

UNIVERZA V MARIBORU
FAKULTETA ZA STROJNIŠTVO

Katja KUZMIČ

**OKOLJSKO PRIJAZNA IN NAPREDNA
FUNKCIONALIZACIJA SILIKONA ZA RAZVOJ NOVIH
MEDICINSKIH PRIPOMOČKOV**

Magistrsko delo
študijskega programa 2. stopnje
Tehniško varstvo okolja

Maribor, september 2021



OKOLJSKO PRIJAZNA IN NAPREDNA FUNKCIONALIZACIJA SILIKONA ZA RAZVOJ NOVIH MEDICINSKIH PRIPOMOČKOV

Magistrsko delo

Študentka:	Katja KUZMIČ
Študijski program:	študijski program 2. stopnje Tehniško varstvo okolja
Mentor:	doc. dr. Tamilselvan MOHAN
Somentorica:	red. prof. dr. Lidija FRAS ZEMLJIČ
Somentor:	dr. Matej BRAČIČ

Maribor, september 2021



Fakulteta za strojništvo

Smetanova ulica 17
2000 Maribor, Slovenija

Številka: TVO-BM0060

Datum in kraj: 13.01.2021, Maribor

Na osnovi 330. člena Statuta Univerze v Mariboru (Uradni list RS, št. 29/2017–UPB12, 32/2019 in 14/2020) izdajam:

SKLEP O ZAKLJUČNEM DELU

KATJI KUZMIČ, študentki magistrskega študijskega programa druge stopnje **TEHNIŠKO VARSTVO OKOLJA**, se dovoljuje izdelati zaključno delo.

Tema zaključnega dela je pretežno s področja **Katedre za energetska, procesna in okoljska inženirstvo**.

Mentor: **doc. dr. TAMILSELVAN MOHAN, TU Graz, Avstrija**
Somentorica: **red. prof. dr. LIDIJA FRAS ZEMLJIČ**
Somentor: **dr. MATEJ BRAČIČ, asist.**
Zunanji delovni somentor: /

Naslov zaključnega dela: **Okoljsko prijazna in napredna funkcionalizacija silikona za razvoj novih medicinskih pripomočkov**

Naslov zaključnega dela v angleškem jeziku: **Environmentally Friendly and Advanced Functionalization of Silicone for the Development of New Medical Devices**

Podaljšan rok za izdelavo in oddajo zaključnega dela je: **15.01.2022**. Zaključno delo je potrebno izdelati skladno z »Navodili za pripravo magistrskega dela« in ga v štirih izvodih oddati v pristojnem referatu članice. Hkrati se odda tudi izjava mentorja in somentorjev o ustreznosti zaključnega dela ter poročilo o preverjanju podobnosti z drugimi deli.

Pravni pouk: Zoper ta sklep je možna pritožba na Senat članice v roku 10 delovnih dni od dneva prejema sklepa.

Dekan:

red. prof. dr. Bojan Dolšak



Obvestiti:

- kandidata,
- mentorja,
- somentorja,
- odložiti v arhiv.

FS

IZJAVA

Podpisana _____, izjavljam, da:

- je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela,
- predloženo delo v celoti ali v delih ni bilo predloženo za pridobitev kakršnekoli izobrazbe po študijskem programu druge fakultete ali univerze,
- so rezultati korektno navedeni,
- nisem kršil-a avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih,
- soglašam z javno dostopnostjo magistrskega dela v Knjižnici tehniških fakultet ter Digitalni knjižnici Univerze v Mariboru, v skladu z Izjavo o istovetnosti tiskane in elektronske verzije zaključnega dela.

Maribor, _____

Podpis: _____

ZAHVALA

I would like to express my gratitude towards my mentor dr. Tamilselvan Mohan, thank you for all your help and guidance during this work.

Iskreno se zahvaljujem tudi somentorjema dr. Lidiji Fras Zemljič in dr. Mateju Bračiču za prijaznost, vso pomoč, vodenje in koristne nasvete pri izvajanju eksperimentalnega dela.

Zahvaljujem se tudi svoji družini in vsem mojim najdražjim za pomoč, spodbujanje in podporo.

OKOLJSKO PRIJAZNA IN NAPREDNA FUNKCIONALIZACIJA SILIKONA ZA RAZVOJ NOVIH MEDICINSKIH PRIPOMOČKOV

Ključne besede: biopolimeri, biofunkcionalizacija, protimikrobnost, polidopamin, karboksimetil hitozan

UDK: 577.11:615.8-7(043.2)

POVZETEK

Prekomerna uporaba antibiotikov za zdravljenje infekcij vodi v naraščanje števila odpornih bakterij, kar predstavlja grožnjo javnemu zdravju. Strategije zmanjševanja uporabe temeljijo tudi na preprečevanju nastanka bakterijskega biofilma na površinah medicinskih pripomočkov. Predstavljamo metodo funkcionalizacije silikona z oplaščanjem z naravnimi bioaktivnimi substancami. Na silikon smo kot vezni polimer adsorbirali biopolimer polidopamin, na katerega smo kovalentno vezali karboksimetil hitozan s tiolnimi funkcionalnimi skupinami, ki izkazuje protimikrobne in biofilm-inhibitorne lastnosti. Rezultati karakterizacije so pokazali uspešno kovalentno vezavo karboksimetil hitozana preko tiolnih skupin na polidopamin, kar je pripomoglo k zmanjšanju tvorbe biofilma na površini v primerjavi s fizikalno vezanim karboksimetil hitozanom in neobdelanim silikonom.

ENVIRONMENTALLY FRIENDLY AND ADVANCED FUNCTIONALIZATION OF SILICONE FOR THE DEVELOPMENT OF NEW MEDICAL DEVICES

Key words: biopolymers, biofunctionalization, antimicrobial, polydopamine, carboxymethyl chitosan

UDK: 577.11:615.8-7(043.2)

ABSTRACT

Excessive use of antibiotics to treat infections leads to an increase in the number of resistant bacteria, which poses a threat to public health. Strategies to reduce the use of antibiotics are also based on preventing the formation of bacterial biofilm on the surfaces of medical devices. In this work, we present a method of functionalizing silicone by coating it with natural bioactive substances. The biopolymer polydopamine was adsorbed on the silicon as a binding polymer, to which carboxymethyl chitosan was covalently bound with thiol functional groups exhibiting antimicrobial and biofilm-inhibitory properties. The characterization results showed successful covalent binding of carboxymethyl chitosan via thiol groups to polydopamine, which helped to reduce surface biofilm formation compared to physically bound carboxymethyl chitosan and untreated silicone.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Opredelitev problema	1
1.2	Opredelitev namena, ciljev in omejitev dela.....	2
1.3	Kratek opis strukture dela	3
2	PREGLED STANJA OBRAVNAVANE PROBLEMATIKE	5
2.1	Odpornost proti antibiotikom	5
2.1.1	Vpliv na okolje	7
2.2	Tvorba biofilma na površini medicinskih pripomočkov	9
2.2.1	Strategije preprečevanja tvorbe biofilma na površini medicinskih pripomočkov	11
2.2.2	Biofilm-inhibitornost	12
2.2.3	Protimikrobnost	14
2.3	Uporaba silikona v medicinskih pripomočkih.....	15
2.4	Funkcionalizacija silikona	16
2.4.1	Modifikacija silikona s polidopaminom.....	16
2.4.2	Funkcionalizacija polidopamin-modificiranega silikona s tiolkarboksimetil hitozanom	18
3	UPORABLJENE METODE DELA	21
3.1	Uporabljeni materiali in laboratorijska oprema	21
3.2	Postopki funkcionalizacije površine silikona	22
3.2.1	Predobdelava silikonskih ploščic	23
3.2.2	Modifikacija silikonskih ploščic s polidopaminom.....	24

3.2.3	Sinteza tiolkarboksimetil hitozana (tCMCh) in vezava na polidopamin-modificirano silikonsko ploščico	24
3.3	Teoretične osnove in izvedba izbranih analiznih metod	26
3.3.1	Omočljivost in optična goniometrija	26
3.3.2	Določanje kemijske sestave z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo (FTIR)	27
3.3.3	Določanje kemijske sestave površine z rentgensko fotoelektronsko spektroskopijo (XPS)	29
3.3.4	Optična analiza površine z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM).....	30
3.3.5	Karakterizacija funkcionalnih skupin z nevtralizacijsko titracijo	31
3.3.6	Določanje prostih tiolnih skupin z Ellman-ovim testom.....	32
3.3.7	Mikrobiološki testi – tvorba bakterijskega biofilma na površini materiala.....	34
4	REZULTATI IN DISKUSIJA REZULTATOV	37
4.1	Rezultati pred-obdelave silikonskih diskov in vezave polidopamina .	37
4.1.1	Omočljivost in optična goniometrija	37
4.1.2	Določevanje kemijske sestave z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo (FTIR)	40
4.1.3	Optična analiza površine z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM).....	42
4.1.4	Določanje kemijske sestave površine z rentgensko fotoelektronsko spektroskopijo (XPS)	43
4.2	Karakterizacija sintetiziranega tiolkarboksimetil hitozana	44
4.2.1	Določanje kemijske sestave z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo (FTIR)	44
4.2.2	Določanje kemijske sestave površine z rentgensko fotoelektronsko spektroskopijo (XPS)	45
4.2.3	Karakterizacija funkcionalnih skupin z nevtralizacijsko titracijo	46

4.2.4	Določanje prostih tiolnih skupin z Ellman-ovim testom.....	49
4.3	Karakterizacija vezave tiolkarboksimetil hitozana na polidopamin-modificirano silikonsko ploščico	53
4.3.1	Omočljivost in optična goniometrija	53
4.3.2	Določanje kemijske sestave z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo (FTIR)	55
4.3.3	Določanje kemijske sestave površine z rentgensko fotoelektronsko spektroskopijo (XPS)	56
4.3.4	Optična analiza površine z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM).....	58
4.3.5	Mikrobiološki testi – tvorba bakterijskega biofilma na neobdelanem silikonu in silikonu obdelanem s PDA in karboksimetilhitozanom po različnih postopkih	60
4.4	Povezovanje ugotovitev rezultatov karakterizacije	61
5	SKLEP	63
6	SEZNAM UPORABLJENIH VIROV	65

1 UVOD

1.1 Opredelitev problema

Antibiotiki so ena izmed večjih odkritij v zgodovini človeštva in so povzročili pravo revolucijo v moderni medicini. S tem se je v razvitih državah sveta močno povišala pričakovana življenjska doba ljudi. Že nekaj časa pa se svet srečuje s problemom odpornosti vedno več bakterij na antibiotike, saj se ti v telesu človeka oz. živali ne razgradijo v celoti ali pa se sploh ne razgradijo. Po besedah avtorjev [1] je delež izločene količine antibiotikov, glede na zaužito 30 – 90 %. Tako v primeru človeka z izločanjem urina in blata preidejo v okolje preko komunalnih čistilnih naprav v reke, morja, v podtalnico (pitno vodo), saj v komunalnih čistilnih napravah nimamo posebne metode odstranjevanja antibiotikov iz odpadne vode. Tako se antibiotiki v rekah, morjih in oceanih, tleh ter podtalnici akumulirajo, prehajajo v rastline in živali ter vstopijo v prehranjevalno verigo, katere del je tudi človek. Prav zaradi tega, ker so prisotni v manjših koncentracijah, bakterije postajajo nanje odporne. To pa lahko predstavlja veliko nevarnost, da zdravljenje bolezni s trenutnimi zdravili ne bo več učinkovito. Zato so potrebni ukrepi za preprečevanje odpornosti bakterij na antibiotike.

Eden izmed ukrepov preprečevanja odpornosti bakterij na antibiotike je zmanjševanje uporabe le-teh. V zdravstvu, predvsem pri kirurških posegih in uporabi različnih vsadkov, pogosto prihaja do infekcij, ki so predvsem bakterijske narave. Infekcije, povzročene z biofilmi na implantacijskih medicinskih pripomočkih, veljajo za ene izmed najpogostejših zdravstvenonegovalnih težav. Letno v Evropi povzročijo 2 do 3 milijone okužb, kar predstavlja 15 milijonov dodatnih dni hospitalizacije in 1 do 14,4 milijard evrov dodatnih stroškov zdravljenja [2]. Takšne okužbe lahko preidejo v resen zaplet in posledično vodijo celo v smrt. Smrtnost, ki je posledica zapletov zaradi medicinskih pripomočkov, se med različnimi pripomočki močno razlikuje, vendar se lahko giblje od < 5 % pri pripomočkih, kot so zobni vsadki in urinski katetri, do > 25 % pri mehanskih srčnih zaklopkah [3].

Tovrstni problem se pojavlja pri velikem številu medicinskih pripomočkov, tudi na raznoraznih vsadkih, kar je posebej problematično, saj je, za razliko od drugih medicinskih pripomočkov (katetri, dihalne cevke ipd.), za odstranitev potreben kirurški poseg. Na površini vsadka se pogosto tvori biofilm, kjer se razvijejo bakterije in povzročijo infekcijo. Tovrstne infekcije pa se zdravijo lokalno z antibiotiki. Strategija zamenjave le teh je lahko tudi v uporabi naravnih substanc, kot so recimo biopolimeri, kot premazi na medicinskih pripomočkih s protimikrobnimi oz. biofilm-inhibitornimi lastnostmi. Na ta način premaz onemogoča nastanek biofilma in s tem infekt ter zmanjša potrebo po uporabi antibiotikov.

1.2 Opredelitev namena, ciljev in omejitev dela

Namen magistrskega dela, ki se neposredno navezuje na reševanje opredeljenega problema, je funkcionalizacija površine silikona z biopolimerom karboksimetil hitozanom za doseganje protimikrobnega učinka in zaviranja rasti bakterijskega biofilma, kar bi posledično izboljšalo učinkovitost in trajnost medicinskega pripomočka.

Cilji magistrske naloge za doseganje njenega namena so:

- sinteza tioliranega karboksimetil hitozana iz karboksimetil hitozana in tiobutirolaktona
- kovalentna vezava tioliranega hitozana na površino silikona preko veznega polimera, površinsko adsorbiranega polidopamina.
- preučiti vpliv veznega polimera polidopamina na ireverzibilno vezavo karboksimetiliranega hitozana
- ovrednotenje fizikalno-kemijskih lastnosti funkcionaliziranega silikona
- ovrednotenje biofilm-inhibitornih lastnosti funkcionaliziranega silikona

Morebitne težave smo pričakovali pri sami vezavi polidopamina na silikonsko površino, zaradi močno hidrofobnega značaja površine silikona, kar bi posledično lahko privedlo do težav pri vezavi karboksimetil hitozana na polidopamin. Težave smo pričakovali tudi pri sintezi karboksimetil hitozana s tiolnimi skupinami. Sinteza tioliranih laktonov je bila v magistrskem delu prvič izvedena s polisaharidi v vodnem mediju in bo zato potrebna še morebitna optimizacija reakcijskih pogojev. Nadalje je bilo mogoče pričakovati omejitve pri pridobitvi

multifunkcionalnih lastnosti. Velikokrat protimikrobnost in biofilm inhibitornost zahtevata nasprotno funkcionalne skupine površin in jih je tako težko razviti sočasno z veliko stopnjo učinkovitosti. Namreč, za izkazovanje protimikrobne lastnosti so potrebne pozitivno nabite (kationske) funkcionalne skupine, medtem ko površine z negativno nabitimi (anionskimi) funkcionalnimi skupinami igrajo pomembno vlogo pri biofilm-inhibitornih lastnostih.

1.3 Kratek opis strukture dela

V nadaljevanju naloge (poglavje 2) bo podrobneje predstavljena problematika pojava odpornosti bakterij na antibiotike ter vpliv na javno zdravje in okolje. Nadalje se bomo v podpoglavjih 2.2 do 2.4 osredotočili na problematiko nastanka bakterijskih biofilmov na medicinskih pripomočkih, navedene bodo tudi do sedaj znane strategije preprečevanja nastanka le-teh ter stanje raziskav na področju funkcionalizacije površine materiala medicinskega pripomočka oz. vsadka.

V poglavju 3 bodo predstavljeni postopki funkcionalizacije silikona s polidopaminom in tioliranim karboksimetil hitozanom (derivatom hitozana), temu pa bo sledil opis analiznih metod, ki smo jih uporabili za karakterizacijo naših produktov ter eksperimentalna izvedba.

Rezultati karakterizacije z različnimi analiznimi metodami bodo prikazani v poglavju 4, pri tem se bomo v podpoglavju 4.1 osredotočili na karakterizacijo vezave polidopamina na silikonske ploščice. V podpoglavju 4.2 pa bomo okarakterizirali še rezultate analiz vzorcev, kjer je na polidopamin kovalentno vezan tiolkarboksimetil hitozan. Ugotovitve iz rezultatov analiz bodo diskutirane sproti.

Zaključki ugotovitev, predlogi za izboljšave ter smernice za prihodnje raziskave bodo povezani v poglavju 5.

2 PREGLED STANJA OBRAVNAVANE PROBLEMATIKE

2.1 Odpornost proti antibiotikom

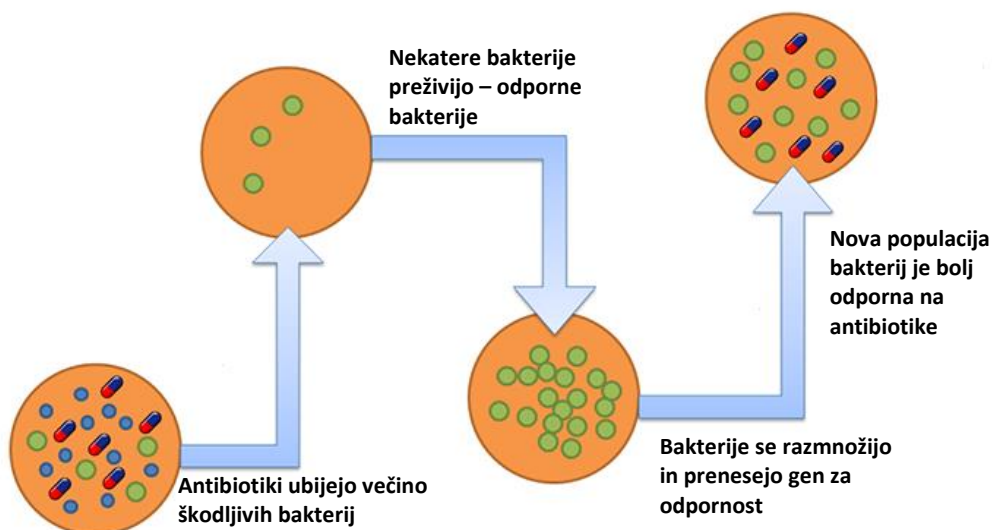
Antibiotiki so zdravila, s katerimi preprečujemo in zdravimo infekcije pri ljudeh in živalih, ki jih povzročijo patogeni mikroorganizmi. Sodiijo v skupino protimikrobnih zdravil, med katere spadajo tudi antiparazitiki, protivirusna in protiglivična zdravila [4]. Delujejo tako, da prodrejo v membrano mikroorganizma ter ga uničijo, vendar po večini ne v celoti. Nekaj mikrobov preživi – razvije odpornost in ti se pričnejo razmnoževati. S tem prenesejo svoje rezistentne gene na novo populacijo mikrobov, ki se v prihodnje na zdravila več ne odzovejo in učinkovitost zdravljenja se zmanjša. Cikel se tako ponavlja, vse dokler mikroorganizmi postanejo popolnoma odporni, kot je prikazano na **sliki 2.1**. Od prvega odkritja protimikrobnega zdravila – antibiotika penicilina, ki ga je leta 1928 odkril škotski biolog in farmakolog Alexander Fleming, je trajalo le nekaj manj kot 30 let do pojava prve, proti antibiotiku odporne bakterije *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [5]. V naslednjih desetletjih je bilo odkritih in sintetiziranih precej novih antibiotikov, čemur pa so z nekajletnim zamikom sledili tudi pojavi novih odpornosti bakterij in mikrobov. Med najbolj zaskrbljujočimi so:

- Meticilin-rezistentna *Staphylococcus aureus* (MRSA),
- Vancomicin-rezistentna *Enterococcus* (VRE),
- *Neisseria gonorrhoeae*,
- *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) – odporna na več zdravil,
- Carbapenem-rezistentna *Enterobacteriaceae* (CRE), poznana tudi kot *Escherichia coli* (*E. coli*),
- *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) idr. [5], [6].

Tako antibiotiki in druga protimikrobna zdravila postanejo neučinkoviti in zdravljenje infekcij postane čedalje težje in nemogoče. Poleg daljšega poteka bolezni in celo smrti, odpornost na protimikrobna zdravila povzroča, ne samo višje stroške zaradi daljšega zdravljenja in potrebe po dražjih zdravilih, ampak tudi negativne vplive na okolje, ki so podrobneje opisani v naslednjem podpoglavju 2.1.1. Pomemben faktor, ki vpliva na čedalje večjo odpornost mikroorganizmov, pa je tudi neprimerna, nekontrolirana in prekomerna uporaba antibiotikov

in drugih protimikrobnih zdravil. Pri zdravljenju okužbe je po navadi zaužita večja količina antibiotikov kot je to potrebno, zato se v telesu (človeka ali živali) le delno prebavijo [7]. Velika količina aktivnih substanc se torej preko urina in blata izloči v okolje. Poleg tega so v precejšnjih delih sveta antibiotiki prosto dostopni in pogosto prihaja do nekontrolirane rabe antibiotikov za zdravljenje okužb takrat, ko ti niso potrebni. Problem nepravilne rabe pa se čedalje večja tudi v zdravstvu, saj se ob infekciji pogosto ne preveri kateri tip mikroorganizma je okužbo povzročil in se preprosto zdravi s široko-spektralnim antibiotikom, s tem pa se širi spekter protimikrobnih zdravil, na katere mikrob razvija odpornost [4], [8].

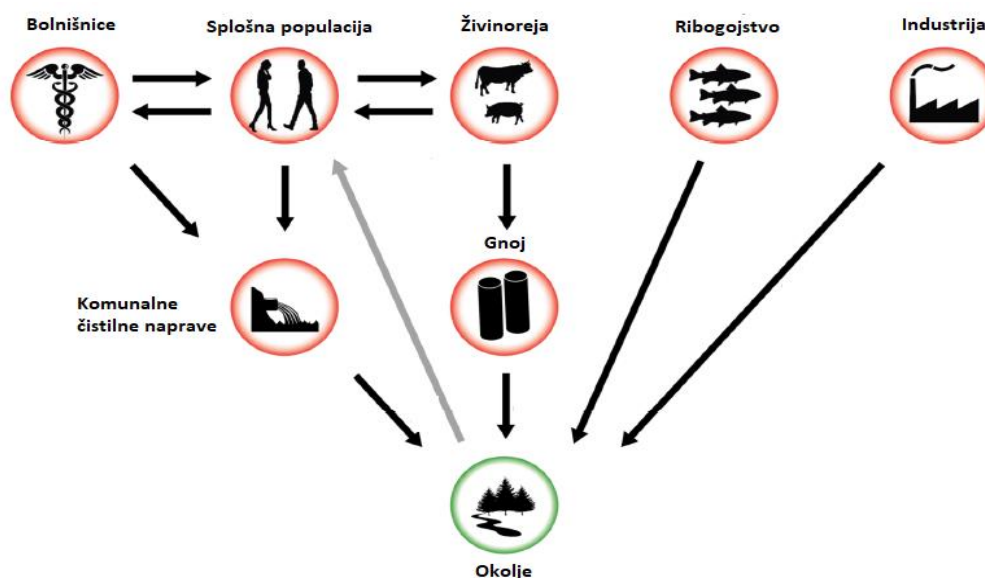
Odpornost na antibiotike in druga protimikrobna zdravila zato predstavlja globalno in zelo resno grožnjo človeštvu in moderni medicini. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) je protimikrobno odpornost označila za trenutno 10. največjo grožnjo javnemu zdravju, s katero se sooča človeštvo [4]. Od konca 90. let prejšnjega stoletja do sedaj se je razvoj novih protimikrobnih zdravil zaustavil. V letu 2019 je Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) identificirala 32 antibiotikov v fazi kliničnega razvoja, od tega jih je 6 klasificiranih kot inovativnih [4]. Zato se veliko pozornosti usmerja v razvoj preventivnih strategij in alternative za zamenjavo antibiotikov.



Slika 2.1: Razvoj odpornosti bakterij na antibiotike [9]

2.1.1 Vpliv na okolje

Odpornost bakterij na antibiotike se pomembno odraža tudi v okolju. Kot že omenjeno, se antibiotiki v telesu razgradijo le deloma, kar pomeni, da se velik delež nespremenjenih ali aktivnih substanc izloči v okolje z urinom in blatom preko čistilnih naprav. Konvencionalne čistilne naprave niso posebno zasnovane za odstranjevanje antibiotikov in se tako neposredno sproščajo v okolje [7], [10]. Odpadne vode bolnišnic in farmacevtske industrije, nenadzorovano in nezakonito odlaganje zdravil in ribogojstvo, so lahko tudi pomemben vir onesnaženja vodnih organizmov. Uporaba gnoja in blata v tleh kot gnojila, skupaj z namakanjem s predelano, vodo lahko pomembno prispeva k širjenju antibiotikov in genov za odpornost na antibiotike v tleh. Rastline ali drugi organizmi pa tudi absorbirajo antibiotike iz tal, gnojnih z živalskim gnojem ali namakane z odpadnimi vodami. Čeprav škodljivi učinki zaužitja antibiotikov, prisotnih v rastlinah, niso dobro znani in raziskani, lahko povzročijo alergične ali toksične reakcije in/ali lahko izboljšajo odpornost na antibiotike pri ljudeh. Tako se lahko iz površinskih tal, odvisno od njihovih specifičnih lastnosti, antibiotiki prenesejo v globlje plasti tal in podtalnico [7]. Shema migracijske poti antibiotikov je prikazana na **sliki 2.2**.



Slika 2.2: Shema migracij antibiotikov [10]

Koncentracija antibiotikov v naravnih okoljih, kot so tla ali vode, se giblje od nekaj nanogramov do stotine nanogramov na liter ali kilogram zemlje ali vode. Največje količine običajno najdemo na območjih z izrazitimi antropogeni vplivi, kot so odplake iz bolnišnic, odplake odpadnih vod komunalnih čistilnih naprav in tla, obdelana z gnojem ali tla, ki se uporabljajo za živinorejo [7], [10]. V odpadnih vodah komunalnih čistilnih naprav se koncentracije antibiotikov spreminjajo na letni ravni, z viškom pozimi. Koncentracija antibiotikov, prisotnih v okolju, pa je povezana tudi z njihovo obstojnostjo. Nekateri antibiotiki, na primer penicilini, se lažje in hitreje razgradijo kot drugi, na primer fluorokinoloni (npr. ciprofloksacin). Makrolidi (npr. tilozin) in tetraciklini so bistveno bolj obstojni, zato ostanejo dlje v okolju, se širijo in kopičijo v višjih koncentracijah [7].

Nizke koncentracije (tj. nanogrami na liter ali kg zemlje) antibiotikov pa imajo lahko tudi dolgoročne posredne učinke na mikrobne vrste, na katere njihova prisotnost ne vpliva neposredno (npr. z dinamiko populacije). "Nizke koncentracije" pomenijo nesmrtonosne in sub-inhibitorne koncentracije, ki so pod tako imenovano minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC), najnižjo koncentracijo zdravila, ki v določenih pogojih zavira vidno rast ciljne populacije bakterij [7], [10], [11]. Takšne koncentracije lahko učinkujejo na različne načine, kot so:

- razvoj selektivne odpornosti (obogatitev že obstoječe odpornosti in razvoj nove selektivne odpornosti),
- ustvarjanje genetske in fenotipske variabilnosti (s povečanjem stopnje prilagoditvenega razvoja, vključno z razvojem odpornosti) in
- vplivajo na različne fiziološke aktivnosti, vključno z virulenco, tvorbo biofilmov in ekspresijo genov [7], [11].

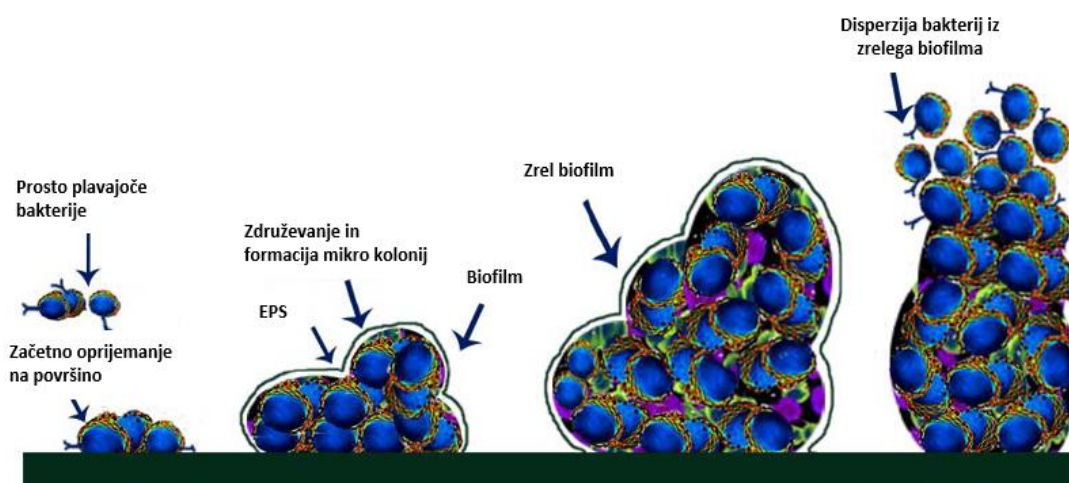
Iz teh vidikov je zato potrebno usmeriti precejšnjo pozornost v preprečevanje in omejevanje migracij antibiotikov in drugih protimikrobnih zdravil v okolje in še posebej pomembno razviti strategije zmanjševanja potrebe po uporabi antibiotikov. Ena izmed strategij je preprečevanje infekta, ki je posledica tvorbe bakterijskega biofilma na medicinskih pripomočkih in sicer z uporabo protimikrobnih oz. biofilm-inhibitornih premazov na površini pripomočkov. S tem bi tako posredno vplivali na zmanjšano uporabo antibiotikov.

2.2 Tvorba biofilma na površini medicinskih pripomočkov

Biofilm je populacija ali skupnost bakterij, ki živijo v organiziranih strukturah s tekočim vmesnikom. Živijo v mikrokolonijah, ki so enkapsulirani v matriki, sestavljeni iz zunajcelične polimerne substance (EPS), ločene z odprtimi vodnimi kanali, ki delujejo kot primitivni krožni sistem za dostavo hranil in odstranjevanje presnovnih odpadnih produktov [12].

Biofilmi so z zdravstvenega vidika zelo pomembni, saj so vzrok za več kot 80 % mikrobnih okužb v telesu [6], [12]. Število bolezni, povezanih z bakterijskimi biofilmi, je precej; kolitis, vaginitis, uretritis, konjunktivitis in otitis je le kratek seznam pogostih primerov [12]. Kot že omenjeno, so biofilmi ključni tudi kot kolonizatorji na medicinskih pripomočkih, vključno z urinskimi, venskimi, arterijskimi katetri in spoji, respiratorji, umetnimi vsadki in protezami. Pogosto nastanejo zdravstvene težave predvsem zaradi pojava infekcije, povezane s tvorbo biofilma na materialu, kot pa zaradi samega vsadka [12].

Primarna stopnja adhezije biofilma vključuje hitro oprijemanje mikrobov na površino medicinskih pripomočkov in širjenje celic. Za tvorbo biofilma obstajajo različni dejavniki, ki vplivajo na začetno adhezijo mikrobov, kot so polarnost, London-van der Waalove sile in hidrofobne interakcije [12], [13]. Adhezija bakterij na inertno površino vodi do tvorbe stabilne mikro-kolonije. Ko se mikrobi oprimejo površine, pride do proliferacije bakterijskih celic in medcelične adhezije. Nato sledi akumulacija, kjer se mikrobi razmnožijo in tvorijo večplastne skupke celic na površini tujka. Mikro-kolonije se nadalje razvijejo v makro-kolonije, ki so zaprte z zunajcelično polisaharidno matrico. V tej fazi nastajajo zunajcelične polisaharidne substance (EPS), ki so odgovorne za vezavo in celično adhezijo na površino [6], [13]. Prav tako pa delujejo kot pregrada za varovanje mikrobov pred zunanjimi vplivi. Znotraj matrike EPS poteka medcelično signaliziranje ali zaznavanje kvoruma (*ang. quorum sensing*). Avtorji [6] ugotavljajo, da ima signalizacija vlogo pri pritrjevanju celic in odklopu od biofilma. Zaznavanje kvoruma temelji na postopku samodejne indukcije in zagotavlja mehanizem za samoorganizacijo in regulacijo mikrobnih celic. Mikroorganizmi uporabljajo zaznavanje kvoruma za usklajevanje njihovega skupnega vedenja, kot so nastajanje biofilma, mobilnost in proizvodnja EPS [6], [12].



Slika 2.3: Faze nastajanja bakterijskega biofilma na površini [6]

Biofilm doseže kritično maso in ustvarja planktonske mikroorganizme. Ti prosto plavajoči organizmi pobegnejo iz biofilma in se naselijo na drugih površinah. Te bakterijske celice postanejo neaktivne ali odmrejo zaradi pomanjkanja hranil, znižanja pH ali kopičenja strupenih snovi presnovnih produktov. V tej fazi nastane dozoreli biofilm in mikroorganizmi so pripravljani na disperzijo. Bakterijske celice iz biofilma razpršijo celice s površine in se zaradi pomanjkanja hranilnih snovi selijo. Končno se mikroorganizem loči od makrokolonije in se premakne v krvni obtok in širi okužbe ter embolične zaplete [6].

Po nastanku biofilma in s tem okužbe pacienta ni potrebno izključno zdravljenje z antibiotiki; v večini primerov je po neuspešnem zdravljenju prav tako potrebna odstranitev pripomočka/vsadka. Ker pa to pogosto zahteva kirurško posredovanje, se s tem poveča možnost dodatne okužbe in povečajo se tudi stroški. Stroški zdravljenja s tem povezane okužbe so lahko od 5 do 7-krat večji od stroškov prve implantacije. Posledica tega pa je seveda tudi nezadovoljstvo pacientov, ki se ob takšnih situacijah redkeje odločijo za ponovno implantacijo [14]. Po informacijah dr. Janeza Rebola, specialista otorinolaringologije na Univerzitetnem kliničnem centru v Mariboru, imamo v Sloveniji povprečno 2 tovrstna primera letno, ko je potrebna odstranitev polžjega vsadka zaradi bakterijske okužbe, povzročene s tvorbo biofilma na vsadku. Cena takšnega vsadka pa se giblje okoli 20.000 €, kar pa je tudi precejšen – nepotreben strošek.

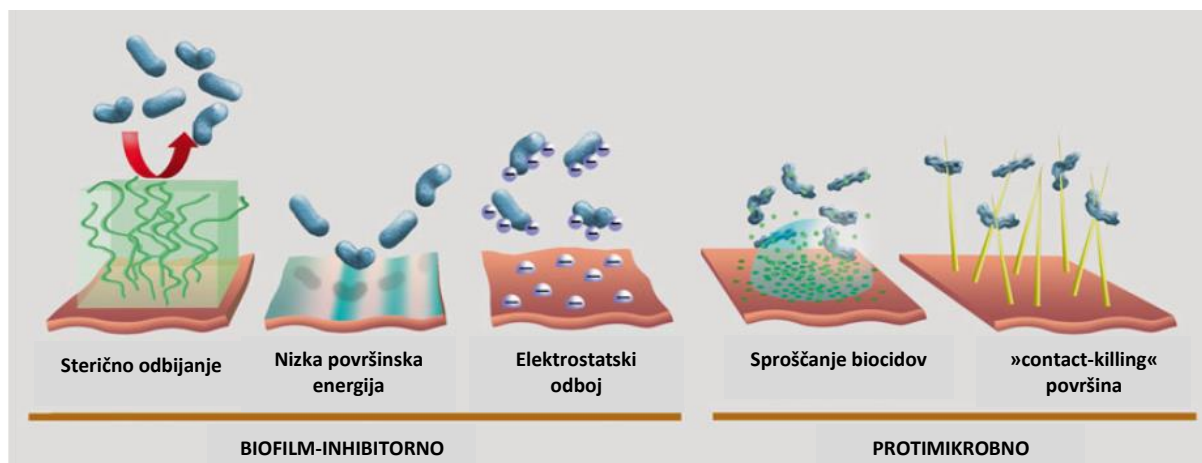
Zaradi vseh zgoraj naštetih razlogov je torej ključnega pomena razviti najrazličnejše strategije za preprečevanje tovrstnih težav, predvsem preprečevanje nastanka biofilma na površini medicinskih pripomočkov, kar je v zadnjih desetletjih tudi glavni predmet raziskav mnogih raziskovalcev. Nadalje bodo predstavljene do sedaj raziskane strategije preprečevanja tvorbe biofilma na površini medicinskih pripomočkov.

2.2.1 Strategije preprečevanja tvorbe biofilma na površini medicinskih pripomočkov

Obstajata dva pristopa k preprečevanju nastanka biofilma na površini vsadka oz. medicinskega pripomočka in sicer:

- s ciljem preprečiti adhezijo mikrobov na substrat (**biofilm-inhibitornost**) in
- s ciljem uničenja sprijetih mikrobov na substrat (**protimikrobnost**).

Primarni način delovanja protimikrobnega materiala je dosežen s sproščanjem biocidov ali s prisotnostjo komponent na površini, ki ob kontaktu uničijo mikrobe (*ang. contact-killing*). Strategije proti kolonizaciji bakterij običajno uporabljajo enega od več mehanizmov za preprečevanje adhezije mikrobov, vključno s steričnim odbijanjem oz. hidracijo, specifičnimi interakcijami proteinov ali nizko površinsko energijo [15], [16]. Zaradi pomanjkljivosti posameznih strategij se za doseg maksimalnega učinka uporablja kombinacija različnih pristopov,. Klasifikacija teh pristopov je ilustrirana na **sliki 2.4**.



Slika 2.4: Klasifikacija strategij za preprečevanje tvorbe biofilma na površini [17]

2.2.2 Biofilm-inhibitornost

Hidrofobnost in elektrostatski odboj

Kot že omenjeno v podpoglavju 2.2, se bakterije raje oprimejo na hidrofobne, še posebej pozitivno nabite površine zaradi hidrofobnega, negativno nabitega značaja bakterijskih celic, saj med tako nabito površino in bakterijo obstaja privlačna sila [16]. Hidrofilno površino lahko dosežemo z uporabo premazov, ki vsebujejo negativno nabite spojine hidrofilnega značaja. Za omejevanje razvoja biofilma je bilo razvitih več hidrofilnih premazov, kot so hidrogeli ali kemično spremenjene površine medicinskih pripomočkov [18]. Najpogosteje preučevana je spojina je heparin, negativno nabit polisaharid, sicer tudi uporaben kot antikoagulant, ki ima zelo dobre sposobnosti preprečevanja adhezije bakterij. Velikokrat je imobiliziran na osnovni premaz. Kara in soavtorji [19] v svojem delu poročajo o učinkovitem preprečevanju nastanka biofilma na poliuretanu (PU) s premazom biopolimera hitozana, na katerega so vezali heparin. Navajajo tudi dobre protimikrobne lastnosti takšnega premaza proti Gram-pozitivnim in Gram-negativnim bakterijam. Prisotnost heparina pa je pomembno pripomogla tudi k hidrofilnemu značaju površine. Vendar pa takšen mehanizem ne velja za vse tipe bakterije. Adhezija bakterij je lahko na hidrofilne materiale obsežnejša kot na hidrofobne, ko je površinska napetost bakterij večja od površinske napetosti mase suspendiranega medija.

Sterično odbijanje

Kemično lahko spreminjamo površino tudi z vgraditvijo polimerov z dolgimi verigami, ki na površini tvorijo t.i. čopičasto strukturo. Gostota verig zagotavlja sterično pregrado, ki preprečuje adhezijo bakterij z zmanjšanjem kovalentnih interakcij. Najbolj raziskani čopičasti polimeri so derivati polietilen oksida. Med temi se je polietilen glikol (PEG) izkazal za učinkovitega proti adheziji beljakovin zaradi izrazitega hidrofilnega značaja [16], [17], [20], [21]. Ta je posledica sposobnosti močne vezave molekul vode na vsako ponavljajočo se enoto etilen glikola. Na ta način nastane visoko hidrirana plast, ki povzroči sterično oviro. Ko se molekula beljakovin približa pregradi hidracijske plasti, nastala kompresija plasti zmanjša konformacijsko entropijo polimernih verig, kar na koncu privede do odbijanja približujočih se beljakovin – sterični odboj [22]. Kljub temu pa, zaradi nezmožnosti ubijanja bakterij, učinkovitost preprečevanja tvorbe biofilma PEG premazov sčasoma upada [23].

Nizka površinska energija

Eden izmed pristopov k zmanjševanju adhezije bakterij na površine medicinskih pripomočkov je tudi uporaba materiala z nizko površinsko energijo. Zaradi nizke proste površinske energije se medfazna napetost med podlago in bakterijo bistveno poveča, kar privede do zmanjšanja možnosti adhezije [16]. Med te pristope uvrščamo tudi spreminjanje površinske topografije in hrapavosti. Tovrstne modifikacije lahko tudi spremenijo površinske lastnosti, kot je na primer omočljivost materiala. Puckett in sodelavci [24] so raziskovali učinke nano-modifikacij površine titana (Ti) ter ugotovili izboljšanje hidrofilnega značaja nanostrukturirane površine titana v primerjavi s konvencionalnim in s tem nižjo adhezijo bakterij. Tehnologije mikro in nano vzorčenja so navdihnjene tudi iz narave. Primer tega je tehnologija Sharklet, kjer gre za posnemanje površine kože morskega psa, ki zaradi specifične, hrapave površine, uspešno zavira rast bakterij v primerjavi z gladkimi površinami [25].

2.2.3 Protimikrobnost

Sproščanje biocidov

Tehnika sproščanja biocidov temelji na vezanju protimikrobnih substanc na površino materiala, iz katere se postopno kontrolirano sproščajo in tarčno uničujejo bakterije. Po navadi se biocidi vežejo na osnovni, nosilni premaz iz različnih polimernih struktur, zaradi večje poroznosti in specifične morfologije, kar omogoči sproščanje na daljši rok, v primerjavi z imobilizacijo na samo površino materiala medicinskega pripomočka [26]. Med biocidnimi substancami, ki se vgrajujejo na premaz, so najpogosteje uporabljeni srebro in srebrovi nanodelci, nanodelci kovinskih oksidov (cinkov oksid, bakrov oksid), triklosan, dušikov oksid (NO), encimi in antibiotiki [26]. Glavna omejitev tovrstnih premazov je neučinkovitost, potem ko se protimikrobne substance iztrošijo; vprašljiva pa je tudi biokompatibilnost nekaterih substanc. Do uporabe kovin (npr. srebro) kot protimikrobnih substanc obstajajo zadržki zaradi potencialne toksičnosti [27].

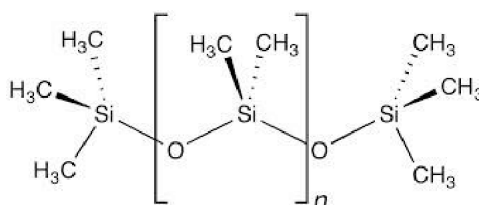
»Contact-killing« površina

Za doseg površinsko aktivnih lastnosti materiala lahko na površino vežemo protimikrobne substance, ki imajo sposobnost uničenja bakterij ob stiku (*ang. contact-killing*). Te se lahko na površino pritrdijo z ireverzibilno kovalentno vezavo ali fizikalno adsorpcijo. Protimikrobne substance so lahko naravne ali sintetične. Sem sodijo kvarterne amonijeve spojine (*ang. QACs – quaternary ammonium compounds*) [26] in druge biomolekule, pridobljene iz naravnih virov, kot so protimikrobni encimi (*ang. AMEs - antimicrobial enzymes*), protimikrobni pepidi (*ang. AMPs - antimicrobial peptides*) in biopolimer hitozan. Predvidevan mehanizem delovanja kvarternih amonijevih spojin in tudi biopolimera hitozana je raznovrstnost nabojev. Privlačnost naboja med pozitivno nabitimi molekulami QAC oz. hitozana in negativno nabitim fosfolipidnim dvoslojem celične membrane bakterij povzroči motnjo v celični membrani in tako uniči mikroorganizem.

2.3 Uporaba silikona v medicinskih pripomočkih

Elastomeri so že nekaj časa predmet raziskav številnih raziskovalcev, zaradi nekaterih njihovih zanimivih biomehanskih lastnosti, kot so fleksibilnost, kemijska stabilnost in odpornost proti koroziji. Med različnimi elastomeri na trgu v zadnjih letih izstopa polidimetilsiloksan (PDMS), splošno znan kot polisiloksan ali silikon, organski polimer na osnovi silicija. Uporablja se na več industrijskih področjih, od mehanike do elektronike, vključno z biomedicino. Nekateri razlogi za njegovo široko uporabo se nanašajo na preprostost proizvodnega procesa, optično transparentnost, biološko kompatibilnost in nizke stroške proizvodnje. Nekatere najpomembnejše aplikacije PDMS so med drugim mehanski senzorji, elektronske komponente, elektrokemični senzorji ter medicinska oprema in pripomočki [28]–[30].

PDMS je sintetični polimer, ki spada v skupino siloksanov. Glavna veriga PDMS je sestavljena iz ponavljajočih se vezi silicija (Si) in kisika (O), na katero so vezane metilne skupine (-CH₃) kot je prikazano na **sliki 2.5**.



Slika 2.5: Struktura PDMS [31]

Zaradi lastnosti, kot so termična in kemijska stabilnost, biološka stabilnost in kompatibilnost ter fleksibilnost, ima PDMS široko paleto uporabnosti na področju biomedicine. Kot material se uporablja v

- kratkoročnih medicinskih pripomočkih (katetri, drenaže, srčne zaklopke, cevi za dializo, oksigeniranje krvi itd.)
- ortopedskih vsadkih,
- estetskih vsadkih in
- dolgoročnih vsadkih (leče, polžji vsadki, srčni spodbujevalniki) [28], [29].

Glavna slabost tega materiala iz vidika uporabe v biomedicini pa je oteženo omakanje površine z vodnimi raztopinami. PDMS ima zaradi prisotnosti metilnih (CH₃) skupin hidrofoben značaj površine. To je še posebej pomembno z vidika tvorbe bakterijskega biofilma na površini medicinskega pripomočka. V splošnem velja, da bakterije raje tvorijo biofilm na hidrofobnih, kot na hidrofilnih površinah [6], [32]. S tem se verjetnost infekcije, ki jo povzroči bakterijski biofilm na površini medicinskega pripomočka, bistveno poveča.

2.4 Funkcionalizacija silikona

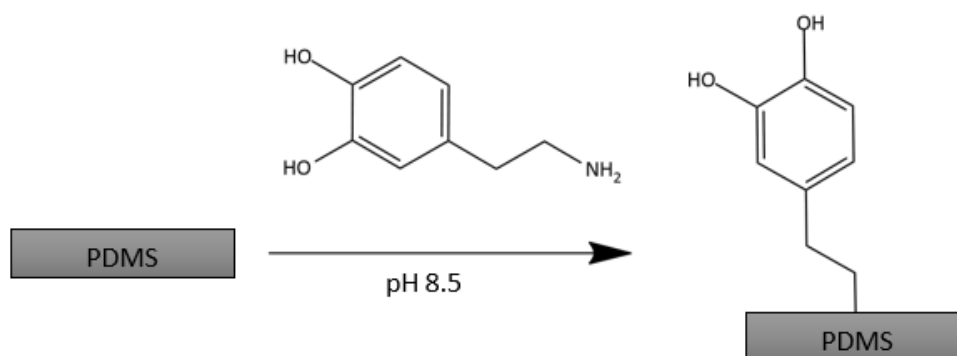
2.4.1 Modifikacija silikona s polidopaminom

Kemijske reakcije funkcionalizacije substratov običajno zahtevajo kompleksne reakcijske pogoje, uporabo toksičnih organskih topil in zapletenih laboratorijskih postopkov. Še posebej za namene aplikacije na medicinskih pripomočkih se teži k izogibanju tovrstnih postopkov in kemikalij, zato je zaželena uporaba postopkov na vodni osnovi.

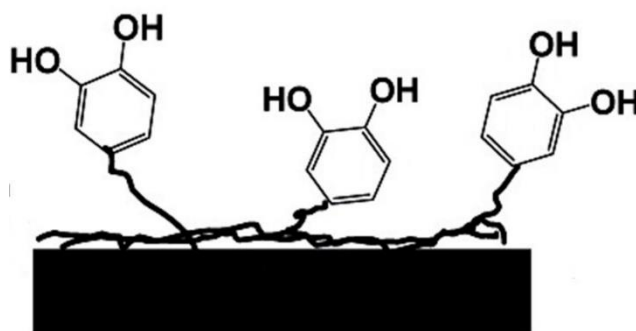
Kot adhezivno sredstvo za modifikacijo materialov je veliko zanimanja pridobil dopamin [33], [34]. Je vodotopna spojina, katerih oksidirani monomeri imajo močno sposobnost samosestavljanja (samopolimerizacije) iz raztopine in s tem tvorijo plasti **polidopamina (PDA)** na skoraj vseh vrstah materialov, vključno s polimeri, kovinami in kompoziti [35]. Takšna adsorpcija na substrat spominja na način sprijemanja školjk na les ali kamen pri vlažnih pogojih in visokih strižnih napetostih zaradi toka vode. Povezava s polidopaminom je v podobni strukturi dela školjk, s katerimi so pritrjene na površino. Pri obeh so v strukturi prisotni kateholi in aminske skupine, za katere se predvideva, da so ključne pri tako močni adheziji na površino [33]. Zaradi te korelacije se v literaturi pojavlja izraz za modifikacijo površin s polidopaminom »po navdihu školjk« (*ang. mussel-inspired*).

Polidopamin se spontano tvori na površini s pH-inducirano (z uporabo TRIS pufru) oksidativno polimerizacijo dopamin-hidroklorida v alkalni raztopini [36]. Predvideva se [37], da se

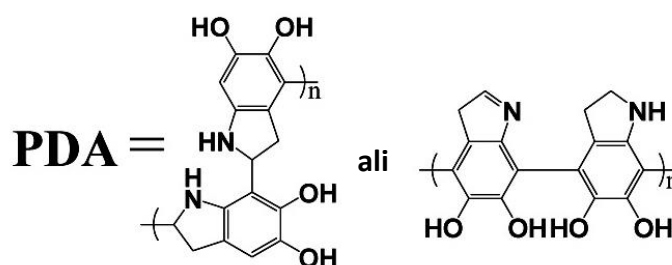
polidopamin na površino veže preko amskih skupin (**slika 2.6**). V raziskavi Tyo in sodelavcev [38] sicer navajajo drugačen način vezave, t.j. preko hidroksilnih skupin. Površina, na katero je vezan polidopamin, zaradi prisotnosti prostih hidroksilnih skupin postane bolj hidrofilna, kar je ugodno za nadaljnjo vezavo funkcionalnih substanc.



Slika 2.6: Vezava PDA na substrat PDMS



Slika 2.7: Polimerizacija PDA na substrat [37]

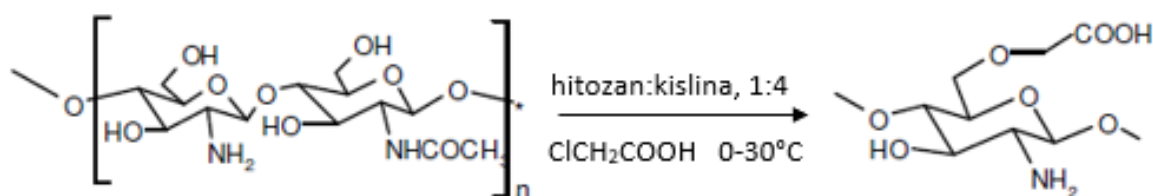


Slika 2.8: Struktura PDA [37]

PDA je dalj časa zelo stabilen v vodnem okolju, močnih kislinah in tudi blagem redoks okolju [35]. Uporaba PDA kot primarnega nanosa je ugodna zaradi vsestranskosti, preprostosti in netoksičnosti. Poleg tega pa omogočajo reakcije in vezave s široko paleto spojin, ki vsebujejo amsko ali tiolno skupino. Med temi so polisaharidi, peptidi in »zwitterioni« - ioni dvojčki, molekule, ki sočasno izkazujejo pozitiven in negativen naboj. V nadaljevanju bo predstavljena funkcionalizacija polidopamina z derivatom biopolimera hitozana (karboksimetil hitozan) preko tiolne skupine.

2.4.2 Funkcionalizacija polidopamin-modificiranega silikona s tiolkarboksimetil hitozanom

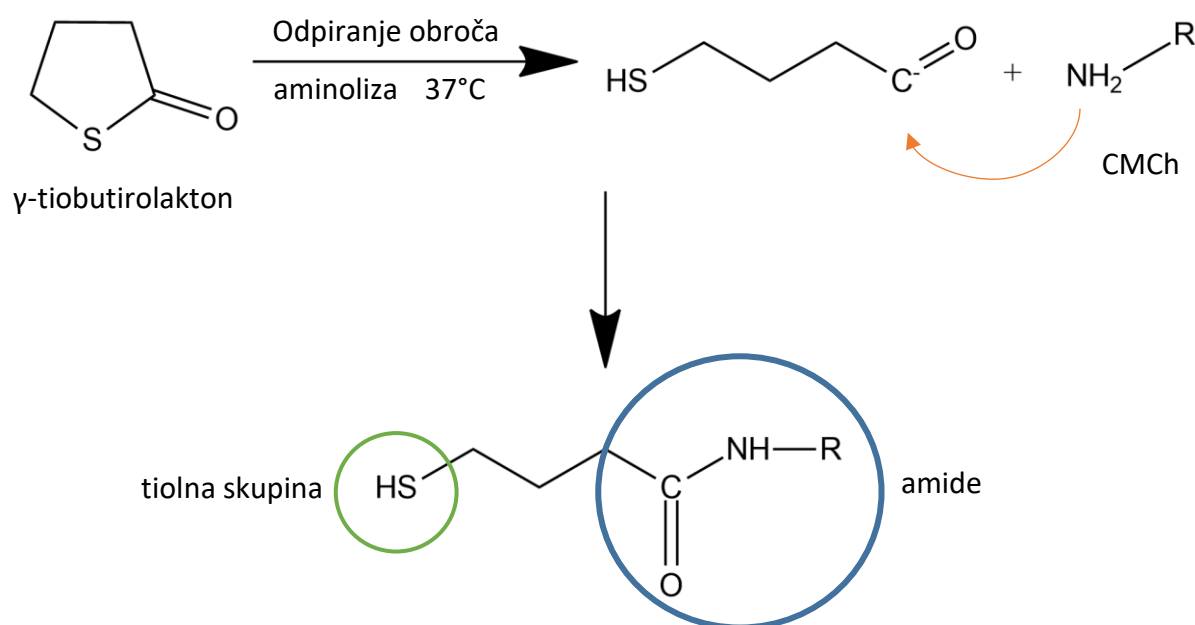
Hitozan, kationski kopolimer glukozamina in N-acetilglukozamina, je delno deacetiliran derivat naravnega polisaharida – hitina [39]. Hitin je v naravi, za celulozo, drugi najpogostejši polisaharid v naravi in se ga najpogosteje pridobiva iz skeleta rakov. Hitozan odlikujejo karakteristike kot so naravna obnovljivost, biorazgradljivost, biokompatibilnost in netoksičnost. Hitozan in derivati so pogosto uporabljeni na različnih področjih: farmacija, biomedicina, čiščenje vod, kozmetika, agrikultura in prehrabna industrija [39], [40]. Pomembna omejitev hitozana pri različnih aplikacijah je netopnost pri nevtralnem in alkalnem pH. To pomanjkljivost je mogoče odpraviti s kemijsko modifikacijo, na primer z dodajanjem hidrofilnih funkcionalnih skupin. Eden izmed pristopov je karboksimetilacija (**slika 2.9**), s čimer dobimo derivat **karboksimetil hitozan (CMCh)**.



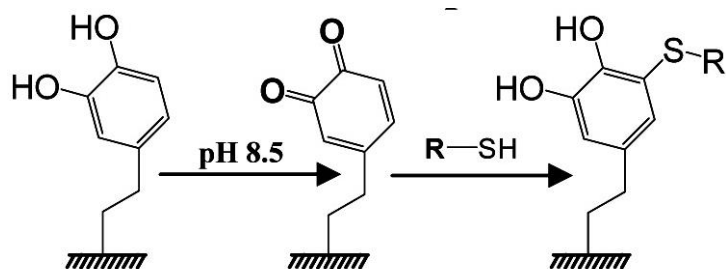
Slika 2.9: Karboksimetilacija hitozana

Kot že omenjeno, tiolacija karboksimetil hitozana omogoča kovalentno vezavo na PDA (**slika 2.11**). Tiolacija hitozana je bila do sedaj že precej raziskana [41], [42]. Med najpogosteje

uporabljene spojine, ki vsebujejo tiolne skupine, sodijo cistein, tioglikolna kislina (TGA), tiolaktična kislina (TLA) in podobni [42]. Pri tiolaciji gre za kovalentno vezavo spojin s tiolnimi skupinami na amsko skupino preko nastanka amidne vezi. Delo, ki ga v članku predstavljajo Russo in drugi [43], opisuje sintezo hidrogelov na podlagi tiolirane želatine. Pri tem so za tiolacijo uporabili γ -tiobutirolakton, kar smo uporabili tudi pri našem delu. Kot že omenjeno v uvodu, tiolacija polisaharida z laktonom do sedaj še ni bila izvedena. Reakcija tiolacije karboksimetil hitozana s tiobutirolaktonom je prikazana na **sliki 2.10**. Pri mešanju CMCh s tiobutirolaktonom nastane reakcija aminolize, ki povzroči odpiranje obroča tiobutirolaktona. Nato pa preko reakcije nukleofilne adicije nastane amidna vez.



Slika 2.10: Reakcija tiolacije karboksimetil hitozana s tiobutirolaktonom



Slika 2.11: Kovalentna vezava na PDA preko tiolne skupine

Najsodobnejša tehnologija

Za funkcionalizacijo površin medicinskih pripomočkov za namen pridobivanja protimikrobnih in/ali biofilm-inhibitornih lastnosti so bili biopolimeri do sedaj že precej raziskani [44]–[48]. Specifično za funkcionalizacijo silikona se je karboksimetil hitozan uporabil kot samostojen premaz [49], [50], tudi v obliki nanodelcev [51]. Tudi funkcionalizacija PDMS s polidopaminom je bila večkrat raziskana, predvsem za namen lažje imobilizacije celičnih kultur na površino in za uporabo na področju tkivnega inženiringa [36], [52] ter v kombinaciji z drugimi substancami, kot so hialuronska kislina [53] in kolagen [54] za namen izboljšanja biokompatibilnosti silikona, pa tudi z vgraditvijo sintetičnih protimikrobnih peptidov [55]. γ -tiobutirolakton je bil do sedaj že uporabljen kot zamreževalno sredstvo [56]–[58], vendar pa glede na pregled literature, do sedaj še nikoli v kombinaciji s karboksimetil hitozanom. Takšna kombinacija premaza – polidopamin, kot vezni polimer ter karboksimetil hitozan, tioliran z γ -tiobutirolaktonom, je bila v tej nalogi prvič izvedena.

3 UPORABLJENE METODE DELA

3.1 Uporabljeni materiali in laboratorijska oprema

Za izvedbo eksperimentalnega dela so bile uporabljene naslednje kemikalije in materiali:

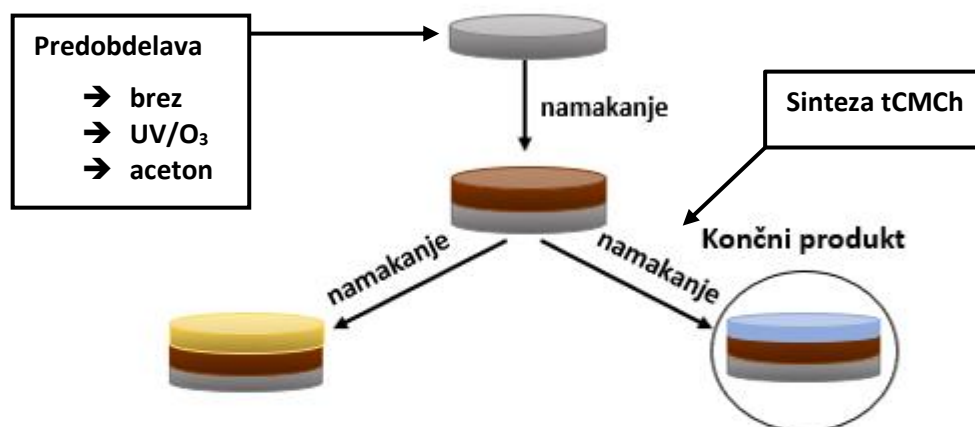
- silikon (PDMS) elastomer komplet z zamreževalcem (Sylgard 184, Dow Europe GmbH)
- aceton ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ – M: 58,08 g/mol), (Avantor)
- 3-hidroksitiramin hidroklorid ($(\text{HO})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$) – M: 189,64 g/mol), 99% – dopamin hidroklorid (Acros Organics)
- TRIS pufer ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ – M: 121,14 g/mol) (Carl Roth GmbH)
- karboksimetil hitozan ($(\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NO}_6)_n$) – stopnja deacetilacije $\geq 90\%$ (Carbosynth)
- γ -tiobutirolakton ($\text{C}_4\text{H}_6\text{OS}$ – M: 102,15 g/mol), 98% (Sigma Aldrich)
- etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), 96% (KEFO d.o.o.)
- fosfatni pufer – PBS (Phosphate-Buffered Saline) pH 7.4
- L-cistein hidroklorid ($\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \cdot \text{HCl}$) – M: 157,62 g/mol), $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)
- Etilendiamintetraoacetna kislina – EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$)
- Ellman-ov reagent: 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzojska kislina)
- Ultra-čista voda (Mili-Q Millipore, ZDA) ($18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, 25°C)

Uporabljena je bila naslednja laboratorijska oprema:

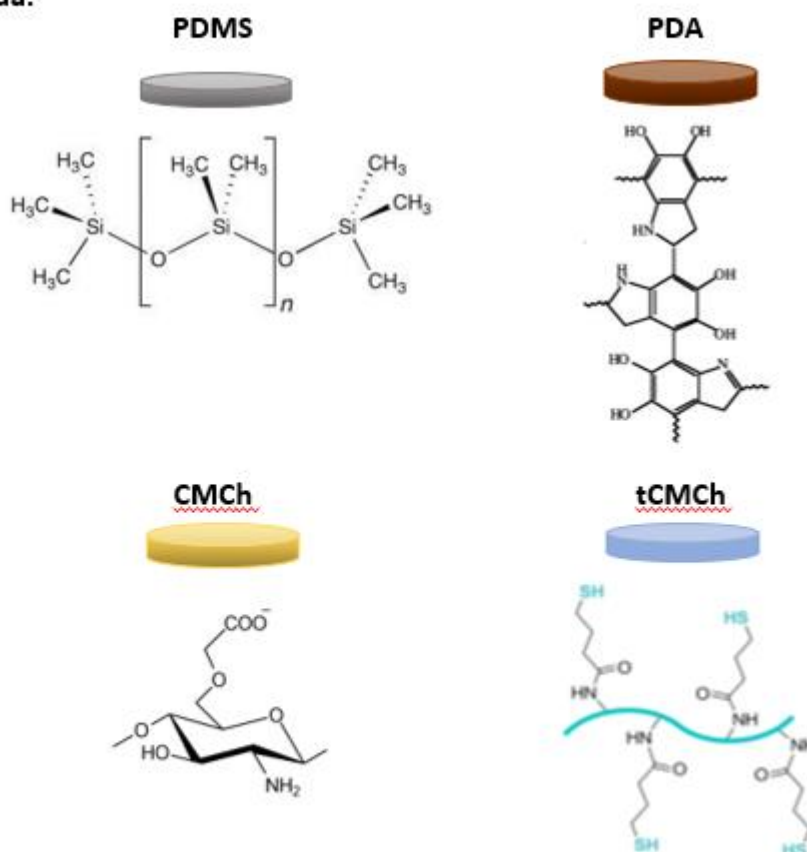
- pH meter
- stresalnik
- konvekcijski sušilnik
- magnetno grelno mešalo
- liofilizator
- laboratorijski pribor in potrošni materiali: pipete, rokavice, plastične kapalke, plošče z vdolbinicami, plastične petrijevke, dializne membrane (30 kDA) itd.
- naprave za izvedbo analiz – podrobneje opisane v podpoglavju 3.3

3.2 Postopki funkcionalizacije površine silikona

Vsi uporabljeni postopki funkcionalizacije silikona so v tem poglavju predstavljeni tako, kot so bili kronološko izvedeni v laboratoriju (slika 3.1).



Legenda:



Slika 3.1: Shema postopka eksperimentalnega dela

Silikon smo pripravili s pomočjo silikon (PDMS) elastomer kompleta z zamreževalcem in sicer smo zmešali:

- komponento A: dimetil siloksan (osnova za elastomer) in
- komponento B: zamreževalec za elastomer

v razmerju

A : B = 10 : 1

Vsebino smo prelili v model (plastično petrijevko) ter sušili 24 ur pri sobni temperaturi, nato pa s kovinskim rezilom oblikovali okrogle diske, premera 1 cm.

3.2.1 Predobdelava silikonskih ploščic

Površina silikona je hidrofobne narave, zato je vezava premazov na površino otežena. Pred funkcionalizacijo površine silikona s polidopaminom smo zato preizkusili tehnike odpiranja strukture površine z namenom narediti površino bolj hidrofilno in sicer z namakanjem v acetonu in aktivacijo z UV/O₃. Tako smo izvedli tri sisteme z različno vrsto predobdelave:

– brez predobdelave

Neobdelane silikonske diske smo položili v polistirenske ploščice s 24 vdolbinicami, kjer smo jih nato omakali s polidopaminom.

– namakanje v acetonu

V 20 mL steklene vial, napolnjene z acetonom, smo dodali silikonske diske ter jih položili na stresalnik in rahlo stresali 24 ur. Tako smo omogočili odpiranje strukture na obeh straneh ploščic. Po končanem stresanju smo jih odcedili ter jih prenesli direktno v vial, kjer smo jih omakali s polidopaminom.

– aktivacija z UV/O₃

Diske smo položili v UV/O₃ aktivacijsko komoro ter jih pustili 15, 30 in 45 min. Aktivirana je bila zgornja površina ploščic. Po končanem postopku aktivacije smo jih prenesli direktno v 20 mL vial, kjer smo jih omakali s polidopaminom.

3.2.2 Modifikacija silikonskih ploščic s polidopaminom

Priprava TRIS pufra

Za modifikacijo silikonskih diskov s polidopaminom je bilo najprej potrebno pripraviti TRIS puffer. Pripravili smo 100 mL raztopine TRIS v ultra-čisti vodi s koncentracijo 10 mmol/L. pH raztopine – pufra je bil 8.5.

Priprava raztopine dopamin hidroklorida (dopamin HCl)

Pripravili smo 20 mL 1 %, 5 % in 10 % (w/w) raztopino dopamin HCl. Raztopili smo ga v TRIS pufri, ki smo si ga predhodno pripravili, ter raztopino dodali v ploščice z vdolbinicami oz. vialo s silikonskimi diski. Vialo/ploščice z vdolbinicami smo dali na stresalnik ter rahlo stresali 24 ur. Po končanem namakanju smo silikonske diske 3-krat spirali z ultra-čisto vodo in nato sušili pri sobni temperaturi 24 ur. Pri tem smo diske, oplaščene s polidopaminom, hranili v temnem prostoru.

3.2.3 Sinteza tiolkarboksimetil hitozana (tCMCh) in vezava na polidopamin-modificirano silikonsko ploščico

Sinteza tiolkarboksimetil hitozana zajema 4 korake:

- 1) Priprava raztopine karboksimetil hitozana (CMCh)

Pripravili smo 2-krat po 20 mL 1 % (w/w) raztopine CMCh. Kot topilo smo uporabili ultra-čisto vodo, nato smo z 1.5 M NaOH pH uravnali na pH 9.

2) Priprava dveh raztopin tiobutiolaktona različnih koncentracij

c_1 (tiobutiolakton) = 0,224 mmol/10 mL → enaka množina, kot je množina aaminskih skupin v CMCh

→ **n (tiobutiolakton) : n (aminske skupine v CMCh) = 1 : 1**

c_2 (tiobutiolakton) = 2,24 mmol/10 mL → 10-krat večja množina, kot je množina aaminskih skupin v CMCh

→ **n (tiobutiolakton) : n (aminske skupine v CMCh) = 10 : 1**

Tako kot CMCh, smo tudi za obe koncentraciji pripravili po 20 mL raztopine tiobutiolaktona. Pri tem pa smo kot topilo uporabili etanol.

3) Reakcija: zmešanje raztopin CMCh in tiobutiolaktona

Vsako raztopino tiobutiolaktona smo dodali k raztopini CMCh ter jih zmešali. S pH metrom smo izmerili pH in po potrebi z 1.5 M NaOH zvišali na pH > 9, da smo zagotovili deprotonirano obliko aaminskih skupin v CMCh. Mešanice smo postavili na grelec ter nastavili gretje na 37° C. Reakcija je potekala 24h ob konstantnem mešanju z magnetnim mešalom.

4) Čiščenje – odstranjevanje tiobutiolaktona, ki ni reagiral tekom reakcije

Po končani reakciji smo produkta prelili v dializne membrane s poroznostjo 30 kDa. Dializa je potekala v Milli-Q prečiščeni vodi, katero smo menjavali 2-krat dnevno, pri 50° C. Dializa je trajala 3 dni.

Po končani dializi smo produkta zamrznili in liofilizirali 3 dni.

Liofilizirana tCMCh smo ponovno raztopili v ultra-čisti vodi. Pripravili smo 1 % (w/w) raztopini tCMCh ter z 1.5 M NaOH uravnali na pH 9. Raztopini smo dodali v ploščice z vdolbinicami s polidopamin-modificiranimi silikonskimi diski. Ploščice z diski smo položili na stresalnik ter

rahlo stresali 24 ur. Po končanem namakanju smo oplaščene silikonske diske 3-krat spirali z ultra-čisto vodo in nato sušili pri sobni temperaturi 24 ur.

3.3 Teoretične osnove in izvedba izbranih analiznih metod

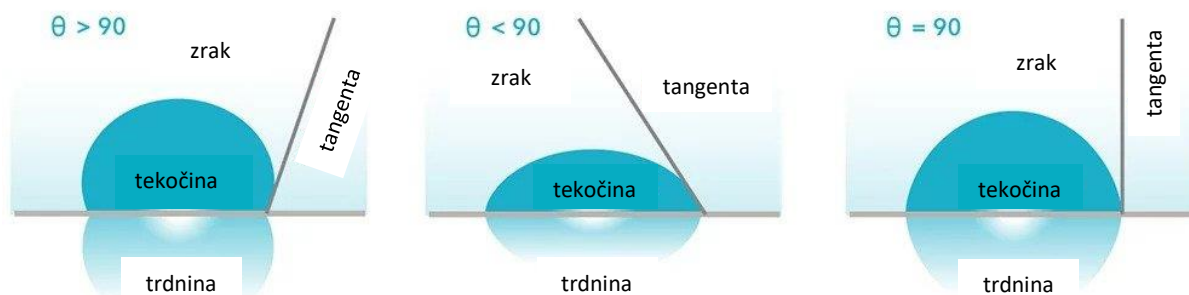
V tem pod poglavju bodo predstavljene analizne metode, ki smo jih uporabili za karakterizacijo naših produktov ter njihova izvedba. Pri analizi produktov smo se osredotočili na naslednje lastnosti:

- omočljivost materiala,
- kemijska sestava,
- morfologija ter
- bioaktivne lastnosti materiala.

3.3.1 Omočljivost in optična goniometrija

Princip delovanja

Optična goniometrija je metoda, s katero določujemo omočljivost materiala. Pri tem se meri stični kot θ , ki je kvantitativno merilo omočljivosti trdne snovi s tekočino. Definiran je kot kot (θ), ki nastane na stiku mejne faze tekočine-trdnine in tekočine-plina (zraka) [59]. Določi se s tangento na zunanji rob kapljice na stiku s površino, kot je prikazano na **Slika 3.2**. Vrednosti stičnega kota so v območju $0 - 180^\circ$. Vrednost stičnega kota je zelo nizka ($\ll 90^\circ$), ko se tekočina razlije po površini – površina materiala je hidrofilna (ima »rada« vodo). Na hidrofobnih površinah (se »boji« vode) pa tekočina na površini teži k obliki kapljice, vrednost stičnega kota pa je zato visoka ($\gg 90^\circ$) [59].



Slika 3.2: Načini omočenja materiala [60]

Eksperimentalna izvedba

Meritve stičnih kotov smo izvedli na optičnem goniometru Dataphysics OCA 35 (DataPhysics Instruments GmbH, Nemčija), s pripadajočo programsko opremo SCA20_U, ki je sestavljen iz

- elektronsko krmiljene podlage, kamor smo položili vzorec,
- igle za doziranje vode (avtomatsko doziranje) ter
- kamere, ki prenaša povečano sliko površine s kapljico na računalnik.

Z elektronsko vodeno iglo smo na vzorec kanili kapljico vode volumna $2 \mu\text{L}$. Ta je ob stiku s površino vzorec ustrezno omočila. Program je nato geometrično na podlagi slike izračunal stični kot med površino vzorca in kapljevino. Stični kot smo pri vsakem vzorcu izmerili na treh mestih.

3.3.2 Določanje kemijske sestave z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo (FTIR)

Princip delovanja

Z metodo infrardeče spektroskopije ugotavljamo molekularno strukturo materiala, ki ga analiziramo. Metoda temelji na absorpciji infrardeče svetlobe. Molekule infrardečo svetlobo absorbirajo pri točno določenih frekvencah. Te so sorazmerne z vibracijsko energijo vezi med atomi molekul. Do absorpcije pride takrat, ko se vibracijska energija vezi izenači z energijo

specifične valovne dolžine IR svetlobe. Različni tipi vezi v molekuli imajo različno vibracijsko energijo in posledično absorbirajo IR sevanje pri različnih valovnih dolžinah [61], [62].

Žarek IR svetlobe najprej potuje skozi interferometer, kjer se razcepi na dva ekvivalentna žarka. Eden od žarkov potuje proti statičnemu ogledalu, eden pa proti premikajočemu ogledalu. Oba žarka se ob trku v ogledala odbijeta in potujeta proti vzorcu. Ker pa se eno od ogledal premika, imata žarka različno dolgo pot do vzorca, kar povzroči interferenco v spektru. Ta interferenca je lahko konstruktivna ali destruktivna. Konstruktivna interferenca se zgodi takrat, ko sta žarka v isti fazi valovanja – amplituda valovanja se poveča, pri destruktivni interferenci pa sta žarka v različnih fazah valovanja – amplituda valovanja se zmanjša (se izničujeta). Detektor nato izmeri signal interferometra, ki preide vzorec, v obliki amplitude valovanja v odvisnosti od optične poti žarka. Ta se s pomočjo matematičnega algoritma, imenovanega Fourierjeva transformacija, preoblikuje v »bolje razumljiv« spekter, kjer je prikazana intenziteta transmisije v odvisnosti od valovnega števila [61].

Območje IR valovanja je razdeljeno na tri dele: bližnji (*ang. near*) IR – **NIR**, srednji (*ang. mid*) IR – **MIR** in daljni (*ang. far*) IR – **FIR**. Za FTIR spektroskopijo je najbolj pomembno območje srednjega IR, ki se nahaja v območju elektromagnetnega valovanja 2.5 – 25 μm oz. med valovnimi števili 4000 – 100 cm^{-1} . Večina molekularnih vibracij se pojavlja znotraj tega območja [63]. Pri višjih valovnih številih nekje med 3500 in 2300 cm^{-1} IR svetlobo absorbirajo molekule z enojnimi vezmi (C-H, O-H, N-H, S-H), sledijo trojne vezi ($\text{C}\equiv\text{N}$, $\text{C}\equiv\text{C}$) pri valovnih številih 2300 – 2100, od 1800 do približno 600 pa dvojne vezi (C=O, C=N, C=C) in razne ciklične spojine. FTIR spektroskopija je tako enostavna, nedestruktivna in učinkovita metoda za določanje prisotnosti raznih funkcionalnih skupin v vzorcu. Naprava po navadi vsebuje še dodatek ATR (*ang. attenuated total reflectance* – oslabljen popoln odboj) z diamantnim kristalom, ki omogoča analizo vzorca v trdnem, tekočem ali plinastem stanju.

Eksperimentalna izvedba

Za analizo infrardeče spektroskopije s Fourierjevo transformacijo (FTIR) smo uporabili napravo PerkinElmer Spectrum GX z dodatkom ATR (*ang. attenuated total reflectance* – oslabljen popoln odboj) z diamantnim kristalom. Merili smo v območju $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ z resolucijo 4 cm^{-1} , dobljen spekter pa je povprečje 16 meritev. Vsak vzorec smo izmerili na treh mestih.

3.3.3 Določanje kemijske sestave površine z rentgensko fotoelektronsko spektroskopijo (XPS)

Princip delovanja

Metoda XPS se uporablja za ugotavljanje kemijske sestave, stanja in elektronskih lastnosti površin materiala. Pri tej metodi površino vzorca obsevamo z rentgensko svetlobo. S tem se elektronom atomov na površini zviša energija do te mere, da se elektroni izbijejo iz notranjih atomskih energijskih nivojev. Izbiti elektroni, ki imajo višjo kinetično energijo, zapustijo površino in jih lahko detektiramo z analizatorjem energije elektronov [64]. Kot rezultat dobimo fotoelektronski spekter. Pri heterogenem vzorcu je na spektru prisotnih več vrhov, ki pripadajo različnim atomom. Na podlagi tega lahko zato določimo atomsko sestavo površine vzorca, ki je sorazmerna z velikostjo vrhov na spektru. Na podlagi premikov vrhov, v primerjavi s čistimi elementi, kar je povezano z valenčnim stanjem atomov v spojinah, je mogoče določiti tudi tipe kemijskih vezav v spojinah. Globina zaznave je v velikosti $1 - 10 \text{ nm}$, metoda pa je primerna za analizo vseh elementov, z izjemo vodika in helija [64].

Eksperimentalna izvedba

Analiza z rentgensko fotoelektronsko spektroskopijo - XPS (X-Ray photoelectron spectroscopy) je bila opravljena na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani, kjer so tudi izvedli meritve. XPS spektri so bili posneti z monokromatskim spektrometrom K-Alpha, opremljenim z izvorom rentgenskih žarkov Al ($1486,6 \text{ eV}$), ki deluje z baznim tlakom v območju 10^8 do 10^{10} mbar . Spektri so bili pridobljeni z energijo prehoda 100 eV in velikostjo koraka $1,0 \text{ eV}$. Vsi spektri so bili normalizirani na vrh Au $4f7 / 2$. Povprečna kemijska sestava je bila izračunana iz širokega

spektra skeniranja na dveh različnih mestih na vsaki površini. Vse analize so bile izvedene pri sobni temperaturi.

3.3.4 Optična analiza površine z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM)

Princip delovanja

Vrstična elektronska mikroskopija se uporablja za ugotavljanje površinske topografije ter kristalne in kemijske strukture vzorca do približno 1 μm globine [65]. Optični svetlobni mikroskop je sam po sebi omejen z valovno dolžino svetlobe, ki se uporablja za osvetlitev površine vzorca, s tem pa je tudi omejena resolucija. Teoretična meja resolucije pri optičnem svetlobnem mikroskopu je valovna dolžina med 200 in 250 nm [66]. Elektroni imajo veliko manjšo valovno dolžino, kar omogoča boljšo resolucijo. Pri vrstičnem elektronskem mikroskopu vzorec obstreljujemo z visoko energijskim snopom elektronov. Elektroni po interakciji s površino vzorca proizvedejo signale, ki jih zaznamo z enim ali več detektorji. Signali, ki jih detektiramo, so posledica različnih interakcij s površino. Ti izvirajo iz

- sekundarnih elektronov,
- povratno sipanih elektronov,
- toka, inducirane z elektronskim žarkom,
- katodoluminiscence,
- karakterističnih rentgenskih žarkov in
- Augerjevih elektronov.

Najvišjo prostorsko ločljivost slike zagotavljajo sekundarni elektroni, ki se izbijejo od vzorca z energijami pod 50 eV kot posledica vpadnega elektrona. Sekundarni vzorci po navadi izvirajo iz najvišjega sloja materiala. Z detekcijo teh elektronov dobimo sliko topografije materiala.

Povratno sipani elektroni so tisti vpadni elektroni, ki se približajo jedru atoma dovolj blizu, da se razpršijo pod velikim kotom in se izbijejo iz površine. Tovrstnih elektronov je manj v primerjavi s sekundarnimi elektroni, vendar imajo višjo energijo. Ker prihajajo iz večje globine,

nastane slika z nekoliko manjšo ločljivostjo. Iz tovrstne slike lahko dobimo informacije o sestavi – elementi z večjo atomsko maso dajejo svetlejši kontrast[65].

Eksperimentalna izvedba

SEM analiza je bila izvedena na vzorcu, položenem na držalo za vzorec mikroskopa z dvostranskim lepilnim ogljikovim trakom. Za opazovanje morfologije vzorca je bil uporabljen elektronski mikroskop Carl Zeiss FE-SEM SUPRA 35 VP. Slike so bile posnete s pospeševalno napetostjo 1 keV pri delovni razdalji 4,5 mm.

3.3.5 Karakterizacija funkcionalnih skupin z nevtralizacijsko titracijo

Princip delovanja

Nevtralizacijska titracija spada med volumetrične analize, pri kateri merimo spremembo potenciala med indikatorsko in referenčno elektrodo, ki je funkcija količine dodanega volumna titranta znanih koncentracij. Tako lahko pri kislinsko-bazni titraciji z dodajanjem kisline ali baze z znano koncentracijo določimo koncentracijo kisline ali baze v analitu. Pri kislinsko-baznih titracijah se kot indikatorska elektroda najpogosteje uporablja steklena pH-senzitivna elektroda. Referenčne elektrode pa so po navadi na osnovi živega srebra in srebra (kalomelne elektrode), njihova funkcija pa je ohranjanje konstantnega potenciala. Pri avtomatskem titratorju poleg elektrod napravo sestavljajo še čaša z mešalom, avtomatska bireta za doziranje kisline ali baze in visoko-impedančni elektronski pH ali milivolt-meter [67].

Eksperimentalna izvedba

Titracija je bila izvedena na dvo-biretnem avtomatskem titratorju T70 (Mettler Toledo, Švica) v inertni atmosferi (uporaba uplinjenega dušika). Birete so bile napolnjene z 0.1 M HCl in 0.1 M KOH (titranta). Analite (CMCh, tCMCh 1:1 in tCMCh 10:1) smo raztopili v MilliQ vodi s koncentracijo 1.5 mg/mL, ionsko jakost pa smo uravnali na 0.1 M z uporabo 3M raztopine KCl. Analite smo titrirali v smeri »naprej« (kislo → bazično) in »nazaj« (bazično → kislo) v pH

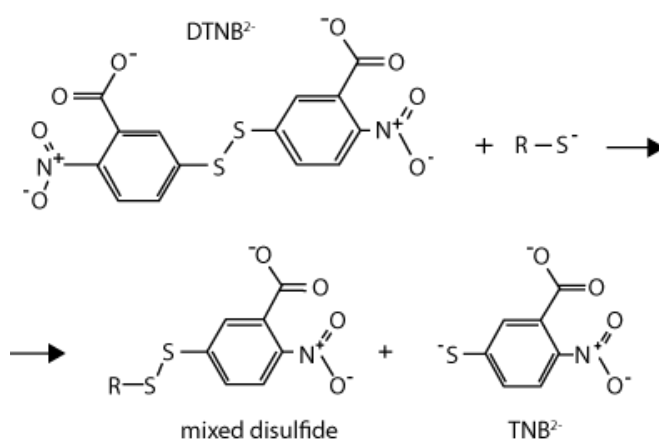
območju 2,4 – 11,1. Vrednost pH je bila merjena s pomočjo steklene elektrode (DG-11SC, Mettler Toledo, Švica). Titriran je bil tudi slepi vzorec pri enakih pogojih kot analiti.

3.3.6 Določanje prostih tiolnih skupin z Ellman-ovim testom

Princip delovanja

Ellman-ov test je pogosto uporabljena metoda, s katero določujemo koncentracije tiolnih (-SH) skupin v neznanih raztopinah. Ime metode izvira iz Ellman-ovega reagenta **DTNB** (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojska kislina)), ki ga je razvil George L. Ellman. Ko reagira s tiolnimi skupinami, se raztopina te spojine obarva rumeno. Posledično lahko ta rumeno obarvan produkt kvantificiramo z uporabo UV-VIS spektrofotometrične spektroskopije na podlagi njegove močne absorpcije pri valovni dolžini 412 nm [68], [69].

DTNB reagira s prosto tiolno skupino, tako da nastane mešan disulfid in 2-nitro-5-tiobenzojska kislina (TNB) (slika 3.3). Tarča DTNB v tej reakciji je konjugirana baza ($R-S^-$) proste tiolne skupine, pri tem pa je TNB tisti produkt, ki v tej reakciji obarva. Tiolne skupine v neznani spojini lahko nato določimo s pomočjo umeritvene krivulje spojine znanih koncentracij tiolnih skupin, kot je na primer cistein [69].



Slika 3.3: Redukcija Ellman-ovega reagenta [69]

Za kvantitativno določanje tiolnih skupin obstajajo sicer še druge metode, kot so elektrokemijske in fluorimetrične metode, ki so v primerjavi z Ellman-ovim testom bolj občutljive, vendar vključujejo dolgotrajne postopke (popolna proteoliza, elektroliza, ločitev s HPLC). Zato je v primerjavi s temi metodami, čeprav je občutljivost manjša, bistveno hitrejša in enostavnejša metoda za kvantitativno določanje tiolnih skupin [69].

Eksperimentalna izvedba

Najprej smo si pripravili reakcijski pufer. Fosfatni pufer PBS (pH 7,4) smo z ultra čisto Mili-Q vodo razredčili na koncentracijo 0,1 mol/L (M). Nato smo v razredčenem PBS raztopili EDTA do koncentracije 1 mM. Tako smo dobili reakcijski pufer. Kasneje smo pripravili standardne raztopine L-cistein hidroklorida (L-cistein HCL) koncentracij 0.2 mM, 0.1 mM, 0.05 mM, 0.025 mM in 0.0125 mM. Cistein je bil raztopljen v reakcijskem pufru. Sledila je priprava raztopin naših vzorcev sintetiziranega tiolkarboksimetil hitozana. Pripravili smo dve raztopini za vsak vzorec (tCMC 1:1 in tCMC 10:1) in sicer 0,087 g vsakega vzorca smo raztopili v 100 mL Mili-Q prečiščene vode.

Sledila je priprava raztopine Ellman-ovega reagenta, pri čemer smo 4 mg Ellman-ovega reagenta raztopili v 1 mL reakcijskega pufra. Nato smo v testne plošče s 36 vdolbinicami dodali 50 μ L raztopine Ellman-ovega reagenta in 2,5 mL reakcijskega pufra ter po 250 μ L vsake standardne raztopine ter naših vzorcev. Raztopine smo inkubirali 15 min pri sobni temperaturi, da je reakcija potekla. Vzorcem (vključno z reakcijskim pufrom – slepi vzorec) smo nato z metodo UV-VIS spektroskopije izmerili absorbanco pri valovni dolžini 412 nm. Na podlagi umeritvene krivulje standardnih raztopin smo nato določili koncentracije tiolnih skupin vzorcev sintetiziranega tiolkarboksimetil hitozana.

3.3.7 Mikrobiološki testi – tvorba bakterijskega biofilma na površini materiala

Princip delovanja

Bakterije se med seboj razlikujejo glede na strukturo celične stene. Delimo jih na dve skupini:

- Gram-negativne in
- Gram-pozitivne bakterije.

Površina Gram-negativnih bakterij sestoji iz zunanje membrane z lipidi in lipopolisaharidi, površina Gram-pozitivnih bakterij iz peptidoglikanov in teihojske kisline [16]. Metoda tovrstne klasifikacije je obarvanje po Gram-u. Gre za tehniko, ki jo je leta 1884 razvil danski bakteriolog Hans Christian Gram [70]. Ob dodatku kristalno vijoličnega barvila Gram-negativne bakterije se obarvajo le prehodno in razbarvajo z dodatkom etanola ali acetona. Za lažjo vidljivost pod mikroskopom se bakteriji doda še barvilo safranin, ki povzroči rahlo rdeče obarvanje. Zaradi razbravanja z etanolom ali acetonom je pri Gram-negativnih bakterijah zunanja membrana degradirana, tanek sloj peptidoglikana pa ni sposoben zadržati barvila, zato se vijolična barva izgubi. Dobimo **negativen** rezultat (Gram-negativna bakterija). Zato se po dodatku safranina obarvajo rahlo rdeče. Pri Gram-negativnih bakterijah pa, tudi po razbarvanju z etanolom ali acetonom, zaradi debelega peptidoglikanskega sloja barvilo ostane ujeto, bakterije se obarvajo vijolično tudi po dodatku safranina. Dobimo **pozitiven** rezultat (Gram-pozitivna bakterija).

Zaradi karakterističnega obarvanja je zato mogoče spektrofotometrično določiti optično gostoto bakterij na površini materiala.

Eksperimentalna izvedba

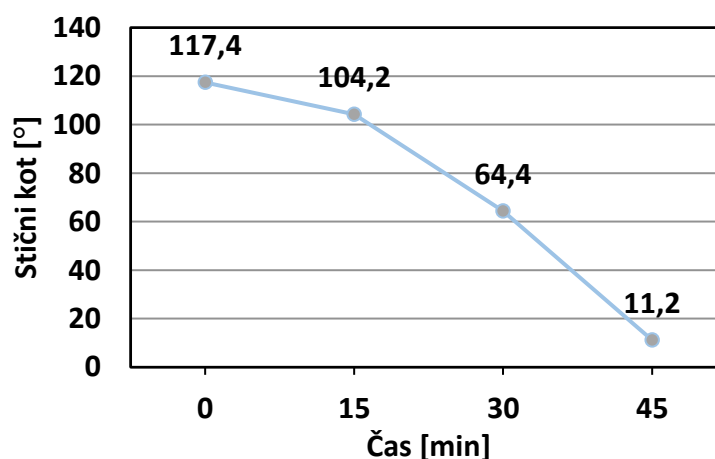
Produkcija biofilma in meritve absorbance so bile izvedene na Centru za medicinsko mikrobiologijo na Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) v Mariboru. Silikonski diski z nanosi ter brez nanosa so bili nameščeni v plošče z 12 vdolbinicami. Nato so Gram pozitivno bakterijo (*Staphylococcus aureus*, sev: ZZV17 – 8422) čez noč gojili v TSB in jo razredčili v TSB v razmerju 1:40 ter nato dopolnili z 0,25% glukoze. Ta suspenzija je bila nato dodana na silikonske diske z nanosi in brez nanosa, nameščene v plošči z 12 vdolbinicami 24 ur pri 37 °C. Po inkubaciji je bila bakterijska suspenzija odstranjena, silikonski diski pa so bili trikrat spirani s PBS (pH 7,4). Nato je bilo v vsako jamico dodanih 125 µL raztopine kristalno vijoličnega barvila in puščeno 10 min, da reagira. Kristalno vijolično obarvane površine biofilma se je spiralo trikrat z ultra čisto vodo. Nato se je vezano barvilo ekstrahiralo z dodatkom 30% oetne kisline. Optična gostota (OD – Optical Density) ekstrahirane kristalno vijolične raztopine je bila izmerjena v ploščah s 96 vdolbinicami pri valovni dolžini 570 nm. Za vsak vzorec sta bili izvedeni dve ponovitvi.

4 REZULTATI IN DISKUSIJA REZULTATOV

4.1 Rezultati pred-obdelave silikonskih diskov in vezave polidopamina

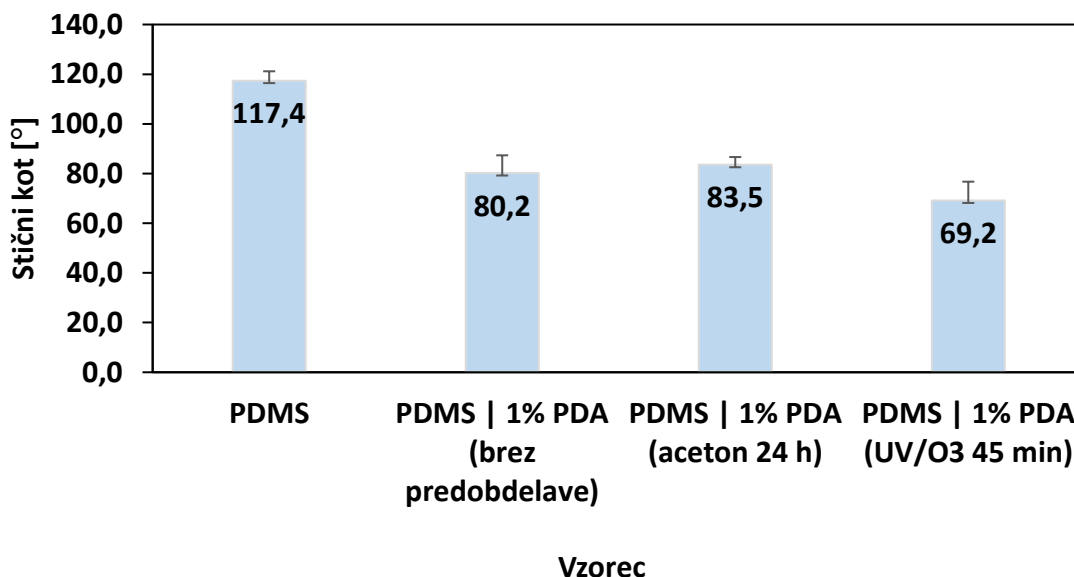
4.1.1 Omočljivost in optična goniometrija

Cilj preobdelave silikonskih diskov je bil torej ustvariti čim bolj hidrofilno površino z namenom uspešnejše vezave polidopamina. Preizkusili smo učinkovitost aktivacije z UV/O₃ pri treh različnih časih in sicer 15, 30 in 47 minut. Učinkovitost smo preverili z meritvami stičnega kota. Rezultati so pokazali, da se je vrednost stičnega kota, v primerjavi z neobdelanimi silikonskimi diski, najbolj zmanjšala pri aktivaciji z UV/O₃ po 45 minutah, kot je razvidno iz **slike 4.1**. Takrat je povprečna vrednost znašala 11,2° – material je postal izrazito hidrofilen. Aktivacijski čas 15 minut ni zadoščal, saj je stični kot znašal več kot 90° in sicer v povprečju 104,2°. Površina silikonskega diska je še vedno imela hidrofoben značaj. Pri aktivacijskem času 30 minut je sicer vrednost stičnega kota padla pod mejo 90°, torej v povprečju na 64,4°, kar pomeni, da je površina postala hidrofilna. Ker pa je učinkovitost obdelave z UV/O₃ relativno kratkotrajna, smo se odločili, da pri nadaljnjih postopkih funkcionalizacije s polidopaminom uporabimo silikonske diske, pri katerih je bilo trajanje aktivacije dolgo 45 minut, da dosežemo maksimalno učinkovitost vezave.

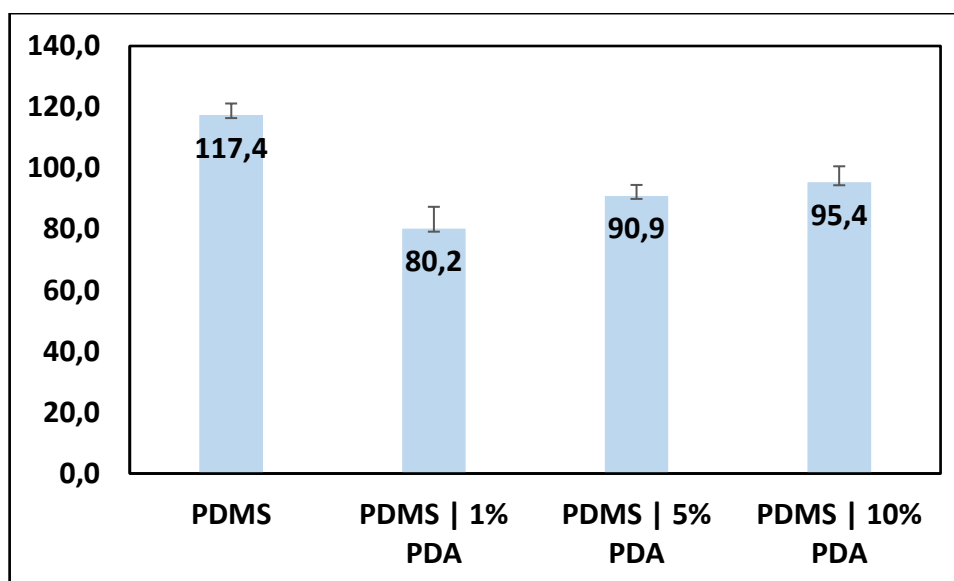


Slika 4.1: Vpliv trajanja aktivacije z UV/O₃ na omočljivost materiala

Rezultati preizkusa vpliva predobdelave PDMS na omočljivost površine po namakanju v PDA so ponazorjeni na **sliki 4.2**. Izkazalo se je, da aktivacija z UV/O₃ najbolj pripomore k izboljšanju omočljivosti površine na PDMS vezanega PDA. Vrednost stičnega kota se je znižala na povprečno 69,2°, kar glede na neobdelan PDMS predstavlja 41 % znižanje. Uspešnost adsorpcije lahko pripišemo pojavu silanolnih skupin na površini PDMS, ki je posledica iradiacije z UV/O₃, zaradi česar je površina postala bolj hidrofilna. Zato lahko sklepamo, da je hidrofilen značaj površine PDMS pripomogel k uspešnejši adsorpciji PDA. V primerih neobdelanega PDMS in PDMS, ki smo ga 24 ur namakali v acetonu, je površina prav tako postala hidrofilna. Stični koti so se, glede na neobdelan PDMS, v povprečju znižali za približno 32 % (PDMS | 1% PDA – brez predobdelave) in 29 % (PDMS | 1% PDA – aceton 24 h). Sklepamo, da je adsorpcija PDA v obeh primerih bila manj učinkovita zaradi bolj hidrofobnega značaja površine PDMS pred vezavo. Tehnika odpiranja strukture z namakanjem v acetonu je bila torej najmanj učinkovita, zato smo se odločili, da se je v prihodnje ne bomo posluževali. Aktivacija z UV/O₃ je v primerjavi z namakanjem v acetonu tudi časovno učinkovitejša tehnika, saj je po 45 minutah dosežen večji učinek. Poleg tega se z okoljevarstvenega vidika teži k čim manjši uporabi organskih topil.



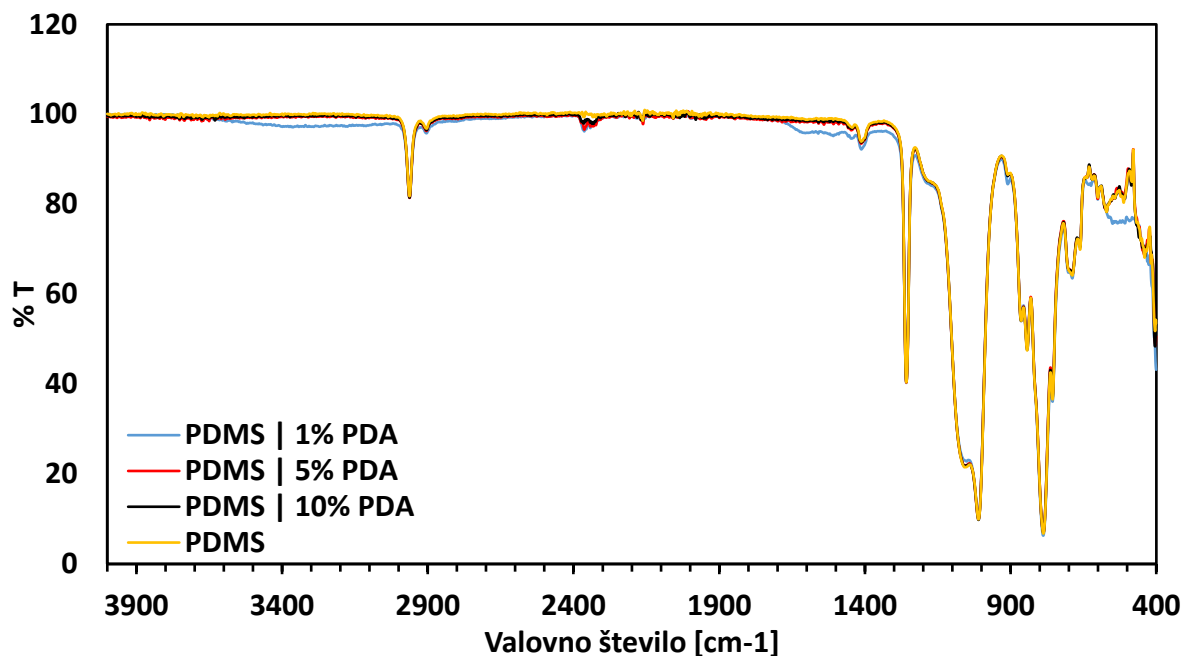
Slika 4.2: Vpliv predobdelave silikona na omočljivost materiala po vezavi PDA



Slika 4.3: Vpliv koncentracije PDA na omočljivost materiala

Preizkusili smo vezavo treh različnih koncentracij polidopamina: 1 %, 5 % in 10 % w/w. Polidopamin smo vezali na neobdelan PDMS. Zanimal nas je vpliv koncentracije polidopamina na spremembo stičnega kota, ki nam poda informacijo o spremembi površine materiala in s tem nakazuje vezavo PDA na PDMS. Meritve stičnega kota so pokazale, da je vrednost stičnega kota najnižja pri vezavi 1 % raztopine PDA, kot je razvidno na **sliki 4.3**. Ta v povprečju znaša 80,2°, medtem ko pri 5 % raztopini znaša 90,9° ter pri 10 % raztopini 95,4°. Tako smo le pri vzorcu, kjer je vezan 1 % PDA, dosegli hidrofilno površino in s tem potrdili prisotnost PDA na PDMS. To velja tudi za primer 5 in 10 % raztopine PDA, kjer je zaradi padca vrednosti stičnega kota glede na čist PDMS, potrjena prisotnost PDA na vzorcu, vendar pa je površina v teh primerih hidrofobna. Iz tega lahko sklepamo, da je bila polimerizacija PDA na površini PDMS učinkovitejša pri koncentraciji 1 %, koncentraciji 5 in 10% pa v tem primeru nista bili ustrezni. Zaradi potrebe po čim bolj hidrofilni površini za optimalno nadaljnjo vezavo derivata hitozana, smo se odločili za 1 % raztopino PDA, kjer je stični kot najnižji in predvidevamo, da je površina pri takšni koncentraciji najbolj enakomerno prekrita.

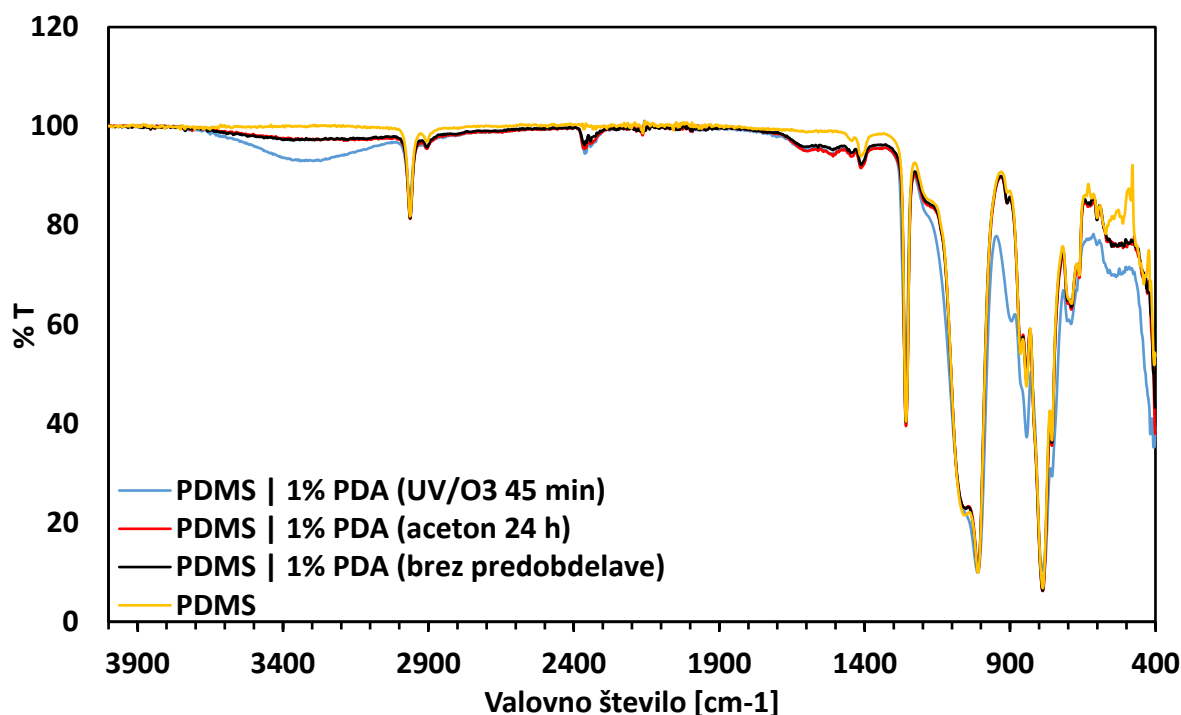
4.1.2 Določevanje kemijske sestave z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo (FTIR)



Slika 4.4: Primerjava različnih koncentracij PDA vezanega na silikon

Na **sliki 4.4** je prikazan FTIR spekter nefunkcionaliziranega PDMS ter tri različne koncentracije PDA, vezanega na PDMS. Pri valovnem številu 2960 cm^{-1} je opazen vrh, ki je karakterističen za C-H raztezanje, ki izvira iz metilnih skupin ($-\text{CH}_3$) PDMS [71]. Prisoten je tudi vrh pri valovnem številu 1250 cm^{-1} , karakterističen za CH_3 simetrično upogibanje pri $\text{Si}-\text{CH}_3$, pri približno 790 cm^{-1} pa CH_3 zibanje v $\text{Si}-\text{CH}_3$. Vrh, prisoten v območju $1000 - 1200\text{ cm}^{-1}$ pa je značilen za siloksan ($\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$). Kot je razvidno, se PDMS | 5 % PDA in PDMS | 10 % PDA po večini popolnoma prekrivata s spektrom neobdelanega PDMS, kar nakazuje na zelo majhno količino vezanega PDA, iz česar lahko sklepamo, da vezava ni bila uspešna. Med tem pa je pri PDMS, na katerega je vezan 1% PDA, viden širok vrh v območju $3200 - 3400\text{ cm}^{-1}$, karakterističen za O-H in N-H raztezanje. Tega lahko pripišemo kateholu iz PDA, lahko pa tudi izvira iz silanolnih skupin ($\text{Si}-\text{OH}$) iz PDMS, ki so posledica aktivacije z UV/ O_3 . Poleg tega pa je prisoten še širši vrh v območju $1500 - 1650\text{ cm}^{-1}$, za katerega je karakteristično C=C raztezanje pri aromatskem obroču, pa tudi za N-H upogibanje. Oboje lahko pripišemo prisotnosti polidopamina, ki ima v zgradbi

aromatski obroč, pa tudi aminske skupine, nič od tega pa ni prisotno v PDMS. Tako smo potrdili uspešno vezavo 1 % PDA na PDMS ter tudi ugotovitve iz meritev stičnega kota.



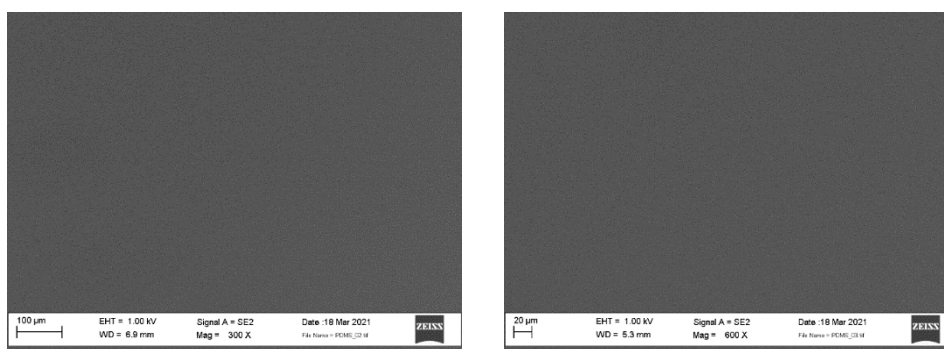
Slika 4.5: Vpliv predobdelave na vezavo PDA na silikon

S FTIR spektroskopijo smo okarakterizirali tudi vzorce PDMS različnih predobdelav (brez predobdelave, namakanje v acetonu 24 h in aktivacija z UV/O₃), na katere smo vezali 1 % raztopino PDA (slika 4.5). Pri valovnem številu 3200 – 3400 cm⁻¹ je viden signal, karakterističen za aminske in hidroksilne skupine, ki pripadajo PDA. Ta je prisoten pri vseh vzorcih, kjer je nanešen PDA, intenzivnejši pa je pri PDMS | 1 % PDA (UV/O₃). To sicer lahko nakazuje na debelejši sloj PDA, lahko pa je tudi posledica aktivacije in je signal pri tem valovnem številu toliko intenzivnejši zaradi silanolnih skupin. Opazen je pa tudi signal v območju, značilnem za aminske skupine in aromatski obroč (1500 – 1650 cm⁻¹), ki prav tako izvirajo iz prisotnosti PDA na PDMS. Ta signal je pri vseh treh vzorcih različne predobdelave približno enake intenzitete.

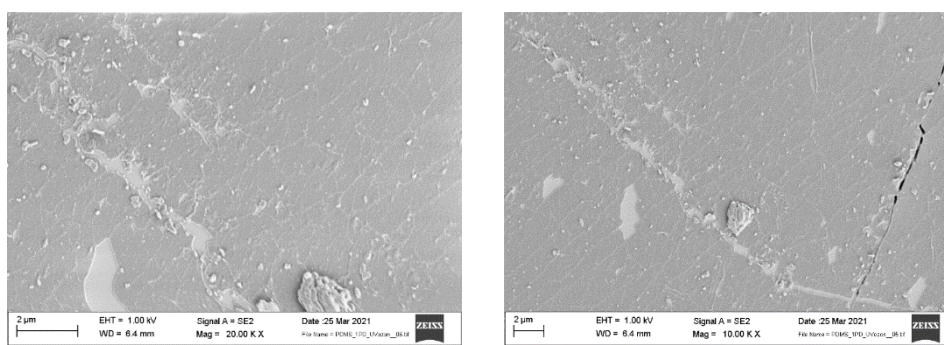
4.1.3 Optična analiza površine z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM)

Na **sliki 4.6** so prikazani posnetki vrstične elektronske mikroskopije (SEM) površine vzorcev PDMS (zgornji sliki) in PDMS, aktiviran z UV-O₃ z nanosom PDA (spodnji sliki). V primerjavi s posnetkom površine PDMS, je na spodnjih slikah (PDMS (UV/O₃) | 1% PDA) lepo viden sloj relativno nizke koncentracije polidopamina (temnejša barva). Površina je homogena in gladka, prisotni so manjši delci oz. skupki. Sicer so vidne manjše razpoke, ki pa so posledica namerne poškodbe materiala, saj se je s tem omogočilo, da je nanos postal na posnetkih viden. V svetlejši barvah pa je vidna podlaga – PDMS.

PDMS



PDMS (UV/O₃) | 1% PDA



Slika 4.6: SEM posnetki površine PDMS in PDA, vezanega na PDMS

4.1.4 Določanje kemijske sestave površine z rentgensko fotoelektronsko spektroskopijo (XPS)

Preglednica 4.1: Sestava vzorcev PDMS, PDMS (UV/O₃) | 5% PDA in PDMS (UV/O₃) | 1% PDA (atomski %)

Vzorec	C	N	O	Si	Na	S	Cl
PDMS	45.0		30.5	24.5			
PDMS (UV/O ₃) 5% PDA	62.0	5.6	25.2	5.9			1.4
PDMS (UV/O ₃) 1% PDA	50.8	1.5	29.1	18.5			

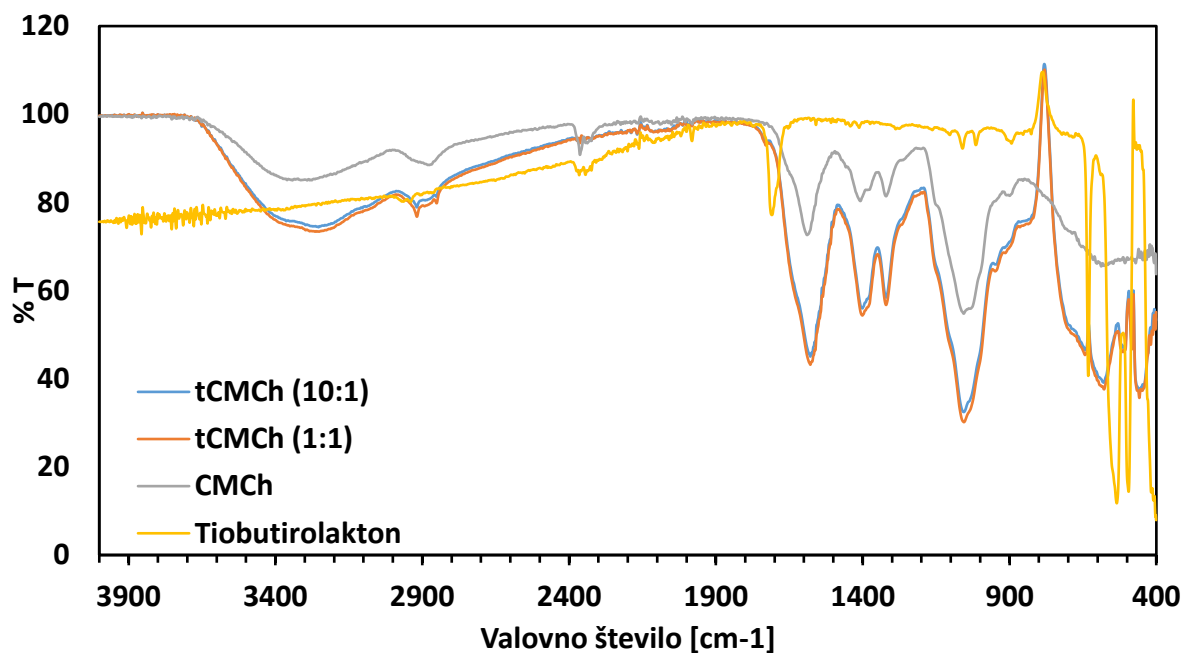
V **preglednici 4.1** je prikazana elementarna sestava vzorcev PDMS, PDMS (UV/O₃) | 5 % PDA in PDMS (UV/O₃) | 1 % PDA. Ogljik (C) in kisik (O) sta prisotna v vseh vzorcih, zato sta za karakterizacijo vzorcev bolj pomembna elementa silicij (Si), ki izvira samo iz PDMS in dušik (N), ki izvira iz PDA. Detekcijska globina XPS je 1 - 10 nanometrov. Glede na visoko koncentracijo Si v vzorcih z nanosom PDA, lahko sklepamo, da je plast nanosa zelo tanka. V primeru nanosa 1 % PDA je delež Si bistveno večji kot pri 5 % PDA, pa tudi manjši je delež N kot pri 5 % PDA. To potrjuje, da je na tem vzorcu prisotna manjša količina PDA, kar je sicer v nasprotju od ugotovitev iz FTIR spektroskopije. Prisotnost nanosa pa tudi potrjuje povečanje deleža C, tako pri 1% kot pri 5 % PDA. Pojav klora (Cl) v sestavi pa nakazuje na nečistočo, ki je prisotna v vzorcu.

Analizna globina pri FTIR spektroskopiji je nekaj mikrometrov. Glede na to, da je film debel le nekaj nanometrov, je v opazovanem spektru zajeto več kot 99 % PDMS in le manj kot 1 % površinskega nanosa PDA. Zaradi tega je razlikovanje med posameznimi koncentracijami PDA na površini veliko bolj nenatančno kot pri XPS, ki je bolj površinsko občutljiva metoda.

Glede na to, da je pokritost površine s PDA enaka za 1 % in 5 %, smo se v nadaljevanju odločili za uporabo 1 % PDA.

4.2 Karakterizacija sintetiziranega tiolkarboksimetil hitozana

4.2.1 Določanje kemijske sestave z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo (FTIR)



Slika 4.7: Spektri sintetiziranega tCMC (1:1 in 10:1), CMC in tiobutirolaktona

Po sintezi tCMCh (10:1) in tCMCh (1:1) smo vzorcema posneli FTIR spekter ter ju primerjali s karboksimetil hitozanom in tiobutirolaktonom (Napaka! Vira sklicevanja ni bilo mogoče najti.). Pri CMCh je na območju valovnega števila $3200 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ prisoten širok signal, karakterističen za aminske in hidroksilne skupine. Dva signala pri valovnem številu 1410 in 1580 cm^{-1} sta karakteristična za $-\text{COO}^-$ iz karboksilne skupine ($-\text{COOH}$), ki prav tako izvira iz CMCh. Viden pa je tudi signal pri valovnem številu 1050° , za katerega je značilno C-O raztezanje pri sekundarnih hidroksilnih skupinah ($-\text{OH}$). Pri spektru tiobutirolaktona je pomemben signal pri valovnem številu 1700 cm^{-1} , ki je karakterističen za ketonsko skupino (R1-C=O-R2). Ker pri sintezi tCMCh pride do odpiranja obroča tiobutirolaktona, ketonska skupina razpade. Pri obeh tCMCh tako signal za ketonsko skupino ni več prisoten, zato lahko potrdimo uspešno sintezo tCMCh. Pri tem vzorcu tudi nastane tiolna skupina ($-\text{SH}$). Signal, značilen za to skupino, pa na spektrih tCMCh (10:1 in 1:1) ni prisoten. Nahaja se v območju

valovnega števila $2400 - 2600 \text{ cm}^{-1}$, je zelo šibak in se ga pogosto spregleda. V tem primeru lahko sklepamo, da je koncentracija tiolnih skupin v vzorcih zelo nizka. Prisotnost tiolnih skupin smo zato podrobneje analizirali z metodo XPS.

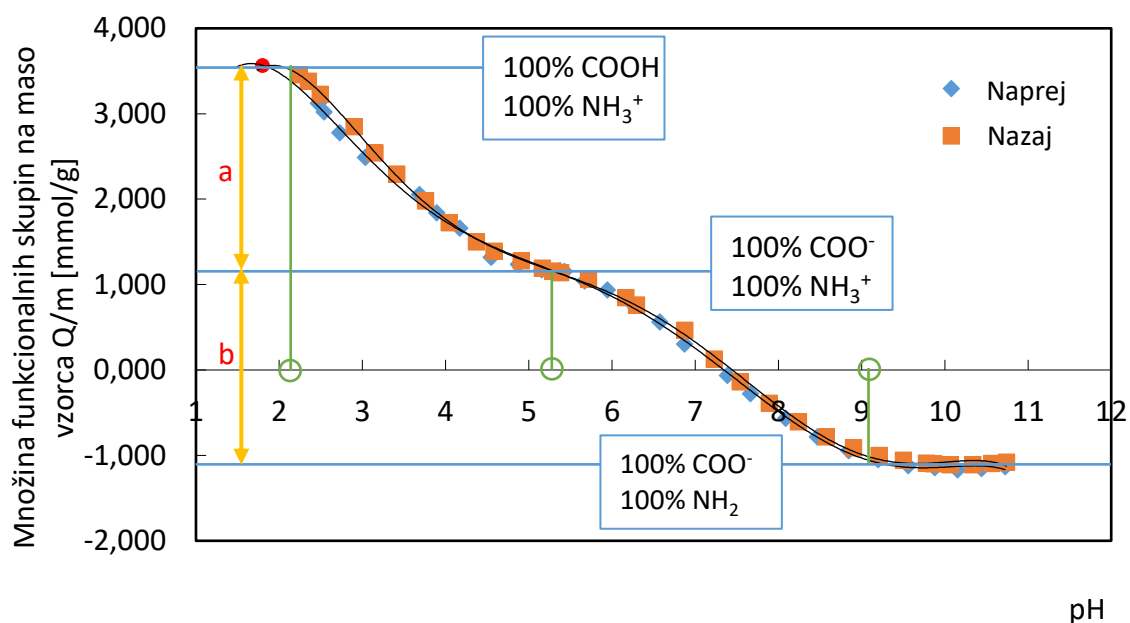
4.2.2 Določanje kemijske sestave površine z rentgensko fotoelektronsko spektroskopijo (XPS)

Preglednica 4.2: Sestava vzorcev sintetiziranega tCMCh (1:1 in 10:1) ter referenčnega CMCh (atomski %)

Vzorec	C	N	O	Si	Na	S	Cl
CMCh	60.1	4.7	31.5	0.7	2.9		
TCMCh 1:1	74.8	2.3	20.2	1.5	1.0	0.2	
TCMCh 10:1	70.9	2.9	23.2	1.9	0.9	0.3	

V **preglednici 4.2** je prikazana elementarna sestava vzorcev sintetiziranega tCMCh (1:1 in 10:1) ter referenčnega CMCh. S to metodo smo želeli ugotoviti uspešnost reakcije tiolacije CMCh glede na prisotnost žvepla v vzorcu, ki je posledica nastanka tiolnih skupin. Pri referenčnem CMCh je delež dušika nekoliko višji (4,7 at. %) kot pri obeh tCMCh (2,3 – 2,9 at.%), kjer pa je prisotno tudi žveplo, sicer v zelo malih količinah (0,2 – 0,3 at.%). To potrjuje nastanek tiolne (-SH) vezi v tCMCh. Delež žvepla je višji pri tCMCh (10:1), kar sovпада z večjo količino dodanega tiobutiolaktona. Prisotnost silicija in natrija v vseh treh referenčnih vzorcih pa predstavlja nečistoče.

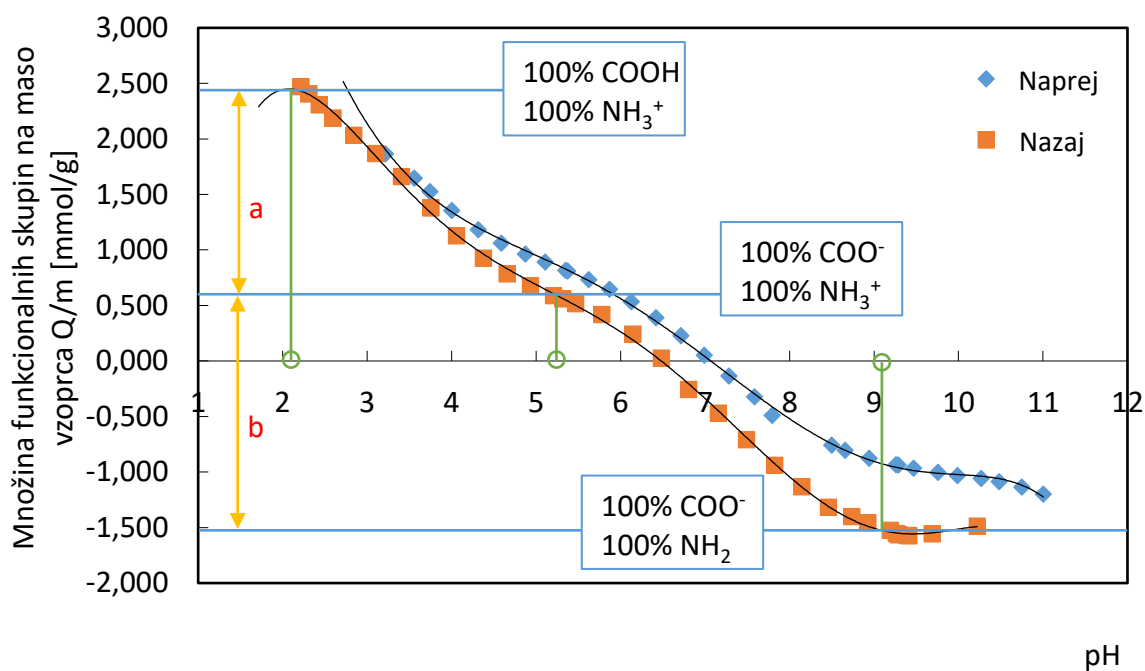
4.2.3 Karakterizacija funkcionalnih skupin z nevtralizacijsko titracijo



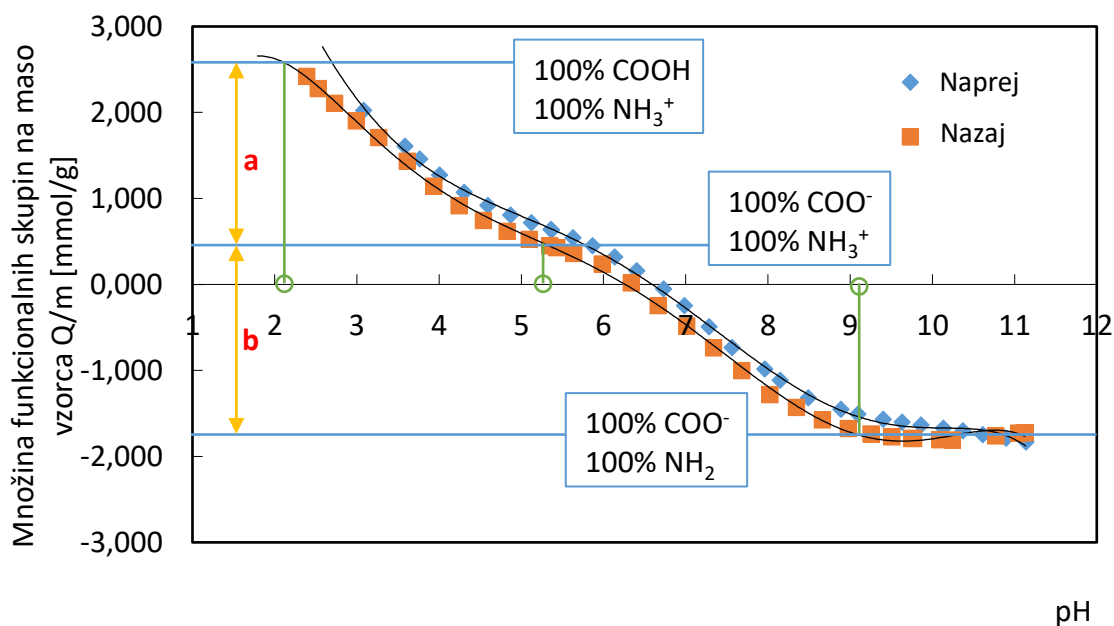
Slika 4.8: Titracijska krivulja – CMCh

Na **sliki 4.8** sta prikazani titracijski krivulji karboksimetil hitozana (CMCh), natančneje v smeri naprej (*ang. forth*; kislino \rightarrow bazično) in nazaj (*ang. back*; bazično \rightarrow kislino), ki opisujeta naboj vzorca v odvisnosti od pH. Kot je razvidno, se naboj vzorca znižuje z višanjem pH (z dodajanjem baze). Opaziti je, da se krivulji bolj ali manj prekrivata, vrednosti titracije v smeri naprej in nazaj so skladne. Na krivuljah so vidni trije platoji. Na prvem platoju, pri $\text{pH} \approx 2$, so v vzorcu vse funkcionalne skupine ($-\text{COOH}$ in NH_3) protonirane. Nato se z višanjem pH začne disociacija protonov karboksilnih skupin, vse do $\text{pH} \approx 5.3$. Na tej točki, drugi plato, so vse karboksilne skupine deprotonirane ($-\text{COO}^-$). Pri tem pH začnejo disociirati še protoniaminskih funkcionalnih skupin do $\text{pH} \approx 9$. Takrat so vse funkcionalne skupine deprotonirane ($-\text{COO}^-$ in NH_2). To je pomemben podatek za sintezo tiolkarboksimetil hitozana, saj so za kovalentno vezavo tiobutirolaktona vseaminske funkcionalne skupine v karboksimetil hitozanu morale biti deprotonirane, da je potekla reakcija aminolize.

Na podlagi titracijske krivulje pa smo lahko določili tudi množino funkcionalnih skupin na maso vzorca (Q/m). Območje na grafu, označeno z **a**, predstavlja množino karboksilnih funkcionalnih skupin, ta za CMCh znaša $1,99 \pm 0,57$ mmol/g. Območje, označeno z **b**, pa množino aaminskih funkcionalnih skupin v vzorcu, ki znaša $2,26 \pm 0,03$ mmol/g.



Slika 4.9: Titracijska krivulja – tCMCh (1:1)



Slika 4.10: Titracijska krivulja – tCMCh (10:1)

Potenciometrično titracijo smo izvedli tudi za produkta tCMCh (1:1) in tCMCh (10:1), katerih titracijske krivulje so prikazane na **sliki 4.9** in **sliki 4.10**. Pri obeh vzorcih so, tako kot pri CMCh, opazni trije platoji. V primerjavi s titracijsko krivuljo CMCh je pri produktih tCMCh vidno odstopanje vrednosti med krivuljama naprej (forth) in nazaj (back), še posebej pri tCMCh (1:1), kjer je odstopanje še posebej izstopajoče v območju pH 5 - 11. To je otežilo določevanje množine posameznih funkcionalnih skupin in s tem povečalo možnost pojava napake pri določanju. Za produkta smo določili naslednje vrednosti Q/m funkcionalnih skupin, navedene v preglednici 4.3 ter primerjali z vrednostmi Q/m aaminskih skupin CMCh.

Preglednica 4.3: Množina funkcionalnih skupin v produktih tCMCh ter razlika aaminskih skupin v primerjavi s CMCh

Q/m [mmol/g]	tCMCh (1:1)	tCMCh (10:1)
Karboksilne skupine	0,94 ± 1,33	1,80 ± 0,70
Aminske skupine	1,96 ± 0,23	2,11 ± 0,05
CMCh (NH₂) – tCMCh (NH₂)	0,30 ± 0,23	0,15 ± 0,01

Iz **preglednici 4.3** je razvidno, da se je množina končnih aaminskih skupin glede na CMCh v obeh produktih znižala. Iz tega bi lahko sklepali, da so se na te končne aminske skupine kovalentno vezale molekule tiobutiolaktone po reakciji, prikazani na **sliki 2.10**. Razlika v množini aaminskih funkcionalnih skupinah je torej množina vezanega tiobutiolaktone oz. množina prostih tiolnih (-SH) skupin. Ta je, glede na rezultate, 2-krat višja pri tCMCh (1:1) kot pri tCMCh (10:1), kar je neskladno z rezultati XPS analize. Ker pa je odstopanje rezultatov precejšnje, lahko smatramo, da metoda v tem primeru ni dovolj natančna in s tem neprimerna za kvantitativno določanje množine tiolnih skupin v vzorcu. Zato smo za natančnejše kvantitativno določevanje tiolnih skupin izvedli še test z Ellman-ovim reagentom.

4.2.4 Določanje prostih tiolnih skupin z Ellman-ovim testom

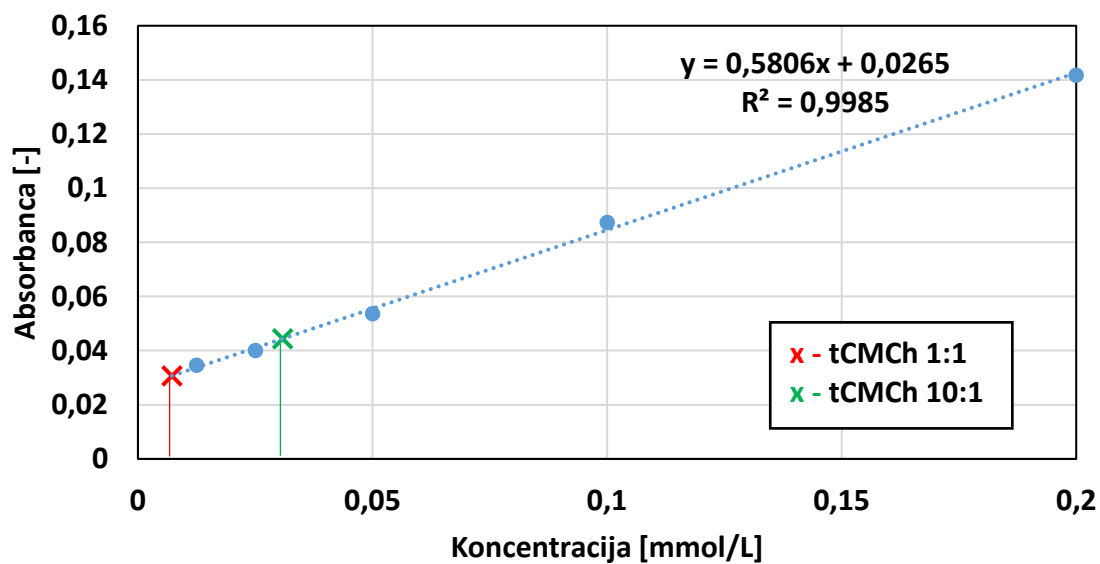
V naslednjih preglednicah so prikazani rezultati meritev absorbance z metodo UV-VIS spektrofotometrije. V **preglednici 4.4** so navedene absorbance standardne raztopine cisteina, ki smo jih uporabili za izris umeritvene krivulje. Ta je prikazana na **sliki 4.11**. S pomočjo enačbe krivulje smo lahko nato, na podlagi izmerjene absorbance, navedene v **preglednici 4.5**, izračunali koncentracije prostih tiolnih skupin v produktih tCMCh .

Preglednica 4.4: Absorbanca standardnih koncentracij

Koncentracija standarda [mmol/L]	Izmerjena absorbanca [-]
0,0125	0,0346
0,025	0,0400
0,05	0,0537
0,1	0,0874
0,2	0,1417

Preglednica 4.5: Absorbanca vzorcev neznanih koncentracij

Vzorec	Izmerjena absorbanca [-]
tCMCh 1:1	0,0307
tCMCh 10:1	0,0444



Slika 4.11: Umeritvena krivulja

Izračun koncentracije tiolnih skupin v vzorcu

Enačba umeritvene krivulje:

$$y = 0,5806 x + 0,0265 \quad (4.1)$$

Iz tega sledi

$$A = 0,5806 \cdot c + 0,0265 \quad (4.2)$$

$$c = \frac{A - 0,0265}{0,5806} \quad (4.3)$$

kjer je:

A – absorbanca [-] in

c – množinska koncentracija [mmol/L].

V enačbo 4.2 vstavimo vrednosti izmerjene absorbance za oba vzorca, da dobimo **koncentracijo prostih tiolnih skupin**:

Preglednica 4.6: Koncentracija prostih tiolnih skupin v vzorcih

Vzorec	c (SH) [mmol/L]
tCMC 1:1	0,0072
tCMC 10:1	0,0308

Tako lahko še izračunamo **množino prostih tiolnih skupin na maso vzorca**:

$$m \text{ (vzorca)} = 0,087 \text{ g}$$

$$V \text{ (raztopine)} = 100 \text{ mL}$$

$$Q/m = \frac{c (SH - tCMCh)}{\rho (tCMCh)} \quad (4.4)$$

kjer je:

Q/m – množina prostih tiolnih skupin na maso vzorca [mmol/g]

c (SH – tCMCh) – koncentracija prostih tiolnih skupin v vzorcih tCMCh [mmol/L] in

 ρ (tCMCh) – gostota raztopine tCMCh [g/L]

Preglednica 4.7: Množina prostih tiolnih skupin na maso vzorca

Vzorec	Q /m [$\mu\text{mol/g}$]
tCMC 1:1	8,3
tCMC 10:1	35,4

S to metodo smo prav tako uspeli dokazati prisotnost prostih tiolnih skupin v sintetiziranem tCMCh. Množina teh skupin, navedena v **preglednici 4.7**, je sicer zelo majhna, vendar sorazmerna z rezultati XPS analize. Kot pričakovano, je ta večja v vzorcu, kjer je bila dodana večja količina tiobutiolaktona. V primerjavi z množino aaminskih skupin v CMCh, je množina tiolnih skupin v vzorcu tCMCh (10:1) približno 85% manjša, za kar lahko sklepamo, da je tiolna skupina vezana na vsako 9. ali 10. enoto CMCh. V vzorcu tCMCh (1:1) pa je množina tiolnih skupin v primerjavi z aaminskimi približno 95% manjša, kar pomeni, da je tiolna skupina vezana na približno vsaki 20. enoti CMCh. Več kot je prostih tiolnih skupin v vzorcu, več je možnih veznih mest za kovalentno vezavo na polidopamin, ki je stabilnejša kot fizikalna vezava. Zato je v tem primeru vzorec tCMCh (10:1) ustrežnejša izbira za vezavo na polidopamin. Za doseg večjih koncentracij prostih tiolnih skupin bi bilo potrebno prilagoditi sintezni postopek tioliranja CMCh, morda z dodajanjem večje koncentracije tiobutiolaktona.

4.3 Karakterizacija vezave tiolkarboksimetil hitozana na polidopamin-modificirano silikonsko ploščico

V nadaljevanju bodo prikazani rezultati karakterizacije vezave tiolkarboksimetil hitozana na PDMS preko veznega biopolimera PDA za namen pridobivanja protimikrobnih oz. biofilm-inhibitornih lastnosti modificirane površine.

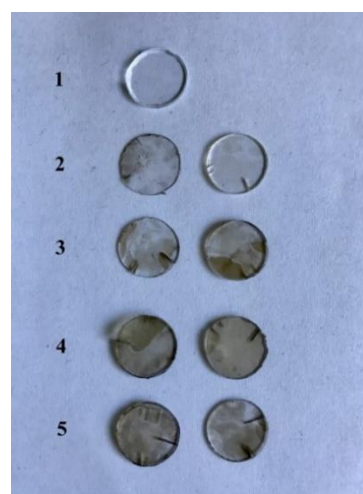
1 – PDMS

2 – PDMS | 1% PDA

3 – PDMS | 1% PDA | 1% CMCh

4 – PDMS | 1% PDA | 1% tCMCh (1:1)

5 – PDMS | 1% PDA | 1% tCMCh (10:1)



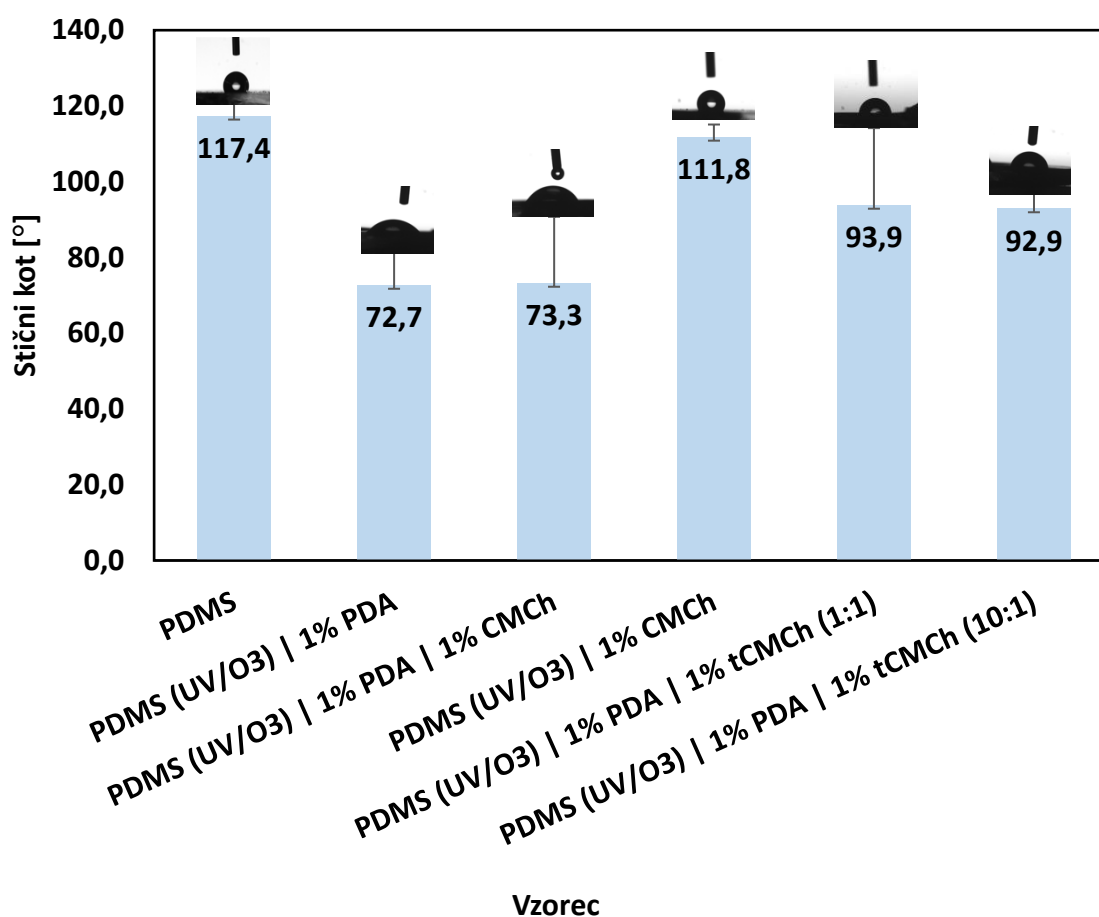
Slika 4.1: Izgled vzorcev

Na **sliki 4.12** so prikazani vzorci PDMS z različnimi nanosi. PDMS je popolnoma transparenten, dopamin pa se pri polimerizaciji na površini obarva temno rjavo. Barva je opazna na vseh vzorcih z nanosom, ni pa popolnoma enakomerna, pri tem pa odsotnost barve še ne pomeni odsotnosti polidopamina na površini. CMCh in tCMCh sta brezbarvni spojini, zato ju s prostim očesom ni mogoče zaznati.

4.3.1 Omočljivost in optična goniometrija

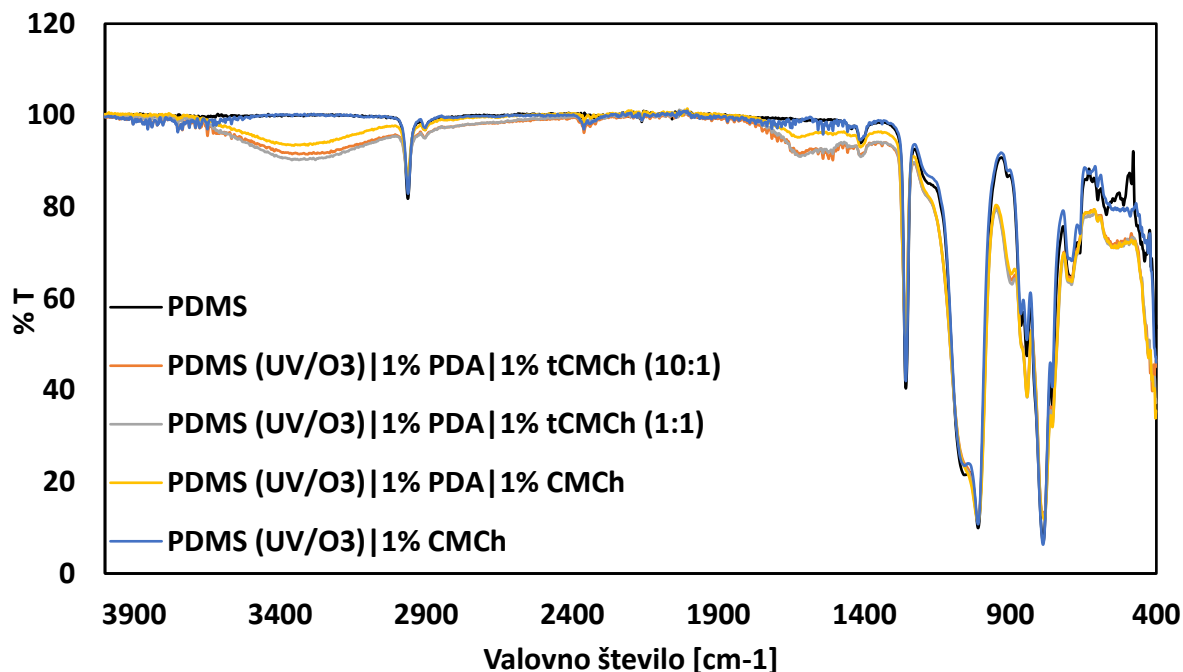
Na **sliki 4.13** so prikazane vrednosti stičnega kota vzorcev različnih nanosov. Najnižje vrednosti so bile dosežene pri vzorcih PDMS (UV/O₃) | 1 % PDA in PDMS (UV/O₃) | 1 % PDA | 1 % CMCh. Te so se gibale okoli vrednosti 73° in sta tako edina vzorca s hidrofilno površino. Nekoliko višje,

na meji hidrofilnost/hidrofobnost, so se gibale vrednosti stičnega kota vzorcev PDMS (UV/O₃) | 1 % PDA | 1 % tCMCh (1:1 in 10:1). Pri tem je bila vrednost stičnega kota vzorca PDMS (UV/O₃) | 1 % PDA | 1 % tCMCh (10:1) za stopinjo nižja (92,9°). Najvišjo vrednost stičnega kota je izmed vseh vzorcev z nanosom dosegel PDMS (UV/O₃) | 1 % CMCh. S tem smo utemeljili pomembnost nanosa PDA kot veznega polimera, saj se v primeru odsotnosti le-tega, CMCh, kljub aktivaciji PDMS z UV/O₃, ne more uspešno vezati na površino PDMS. Glede na manjši padec stičnega kota predvidevamo, da je količina nanosa zelo majhna, lahko pa temu vzrok nehomogenost nanosa in drugačna hrapavost površine. Napram PDMS se je stični kot pri PDMS (UV/O₃) | 1 % CMCh zmanjšal le za dobrih 5°.



Slika 4.13: Omočljivost vzorcev silikona pri nanosu različnih spojin

4.3.2 Določanje kemijske sestave z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo (FTIR)



Slika 4.14: Spektri PDMS z nanosi

Na **sliki 4.14** so prikazani FTIR spektri PDMS z različnimi nanosi ter PDMS kot referenca. Spet lahko opazimo širok signal v območju $3200 - 3400 \text{ cm}^{-1}$, značilen za aminske in hidroksilne skupine, ki je prisoten pri vseh nanosih, kjer je PDA kot vezni polimer. Pri tem pa ima najintenzivnejši signal vzorec PDMS|1 % PDA|1 % tCMCh (10:1). Prav tako ima, podobno kot vzorec z manjšo koncentracijo tiolaktona, najvišjo intenziteto signala pri valovnih številih $1500 - 1650 \text{ cm}^{-1}$, ki pripadajo aminskim skupinam (iz CMCh in PDA) ter aromatskemu obroču (iz PDA). Iz tega sledi, da je pri teh dveh vzorcih sloj nanosa najdebelejši. Pri teh dveh signalih je pri vzorcu PDMS|1 % PDA|1 % CMCh intenziteta nekoliko manjša, kar nakazuje na manjšo količino vezanega CMCh. CMCh je v tem primeru fizikalno vezan (na podlagi privlačnih sil) na PDA. Medtem pa pri vzorcu PDMS|PDA|tCMCh preko tiolne skupine pričakujemo kovalentno vezavo na PDA, ki pa je močnejša. Tudi iz tega vidika lahko sklepamo, da je kovalentna vezava

pripomogla k večji količini vezanega tCMC. Signal za tiolne skupine ($2400 - 2600 \text{ cm}^{-1}$) na spektrih ni prisoten.

Tudi s to metodo smo potrdili pomembnost PDA kot veznega polimera. Pri spektru PDMS|CMCh sta oba signala, značilna za aminske in hidroksilne skupine, odsotna, kar kaže na neuspešno vezavo CMCh na PDMS glede na to metodo.

4.3.3 Določanje kemijske sestave površine z rentgensko fotoelektronsko spektroskopijo (XPS)

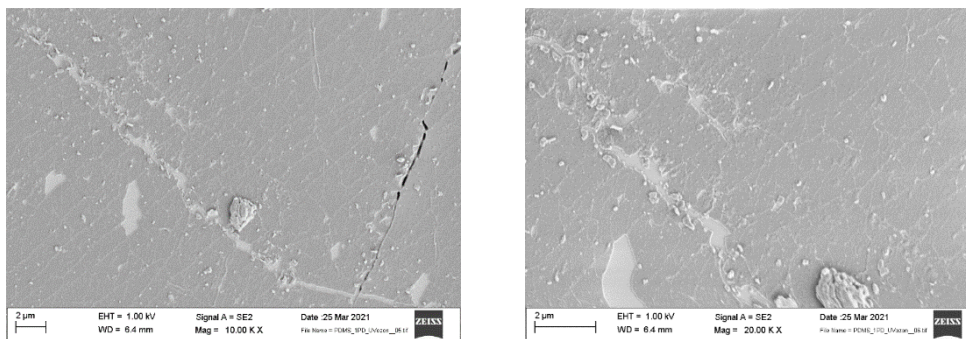
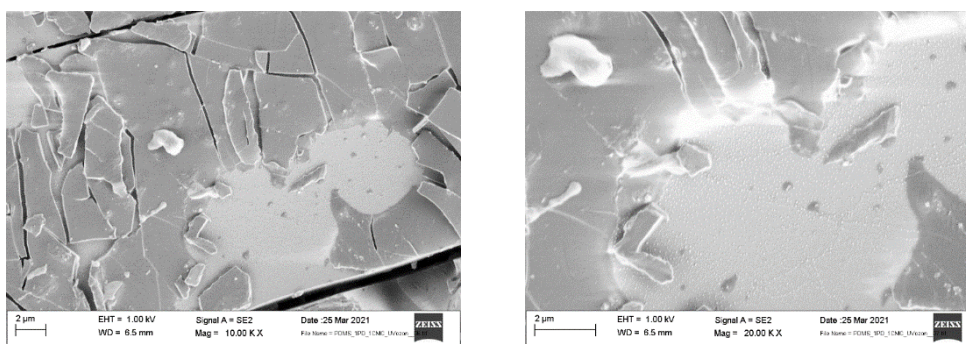
Preglednica 4.8: Pregledna tabela sestave vzorcev (atomski %)

Vzorec	C	N	O	Si	Na	S	Cl
PDMS referenca	45.0		30.5	24.5			
CMCh referenca	60.1	4.7	31.5	0.7	2.9		
TCMCh 1:1 referenca	74.8	2.3	20.2	1.5	1.0	0.2	
TCMCh 10:1 referenca	70.9	2.9	23.2	1.9	0.9	0.3	
PDMS (UV/O ₃) 1% CMCh	47.0	1.4	29.6	22.0			
PDMS (UV/O ₃) 1% PDA	50.8	1.5	29.1	18.5			
PDMS (UV/O ₃) 1% PDA 1% CMCh	38.4	0.5	37.3	22.5	1.2		
PDMS (UV/O ₃) 1% PDA 1% tCMCh 1:1	50.8	3.2	34.2	11.9			
PDMS (UV/O ₃) 1% PDA 1% tCMCh 10:1	51.0	2.9	32.5	13.6			

V preglednici 4.8 je prikazana elementarna sestava vzorcev. Glede na to, da je dušik prisoten pri vseh nanosih, je zato nemogoče trditi ali izhaja iz PDA ali iz CMCh.

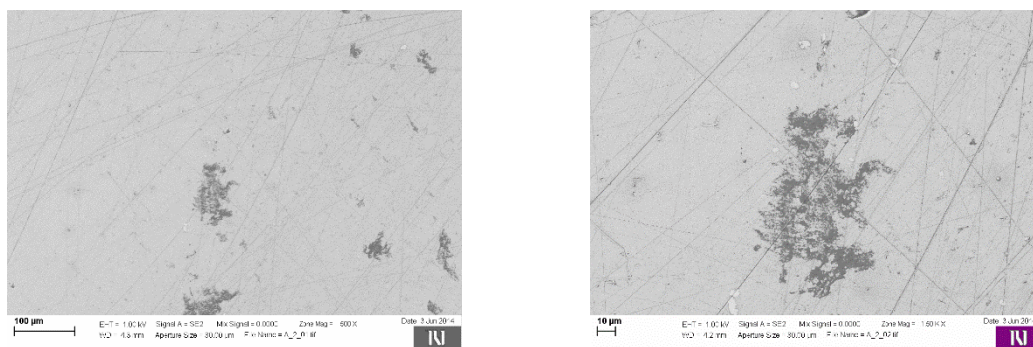
Pri vzorcu PDMS | CMCh je iz sestave razviden sloj nanosa, ki sledi iz prisotnosti N (1,4 at.%) ter povečanja deleža C (+2 at.%) in zmanjšanja Si (-2,5 at.%) glede na referenčni PDMS. Glede na vzorec PDMS|PDA je sloj pri PDMS|CMCh tanjši, saj je v vzorcu PDMS z nanosom PDA večji delež N (+0,1 at.%) in C (+3,8 at.%) , delež Si pa manjši (-3,5 at.%). Žveplo pri vzorcih PDMS|PDA|tCMCh (1:1 in 10:1) ni več opazno, kar pa še ne pomeni, da je v vzorcu odsoten. Njegov delež v referenčnih tCMCh je že tako bil minimalen, da v tem primeru zaradi visoke zastopanosti Si ne pride do izraza. V primerjavi z vzorcem PDMS|PDA|CMCh pa imata PDMS s končnim nanosom tCMCh precej večji delež N (+2,7 in +2,4 at.%) in tudi C (+12,4 in +12,6 at.%) . Veliko manjši je tudi delež Si (-10,6 in -8,9 at.%) iz PDMS, kar nakazuje na debelejši sloj nanosa. Iz tega lahko sklepamo, da je bila vezava tCMCh na PDA uspešnejša. Pri obeh vzorcih smo na PDMS vezali enake koncentracije CMCh in tCMCh, zato bi, glede na opažanja, pri spiranju z vodo prišlo do večje desorpcije materiala pri vzorcu s končnim nanosom CMCh. To posredno nakazuje na kovalentno vezavo tCMCh na PDA, ki je močnejša in stabilnejša, kot pa elektrostatska (fizikalna) vezava, ki jo predvidevamo pri PDA|CMCh.

4.3.4 Optična analiza površine z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM)

PDMS (UV/O₃) | 1% PDAPDMS (UV/O₃) | 1% PDA | 1% CMCh

Slika 4.15: SEM posnetki površine silikona z različnimi nanosi

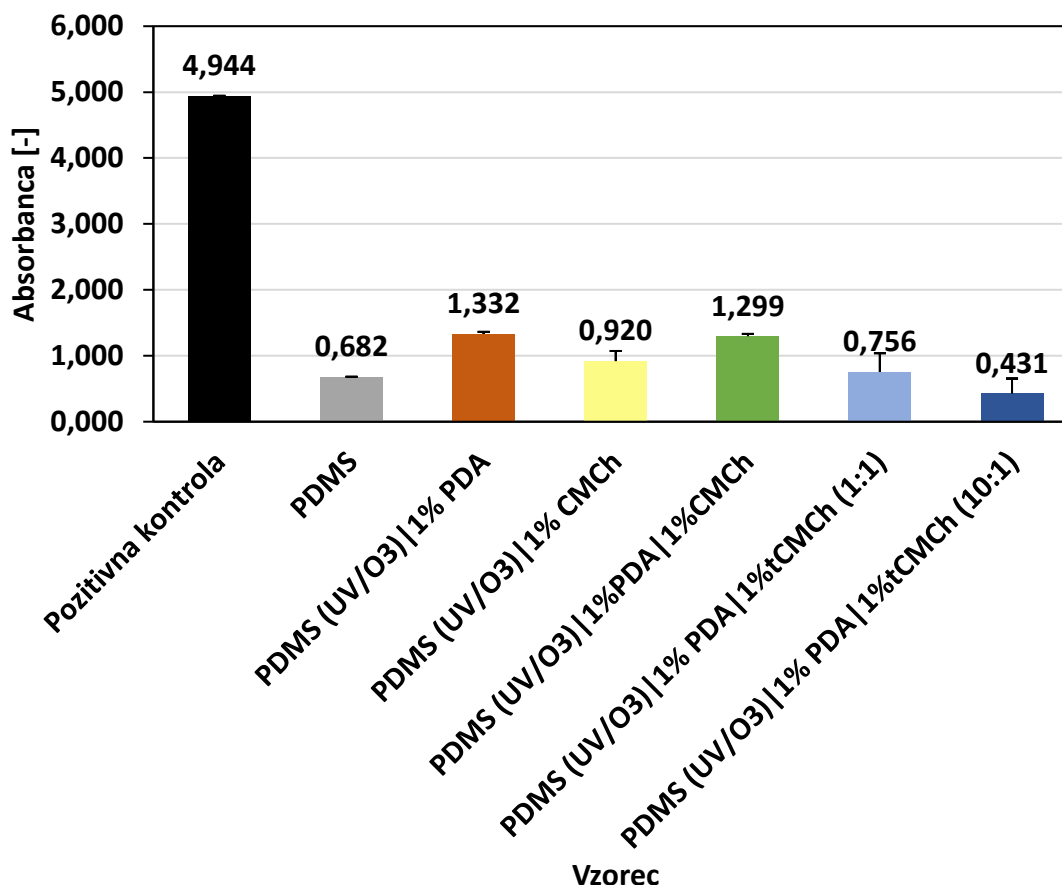
Na **sliki 4.15** so prikazani SEM posnetki površine vzorcev PDMS z nanosom PDA kot referenco (zgornji sliki) in PDMS z nanosom PDA in CMCh (spodnji sliki). Sloj CMCh (temnejša barva) na PDA je na posnetkih lepo viden, kar je presenetljivo glede na relativno nizko koncentracijo. Površina sloja je gladka in homogena, delci oz. skupki niso prisotni. Razpoke so tudi v tem primeru posledica namerne poškodbe materiala zaradi boljše refleksije, saj se v nasprotnem primeru nanos na posnetkih ni videl. Zato sklepamo, da razpok na površini pred poškodbo ni bilo. Svetlejša površina, vidna na posnetkih PDMS z nanosom PDA in CMCh, najverjetneje pripada PDA. To nakazujejo tudi majhni delci, ki so vidni tudi na posnetku nanosa PDA (zgornji sliki).

PDMS (UV/O₃) | 1% CMCh

Slika 4.16: SEM posnetki površine silikona z nanosom CMCh [72]

Površina PDMS, na katero smo adsorbirali 1% CMCh, je vidna na SEM posnetkih na **slika 4.16**. Svetla površina z risi predstavlja PDMS, temnejši »madeži« pa adsorbiran CMCh. Kot je razvidno, je na površino zelo redko in neenakomerno adsorbirana precej manjša količina v primerjavi s površino, kjer je kot vezni polimer uporabljen PDA. Takšna površina, zaradi odsotnosti CMCh, tako ne bi mogla izkazovati biofilm-inhibitornih oz. protimikrobnih lastnosti. S tem je pomembnost PDA, kot veznega polimera, še dodatno podkrepljena.

4.3.5 Mikrobiološki testi – tvorba bakterijskega biofilma na neobdelanem silikonu in silikonu obdelanem s PDA in karboksimetilhitozanom po različnih postopkih



Slika 4.17: Rezultati tvorbe bakterijskega biofilma na tretiranem materialu

Z mikrobiološkimi testi smo želeli preveriti biofilm-inhibitorno aktivnost posameznih nanosov. Najučinkoviteje je zaviral rast biofilma vzorec s končnim nanosom tCMCh (10:1), kjer je bila dosežena najnižja optična gostota. Kot smo ugotovili na predhodnih analizah, ta vzorec vsebuje največ dušika, ki izvira iz aaminskih skupin, le-te pa prispevajo k boljši protimikrobni aktivnosti. Vzorec PDMS (UV/O₃)|1% PDA|1% tCMCh (1:1) je bil manj uspešen pri zaviranju rasti biofilma kot neobdelan PDMS, predvidevamo da zaradi premajhne koncentracije tiolnih skupin v sintetiziranem tCMCh (1:1). Posledica tega pa je manj veznih mest za kovalentno vezavo, zaradi česar se je lahko pri spiranju desorbiralo več materiala kot pri vzorcu PDMS (UV/O₃)|1% PDA|1% tCMCh (10:1). Presenetljivo je, da se tudi na PDMS brez nanosa ni tvorilo veliko biofilma. Pričakovali smo večjo rast na tem materialu. PDMS z nanosom PDA je najmanj

zaviral rast bakterij, podobno se je pokazalo tudi pri vzorcu PDMS (UV/O₃)|1% PDA|1% CMCh, kjer bi pričakovali podoben izid kot pri PDMS|CMCh. Rezultat tega je sorazmeren z ugotovitvami XPS analize, iz katerih smo sklepali na zelo tanko plast CMCh na PDA. Zato bi lahko v tem primeru prevladoval vpliv PDA, ki pa nima protimikrobnih lastnosti.

Čeprav je na vseh vzorcih prisoten biofilm, pa pri tej metodi ne moremo vedeti ali so bakterije žive ali mrtve. Zato je tudi nemogoče trditi, da premazi niso imeli protimikrobnega učinka in niso uničili bakterijskega biofilma. Za natančnejše informacije o protimikrobnih učinkih bi bilo potrebno analizirati tvorbo biofilma z metodo štetja živih/mrtvih celic.

4.4 Povezovanje ugotovitev rezultatov karakterizacije

Biopolimer polidopamin smo na PDMS adsorbirali kot vezni polimer za boljšo adsorpcijo tioliranega karboksimetil hitozana. Za lažjo adhezijo polidopamina na PDMS smo preizkusili različne tehnike odpiranja strukture, pri tem pa se je kot najbolj optimalna izkazala aktivacija z UV-O₃, ki je trajala 45 min. Z meritvami stičnega kota smo pokazali, da je po tem postopku površina PDMS postala najbolj hidrofilna, kar je omogočilo boljšo vezavo polidopamina. To smo potrdili tudi z metodo FTIR spektroskopije.

Preizkusili smo tudi različne koncentracije raztopin polidopamina (1, 5 in 10 % w/w). Ugotovili smo, da je površina z nanosom 1 % PDA dosegla najnižji stični kot in bila tako najbolj hidrofilna, kar je ugodno vplivalo na vezavo tioliranega karboksimetil hitozana. Pri metodi FTIR spektroskopije se je pokazalo, da je pri takšni koncentraciji količina nanosa največja. Nasprotno se je izkazalo pri rezultatih XPS analize, kjer je bila količina nanosa večja pri nanešeni 5 % raztopini PDA. Kljub relativno majhni koncentraciji polidopamina, adsorbiranega na PDMS, je sloj polimera na površini zelo lepo viden, kar smo pokazali z metodo SEM.

Karakterizacijo silikonskih diskov z nanosom na polidopamin vezanega tiolkarboksimetil hitozana smo izvedli z uporabo različnih metod, žal pa z nobeno nismo mogli neposredno potrditi kovalentne vezave karboksimetil hitozana preko tiolnih skupin, zaradi premajhne

koncentracije le-teh v sintetiziranem tiolkarboksimetil hitozanu, kar pa smo potrdili z Ellman-ovim testom in XPS analizo. Obstoj kovalentne vezave smo lahko potrdili le posredno glede na povečano količino prisotnega dušika v vzorcu, ki izhaja iz prostih aaminskih skupin, kar smo lahko videli pri rezultatih XPS analize. Tudi glede na mikrobiološke preiskave tvorbe bakterijskega biofilma smo lahko na podlagi boljšega zaviranja rasti biofilma v primerjavi z referenčnim karboksimetil hitozanom, kjer smo predpostavljali fizikalno vezavo na PDA, sklepali na kovalentno vezavo preko tiolnih skupin.

Adsorpcija CMCh na PDMS se je izkazala za neobstojno in neučinkovito, kar smo uspeli dokazati z vsemi analitičnimi metodami in tako dodatno poudarili bistvenost uporabe polidopamina kot veznega polimera, ki učinkovito pripomore k vezavi na substrat.

Metodi FTIR spektroskopija in potenciometrična titracija sta se izkazali kot neustrezni za karakterizacijo sintetiziranega tiolkarboksimetil hitozana, saj za tako nizko koncentracijo tiolnih skupin v vzorcu nista bili dovolj občutljivi metodi. Prisotnost tiolnih skupin smo uspeli dokazati z Ellman-ovim testom in XPS analizo. Najbolj ustrezna metoda za ugotavljanje prisotnosti kovalentne vezave tCMCh bi bila analiza z nuklearno magnetno resonanco (NMR), s katero lahko z veliko natančnostjo določamo različne tipe vezi v analiziranem vzorcu. Te metode zaradi dolgotrajne analize in stiske s časom žal nismo mogli izvesti.

S testom tvorbe bakterijskega biofilma na vzorcih smo sicer uspeli potrditi biofilm-inhibitorne lastnosti vzorca silikona z nanosom tCMCh (10:1), vendar smo pričakovali večji učinek. To je bila verjetno posledica prenizke koncentracije tiolnih skupin. Test tvorbe bakterijskega biofilma pa ni podal informacij o protimikrobnih lastnostih, katere pričakujemo, da ta premaz izkazuje.

5 SKLEP

V tem delu smo z metodo 2-stopenjskega premazovanja in z uporabo dveh biopolimerov poizkušali funkcionalizirati površino tako, da bi imela protimikrobne lastnosti in/ali zavirala rast biofilma. Izmed načinov funkcionalizacije se je izkazal za najuspešnejšega za doseg ciljev postopek, kjer smo silikon (PDMS) predhodno obdelali s 45 minutno aktivacijo z UV-O₃, na katerega smo adsorbirali 1% w/w raztopino polidopamina (PDA). Na tega smo v drugi stopnji kemijsko vezali sintetiziran karboksimetil hitozan s tiolnimi skupinami (tCMCh) in sicer CMCh, ki smo mu dodali več tiobutirolaktona – tCMCh (10:1) in je posledično vseboval večjo koncentracijo tiolnih skupin, s tem pa več veznih mest za vezavo na PDA. Glede na to, da je bilo v tem vzorcu prisotnih več tiolnih skupin, bi bilo potrebno za učinkovitejšo vezavo prilagoditi sintezni postopek tioliranja CMCh, na primer poizkusiti z dodatkom večje količine tiobutirolaktona in preizkusiti različne reakcijske pogoje.

Uporaba polidopamina je bila pri tem postopku funkcionalizacije ključnega pomena za uspešno vezavo tCMCh na PDMS. Zaradi sposobnosti samo-polimerizacije je postopek adsorpcije polidopamina na površino preprost, zaradi naravnega izvora in biokompatibilnosti pa ima veliko prednost drugimi kemijskimi substancami, ki se uporabljajo kot vezni elementi, ti pa so po navadi zelo toksični in okolju neprijazni. Prav tako je izbira karboksimetil hitozana kot funkcionalnega polimera primerna za uporabo na površinah medicinskih pripomočkov zaradi netoksičnosti in biokompatibilnosti.

Za ugotavljanje protimikrobnih lastnosti tega premaza bi bilo potrebno izbrati drugačno metodo, saj smo z metodo tvorbe bakterijskega biofilma na površini dobili le informacije o sposobnosti zaviranja rasti bakterijskega biofilma, nismo pa izvedeli ali so bakterije, ki so nastale na površini, tudi ostale žive. Prav tako bi bilo potrebno preučiti še vpliv pH vrednosti na biofilm-inhibitorne in protimikrobne lastnosti. Velikokrat se, zaradi naboja premaza, lastnosti medsebojno izključujeta.

Takšna funkcionalizacija silikona traja razmeroma dolgo časa, od priprave PDMS do sušenja po nanosu sloja tCMCh zajema skupaj 6 dni. Smiselno bi bilo preizkusiti učinkovitost krajših časov namakanja PDA in tCMCh, s čimer bi lahko celokupno skrajšali trajanje celotnega postopka. Kombinacija premazov (PDMS (UV/O3)|1% PDA|1% tCMCh (10:1)), ki je bila predstavljena v nalogi, je sicer izkazovala boljše biofilm-inhibitorne lastnosti kot neobdelan PDMS, vendar pričakujemo, da bi ob spremembi reakcijskih pogojev pri sintezi in prilagoditvi postopkov, lahko dosegla boljše rezultate. Biopolimera PDA in CMCh sta biorazgradljiva in netoksična in sta zato primerna za uporabo na medicinskih pripomočkih. Tiobutiolakton je sam po sebi toksičen, vendar pa to nujno ne drži za sintetiziran tCMCh. Zato bi bilo potrebno opraviti še test citotoksičnosti, da bi lahko vedeli ali je tovrsten premaz primeren za uporabo na medicinskih pripomočkih.

6 SEZNAM UPORABLJENIH VIROV

- [1] J. Hu, J. Zhou, S. Zhou, P. Wu, Y. F. Tsang, "Occurrence and fate of antibiotics in a wastewater treatment plant and their biological effects on receiving waters in Guizhou," *Process Saf. Environ. Prot.*, let. 113, str. 483–490, 2018.
- [2] World Health Organization, "WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care," *WHO Guidel. Hand Hyg. Heal. Care First Glob. Patient Saf. Chall. Clean Care Is Safer Care*, str. 292, 2009.
- [3] J. S. VanEpps, J. G. Younger, "Implantable Device Related Infection," *Shock*, let. 46, št. 6, str. 597, 2016.
- [4] "Antimicrobial resistance." Dosegljivo: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> [Datum dostopa: 23.7.2021].
- [5] T. Saga, K. Yamaguchi, "History of antimicrobial agents and resistant bacteria," *Japan Medical Association Journal*, let. 52, št. 2, str. 103–108, 2009.
- [6] S. Veerachamy, T. Yarlagadda, G. Manivasagam, P. K. Yarlagadda, "Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review," *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.*, let. 228, št. 10, str. 1083–1099, oktober 2014.
- [7] P. Grenni, V. Ancona, A. Barra Caracciolo, "Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review," *Microchem. J.*, let. 136, str. 25–39, 2018.
- [8] "Antibiotic resistance." Dosegljivo: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> [Datum dostopa: 23.7.2021].
- [9] "What is AMR - Teagasc | Agriculture and Food Development Authority." Dosegljivo: <https://www.teagasc.ie/animals/amr/what-is-amr/> [Datum dostopa: 24.7.2021].
- [10] S. A. Kraemer, A. Ramachandran, G. G. Perron, "Antibiotic pollution in the environment: From microbial ecology to public policy," *Microorganisms*, let. 7, št. 6, str. 1–24, 2019.
- [11] M. Kumar *et al.*, "Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance," *Environ. Int.*, let. 124, št. Januar, str. 448–461, 2019.
- [12] D. Davies, "Understanding biofilm resistance to antibacterial agents," *Nat. Rev. Drug Discov.*, let. 2, št. 2, str. 114–122, 2003.

-
- [13] D. Mack, H. Rohde, L. G. Harris, A. P. Davies, M. A. Horstkotte, J. K.-M. Knobloch, "Biofilm Formation in Medical Device-Related Infection," *The International journal of artificial organs*, let. 29, št. 4, str. 343–359, januar 2018.
- [14] N. Vaid, S. Vaid, M. Manikoth, "Case report - Biofilm infection of a cochlear implant," *Cochlear Implants Int.*, let. 14, št. 2, str. 117–120, 2013.
- [15] Z. K. Zander, M. L. Becker, "Antimicrobial and Antifouling Strategies for Polymeric Medical Devices," *ACS Macro Lett.*, let. 7, št. 1, str. 16–25, 2018.
- [16] C. Desrousseaux, V. Sautou, S. Descamps, O. Traoré, "Modification of the surfaces of medical devices to prevent microbial adhesion and biofilm formation," *J. Hosp. Infect.*, let. 85, št. 2, str. 87–93, 2013.
- [17] I. Francolini, G. Donelli, F. Crisante, V. Taresco, A. Piozzi, "Antimicrobial polymers for antibiofilm medical devices: State-of-Art and perspectives," *Adv. Exp. Med. Biol.*, let. 831, str. 93–117, 2015.
- [18] N. Erathodiyil, H. M. Chan, H. Wu, J. Y. Ying, "Zwitterionic polymers and hydrogels for antibiofouling applications in implantable devices," *Mater. Today*, let. 38, št. September, str. 84–98, 2020.
- [19] F. Kara, E. A. Aksoy, S. Calamak, N. Hasirci, S. Aksoy, "Immobilization of heparin on chitosan-grafted polyurethane films to enhance anti-adhesive and antibacterial properties," *J. Bioact. Compat. Polym.*, let. 31, št. 1, str. 72–90, september 2016.
- [20] I. Francolini, C. Vuotto, A. Piozzi, G. Donelli, "Antifouling and antimicrobial biomaterials: an overview," *Apmis*, let. 125, št. 4, str. 392–417, 2017.
- [21] M. Ramasamy, J. Lee, "Recent nanotechnology approaches for prevention and treatment of biofilm-associated infections on medical devices," *Biomed Res. Int.*, let. 2016, 2016.
- [22] V. B. Damodaran, N. S. Murthy, "Bio-inspired strategies for designing antifouling biomaterials," *Biomater. Res. 2016 201*, let. 20, št. 1, str. 1–11, junij 2016.
- [23] C. Yang *et al.*, "Brush-like polycarbonates containing dopamine, cations, and PEG providing a broad-spectrum, antibacterial, and antifouling surface via one-step coating," *Adv. Mater.*, let. 26, št. 43, str. 7346–7351, november. 2014.
-

-
- [24] S. D. Puckett, E. Taylor, T. Raimondo, T. J. Webster, "The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment," *Biomaterials*, let. 31, št. 4, str. 706–713, februar 2010.
- [25] K. K. Chung, J. F. Schumacher, E. M. Sampson, R. A. Burne, P. J. Antonelli, A. B. Brennan, "Impact of engineered surface microtopography on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*," *Biointerphases*, let. 2, št. 2, str. 89–94, junij 2007.
- [26] J. A. Del Olmo, L. Ruiz-Rubio, L. Pérez-Alvarez, V. Sáez-Martínez, J. L. Vilas-Vilela, "Antibacterial coatings for improving the performance of biomaterials," *Coatings*, let. 10, št. 2, februar 2020.
- [27] R. Greenhalgh, N. C. Dempsey-Hibbert, K. A. Whitehead, "Antimicrobial strategies to reduce polymer biomaterial infections and their economic implications and considerations," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, let. 136, št. Julij 2018, str. 1–14, 2019.
- [28] A. Victor, J. Ribeiro, F. F. Araújo, "Study of PDMS characterization and its applications in biomedicine: A review," *J. Mech. Eng. Biomech.*, let. 4, št. 1, str. 1–9, 2019.
- [29] J. Curtis, A. Colas, *Medical Applications of Silicones*, Tretja izdaja, št. 2002. Elsevier, 2013.
- [30] S. V. Gohil, S. Suhail, J. Rose, T. Vella, L. S. Nair, "Polymers and Composites for Orthopedic Applications," *Materials for Bone Disorders*, str. 349–403, 2017.
- [31] J. D. Guevara, M. L. Jones, P. Müllner, E. Jankowski, "Development of a Molecular Model for Understanding the Polymer-metal Interface in Solid State Pumps," *J. Comput. Sci. Educ.*, let. 11, št. 2, str. 12–22, april 2020.
- [32] L. D. Renner, D. B. Weibel, "Physicochemical regulation of biofilm formation," *MRS Bull.*, let. 36, št. 5, str. 347–355, maj 2011.
- [33] Y. H. Ding, M. Floren, W. Tan, "Mussel-inspired polydopamine for bio-surface functionalization," *Biosurface and Biotribology*, let. 2, št. 4, str. 121–136, 2016.
- [34] J. Jiang, L. Zhu, L. Zhu, B. Zhu, Y. Xu, "Surface characteristics of a self-polymerized dopamine coating deposited on hydrophobic polymer films," *Langmuir*, let. 27, št. 23, str. 14180–14187, 2011.
- [35] S. C. Goh *et al.*, "Polydopamine–polyethylene glycol–albumin antifouling coatings on
-

- multiple substrates," *J. Mater. Chem. B*, let. 6, št. 6, str. 940–949, februar 2018.
- [36] Y. J. Chuah, Y. T. Koh, K. Lim, N. V. Menon, Y. Wu, Y. Kang, "Simple surface engineering of polydimethylsiloxane with polydopamine for stabilized mesenchymal stem cell adhesion and multipotency," *Sci. Rep.*, let. 5, št. November, str. 1–12, 2015.
- [37] L. Q. Xu, W. J. Yang, K.-G. Neoh, E.-T. Kang, G. D. Fu, "Dopamine-Induced Reduction and Functionalization of Graphene Oxide Nanosheets," *Macromolecules*, let. 43, št. 20, str. 8336–8339, oktober 2010.
- [38] A. Tyo, S. Welch, M. Hennenfent, P. Kord Fooroshani, B. P. Lee, R. Rajachar, "Development and Characterization of an Antimicrobial Polydopamine Coating for Conservation of Humpback Whales," *Front. Chem.*, let. 0, str. 618, september 2019.
- [39] V. K. Mourya, N. N. Inamdar, A. Tiwari, "Carboxymethyl chitosan and its applications," *Adv. Mater. Lett.*, let. 1, št. 1, str. 11–33, 2010.
- [40] P. S. Bakshi, D. Selvakumar, K. Kadirvelu, N. S. Kumar, "Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications," *Int. J. Biol. Macromol.*, let. 150, str. 1072–1083, 2020.
- [41] A. Bernkop-Schnürch, M. Hornof, D. Guggi, "Thiolated chitosans," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, let. 57, št. 1, str. 9–17, 2004.
- [42] "Thiolated Chitosan: Preparation, Properties, and Applications," *Chitin and Chitosan Derivatives*, str. 137–166, 2013.
- [43] L. Russo *et al.*, "Gelatin hydrogels via thiol-ene chemistry," *Monatshefte für Chemie*, let. 147, št. 3, str. 587–592, 2016.
- [44] J. Song, B. Winkeljann, O. Lieleg, "Biopolymer-Based Coatings: Promising Strategies to Improve the Biocompatibility and Functionality of Materials Used in Biomedical Engineering," *Adv. Mater. Interfaces*, let. 7, št. 17, str. 2000850, september 2020.
- [45] R. Rebelo, M. Fernandes, R. Figueiro, "Biopolymers in Medical Implants: A Brief Review," *Procedia Eng.*, let. 200, str. 236–243, januar 2017.
- [46] S. Pakseresht *et al.*, "Silver/Chitosan Antimicrobial Nanocomposites Coating for Medical Devices: Comparison of Nanofiller Effect Prepared via Chemical Reduction and Biosynthesis," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, let. 19, št. 5, str. 2938–2942, december 2018.

-
- [47] K. Bazaka, M. V. Jacob, R. J. Crawford, E. P. Ivanova, "Plasma-assisted surface modification of organic biopolymers to prevent bacterial attachment," *Acta Biomater.*, let. 7, št. 5, str. 2015–2028, maj 2011.
- [48] A. F. de Faria, F. Perreault, E. Shaulsky, L. H. A. Chavez, M. Elimelech, "Antimicrobial Electrospun Biopolymer Nanofiber Mats Functionalized with Graphene Oxide–Silver Nanocomposites," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, let. 7, št. 23, str. 12751–12759, junij 2015.
- [49] Y. Tan, M. Leonhard, D. Moser, S. Ma, B. Schneider-Stickler, "Inhibition of mixed fungal and bacterial biofilms on silicone by carboxymethyl chitosan," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, let. 148, str. 193–199, december 2016.
- [50] Y. Tan, M. Leonhard, D. Moser, S. Ma, B. Schneider-Stickler, "Long-term antibiofilm activity of carboxymethyl chitosan on mixed biofilm on silicone," *Laryngoscope*, let. 126, št. 12, str. E404–E408, december 2016.
- [51] M. Bračič, T. Mohan, T. Griesser, K. Stana-Kleinschek, S. Strnad, L. Fras-Zemljič, "One-Step Noncovalent Surface Functionalization of PDMS with Chitosan-Based Bioparticles and Their Protein-Repellent Properties," *Adv. Mater. Interfaces*, let. 4, št. 21, str. 1700416, november 2017.
- [52] D. R. Jun, S. K. Moon, S. W. Choi, "Uniform polydimethylsiloxane beads coated with polydopamine and their potential biomedical applications," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, let. 121, str. 395–399, september 2014.
- [53] P. Xue *et al.*, "Surface Modification of Poly(dimethylsiloxane) with Polydopamine and Hyaluronic Acid To Enhance Hemocompatibility for Potential Applications in Medical Implants or Devices," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, let. 9, št. 39, str. 33632–33644, oktober 2017.
- [54] Q. Li, L. Sun, L. Zhang, Z. Xu, Y. Kang, P. Xue, "Polydopamine-collagen complex to enhance the biocompatibility of polydimethylsiloxane substrates for sustaining long-term culture of L929 fibroblasts and tendon stem cells," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, let. 106, št. 2, str. 408–418, februar 2018.
- [55] K. Lim, R. R. Y. Chua, B. Ho, P. A. Tambyah, K. Hadinoto, S. S. J. Leong, "Development of a catheter functionalized by a polydopamine peptide coating with antimicrobial and
-

- antibiofilm properties," *Acta Biomater.*, let. 15, str. 127–138, marec 2015.
- [56] P. J. R. J., H. J., S. A., "Injectable Shape-Holding Collagen Hydrogel for Cell Encapsulation and Delivery Cross-linked Using Thiol-Michael Addition Click Reaction," *Biomacromolecules*, let. 20, št. 9, str. 3475–3484, september 2019.
- [57] C. Vasile, D. Pamfil, E. Stoleru, M. Baican, "New Developments in Medical Applications of Hybrid Hydrogels Containing Natural Polymers," *Molecules*, let. 25, št. 7, 2020.
- [58] P. Espeel, F. E. Du Prez, "One-pot multi-step reactions based on thiolactone chemistry: A powerful synthetic tool in polymer science," *Eur. Polym. J.*, let. 62, str. 247–272, januar 2015.
- [59] Y. Yuan, T. R. Lee, "Contact angle and wetting properties," *Springer Ser. Surf. Sci.*, let. 51, št. 1, str. 3–34, 2013.
- [60] "Contact Angle Goniometry - Tensiometry - Nanoscience Instruments." Dosegljivo: <https://www.nanoscience.com/techniques/tensiometry/> [Datum dostopa: 6.8.2021].
- [61] B. C. Smith, *Fundamentals of fourier transform infrared spectroscopy*, Druga izdaja, 2011.
- [62] K. Kavkler, A. Demšar, "Uporaba FTIR in ramanske spektroskopije pri kvalitativni analizi strukturnih sprememb celuloznih vlaken," *Tekstilec*, let. 55, št. 1, str. 19–44, 2012.
- [63] J. C. Lindon, G. E. Tranter, D. W. Koppenaal, "Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry," let. 1, str. 1048–1057, 2000.
- [64] J. Kovač, A. Zalar, "Zmogljivosti Rentgenskega Fotoelektronskega Spektrometra (XPS) Na Institutu 'Jožef Stefan,'" *Vakuumist*, let. 3, str. 19–24, 2005.
- [65] M. Henini, "Scanning electron microscopy: An introduction," *III-Vs Rev.*, let. 13, št. 4, str. 40–44, 2000.
- [66] "Scanning Electron Microscopy - Nanoscience Instruments." Dosegljivo: <https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electron-microscopy/> [Datum dostopa: 17.8.2021].
- [67] A. Hulanicki, M. Maj-Żurawska, S. Glab, "Titrimetry | potentiometry," *Encycl. Anal. Sci.*, št. Marec, str. 121–128, 2019.

-
- [68] "Procedure for Quantitating Sulfhydryl Groups Using a Cysteine Standard," Dosegljivo: www.thermoscientific.com/pierce [Datum dostopa: 29.7.2021].
- [69] "Ellman's assay for Quantification of Sulfhydryl Groups | BMG LABTECH." Dosegljivo: <https://www.bmglabtech.com/ellmans-assay-for-in-solution-quantification-of-sulfhydryl-groups/> [Datum dostopa: 29.7.2021].
- [70] "Gram Positive vs Gram Negative | Technology Networks." Dosegljivo: <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/gram-positive-vs-gram-negative-323007> [Datum dostopa: 29.7.2021].
- [71] J. Lee, J. Kim, H. Kim, Y. M. Bae, K. H. Lee, H. J. Cho, "Effect of thermal treatment on the chemical resistance of polydimethylsiloxane for microfluidic devices," *J. Micromechanics Microengineering*, let. 23, št. 3, marec 2013.
- [72] M. Bračič, "Surface modification of silicone with polysaccharides for the development of antimicrobial urethral catheters surface modification of silicone with polysaccharides for the development of antimicrobial urethral catheters," Doktorska disertacija, Maribor: Univerza v Mariboru, 2016.