení. Když k tomu přičteme jeho širokospektrální antimikrobiální aktivitu, výjimečně nízkou toxicitu a biokompatibilitu, tak se PHMB jeví jako nejslibnější konkurent chlorhexidinu jakožto antiseptikum pro klinické aplikace [41, 47].

### 2.2.5 Antidiabetická léčiva na bázi metforminu

Nedávno se také začaly studovat antibakteriální vlastnosti skupiny biguanidů běžně používaných jako antidiabetická léčiva, mezi které patří metformin, phenformin nebo buformin. Největší pozornost na sebe strhl právě metformin, osvědčený lék první volby u nově odhalených diabetiků. Několik studií jasně prokázalo, že diabetičtí pacienti užívající metformin měli nižší pravděpodobnost výskytu infekcí, což poukázalo na jeho možné antibakteriální vlastnosti. Díky svému dobrému profilu nežádoucích účinků je metformin velice atraktivní látkou pro řešení problému multirezistentních kmenů bakterií, na které nepůsobí konvenční antibiotika. Ačkoli není mechanismus účinku zatím zcela objasněn, metformin může vyvíjet adjuvantní antimikrobiální aktivitu v kombinaci s konvenčními antibiotiky prostřednictvím několika možných mechanismů. Ty zahrnují zesílení aktivity antibiotik, modifikace imunitní odpovědi hostitelských buněk na infekci a schopnost zvýšit intracelulární akumulaci různých antibiotik narušením vnějších membrán bakterií. Metformin tedy může pravděpodobně překonat bakteriální rezistenci nejen prostřednictvím zvýšení antimikrobiálního účinku antibiotik, ale také stimulací imunitního systému. Jmenovitě byly tyto účinky pozorovány při studiích s meticilin-rezistentním kmenem *Staphylococcus aureus*, multirezistentními kmeny *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. Dále byly prokázány také antimykotické účinky při studiích s houbami *Aspergillus niger* nebo *Candida albicans* [23, 48].

Na základě těchto poznatků byla vypracována studie, kde byl metformin použit jako adjuvantní antimikrobiální činidlo v kombinaci několika antibiotiky, jmenovitě levofloxacin, chloramfenicol, rifampicin, ampicilin a doxycyklin. Pro vyhodnocení antibakteriální aktivity byla použita mikrodiluční metoda v bujón. Nejenže metformin vykazoval antibakteriální účinek v kombinaci s antibiotiky na testované kmeny *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*, ale také vykazoval nízkou toxicitu na savčí buňky. Synergické studie prokázaly, že metformin zvyšuje účinek kombinovaných antibiotik, neboť tyto kombinace poskytují buď synergický, nebo aditivní účinek s významným snížením MIC [23].

Dále byl metformin také použit v kombinaci s minocyklinem proti multirezistentnímu kmeni *Acinetobacter baumannii*, který u oslabených nebo starších jedinců může vyvolat zápal plic, sepsi a záněty. Tato studie prokázala synergický účinek metforminu s minocyklinem proti minocyklin-rezistentní *Acinetobacter baumannii*, kdy metformin ničí vnější membránu

bakterie, zvýšit její membránový potenciál, ale příliš neovlivňuje propustnost membrány a výskyt ROS. Kombinace s minocyklinem navíc pomáhala předcházet tvorbě biofilmu [49].

Kromě kombinací se staršími antibiotiky se také zkouší nové přístupy pro boj s patogenními bakteriemi a léčbu infekčních onemocnění. Zajímavou možností je chemodynamická terapie, která byla navržena pro biomedicínské aplikace zahrnující léčbu rakoviny, inaktivaci bakteriálních buněk nebo léčbu infekčních onemocnění. Při této metodě reagují nanomateriály obsahující multivalentní kovoové prvky (např. Cu, Fe, Mn a Mo), které reagují s molekulami vody za tvorby toxických hydroxylových radikálů. Tyto radikály způsobují peroxidaci lipidů buněčné membrány, rozpad membrány a buněčnou smrt. Bylo zjištěno, že i v tomto případě kombinace s metforminem zvyšuje antibakteriální aktivitu a tato metoda má velký potenciál např. při léčbě infekcí kožních ran [50].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 CÍLE PRÁCE

Cíle této diplomové práce můžeme shrnout do následujících bodů:

- vypracování rešerše na metformin a jeho antimikrobiální vlastnosti
- modifikace polymerního povrchu s následnou depozicí metforminu,
- charakterizace připravených povrchů pomocí dostupných metod,
- vyhodnocení antimikrobiálních vlastností připravených povrchů,
- diskuze dosažených výsledků.

## 4 MATERIÁLY A ZAŘÍZENÍ

### 4.1 Použité chemikálie

Deionizovaná voda H<sub>2</sub>O

Ethanol C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O

Disiřičitan sodný N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (SIGMA-ALDRICH)

Kyselina akrylová C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (SIGMA-ALDRICH)

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid EDC (SIGMA-ALDRICH)

N-Hydroxysukcinimid NHS (SIGMA-ALDRICH)

Hydroxid sodný NaOH (SIGMA-ALDRICH)

Dimethylbiguanid hydrochlorid (SIGMA-ALDRICH)

Diiodomethan (SIGMA-ALDRICH)

Formamid (SIGMA-ALDRICH)

Živný bujón (HiMedia laboratories, India)

SCDLP agar (HiMedia laboratories, India)

### 4.2 Použité přístroje a pomůcky

Vysokofrekvenční (40 kHz) plazmový reaktor Diener Pico (Diener electronic GmbH & Co. KG, Německo)

Analytické váhy S-64 (Denver Instrument, USA)

Magnetické míchadlo mm7 (LAVAT a.s., Česká republika)

Orbitální multifunkční třepačka PSU-20i (SIA Biosan, Lotyšsko)

Systém pro měření kontaktního úhlu (Advex Instruments, s.r.o., Česká republika)

FT-IR spektrometr Nicolet iS5 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

Horkovzdušný inkubátor Memmert INB 400 (Memmert GmbH + Co. KG, Germany)

Třepačka Vortex-1 plus (SIA Biosan, Lotyšsko)

Biohazard box Safemate 1.2 (BioAir S.p.A., Italy)

Počítačka kolonií Schütt Count (schuett-biotec GmbH, Germany)



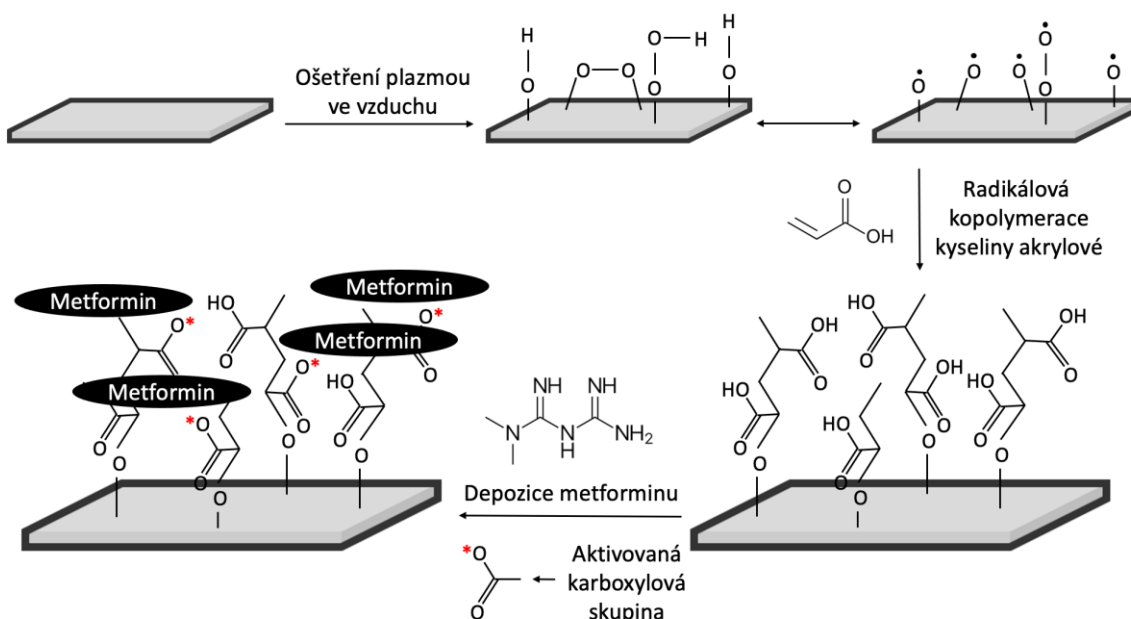
Skenovací elektronový mikroskop Nova NanoSEM 450 (FEI Company, USA)

Rentgenový fotoelektronový spektrometr (XPS) ESCALAB 250Xi (Thermo Fisher Scientific, United Kingdom)

Laboratorní sklo

## 5 DEPOZICE METFORMINU

Metformin byl na povrch polymerního substrátu deponován pomocí tzv. „fyzikálně-chemického víceetapového procesu“ (viz Obrázek 6), který zahrnuje ošetření povrchu plazmovým výbojem, následnou radikálovou polymerací kyselinou akrylovou a konečně navázání metforminu na karboxylové skupiny. Jako polymerní nosič byl použit nízkohustotní polyethylen (LDPE), který byl nastříhán na filmy o rozměrech 50 mm × 50 mm. Před samotnou úpravou byly filmy opláchnuty deionizovanou vodou a nechaly se za laboratorních podmínek vysušit. Suché filmy byly následně ošetřeny plazmovým výbojem, který se využívá pro tvorbu aktivního povrchu za vzniku volných radikálů. V našem případě byl použit vysokofrekvenční plazmový reaktor Diener Pico (Diener electronic GmbH & Co. KG, Německo) viz Obrázek 7. Vzorky byly vystaveny působení plazmatu z obou stran po dobu 1 minuty při výkonu 50 W, frekvenci elektromagnetického vlnění 40 kHz, přičemž průtok plazmového plynu byl nastaven na 20 scc·min<sup>-1</sup>. Takto upravené filmy se následně vložily do roztoku kyseliny akrylové a disiřičitanu sodného a nechaly se polymerovat po dobu 24 h.



Obrázek 6 Fyzikálně-chemický víceetapový proces

Následně byly filmy ponořeny do 1 % roztoku NaOH, aby došlo k neutralizaci a ukončení procesu polymerace. Před depozicí metforminu byly vzorky ještě ponořeny do roztoku EDC a NHS po dobu 4 h pro aktivaci karboxylových skupin kyseliny akrylové. Tato dvě spojovací činidla se používají především pro síťování aminů a karboxylátů tvorbou kovalentních vazeb. EDC nejprve reaguje s karboxylovými skupinami kyseliny akrylové za vzniku

aktivního meziprojektu o-acylmočoviny. Tento meziprojekt je však nestabilní, a aby se zvýšila jeho životnost a účinnost, tak se na karboxylovou skupinu naváže NHS a vytvoří reaktivní ester pro vazbu s aminem. Nakonec je tato esterová struktura vytěsněna nukleofilním útokem primárních aminoskupin metforminu. V našem případě byly připraveny vodné roztoky metforminu o koncentracích 0,5; 1; 2; 5; 10 a 20 g·l<sup>-1</sup>. Aminoskupina metforminu vytvoří amidovou vazbu s původní karboxylovou skupinou a vedlejší produkt reakce se uvolní jako derivát močoviny. Po vyjmutí z roztoku metforminu byly vzorky opláchnuty demineralizovanou vodou a nechaly se vysušit za laboratorních podmínek. Poté probíhala charakterizace a vyhodnocení antimikrobiální aktivity připravených vzorků [51].



Obrázek 7 Vysokofrekvenční (40 kHz) plazmový reaktor Diener Pico (Diener electronic GmbH & Co. KG, Německo)

## 6 CHARAKTERIZACE SUBSTRÁTŮ

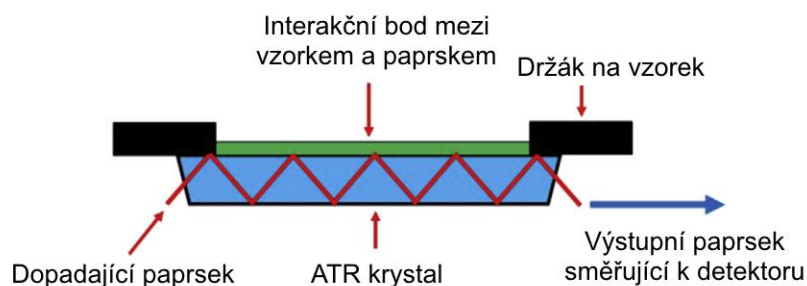
Ošetřené povrchy s deponovaným metforminem byly dále charakterizovány pomocí dostupných metod, aby se ověřila úspěšnost depozice metforminu na polymerní nosič. Tyto metody zahrnovaly infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací, měření mezního úhlu smáčení a povrchové energie, skenovací elektronovou mikroskopii, rentgenovou fotoelektronovou spektroskopii a test antibakteriální aktivity.

### 6.1 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR)

FTIR spektroskopie je výkonná analytická technika, jejímž základem je absorpce infračerveného záření molekulami vzorku, včetně pevných látek, kapalin i plynů. FTIR spektroskopie poskytuje cenné informace o chemickém složení a struktuře materiálů měřením toho, jak absorbují nebo vyzařují infračervené světlo. Metoda FTIR funguje tak, že infračervené záření prochází vzorkem a měří množství světla absorbovaného při různých vlnových délkách. Absorbované světlo odpovídá energii potřebné k excitaci specifických chemických vazeb ve vzorku. Výsledné spektrum je grafem závislosti absorbance (svislá osa) na vlnové délce (vodorovná osa). Infračervená oblast záření se nachází v rozsahu vlnových délek přibližně 780 nm až 1 mm. Oblast vlnových délek využívaných při FTIR spektroskopii je 2,5  $\mu\text{m}$  až 15  $\mu\text{m}$ , což odpovídá vlnočtu 666 až 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Vlnocet je jednotka využívaná v infračervené spektroskopii (IR) a udává se v tzv. recipročných centimetrech [ $\text{cm}^{-1}$ ], jedná se tedy o převrácenou hodnotu vlnové délky. Při porovnání s ultrafialovou (UV) spektroskopií je energie při IR nižší a nedochází k excitaci elektronů do vyšších stavů. Energii molekuly je možno měnit pouze určitými skoky (kvanty), kdy se molekula deformuje pouze při určitých frekvencích, tedy při určité energii záření, která odpovídá různým pohybům (vibrace a rotace) uvnitř molekuly.

Ve FTIR spektroskopii se dále využívají různé techniky manipulace se vzorky, které jsou pro určité typy vzorků účinnější než pro jiné. Pro získání co nejkvalitnějšího spektra ze vzorku je tedy důležité vědět, která technika manipulace je pro daný typ vzorku nejvhodnější. V běžné praxi existují čtyři techniky manipulace se vzorkem, které zahrnují transmisí, zeslabenou totální reflektanci (ATR), difuzní odraz a spekulární reflektanci. Nejpoužívanější modifikací FTIR spektroskopie je právě analýza vzorků pomocí zeslabené totální reflektance (ATR), která je zvláště užitečná pro analýzu tenkých vrstev a povrchů. Jedná se o nedestruktivní metodu, která navíc umožňuje zkoumání pevných nebo kapalných vzorků bez nutnosti rozsáhlé přípravy. Při této metodě je IR paprsek nasměřován pod

určitým úhlem do opticky hustého krystalu s vysokým indexem lomu (viz Obrázek 8). IR paprsek přichází do kontaktu s krystalem ATR a vytváří několikanásobné vnitřní odrazy, které později vytvářejí evanescentní vlnu, jež přesahuje povrch krystalu. Vzorek, který je v kontaktu s evanescentní vlnou, pohlcuje energii vlny a následně dochází k jejímu útlumu. Zeslabený paprsek se odrazí zpět do krystalu a poté vyjde z opačného konce krystalu a je nasměrován do detektoru spektrometru. Detektor zaznamená zeslabený IR paprsek jako signál interferogramu, který lze poté použít k vytvoření IR spektra [52].



Obrázek 8 Interakce IR paprsku se vzorkem při FTIR-ATR [52]

V našem případě byl pro získání infračervených spekter použit přístroj FT-IR spektrometr Nicolet iS5 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), viz Obrázek 9. Jedná se o klasický spektrometr pro střední infračervenou oblast v rozsahu vlnočtů  $7800\text{--}350\text{ cm}^{-1}$ . Jeho příslušenství dovoluje analýzy jak pevných, tak kapalných i plynných vzorků.



Obrázek 9 FT-IR spektrometr Nicolet iS5 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

## 6.2 Mezní úhel smáčení a povrchová energie

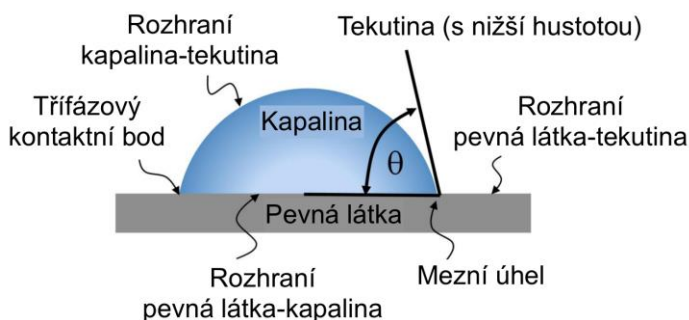
Mezní úhel je nejdůležitějším parametrem používaným k vyhodnocení smáčivosti povrchů pevných látek. Měří se jako úhel mezi tečnou k povrchu pevného tělesa a tečnou kapky kapaliny k základně (viz Obrázek 10). Mezní úhly jsou citlivé na mnoho faktorů, jako je geometrie povrchu, drsnost, znečištění, deformace atd. Proto je nutné měření mezního úhlu na jednom povrchu provádět kvantitativně, aby bylo dosaženo co nejpřesnějšího výsledku. Mezní úhel je jedna z mála veličin, která charakterizuje fázové rozhraní pevná látka-kapalina-plyn. Vztah mezi mezním úhlem a energií jednotlivých mezifázových rozhraní popisuje Youngova rovnice:

$$\gamma_{lv} \cos \theta = \gamma_{sv} - \gamma_{sl}, \quad (1)$$

kde  $\theta$  značí mezní úhel kapky kapaliny na pevném povrchu,  $\gamma_{lv}$  mezifázovou energii rozhraní kapalina-plyn,  $\gamma_{sv}$  mezifázovou energii rozhraní pevná látka-plyn a  $\gamma_{sl}$  mezifázovou energii rozhraní pevná látka-kapalina. Po úpravě tohoto vztahu je možné odvodit vztah pro mezní úhel, který určuje tvar kapky:

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{sv} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lv}}. \quad (2)$$

Na základě velikosti mezního úhlu kapky na pevném povrchu je možno dělit kapaliny podle toho, jak dobře daný povrch smáčejí. Pokud je mezní úhel v rozsahu  $0^\circ$  až  $90^\circ$ , tak kapalina povrch smáčí, ale v případě, že mezní úhel nabývá hodnot od  $90^\circ$  až  $180^\circ$ , tak kapalina povrch nesmáčí. Jestliže se jako kapalina použije voda, tak je možno povrch dále dělit na hydrofilní (mezní úhel má hodnotu menší než  $90^\circ$ ) a hydrofobní (mezní úhel má hodnotu větší než  $90^\circ$ ) [53, 54].



Obrázek 10 Mezní úhel přisedlé kapky kapaliny na pevném povrchu [53]

V našem případě byly hodnoty mezního úhlu získány pomocí přístroje Surface Energy Evaluation System (SEE systém) metodou přisedlé kapky (viz Obrázek 11). Jako smáčecí kapaliny byly použity deionizovaná voda, diiodomethan a formamid, přičemž daná kapalina byla na povrch vzorků vždy nanášena ve formě kapek o objemu 5  $\mu\text{l}$ . Celkem bylo provedeno minimálně pět měření u každého vzorku pro získání konečné průměrné hodnoty. Z těchto dat byla následně stanovena volná povrchová energie připravených vzorků pomocí metody acid-base.



Obrázek 11 SEE systém (Advex Instruments, s.r.o., Česká republika)

Celková volná povrchová energie  $\gamma^{\text{tot}}$  byla stanovena jako součet disperzní složky LW a polární acidobazické složky AB:

$$\gamma^{\text{tot}} = \gamma^{\text{LW}} + \gamma^{\text{AB}}, \quad (3)$$

kde LW charakterizuje disperzní Lifshitz-Van der Waalsovy interakce a AB charakterizuje acidobazické interakce. Polární složka se dále dělí na kyselou a bazickou část, jak popisuje rovnice 2:

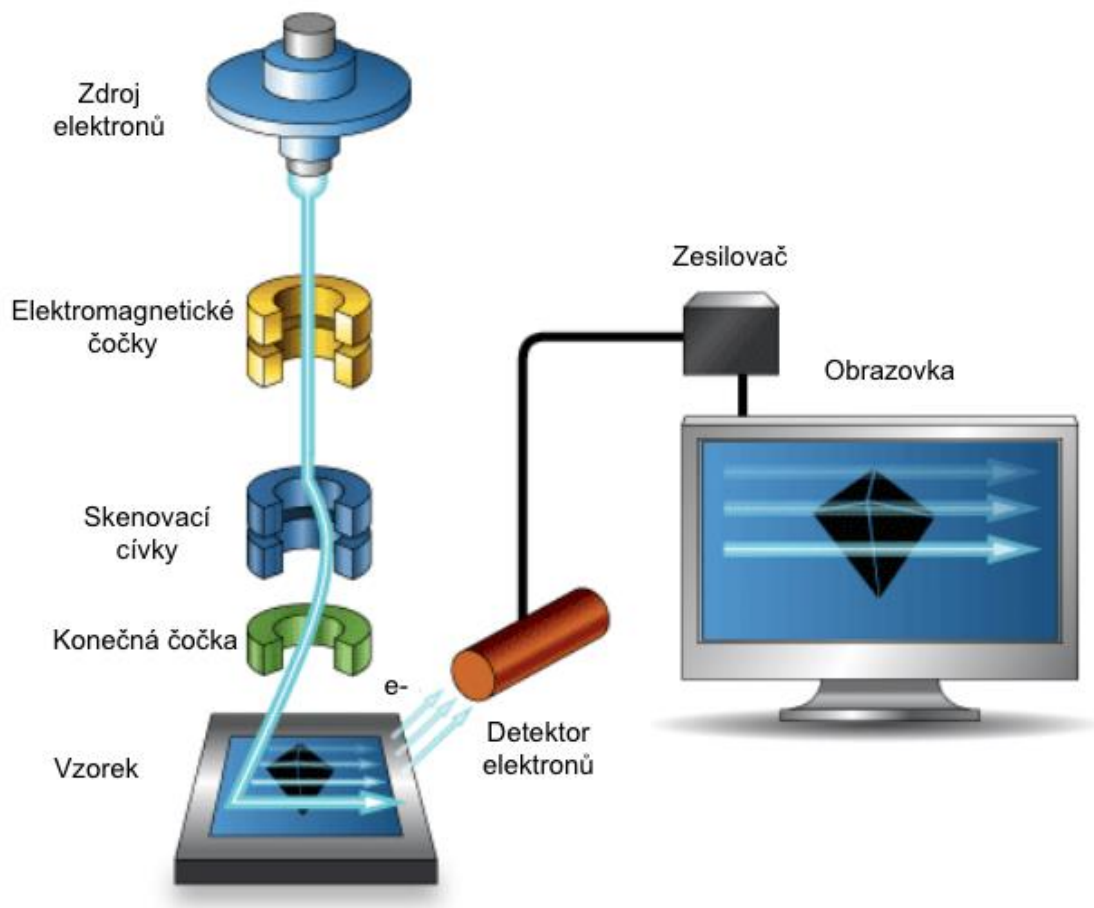
$$\gamma^{\text{AB}} = 2\sqrt{(\gamma^+ \cdot \gamma^-)}, \quad (4)$$

kde  $\gamma^+$  a  $\gamma^-$  reprezentují akceptor elektronu iontového páru (Lewisovu kyselinu) a donor elektronu iontového páru (Lewisovu zásadu) [55].



### 6.3 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

SEM je typ elektronového mikroskopu, který poskytuje detailní obraz zkoumaného povrchu bombardováním vzorku fokusovaným svazkem elektronů. Je to velice účinná metoda používaná při analýze organických a anorganických materiálů v měřítku mikrometrů až nanometrů. SEM pracuje při velkém zvětšení, které dosahuje 300 000 $\times$ , u některých moderních přístrojů až 1 000 000 $\times$ , a vytváří velmi přesné obrazy široké škály materiálů. Na rozdíl od běžných světelných mikroskopů využívá zařízení SEM jako zdroj záření svazek elektronů a pro usměrnění proudu elektronů se používají elektromagnetické čočky (viz Obrázek 12). Celý vnitřní prostor mikroskopu je ve vakuu, aby nedocházelo k interakci elektronů s vnější atmosférou.



Obrázek 12 Části SEM [56]

Vzorek pozorovaný SEM musí být vodivý, a proto se nevodivé vzorky musí předem naprášit vrstvou kovového prášku nebo grafitu. Pro analýzu povrchu se využívá interakce elektronového svazku se vzorkem, přičemž samotné elektrony pronikají do hloubky



přibližně 1  $\mu\text{m}$  a generují signál do detektoru k vytvoření obrazu. Pro tvorbu obrazu se využívají jak zpětně odražené elektrony, tak tzv. „sekundární elektrony“, které byly vyraženy z orbitalu atomového obalu vzorku primárním svazkem. Je-li na kolektorové stínítko přivedeno kladné napětí, dojde k zachycení sekundárních i zpětně odražených elektronů. V případě detekce záporného napětí na kolektorovém stínítku se však zachytí pouze zpětně odražené elektrony. Obraz vzorku se vytváří bod po bodu v závislosti na pohybu snímacích cívek, které usměrňují pohyb elektronového paprsku do určitých míst v podobě přímek, dokud se na povrchu vzorku nevytvoří obdélníkový rastr [56].

V našem případě byly snímky pořízeny na skenovacím elektronovém mikroskopu Nova NanoSEM 450 (FEI Company, USA) s Schottky field emission zdrojem elektronů (dopadová energie od 0,02 do 30 keV) s detektorem zpětně odražených elektronů (BSE) a sekundárních elektronů (SE) s bodovým rozlišením menším než 1,0 nm při 15 kV nebo menším než 1,4 nm při 1 kV a v nízkovakuovém módu menším než 2 nm při 3 kV (viz Obrázek 13).



Obrázek 13 Skenovací elektronový mikroskop Nova NanoSEM 450 (FEI Company, USA)

## 6.4 Rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS)

XPS je vysoce specifická nedestruktivní analytická technika využívaná pro charakterizaci chemického složení povrchů. XPS dokáže analyzovat jakýkoli vzorek ve vakuu, včetně prášků, vláken a tenkých vrstev. Ačkoli vzorky mohou být plynné, kapalně nebo pevné, většina vzorků analyzovaných metodou XPS je v pevném skupenství. Relativní koncentrace různých prvků přítomných ve vzorku se určují z intenzit píků objevujících se ve spektru, zatímco samotná poloha píku podává informaci o kvalitativním složení, tj. o jaký prvek se jedná.

XPS je technika, při níž je vzorek bombardován svazkem vysokoenergetického rentgenového záření a fotoelektrony produkované vzorkem jsou následně detekovány v závislosti na jejich energii. Vazebná energie se stanoví experimentálně z naměřené kinetické energie a známé hodnoty energie fotonů rentgenového svazku namířeného na vzorek. Tento proces popisuje rovnice 5:

$$BE = hv - KE - \varphi, \quad (5)$$

kde BE je vazebná energie,  $hv$  je energie fotonů rentgenového záření, KE je kinetická energie a  $\varphi$  je známá funkce konkrétního spektrometru a vzorku.

K uvolnění elektronů z povrchu vzorku dochází vlivem tzv. „fotoelektrického jevu“. Fotoelektrický jev je fenomén, při kterém dochází k emisi elektronů z povrchu materiálu při vystavení elektromagnetického záření. Tento jev se často vysvětluje částicovou povahou světla, které je složeno z částic zvaných fotony. Rentgenové záření je záření o nižších vlnových délkách než např. viditelné světlo nebo UV záření, a tudíž se jedná o záření s vysokou energií, díky které dochází k emisi vnitřních elektronů atomů. Pokud je energie rentgenového záření rovna energii potřebné k vyražení elektronu, elektron opustí atom bez přebytečné kinetické energie. Avšak ve většině případů je energie rentgenových paprsků větší než energie potřebná k odstranění elektronu, a proto je elektron vyražen s určitým množstvím kinetické energie, kterou lze změřit právě pomocí XPS.

Vazebná energie je množství energie potřebné k vyražení elektronu z vnitřního obalu (jádra). Je to důležitá veličina, protože slouží jako aproximace vlastní hodnoty (eigenvalue) atomového orbitalu, které je specifické pro každý atomový orbital. Experimentálním stanovením vazebné energie a jejím použitím jako aproximace vlastní hodnoty atomového orbitalu je tedy možné určit typ atomu [57].

Pro změření vazebné energie byl použit rentgenový fotoelektronový spektrometr ESCALAB 250Xi (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), viz Obrázek 14. Toto zařízení je určeno pro analýzu chemického složení a stavu povrchů pevných látek a umožňuje kvalitativní i kvantitativní detekci všech prvků kromě vodíku a helia. Spektrometr umožňuje 2D snímkování a mapování i hloubkové profilování s prostorovým rozlišením pod 20  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 14 Rentgenový fotoelektronový spektrometr (XPS) ESCALAB 250Xi (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

## 6.5 Test antibakteriální aktivity

Antibakteriální vlastnosti připravených povrchů byly vyhodnoceny podle upravené normy ČSN ISO 22196 Měření antibakteriální aktivity na plastech a jiných neporézních površích. Testování bylo prováděno jak na ošetřených vzorcích, tak na vzorcích neošetřených, tedy na neupraveném polymerním povrchu, které sloužily jako reference. Vzorky byly na základě této normy nastříhány na rozměry 25 mm × 25 mm. K testování antibakteriálních vlastností byly použity kmeny bakterií gramnegativní *Escherichia coli* a grampozitivní *Staphylococcus aureus*. Bakteriální suspenze byly připraveny v živném bujónu a následně napipetovány na povrch vzorků o objemu 100 µl. Vzorky byly následně překryty krycím filmem z polypropylenu o rozměrech 20 mm × 20 mm. Takto připravené vzorky byly inkubovány při teplotě 35 °C, relativní vlhkosti 100 % po dobu 24 h. Inkubovány byly konkrétně vzorky ošetřené a polovina vzorku neošetřených. Druhá polovina neošetřených vzorků byla zpracována ihned po inokulaci promytím SCDLP agarem, který byl následně odebrán. Tento objem byl následně použit k vyhodnocení antibakteriální aktivity. Ostatní vzorky byly po inkubaci zpracovány stejným způsobem.

Stanovení počtu životaschopných bakterií bylo provedeno plotnovou metodou jejíž jednotkou výpočtu je počet životaschopných (na plotnách rostoucích) buněk v 1 ml média nebo vzorku, tzv. colony forming units (CFU·ml<sup>-1</sup>).

Pro každý vzorek byl stanoven počet životaschopných bakterií podle rovnice 3:

$$N = \frac{100 \times C \times D \times V}{A} [\text{CFU} \cdot \text{cm}^{-2}], \quad (6)$$

kde N je počet životaschopných bakterií na cm<sup>2</sup> testovaného vzorku, C je průměrný počet kolonií, D je ředící faktor, V je objem SCLDP přidaného ke vzorku v ml a A je plocha krycího filmu v cm<sup>2</sup>.

Z platných testů byla poté stanovena antibakteriální aktivita pomocí rovnice 4:

$$R = U_t - A_t, \quad (7)$$

kde R je antibakteriální aktivita, U<sub>0</sub> je průměr z hodnoty dekadického logaritmu počtu životaschopných bakterií stanovených po zpracování neošetřených vzorků po ihned inokulaci, U<sub>t</sub> je průměr z dekadického logaritmu počtu životaschopných bakterií stanovených po zpracování neošetřených vzorků po inkubaci 24 h a A<sub>t</sub> je průměr z dekadického logaritmu počtu životaschopných bakterií stanovených po zpracování

ošetřených vzorků po inkubaci 24 h [58]. Efektivita antibakteriálních vlastností vzorků byla následně vyhodnocena podle normy ČSN EN ISO 20743 Textilie – Stanovení antibakteriální aktivity textilních výrobků, která klasifikuje efektivitu podle antibakteriální aktivity vzorků na slabou, významnou a silnou (viz Tabulka 1) [59].

Tabulka 1 Efektivita antibakteriálních vlastností

Efektivita antibakteriálních vlastností	Hodnota antibakteriální aktivity R
Slabá	$1 < R < 2$
Významná	$2 \leq R < 3$
Silná	$R \geq 3$

Testování bylo prováděno v mikrobiologickém ochranném biohazard boxu Safemate 1.2 (BioAir S.p.A., Italy), viz Obrázek 15 a kultivace mikrobiálních buněk probíhala v horkovzdušném inkubátoru Memmert INB 400 (Mettler GmbH + Co. KG, Germany), viz Obrázek 16.



Obrázek 15 Biohazard box Safemate 1.2 (BioAir S.p.A., Italy)



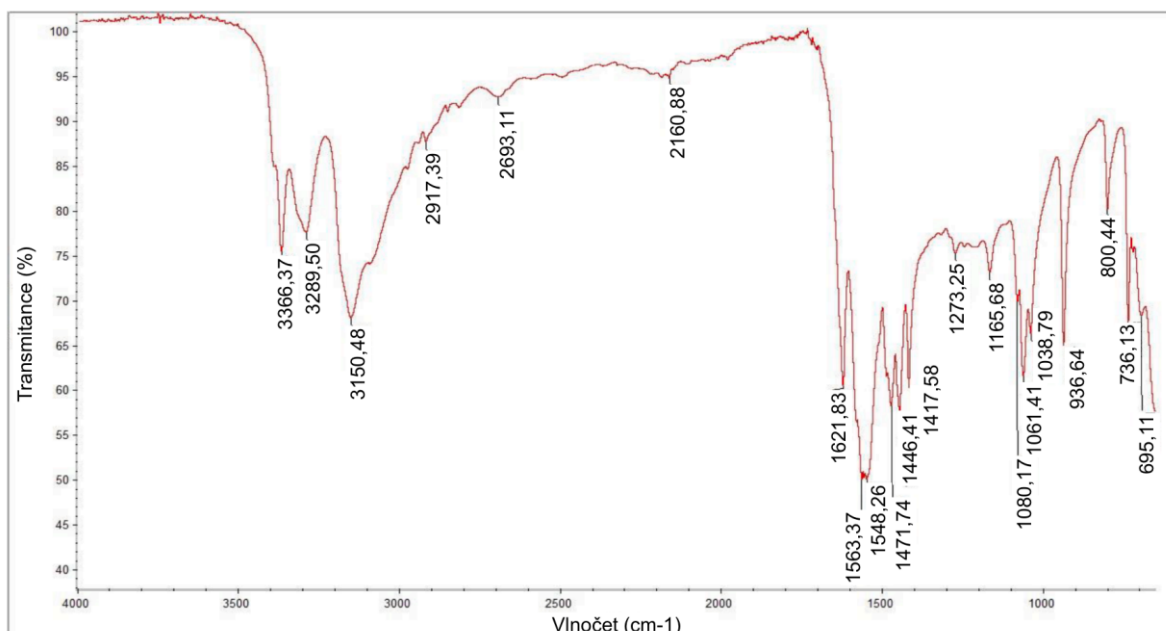
Obrázek 16 Horkovzdušný inkubátor Memmert INB 400  
(Mettmert GmbH + Co. KG, Germany)



## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 7.1 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Infračervená spektra vzorků byla naměřena pomocí přístroje Nicolet iS5 a získaná data vyhodnocena v programu OriginPro 2024, kde byl vytvořen graf závislosti transmitance vzorku na hodnotě vlnočtu (viz Obrázek 18 a 19). Na obrázcích můžeme vidět infračervená spektra jednotlivých vzorků, tj. vzorku čistého polymerního nosiče LDPE, vzorku ošetřeného plazmovým výbojem, vzorku s navázanou kyselinou akrylovou, vzorku s deponovaným metforminem o koncentracích  $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a vzorku čistého metforminu. Jednotlivé charakteristické píky byly vyhodnoceny podle předchozích studií, viz Obrázek 17.



Obrázek 17 FTIR-ATR spektrum metforminu [60]

FTIR spektrum čistého hydrochloridu metforminu, které zobrazuje vibrační pásy odpovídající daným funkčním skupinám, je znázorněno na Obrázku 17. Funkční skupiny přítomné v metforminu zahrnují H–N–H, N–H, C=N, C–N a C–H. Dva píky při vlnočtech  $3366,37$  a  $3289,50 \text{ cm}^{-1}$  jsou způsobeny asymetrickými a symetrickými valenčními vibracemi N–H vazby. Pík při vlnočtu  $3150,38 \text{ cm}^{-1}$  charakterizuje valenční vibrace C–H vazby methylových skupin. Výrazné píky při vlnočtech  $1621,83$  a  $1548,26 \text{ cm}^{-1}$  jsou způsobeny valenčními vibracemi C=N vazby, která je typická pro skupinu biguanidů. Píky při vlnočtech  $1471,74$ ,  $1446,41$  a  $1417,58 \text{ cm}^{-1}$  odpovídají deformačním vibračním funkční

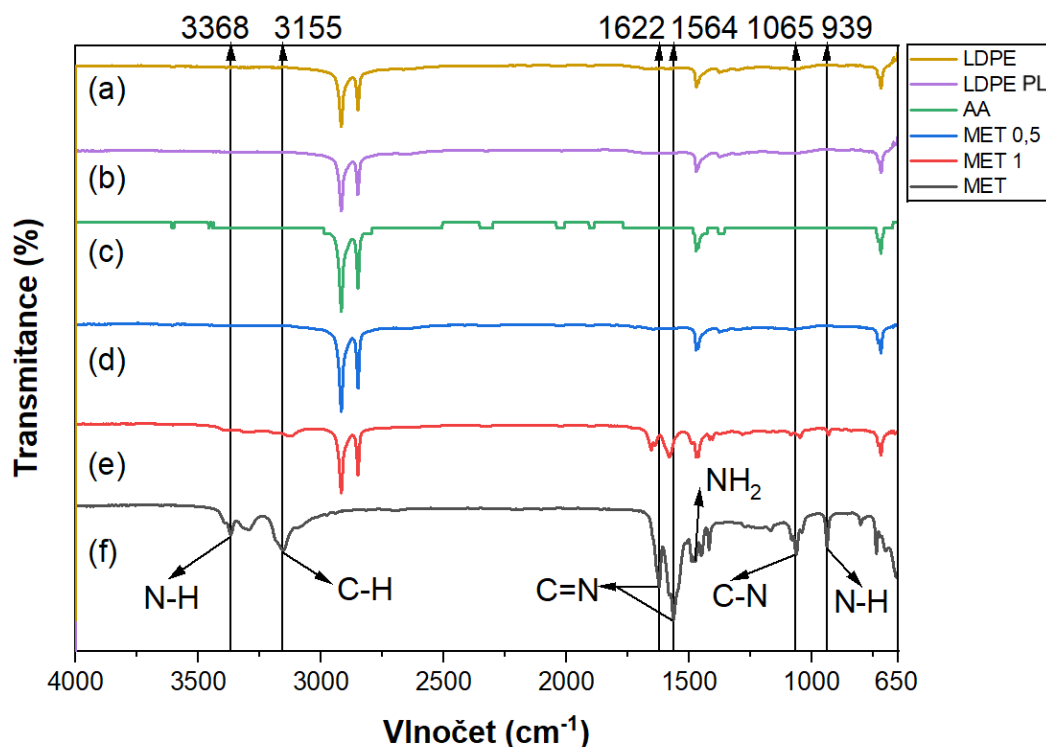
skupiny  $\text{NH}_2$ . Píky v rozmezí vlnočtů  $1165,68\text{--}1038,79\text{ cm}^{-1}$  byly přiřazeny valenčním vibracím vazby  $\text{C--N}$  a poslední skupina píků v rozmezí  $936,13\text{--}736,13\text{ cm}^{-1}$  byla přiřazena deformačním vibracím skupiny  $\text{N--H}$  pro primární a sekundární aminy [60].

Na naměřených spektrech (viz Obrázek 18 a 19) si jako první můžeme všimnout charakteristických píků pro polyethylen (a) při vlnočtech  $2917, 2848, 1471$  a  $719\text{ cm}^{-1}$ , které odpovídají vibracím vazby  $\text{C--CH}_2$ . Tyto píky se objevují ve spektrech všech vzorků až na čistý metfomin (f).

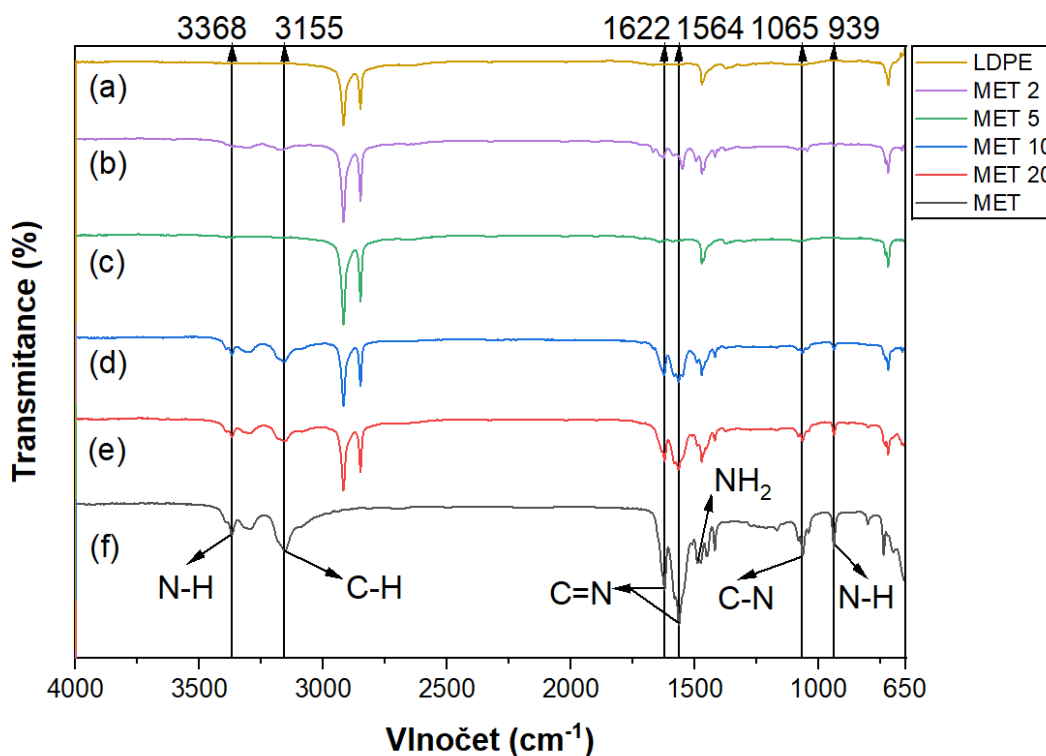
Při porovnání infračerveného spektra vzorku ošetřeného plazmovým výbojem (b) s čistým LDPE na Obrázku 18 si můžeme všimnout, že nedošlo k žádné změně, neboť upravený povrch po ošetření plazmatem nelze detekovat pomocí FTIR spektroskopie. Podobná situace je u vzorku s navázanou kyselinou akrylovou (c), kde došlo pouze ke zvětšení intenzity píků charakteristických pro vazbu  $\text{C--CH}_2$ . Vrstva kyseliny akrylové na povrchu nebyla ovšem dostatečně silná, aby ji spektrometr byl schopen zaznamenat, proto se na spektru neobjevují píky charakteristické, pro funkční skupiny této látky. Dále bylo naměřeno spektrum vzorku LDPE s deponovaným metforminem při koncentraci  $0,5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (d). Na tomto spektru bohužel nejsou viditelné píky charakteristické pro metfomin; spektrum je prakticky totožné se spektrem pro vzorek čistého LDPE. Tato skutečnost může být způsobena heterogenní povahou povrchu vzorků, kdy množství deponovaného metforminu není všude stejné nebo příliš tenkou vrstvou metforminu na povrchu vzorku na to, aby ji spektrometr byl schopen detekovat. Při zvýšení koncentrace metforminu na  $1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (e) už však můžeme pozorovat charakteristické píky pro funkční skupiny metforminu. Konkrétně se jedná o pík při vlnočtu  $3367\text{ cm}^{-1}$ , který odkazuje na valenční vibraci vazby  $\text{N--H}$  nebo pík při vlnočtu  $3153\text{ cm}^{-1}$ , který je charakteristický pro valenční vibraci vazby  $\text{C--H}$ . Dále můžeme pozorovat výrazné píky při vlnočtech  $1622$  a  $1564\text{ cm}^{-1}$  pro valenční vibrace vazby  $\text{C=N}$  a skupinu píků v oblasti  $1420\text{--}1470\text{ cm}^{-1}$  odpovídající deformačním vibracím funkční skupiny  $\text{NH}_2$ . Poslední výraznou oblastí jsou píky při vlnočtu  $1065\text{ cm}^{-1}$ , charakteristický pro valenční vibrace vazby  $\text{C--N}$  a pík při vlnočtu  $939\text{ cm}^{-1}$ , který odkazuje na deformační vibrace skupiny  $\text{N--H}$ .

Při zvyšujících se koncentracích na Obrázku 19 (b, d a e) ještě více vzrostla intenzita píků charakteristických pro metfomin, které dosahovaly maxima při koncentraci  $20\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (e). Výjimkou byl vzorek s koncentrací  $5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (c), kde se charakteristické píky neobjevily, což mohlo být způsobeno neúspěšnou depozicí nebo heterogenní povahou povrchu.





Obrázek 18 Infračervená spektra vzorku čistého povrchu LDPE (a), vzorku ošetřeného plazmovým výbojem (b), vzorku s navázanou kyselinou akrylovou (c), vzorku s deponovaným metforminem o koncentracích  $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (d) a  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (e) a čistý metformin (f)



Obrázek 19 Infračervená spektra vzorku čistého povrchu LDPE (a), vzorku s deponovaným metforminem o koncentracích  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (b),  $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (c),  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (d) a  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (e) a čistý metformin (f)

## 7.2 Mezní úhel smáčení a povrchová energie

Hodnoty mezních úhlů byly stanoveny pomocí přístroje SEE systém metodou přisedlé kapky, aby se zjistila smáčivost povrchů, která přímo souvisí s jejich povrchovou energií kvůli interakcím mezi náboji molekul vody a polární složkou povrchu. Povrchová energie vzorků byla následně stanovena pomocí naměřených mezních úhlů tří různých kapalin metodou acid-base. Kapaliny, které byly použity při tomto měření zahrnovaly deionizovanou vodu, diiodomethan a formamid, přičemž na každý vzorek bylo naneseno alespoň 5 kapek od každé kapaliny. Tabulka 2 shrnuje průměrné hodnoty naměřených mezních úhlů a jejich směrodatné odchylky měření a Tabulka 3 povrchovou energii čistých neošetřených vzorků (LDPE), vzorků ošetřených plazmovým výbojem (LDPE PL), vzorků s deponovanou kyselinou akrylovou (AA) a vzorků s deponovaným metforminem o koncentraci 0,5 g·l<sup>-1</sup> (MET 0,5), 1 g·l<sup>-1</sup> (MET 1,0), 2 g·l<sup>-1</sup> (MET 2,0), 5 g·l<sup>-1</sup> (MET 5,0), 10 g·l<sup>-1</sup> (MET 10) a 20 g·l<sup>-1</sup> (MET 20).

Tabulka 2 Mezní úhly kapek použitých kapalin na površích jednotlivých vzorků

Vzorek	Voda [°]	Diiodomethan [°]	Formamid [°]
LDPE	82,6 ± 1,9	57,0 ± 2,4	79,5 ± 3,3
LDPE PL	57,0 ± 2,1	30,8 ± 1,5	37,6 ± 2,6
AA	62,0 ± 3,4	38,2 ± 1,4	49,7 ± 1,6
MET 0,5	54,7 ± 2,3	33,8 ± 0,7	50,9 ± 2,1
MET 1	57,3 ± 1,6	33,0 ± 1,4	47,4 ± 1,5
MET 2	59,0 ± 1,2	36,0 ± 0,7	48,8 ± 1,7
MET 5	60,8 ± 2,1	35,0 ± 1,3	44,1 ± 0,6
MET 10	59,6 ± 2,0	35,2 ± 1,4	51,2 ± 1,7
MET 20	63,4 ± 3,1	32,2 ± 0,8	49,0 ± 1,2

Čisté LDPE filmy mají téměř hydrofobní povrch s hodnotou kontaktního úhlu deionizované vody 82,6°, která byla nejvyšší mezi všemi vzorky. Čistý povrch měl tedy také nejnižší hodnotu povrchové energie 38,2 mJ·m<sup>-2</sup>, a není tedy vhodný pro následnou chemickou depozici. Ovšem po úpravě plazmatem se situace změnila a můžeme vidět, že hodnota kontaktního úhlu deionizované vody drasticky klesla na 57,0° v důsledku vzniku oxidačních hydrofilních funkční skupin a zvýšením plochy povrchu leptáním plazmou. Po ošetření

plazmou bylo tedy dosaženo vhodných povrchových podmínek pro další chemickou imobilizaci.

Tabulka 3 Povrchová energie vzorků

Vzorek	$\gamma^{\text{tot}}$ [ $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ]	$\gamma^{\text{LW}}$ [ $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ]	$\gamma^{\text{AB}}$ [ $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ]	$\gamma^+$ [ $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ]	$\gamma^-$ [ $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ]
LDPE	38,2	30,3	7,9	1,0	16,2
LDPE PL	49,5	43,9	5,6	0,4	19,2
AA	42,2	40,5	1,7	0,1	20,4
MET 0,5	46,2	42,6	3,6	0,1	32,0
MET 1	43,5	42,9	0,6	0,0	23,7
MET 2	42,3	41,6	0,7	0,0	23,9
MET 5	46,0	42,1	3,9	0,2	18,3
MET 10	43,2	41,9	1,3	0,0	24,9
MET 20	44,0	43,3	0,7	0,0	18,2

Navázání kyseliny akrylové na aktivovaný povrch vzorků způsobilo mírný nárůst kontaktního úhlu deionizované vody na  $62,0^\circ$ , což značí úspěšné navázání kyseliny. Depozice metforminu způsobila pokles mezního úhlu u vody na hodnotu  $54,7^\circ$  a zároveň zvýšení hodnoty povrchové energie na  $46,2 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ , z čehož se dá usuzovat, že depozice metforminu na povrch polymerního nosiče proběhla úspěšně. Při zvýšení koncentrace deponovaného metforminu došlo k mírnému nárůstu mezního úhlu vody, která se při většině koncentrací pohybovala kolem  $60^\circ$  a dosáhla maxima při koncentraci deponovaného metforminu  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  na hodnotu  $63,4^\circ$ .

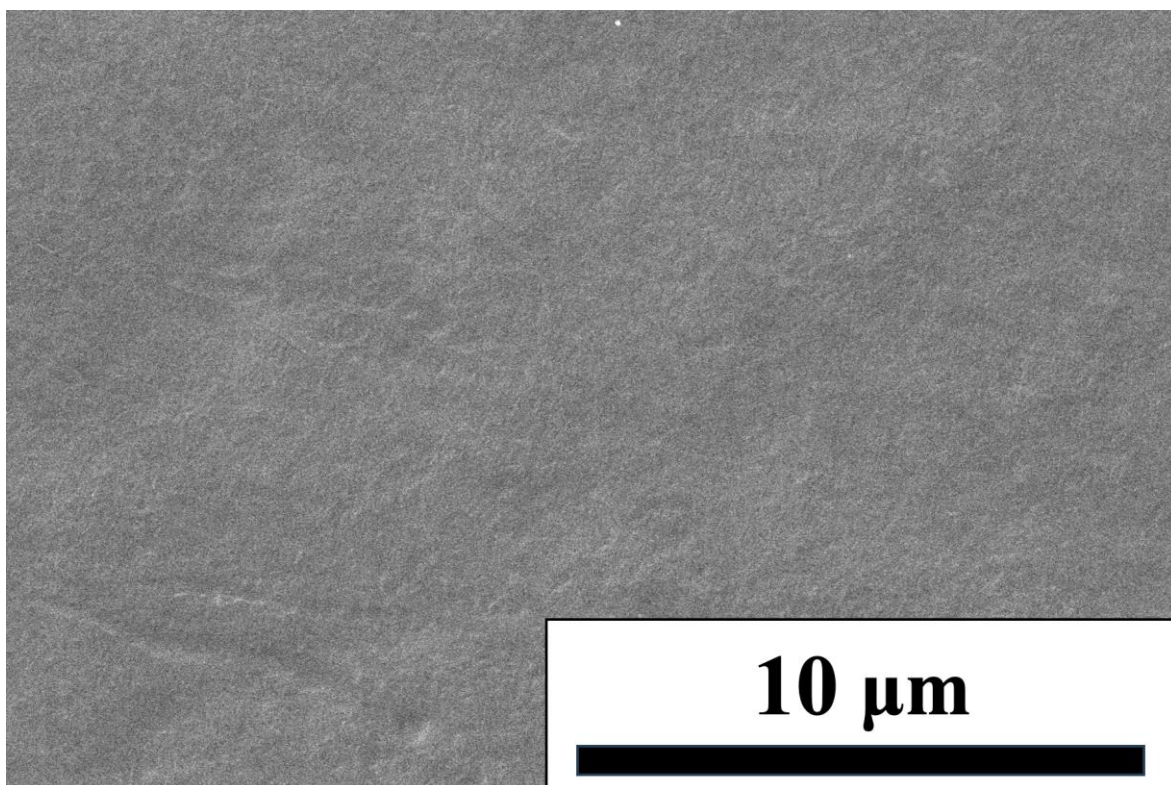
Změny kontaktního úhlu s deionizovanou vodou a povrchové energie jsou indikátory změn povrchových podmínek a imobilizace uvedených chemických látek. Po tomto testu je tedy možné předpokládat, že došlo k úspěšné depozici metforminu na povrch LDPE.

### 7.3 Skenovací elektronová mikroskopie

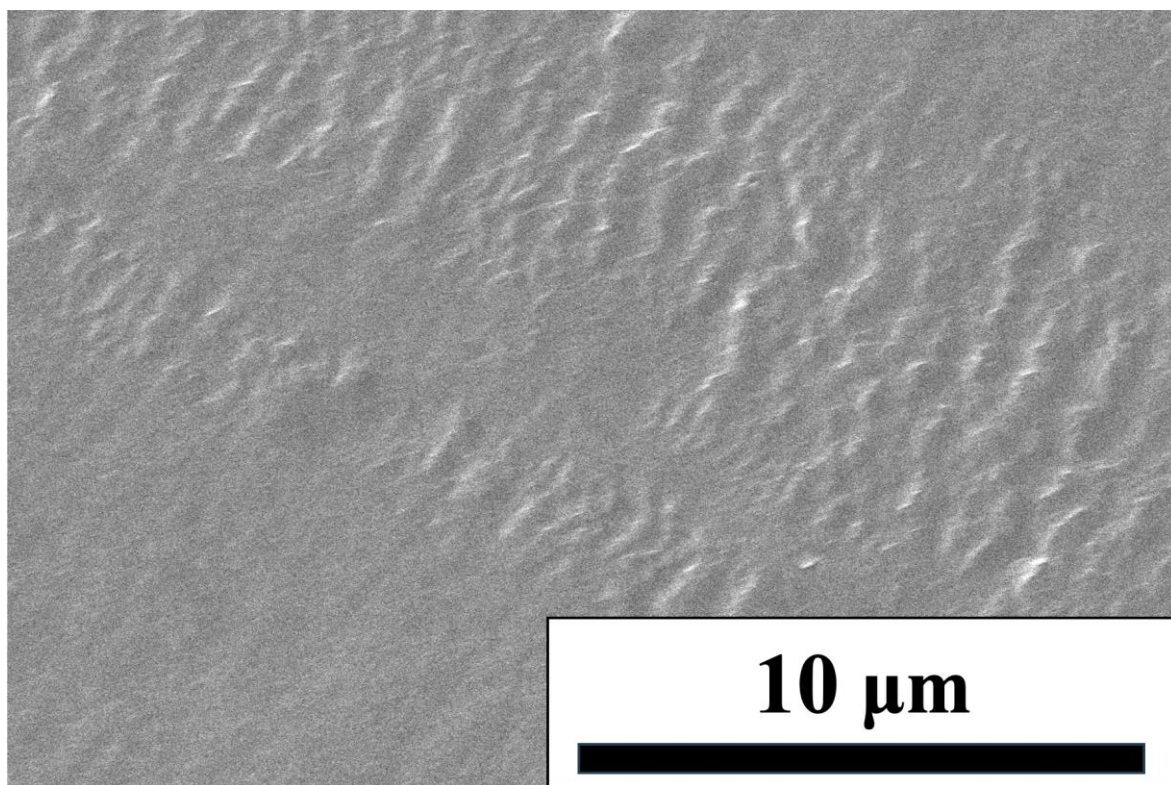
Další použitou metodou, tentokrát pro charakterizaci povrchové topografie, byla skenovací elektronová mikroskopie (SEM). SEM představuje možnost rychlého a efektivního zobrazení povrchových struktur při vysokém rozlišení. Obecně jde o zobrazování systémů, které nejsou pozorovatelné pouhým okem, případně optickým (světelným) mikroskopem. Postupně byly měřeny vzorky čistého neošetřeného povrchu (LDPE), vzorku ošetřeného plazmovým výbojem (LDPE PL), vzorku s navázanou kyselinou akrylovou (AA) a s deponovaným metforminem o koncentracích  $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (MET 0,5) a  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (MET 1). Snímky z měření jsou uvedeny na obrázcích 20–24. V našem případě byl pro vyhotovení snímků použit přístroj Nova NanoSEM 450 (FEI Company, USA). Použité zvětšení bylo ve všech případech  $10\,000\times$  a napětí bylo pro všechna měření 5 kV.

Z mikroskopických obrázků je zřejmé, že neošetřený povrch LDPE (viz Obrázek 20) vykazuje jen velmi malé topografické nehomogenity, které zpravidla odpovídají pozůstatkům procesu zpracování původního materiálu. Situace se však významně mění po opracování polymerního substrátu pomocí nízkoteplotního plazmatu (viz Obrázek 21), kdy je patrné, že tato úprava zapříčinila vznik povrchových nehomogenit. Tento jev je velmi častý a je i obšírně popsán i v literatuře. Na dalších snímcích (viz Obrázek 22–24) je patrné, že po nanesení kyseliny akrylové a později metforminu tyto povrchově topografické útvary již mizí, což je dáno tím, že jsou deponovanou vrstvou překryty. Povrchy se při zachování stejného zvětšení tedy jeví opět jako poměrně hladké. Z naměřených dat je dále zřejmé, že koncentrace metforminu v roztocích pro depozici nemá významný vliv na povrchovou topografii. Všechny vzorky s deponovaným metforminem vypadají téměř identicky, což může být též i dokladem toho, že depozice proběhla úspěšně.

Je třeba zmínit, že další vzorky, které byly připraveny v mezidobí, konkrétně deponované v roztocích metforminu o koncentracích  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (MET 2,0),  $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (MET 5,0),  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (MET 10) a  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (MET 20) bude nutné v budoucnu pomocí SEM zobrazit. V současné době to však nebylo možné, neboť námi používaný přístroj Nova NanoSEM 450 byl toho času mimo provoz.

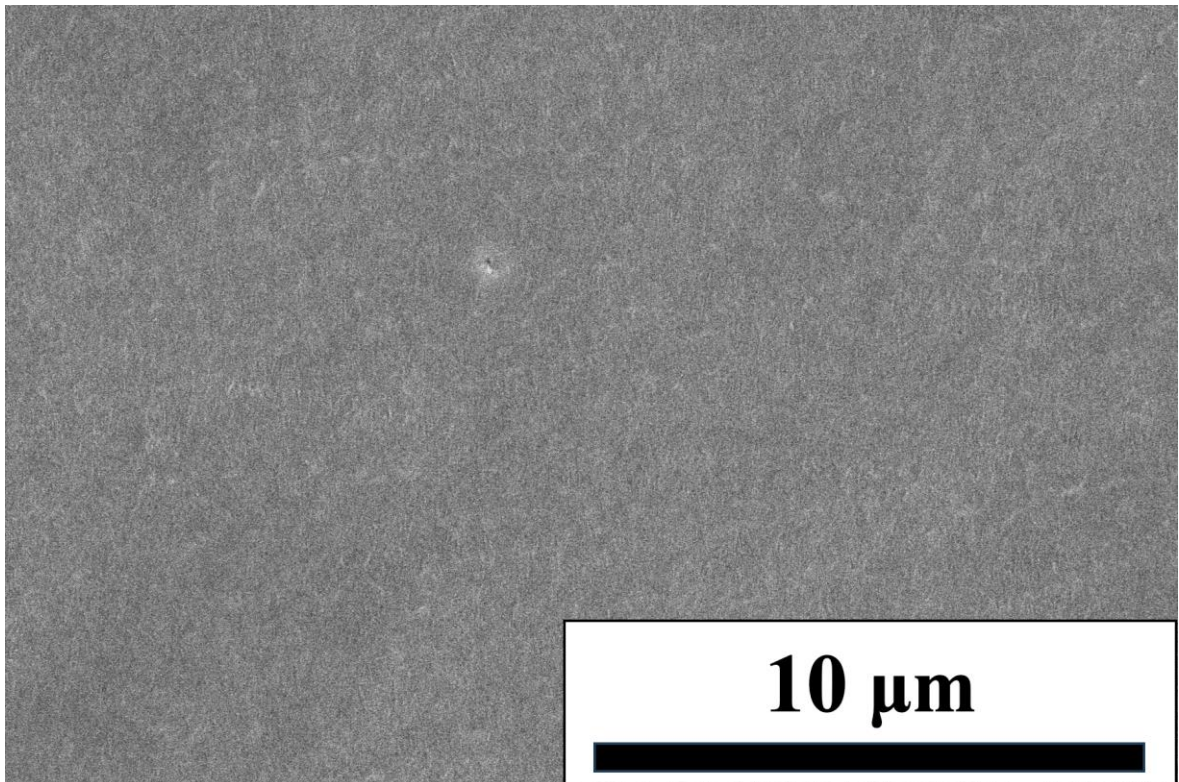


Obrázek 20 Snímek SEM vzorku LDPE (zvětšení 10 000×)

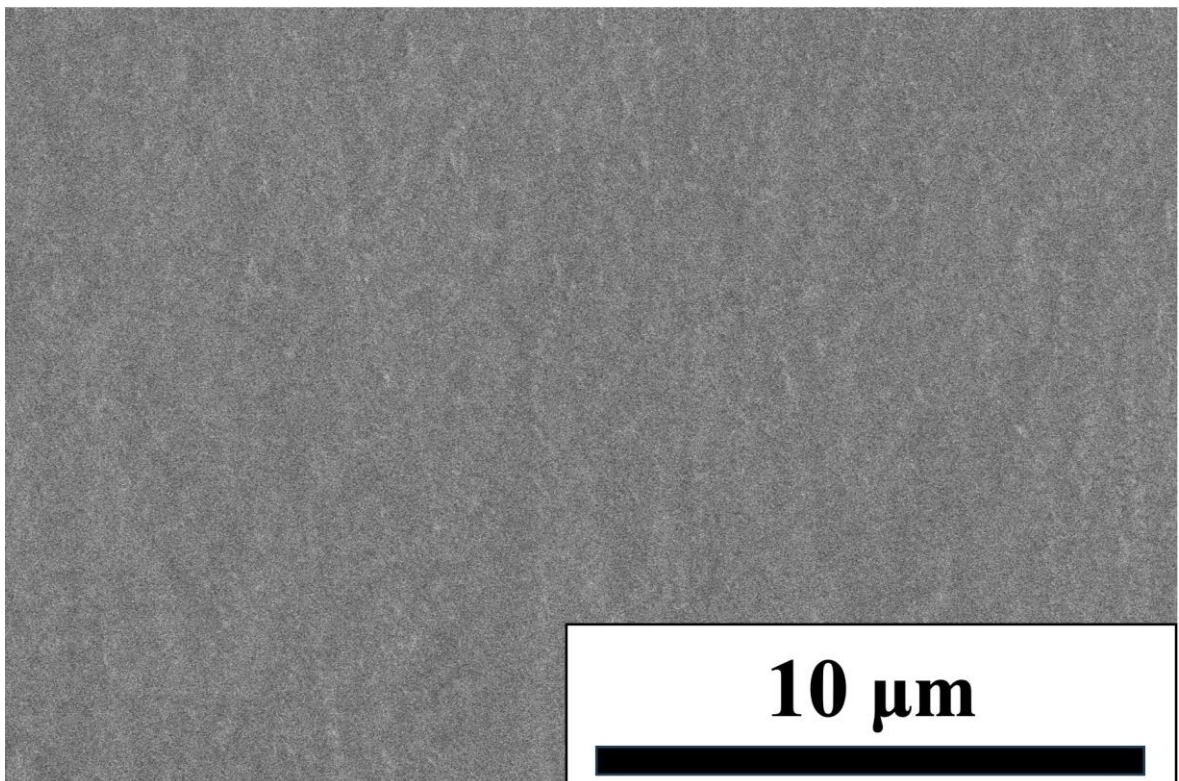


Obrázek 21 Snímek SEM vzorku LDPE PL (zvětšení 10 000×)

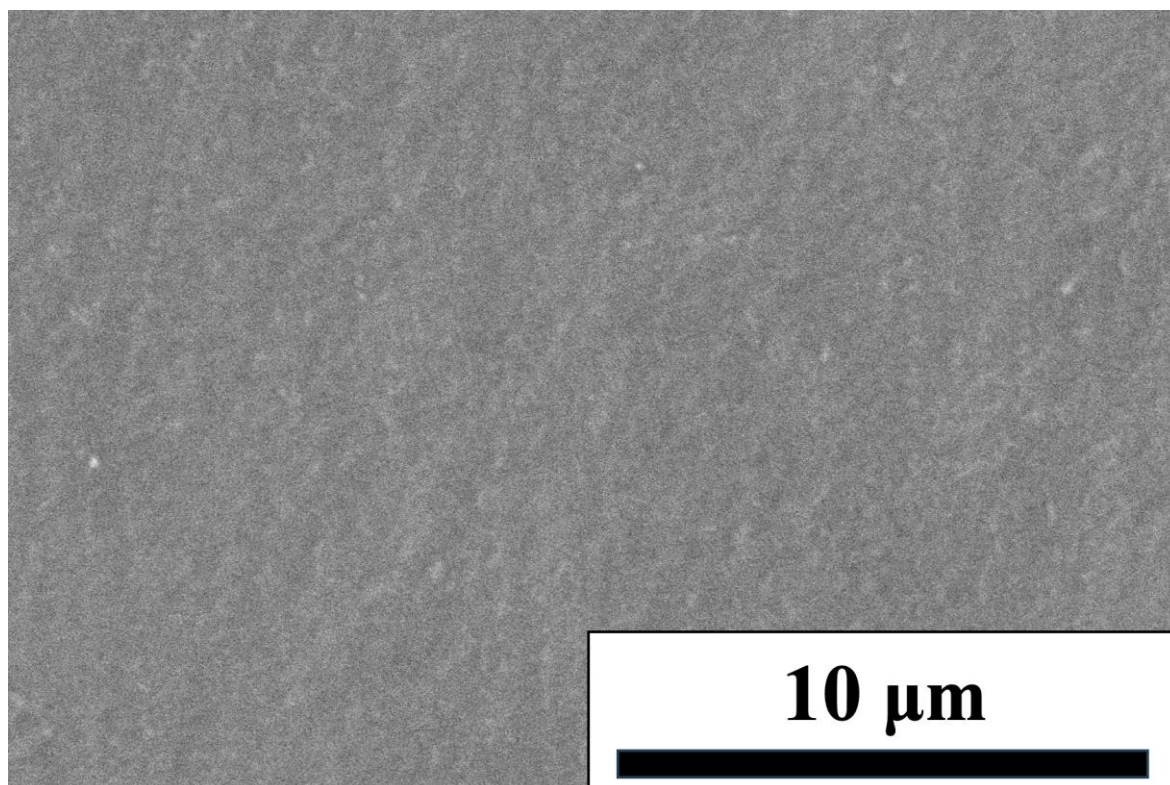




Obrázek 22 Snímek SEM vzorku AA (zvětšení 10 000×)



Obrázek 23 Snímek SEM vzorku MET 0,5 (zvětšení 10 000×)



Obrázek 24 Snímek SEM vzorku MET 1 (zvětšení 10 000×)

## 7.4 Rentgenová fotoelektronová spektroskopie

Pro charakterizaci chemického složení připravených povrchů byla použita metoda XPS, která byla v našem případě prováděna na přístroji ESCALAB 250Xi (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Pomocí této metody jsme byli schopni získat informace o procentuálním zastoupení chemických prvků na vzorcích (viz. Tabulka 4). Největší zastoupení náleželo uhlíku C, kyslíku O a dusíku N, přičemž byla detekována i stopová množství síry S, křemíku Si a chlóru Cl v podílu menším než 1 %.

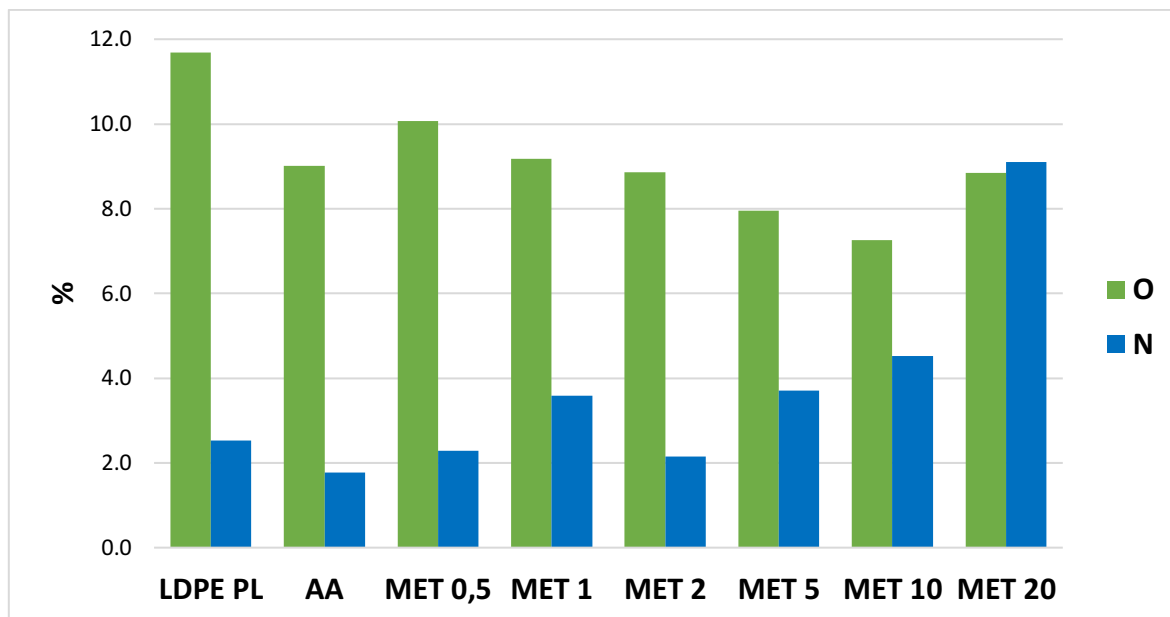
Tabulka 4 Procentuální zastoupení chemických prvků na vzorcích

Vzorek	C [%]	O [%]	N [%]
LDPE PL	85,8	11,7	2,5
AA	89,2	9,0	1,8
MET 0,5	87,6	10,1	2,3
MET 1	87,2	9,2	3,6
MET 2	89,0	8,9	2,2
MET 5	88,3	8,0	3,7
MET 10	88,2	7,3	4,5
MET 20	82,1	8,9	9,1

Ze získaných dat je patrné, že množství kyslíku je nejvyšší po ošetření povrchů plazmovým výbojem a při následných modifikacích povrchu jeho obsah klesá, zatímco obsah dusíku s rostoucí koncentrací deponovaného metforminu roste. Na základě této analýzy je tedy možné předpokládat úspěšné navázání metforminu na povrch LDPE, čímž jsme si potvrdili výsledky z předchozích metod charakterizace.

Tento trend shrnuje i následující graf (viz Obrázek 25), na kterém můžeme vidět procentuální zastoupení kyslíku a dusíku na zkoumaných vzorcích. Na vzorku ošetřeném plazmovým výbojem je velké zastoupení kyslíku, což souvisí s tímto procesem, kdy dochází k inkorporaci kyslíku a jelikož se jednalo o plazmování ve vzduchu, tak bylo detekováno i malé množství dusíku. S rostoucí koncentrací deponovaného metforminu následně obsah kyslíku klesal a zároveň rostl obsah dusíku, který dosáhl nejvyšší hodnoty při koncentraci deponovaného metforminu 20 g·l<sup>-1</sup> na hodnotu 9,1 %.



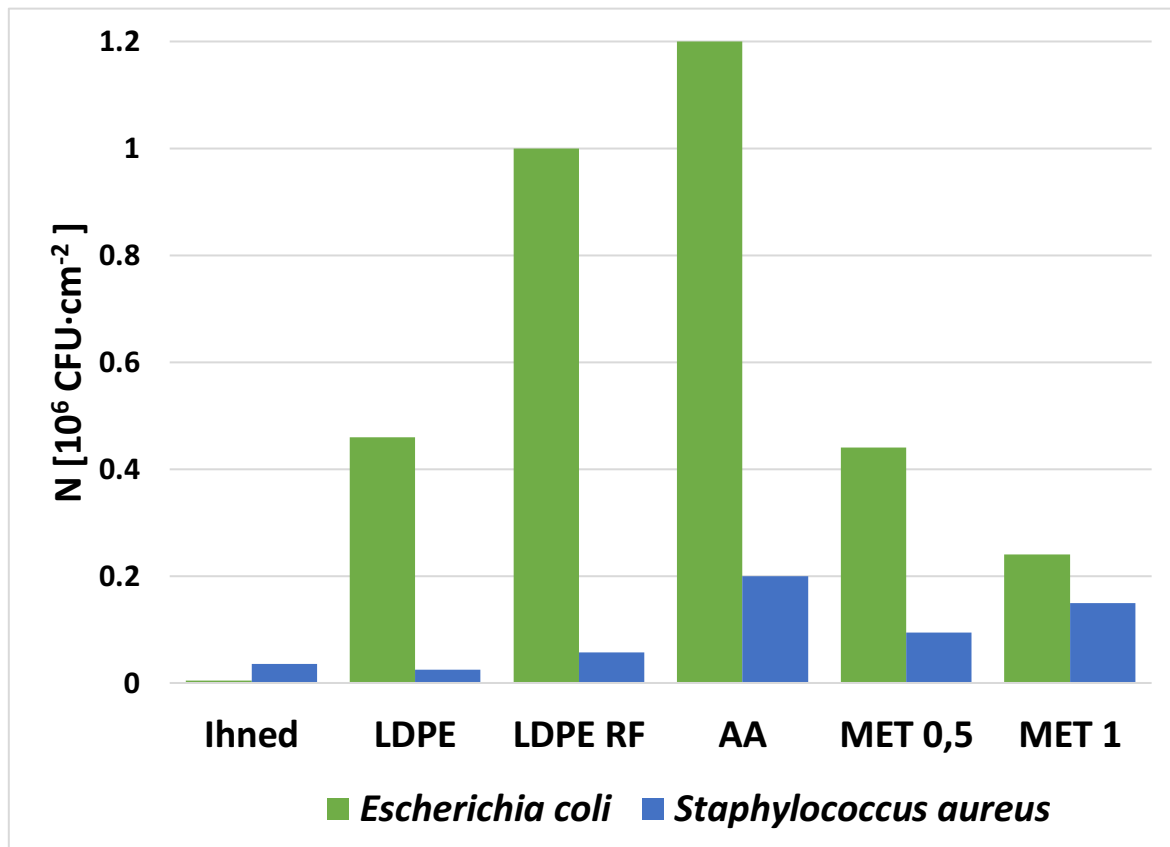


Obrázek 25 Procentuální zastoupení chemických prvků na vzorcích

## 7.5 Test antibakteriální aktivity

Testování antibakteriální aktivity bylo prováděno na základě normy ČSN ISO 22196 Měření antibakteriální aktivity na plastech a jiných neporézních površích a efektivita antibakteriálních vlastností vzorků byla následně vyhodnocena podle normy ČSN EN ISO 20743 Textilie – Stanovení antibakteriální aktivity textilních výrobků. Použité bakteriální kmeny zahrnovaly gramnegativní *Escherichia coli* (CCM 4517) a grampozitivní *Staphylococcus aureus* (CCM 4516) ve formě bakteriální suspenze o koncentraci  $2,7 \cdot 10^5$  CFU·ml<sup>-1</sup> (*Escherichia coli*) a  $2,6 \cdot 10^5$  CFU·ml<sup>-1</sup> (*Staphylococcus aureus*).

Na následujícím grafu (viz Obrázek 26) je vyobrazeno množství životaschopných bakteriálních buněk na vzorcích, které nebyly inkubovány (Ihned), na inkubovaných vzorcích čistého neošetřeného povrchu, který sloužil jako reference (LDPE), vzorcích ošetřených plazmovým výbojem (LDPE PL), vzorcích s navázanou kyselinou akrylovou (AA) a s deponovaným metforminem o koncentracích 0,5 g·l<sup>-1</sup> (MET 0,5) a 1 g·l<sup>-1</sup> (MET 1). Tabulka 5 dále shrnuje přesné hodnoty životaschopných buněk na vzorcích po inkubaci a také antibakteriální aktivitu těchto vzorků.



Obrázek 26 Počet životaschopných bakterií

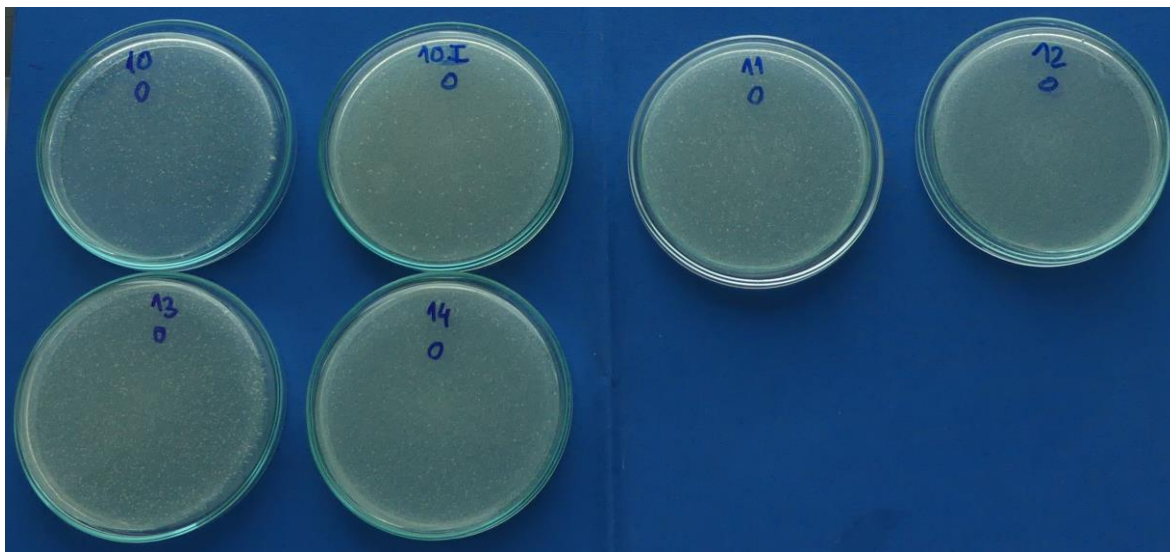
Tabulka 5 Antibakteriální aktivita vzorků

Vzorek	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	N [CFU·cm <sup>-2</sup> ]	R	N [CFU·cm <sup>-2</sup> ]	R
LDPE	$4,6 \times 10^5$	$U_t = 5,8$	$2,5 \times 10^4$	$U_t = 5,1$
LDPE PL	$1,0 \times 10^6$	0	$5,7 \times 10^4$	0
AA	$1,2 \times 10^6$	0	$2,0 \times 10^5$	0
MET 0,5	$4,4 \times 10^5$	0	$9,4 \times 10^4$	0
MET 1	$2,4 \times 10^5$	0,3	$1,5 \times 10^5$	0

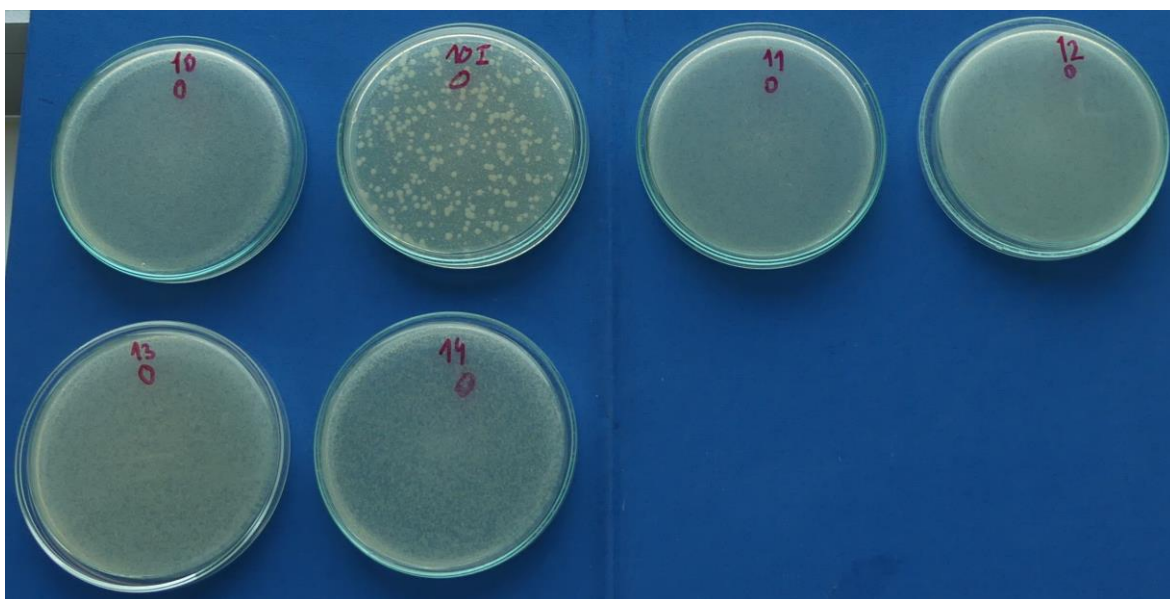
Už z grafu je patrné, že vzorky nevykazovaly významnou antibakteriální aktivitu, neboť počty životaschopných bakteriálních buněk byly po inkubaci stejné ne-li větší než u reference, tedy čistého LDPE. Toto tvrzení se následně potvrdilo při výpočtu antibakteriální efektivity vzorků, která je uvedena v Tabulce 5. Jediný vzorek, který vykazoval alespoň nějakou antibakteriální aktivitu, jejíž hodnota byla 0,3 byl MET 1 proti bakterii *Escherichia coli*. Ani tento vzorek však nemůžeme považovat za antibakteriální, neboť podle normy (viz Tabulka 1) musí mít vzorek hodnotu antibakteriální aktivity alespoň 1, aby mohl být zařazen do kategorie se slabou antibakteriální aktivitou.

Snímky Petriho misek po kultivaci bakteriálních buněk jsou uvedeny na Obrázku 27 a 28.

V době odevzdání této diplomové práce nebylo možno získat výsledky antibakteriálních aktivit pro vzorky s vyššími koncentracemi metforminu při depozici, tj. koncentrace 2 až 20 g·l<sup>-1</sup>. Toto bude předmětem následujícího studia. Je vysoce pravděpodobné, že do termínu obhajob diplomové práce budou výsledky již získány.



Obrázek 27 Petriho misky po inkubaci vzorků se *Staphylococcus aureus*



Obrázek 28 Petriho misky po inkubaci vzorků s *Escherichia coli*

## ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla depozice antidiabetického léčiva metforminu na polymerní povrch LDPE a stanovení, zda tato látka vykazuje antimikrobiální aktivitu. Metformin byl na povrch LDPE deponován pomocí vícestupňového fyzikálně-chemického procesu, který zahrnoval ošetření povrchů plazmovým výbojem ve vzduchu, radikálovou polymeraci kyseliny akrylové na vzniklé reaktivní radikály na povrchu a konečnou depozici metforminu na karboxylové skupiny. Následná charakterizace připravených substrátů byla provedena pomocí metod FTIR, mezního úhlu smáčení a povrchové energie, SEM a XPS. Tato charakterizace sloužila k ověření, zda byla depozice metforminu úspěšná či nikoliv. Test antibakteriální aktivity připravených povrchů byl nakonec proveden podle norem ČSN ISO 22196 a ČSN EN ISO 20743, přičemž použité kmeny bakterií byly kmeny gramnegativní *Escherichia coli* (CCM 4517) a grampozitivní *Staphylococcus aureus* (CCM 4516).

První metodou charakterizace připravených povrchů byla FTIR s modifikací ATR. Tato metoda není ve většině případů příliš citlivá pro detekci tenkých povrchových vrstev, neboť proniká do větších hloubek. Nicméně už při nižších koncentracích deponovaného metforminu jsme mohli pozorovat charakteristické píky pro funkční skupiny metforminu a mohli jsme tedy předpokládat, že depozice proběhla úspěšně. Nejvyšší intenzita píků byla zaznamenána při koncentraci deponovaného metforminu  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , naopak při koncentracích  $0,5$  a  $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  nebyly detekovány žádné funkční skupiny charakteristické pro metformin. Tato skutečnost mohla být způsobena heterogenní povahou povrchu vzorků nebo příliš slabou deponovanou vrstvou metforminu.

Další metodou charakterizace bylo měření mezního úhlu pomocí metody přisedlé kapky a následné vyhodnocení povrchové energie vzorků. I na základě výsledků této metody se dá předpokládat úspěšná depozice metforminu, neboť mezní úhel deionizované vody prudce klesl ve srovnání s čistým LDPE z průměrné hodnoty  $82,6^\circ$  na  $54,7^\circ$  a se vzrůstající koncentrací deponovaného metforminu rostla i hodnota mezního úhlu na maximální hodnotu  $63,4^\circ$  při koncentraci  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Povrchová energie vzorků s deponovaným metforminem naopak vzrostla oproti čistému LDPE.

Povrchová topografie vzorků byla vyhodnocena pomocí zobrazovací metody SEM. Ze získaných snímků je zřejmé, že čistý povrch LDPE vykazuje jen minimální topografické nehomogenity, avšak plazmová úprava zapříčinila vznik těchto nehomogenit. Pro vzorky

s deponovaným metforminem platí, že tyto topografické útvary mizí, což je dáno tím, že jsou deponovanou vrstvou překryty.

Poslední metodou, kterou jsme použili k ověření úspěšně depozice metforminu byla prvková analýza XPS. Výsledky z této metody ukázaly jasný trend rostoucího podílu dusíku u vzorků s větší koncentrací metforminu, a naopak klesající podíl přítomného kyslíku, který vznikl po ošetření povrchů plazmovým výbojem. Na základě této a předchozích metod tedy můžeme potvrdit, že depozice metforminu na povrch LDPE byla úspěšná.

Prokázání antibakteriální aktivity metforminu na povrchu vzorků však už tak úspěšné nebylo. Z výsledků získaných z antibakteriálních testů lze konstatovat, že deponovaný metformin na povrchu LDPE vykazuje pouze minimální, ne-li nulovou antibakteriální aktivitu. Jediný vzorek, u kterého byla naměřena alespoň nějaké antibakteriální aktivita byla vzorek se koncentrací deponovaného metforminu  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  vůči bakterii *Escherichia coli*. Je však nutné zmínit, že u vzorků s větší koncentrací deponovaného metforminu, tj. 2 až  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , nebylo možné v době odevzdání této práce získat výsledky antibakteriálních aktivit a budou tedy předmětem dalšího zkoumání.

Z doposud získaných dat se dá konstatovat, že využití metforminu jakožto antibakteriálního činidla se zdá být velmi omezené, neboť při těchto koncentracích nevykazuje dostatečnou antibakteriální aktivitu. Alternativou může být využití metforminu jako adjuvantní antimikrobiální činidlo pro dosažení synergického účinku v kombinaci s konvenčními antibiotiky.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

1. TRIGGLE, Chris R.; MOHAMMED, Ibrahim; BSHEESH, Khalifa; MAREI, Isra; YE, Kevin et al. Metformin: Is it a drug for all reasons and diseases? Online. *Metabolism*. 2022, roč. 133. ISSN 00260495. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155223>. [cit. 2023-10-07].
2. YENDAPALLY, Raghunandan; SIKAZWE, Donald; KIM, Subin S.; RAMSINGHANI, Sushma; FRASER-SPEARS, Rheaclare et al. A review of phenformin, metformin, and imeglimin. Online. *Drug Development Research*. 2020, roč. 81, č. 4, s. 390-401. ISSN 0272-4391. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ddr.21636>. [cit. 2023-10-20].
3. <https://patentimages.storage.googleapis.com/1d/08/77/ca5e16e7feea83/WO2019154769A1.pdf>
4. FENG, Jin; WANG, Xiaohui; YE, Xiaochun; ARES, Irma; LOPEZ-TORRES, Bernardo et al. Mitochondria as an important target of metformin: The mechanism of action, toxic and side effects, and new therapeutic applications. Online. *Pharmacological Research*. 2022, roč. 177. ISSN 10436618. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106114>. [cit. 2023-11-29].
5. PERUŠIČOVÁ, Jindřiška. Proč je metformin lékem první volby pro nemocné s *diabetes mellitus* 2. typu? *Interní medicína pro praxi*. 2010, roč. 12, č. 7 a 8, s. 385 – 386.
6. *Total synthesis of metformin*. Online. The Science Snail. 2020. Dostupné z: <https://www.sciencesnail.com/science/total-synthesis-of-metformin>. [cit. 2024-04-22].
7. FORETZ, Marc; GUIGAS, Bruno a VIOLLET, Benoit. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. Online. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019, roč. 15, č. 10, s. 569-589. ISSN 1759-5029. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0242-2>. [cit. 2023-11-13].
8. LAMOIA, Traci E a SHULMAN, Gerald I. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. Online. *Endocrine Reviews*. 2021, roč. 42, č. 1, s. 77–96. ISSN 0163-769X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa023>. [cit. 2023-10-07].
9. CAMPBELL, Jonathan E. a NEWGARD, Christopher B. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. Online. *Nature Reviews Molecular Cell*

- Biology*. 2021, roč. 22, č. 2, s. 142-158. ISSN 1471-0072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00317-7>. [cit. 2023-11-15].
10. LEE, Shin-Hae; PARK, Shi-Young a CHOI, Cheol Soo. Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. Online. *Diabetes & Metabolism Journal*. 2022, roč. 46, č. 1, s. 15-37. ISSN 2233-6079. Dostupné z: <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0280>. [cit. 2023-11-15].
11. BERBUDI, Afiat; RAHMADIKA, Nofri; TIAHJADI, Adi Imam a RUSLAMI, Rovina. Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System. Online. *Current Diabetes Reviews*. 2020, roč. 16, č. 5, s. 442-449. ISSN 15733998. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/1573399815666191024085838>. [cit. 2023-11-15].
12. GALICIA-GARCIA, Unai; BENITO-VICENTE, Asier; JEBARI, Shifa; LARREA-SEBAL, Asier; SIDDIQI, Haziq et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, roč. 21, č. 17. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>. [cit. 2023-11-15].
13. HALUZÍK, Martin. Metformin a jeho postavení v léčbě *diabetes mellitus* 2. typu. *Interní medicína pro praxi*. 2014, roč. 16, č. 2, s. 67-69.
14. KUAN, Isabelle H. S.; SAVAGE, Ruth L.; DUFFULL, Stephen B.; WALKER, Robert J. a WRIGHT, Daniel F. B. The Association between Metformin Therapy and Lactic Acidosis. Online. *Drug Safety*. 2019, roč. 42, č. 12, s. 1449-1469. ISSN 0114-5916. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40264-019-00854-x>. [cit. 2023-11-29].
15. SALVATORE, Teresa; PAFUNDI, Pia Clara; MARFELLA, Raffaele; SARDU, Celestino; RINALDI, Luca et al. Metformin lactic acidosis: Should we still be afraid? Online. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2019, roč. 157. ISSN 01688227. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107879>. [cit. 2023-11-29].
16. NASERI, Amirreza; SANAIE, Sarvin; HAMZEHZADEH, Sina; SEYEDI-SAHEBARI, Sepideh; HOSSEINI, Mohammad-Salar et al. Metformin: new applications for an old drug. Online. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 2023, roč. 34, č. 2, s. 151-160. ISSN 2191-0286. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2022-0252>. [cit. 2023-12-20].
17. PERUŠIČOVÁ, Jindřiška. Je Metformin pouze antidiabetikum? *Interní medicína pro praxi*. 201, roč. 12, č. 7 a 8, s. 385-386.



18. KULKARNI, Ameya S.; GUBBI, Sriram a BARZILAI, Nir. Benefits of Metformin in Attenuating the Hallmarks of Aging. Online. *Cell Metabolism*. 2020, roč. 32, č. 1, s. 15-30. ISSN 15504131. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.04.001>. [cit. 2023-12-22].
19. CHEN, Sheng; GAN, Donghao; LIN, Sixiong; ZHONG, Yiming; CHEN, Mingjue et al. Metformin in aging and aging-related diseases: clinical applications and relevant mechanisms. Online. *Theranostics*. 2022, roč. 12, č. 6, s. 2722-2740. ISSN 1838-7640. Dostupné z: <https://doi.org/10.7150/thno.71360>. [cit. 2023-12-22].
20. ADAK, Tuğba; SAMADI, Afshin; ÜNAL, Ayşe Zeynep a SABUNCUOĞLU, Suna. A reappraisal on metformin. Online. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018, roč. 92, s. 324-332. ISSN 02732300. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.12.023>. [cit. 2023-12-22].
21. DUAN, Xuan; ZHOU, Meiyang; ZHOU, Guangqin; ZHU, Qiyu a LI, Weihong. Effect of metformin on adiponectin in PCOS: A meta-analysis and a systematic review. Online. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2021, roč. 267, s. 61-67. ISSN 03012115. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2021.10.022>. [cit. 2023-12-22].
22. ZHANG, Yueqi; WANG, Hongbing a XIAO, Hua. Metformin Actions on the Liver: Protection Mechanisms Emerging in Hepatocytes and Immune Cells against NASH-Related HCC. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 9. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22095016>. [cit. 2023-12-22].
23. MASADEH, Majed M; ALZOUBI, Karem H; MASADEH, Majd M a ABURASHED, Zainah O. Metformin as a Potential Adjuvant Antimicrobial Agent Against Multidrug Resistant Bacteria. Online. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*. 2021, roč. 13, s. 83-90. ISSN 1179-1438. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/CPAA.S297903>. [cit. 2023-12-22].
24. MALIK, Faiza; MEHDI, Syed Faizan; ALI, Haroon; PATEL, Priya; BASHARAT, Anam et al. Is metformin poised for a second career as an antimicrobial? Online. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2018, roč. 34, č. 4. ISSN 1520-7552. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/dmrr.2975>. [cit. 2023-12-22].
25. DEROSA, Giuseppe; D'ANGELO, Angela; ROMANO, Davide a MAFFIOLI, Pamela. Effects of metformin extended release compared to immediate release formula on

- glycemic control and glycemic variability in patients with type 2 diabetes. Online. *Drug Design, Development and Therapy*. 2017, roč. 11, s. 1481-1488. ISSN 1177-8881. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S131670>. [cit. 2023-12-25].
26. ABRILLA, Aedrian A.; PAJES, A. Nico Nahar I. a JIMENO, Cecilia A. Metformin extended-release versus metformin immediate-release for adults with type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Online. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2021, roč. 178. ISSN 01688227. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.108824>. [cit. 2023-12-25].
27. TORUNOGLU, Sema Tuna; ZAJDA, Agnieszka; TAMPIO, Janne; MARKOWICZ-PIASECKA, Magdalena a HUTTUNEN, Kristiina M. Metformin derivatives – Researchers’ friends or foes? Online. *Biochemical Pharmacology*. 2023, roč. 215. ISSN 00062952. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115743>. [cit. 2023-12-26].
28. CAO, Yufang; XU, Simeng; XU, Cangcang; XIAO, Di; CHEN, Zhuliang et al. Synthesis, Anticancer Activity and Mechanism of Phenformin Derivatives. Online. *ChemistrySelect*. 2022, roč. 7, č. 5. ISSN 2365-6549. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/slct.202104250>. [cit. 2023-12-26].
29. LIU, Guanyi; LI, Dingyang; ZHANG, Liwei; XU, Qiuping; ZHUANG, Dexuan et al. Phenformin Down-Regulates c-Myc Expression to Suppress the Expression of Pro-Inflammatory Cytokines in Keratinocytes. Online. *Cells*. 2022, roč. 11, č. 15. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells11152429>. [cit. 2023-12-26].
30. CHEVALIER, Clémence; FOUQUERAY, Pascale a BOLZE, Sébastien. Imeglimin: A Clinical Pharmacology Review. Online. *Clinical Pharmacokinetics*. 2023, roč. 62, č. 10, s. 1393-1411. ISSN 0312-5963. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40262-023-01301-y>. [cit. 2023-12-26].
31. YANAI, Hidekatsu; ADACHI, Hiroki; HAKOSHIMA, Mariko a KATSUYAMA, Hisayuki. Glucose-Lowering Effects of Imeglimin and Its Possible Beneficial Effects on Diabetic Complications. Online. *Biology*. 2023, roč. 12, č. 5. ISSN 2079-7737. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biology12050726>. [cit. 2023-12-26].
32. GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, John F. a DOWLING, Patricia M. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Online. Ames, Iowa, USA: Wiley, 2013. ISBN 9780470963029. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781118675014>. [cit. 2024-01-02].

33. MELANDER, Roberta J.; ZURAWSKI, Daniel V. a MELANDER, Christian. Narrow-spectrum antibacterial agents. Online. *MedChemComm*. 2018, roč. 9, č. 1, s. 12-21. ISSN 2040-2503. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C7MD00528H>. [cit. 2024-01-02].
34. LEVISON, Matthew E. a LEVISON, Julie H. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents. Online. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2009, roč. 23, č. 4, s. 791-815. ISSN 08915520. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.06.008>. [cit. 2024-01-02].
35. CHAKRAVERTY, Raja; SAMANTA, Kalyan; MANDAL, Pallab; KARMAKAR, Samit a KARMAKAR, Sanmoy. Mechanisms of action of antibacterial agents (AMA). Online. In: *How Synthetic Drugs Work*. Elsevier, 2023, s. 421-429. ISBN 9780323998550. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99855-0.00018-X>. [cit. 2024-01-03].
36. PARKER, Nina; SCHNEEGURT, Mark; TU, Anh-Hue Thi; FORSTER, Brian M. a LISTER, Philip. *Microbiology*. Houston, Texas: OpenStax Collage, Rice University, 2016. ISBN 978-1-947172-23-4. Dostupné z: <https://openstax.org/details/books/microbiology>. [cit. 2024-01-03].
37. BOLLENBACH, Tobias. Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. Online. *Current Opinion in Microbiology*. 2015, roč. 27, s. 1-9. ISSN 13695274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.008>. [cit. 2024-01-03].
38. TANG, Ka Wah Kelly; MILLAR, Beverley C. a MOORE, John E. Antimicrobial Resistance (AMR). Online. *British Journal of Biomedical Science*. 2023, roč. 80. ISSN 2474-0896. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>. [cit. 2024-02-01].
39. ABUSHAHEEN, Manar Ali; MUZAHEED; FATANI, Amal Jamil; ALOSAIMI, Mohammed; MANSY, Wael et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. Online. *Disease-a-Month*. 2020, roč. 66, č. 6. ISSN 00115029. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971>. [cit. 2024-02-01].
40. KATHURIA, Deepika; RAUL, Akshay D.; WANJARI, Pravin a BHARATAM, Prasad V. Biguanides: Species with versatile therapeutic applications. Online. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021, roč. 219. ISSN 02235234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113378>. [cit. 2024-01-25].

41. GRYTSAI, Oleksandr; MYRGORODSKA, Iuliia; ROCCHI, Stéphane; RONCO, Cyril a BENHIDA, Rachid. Biguanides drugs: Past success stories and promising future for drug discovery. Online. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021, roč. 224. ISSN 02235234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113726>. [cit. 2024-01-25].
42. LI, Rui; YANG, Guoxing; WANG, Yudan; LIU, Lijia; WANG, Qiang et al. Synthesis of antibacterial polyether biguanide curing agent and its cured antibacterial epoxy resin. Online. *Designed Monomers and Polymers*. 2021, roč. 24, č. 1, s. 63-72. ISSN 1568-5551. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/15685551.2021.1900025>. [cit. 2024-01-25].
43. LEHOČKÝ, Marián. Biofunkcionalizace povrchů polymerů: Polymer surface biofunctionalization: teze přednášky k profesorskému jmenovacímu řízení v oboru fyzikální chemie. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2023. ISBN 978-80-214-6157-4.
44. OZALTIN, Kadir; DI MARTINO, Antonio; CAPAKOVA, Zdenka; LEHOČKY, Marian; HUMPOLICEK, Petr et al. Plasma Mediated Chlorhexidine Immobilization onto Polylactic Acid Surface via Carbodiimide Chemistry: Antibacterial and Cytocompatibility Assessment. Online. *Polymers*. 2021, roč. 13, č. 8. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym13081201>. [cit. 2024-01-26].
45. DA SILVA, Thaís M; ALVES, Flávio RF; LUTTERBACH, Márcia TS; PAIVA, Maurício M a FERREIRA, Dennis de Carvalho. Comparison of antibacterial activity of alexidine alone or as a final irrigant with sodium hypochlorite and chlorhexidine. Online. *BDJ Open*. 2018, roč. 4, č. 1. ISSN 2056-807X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/bdjopen.2018.3>. [cit. 2024-01-29].
46. KHOLINA, E. G.; KOVALENKO, I. B.; BOZDAGANYAN, M. E.; STRAKHOVSKAYA, M. G. a OREKHOV, P. S. Cationic Antiseptics Facilitate Pore Formation in Model Bacterial Membranes. Online. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2020, roč. 124, č. 39, s. 8593-8600. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c07212>. [cit. 2024-01-29].
47. SZKOŁUDA, Patrycja a Tomasz M. KARPIŃSKI. Polyhexanide (PHMB) – properties and applications in medicine. Online. *European Journal of Biological Research*. 2020, roč. 10, č. 3, s. 225-231. ISSN 2449-8955. Dostupné z: <https://doi.org/10.5281/zenodo.3956819>. [cit. 2024-01-29].

48. Meherunisa Jaiswal S, Seth V. Study of Metformin Effect on Antimicrobial Property. Online. *International Archives of BioMedical and Clinical Research*. 2018, roč. 4, č. 3, s. 85-87. Dostupné z: <https://doi.org/10.21276/iabcr.2018.4.3.4>. [cit. 2024-01-29].
49. GUO, Tingting; SUN, Xiaoli; YANG, Jie; YANG, Liying; LI, Mengying et al. Metformin reverse minocycline to inhibit minocycline-resistant *Acinetobacter baumannii* by destroy the outer membrane and enhance membrane potential in vitro. Online. *BMC Microbiology*. 2022, roč. 22, č. 1. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02629-4>. [cit. 2024-01-29].
50. WANG, Xueyu; WANG, Shaobo; GAO, Jiao; YAO, Shuncheng; XU, Teng et al. Metformin capped  $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$  nanosheets for chemodynamic wound disinfection. Online. *Nano Research*. 2023, roč. 16, č. 3, s. 3991-3997. ISSN 1998-0124. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12274-022-4457-5>. [cit. 2024-01-29].
51. KARAKURT, Ilkay; OZALTIN, Kadir; PIŠTĚKOVÁ, Hana; VESELA, Daniela; MICHAEL-LINDHARD, Jonas et al. Effect of Saccharides Coating on Antibacterial Potential and Drug Loading and Releasing Capability of Plasma Treated Polylactic Acid Films. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, roč. 23, č. 15. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms23158821>. [cit. 2024-03-18].
52. MOHAMED, M.A.; JAAFAR, J.; ISMAIL, A.F.; OTHMAN, M.H.D. a RAHMAN, M.A. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. Online. *Membrane Characterization*. Elsevier, 2017, s. 3-29. ISBN 9780444637765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00001-2>. [cit. 2024-02-07].
53. MARMUR, Abraham; DELLA VOLPE, Claudio; SIBONI, Stefano; AMIRFAZLI, Alidad a DRELICH, Jaroslav W. Contact angles and wettability: towards common and accurate terminology. Online. *Surface Innovations*. 2017, roč. 5, č. 1, s. 3-8. ISSN 2050-6252. Dostupné z: <https://doi.org/10.1680/jsuin.17.00002>. [cit. 2024-02-08].
54. KWOK, D.Y. a NEUMANN, A.W. Contact angle measurement and contact angle interpretation. Online. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1999, roč. 81, č. 3, s. 167-249. ISSN 00018686. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00087-6](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00087-6). [cit. 2024-04-29].
55. SWILEM, Ahmed E.; LEHOCKÝ, Marian; HUMPOLÍČEK, Petr; KUČEKOVÁ, Zdenka; NOVÁK, Igor et al. Description of D-glucosamine immobilization kinetics onto poly(lactic acid) surface via a multistep physicochemical approach for preparation of

- novel active biomaterials. Online. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2017, roč. 105, č. 11, s. 3176-3188. ISSN 1549-3296. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36158>. [cit. 2024-03-23].
56. MOHAMMED, Azad; ABDULLAH, Avin. Scanning electron microscopy (SEM): A review. *Proceedings of the 2018 International Conference of Hydraulics and Pneumatics – HARVEX*. Baile Gavora, Romania, 2018, s. 77-85. ISSN 1454-8003.
57. MAHONEY, Janet; MONROE, Caroline; SWARTLEY, Anya M.; UCAK-ASTARLIOGLU, Mine G. a ZOTO, Christopher A. Surface analysis using X-ray photoelectron spectroscopy. Online. *Spectroscopy Letters*. 2020, roč. 53, č. 10, s. 726-736. ISSN 0038-7010. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/00387010.2020.1824197>. [cit. 2024-04-24].
58. ČSN ISO 22196. *Měření antibakteriální aktivity na plastech a jiných neporézních površích*. Praha: Česká agentura pro standardizaci, 2021, 24 s. Třídící znak 640782.
59. ČSN EN ISO 20743. *Textilie – Stanovení antibakteriální aktivity textilních výrobků*. Brno: Textilní zkušební ústav, 2022, 24 s. Třídící znak 800068.
60. SABBAGH, B.A.; KUMAR, P.V.; CHEW, Y.L.; CHIN, J.H. a AKOWUAH, G.A. Determination of metformin in fixed-dose combination tablets by ATR-FTIR spectroscopy. Online. *Chemical Data Collections*. 2022, roč. 39. ISSN 24058300. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2022.100868>. [cit. 2024-04-14].

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

LDPE	Nízkohustotní polyethylen
DM2T	<i>Diabetes mellitus 2. typu</i>
WHO	Světová zdravotnická organizace
IR	Inzulínová rezistence
ROS	Volné kyslíkové radikály
GIT	Gastrointestinální trakt
PCOS	Syndrom polycystických ovarií
NASH	Nealkoholická jaterní steatohepatitida
XR	Extended release
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MBC	Minimální baktericidní koncentrace
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
USA	Spojené státy americké
PHMB	Polyhexamethylenbiguanid
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid
NHS	N-Hydroxysukcinimid
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
IR	Infračervená spektroskopie
UV	Ultrafialové záření
ATR	Zeslabená totální reflektance
SEE	Surface Energy Evaluation
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
BSE	Zpětně odražené elektrony

SE	Sekundární elektrony
XPS	Rentgenová fotoelektronová spektroskopie
BE	Vazebná energie
KE	Kinetická energie
SCDLP	Soya Casein Digest Lecithin Polysorbate
CFU	Colony forming units
PL	Plazmový výboj
MET	Metformin
AA	Kyselina akrylová



**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Syntéza metforminu (vytvořeno v ChemDraw) [3] .....	12
Obrázek 2 Kondenzace hydrochloridu dimethylaminu a kyanoguanidinu (vytvořeno v ChemDraw) [6] .....	13
Obrázek 3 Chemická struktura sulfenamidových a sulfonamidových derivátů metforminu (vytvořeno v ChemDraw) [27].....	19
Obrázek 4 Chemická struktura biguanidů s antimikrobiální aktivitou [41] .....	24
Obrázek 5 Mechanismus působení chlorhexidinu [41] .....	26
Obrázek 6 Fyzikálně-chemický vícestupňový proces .....	34
Obrázek 7 Vysokofrekvenční (40 kHz) plazmový reaktor Diener Pico (Diener electronic GmbH & Co. KG, Německo) .....	35
Obrázek 8 Interakce IR paprsku se vzorkem při FTIR-ATR [52] .....	37
Obrázek 9 FT-IR spektrometr Nicolet iS5 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) .....	37
Obrázek 10 Mezní úhel přisedlé kapky kapaliny na pevném povrchu [53] .....	38
Obrázek 11 SEE system (Advex Instruments, s.r.o., Česká republika) .....	39
Obrázek 12 Části SEM [56].....	40
Obrázek 13 Skenovací elektronový mikroskop Nova NanoSEM 450 (FEI Company, USA) .....	41
Obrázek 14 Rentgenový fotoelektronový spektrometr (XPS) ESCALAB 250Xi (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).....	43
Obrázek 15 Biohazard box Safemate 1.2 (BioAir S.p.A., Italy) .....	45
Obrázek 16 Horkovzdušný inkubátor Memmert INB 400 (Mettler GmbH + Co. KG, Germany) .....	46
Obrázek 17 FTIR-ATR spektrum metforminu [60].....	47
Obrázek 18 Infračervená spektra vzorku čistého povrchu LDPE (a), vzorku ošetřeného plazmovým výbojem (b), vzorku s navázanou kyselinou akrylovou (c), vzorku s deponovaným metforminem o koncentracích 0,5 g·l <sup>-1</sup> (d) a 1 g·l <sup>-1</sup> (e) a čistý metformin (f) .....	49
Obrázek 19 Infračervená spektra vzorku čistého povrchu LDPE (a), vzorku s deponovaným metforminem o koncentracích 2 g·l <sup>-1</sup> (b), 5 g·l <sup>-1</sup> (c), 10 g·l <sup>-1</sup> (d) a 20 g·l <sup>-1</sup> (e) a čistý metformin (f).....	49
Obrázek 20 Snímek SEM vzorku LDPE (zvětšení 10 000 ×) .....	53
Obrázek 21 Snímek SEM vzorku LDPE PL (zvětšení 10 000 ×).....	53
Obrázek 22 Snímek SEM vzorku AA (zvětšení 10 000 ×) .....	54
Obrázek 23 Snímek SEM vzorku MET 0,5 (zvětšení 10 000 ×).....	54
Obrázek 24 Snímek SEM vzorku MET 1 (zvětšení 10 000 ×).....	55
Obrázek 25 Procentuální zastoupení chemických prvků na vzorcích .....	57
Obrázek 26 Počet životaschopných bakterií .....	58

---

Obrázek 27 Petriho misky po inkubaci vzorků se <i>Staphylococcus aureus</i> .....	60
Obrázek 28 Petriho misky po inkubaci vzorků s <i>Escherichia coli</i> .....	60

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Efektivita antibakteriálních vlastností.....	45
Tabulka 2 Mezní úhly kapek použitých kapalin na površích jednotlivých vzorků .....	50
Tabulka 3 Povrchová energie vzorků.....	51
Tabulka 4 Procentuální zastoupení chemických prvků na vzorcích .....	56
Tabulka 5 Antibakteriální aktivita vzorků.....	59

