



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI  
Fakulta textilní



# **Karboxymethylcelulóza v textilních aplikacích**

Karolína Voleská

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

|                                 |                                               |
|---------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>Název disertační práce:</b>  | Karboxymethylcelulóza v textilních aplikacích |
| <b>Autor:</b>                   | Ing. Karolína Voleská                         |
| <b>Obor doktorského studia:</b> | Textilní technika x Materiálové inženýrství   |
| <b>Forma studia:</b>            | Prezenční                                     |
| <b>Školící pracoviště:</b>      | Katedra materiálového inženýrství             |
| <b>Školitel:</b>                | prof. Ing. Jakub Wiener, Ph.D.                |
| <b>Školitel specialista:</b>    | -                                             |

#### **Složení komise pro obhajobu disertační práce**

**Předseda:**

**Místopředseda:**

**Členové:**

S disertační prací je možno seznámit se na děkanátu Fakulty textilní Technické univerzity v Liberci.

Liberec 2019

## **Anotace**

Disertační práce se zabývá zmapováním vlastností karboxymethylcelulózy s cílem navrhnout úpravu karboxymethylcelulózy pro její následnou aplikaci v medicínském odvětví přesněji při hojení ran.

Část disertační práce se věnuje výběru vhodných metod síťování karboxymethylcelulózy za účelem vyvinutí hydrogelu s optimálními vlastnostmi. V práci je prezentována celá řada různých chemických síťovacích činidel, různé fyzikální metody síťování, ale například i využití radiace. Kromě vývoje hydrogelu, který by zajišťoval optimální podmínky hojení v ráně, se práce zabývá i aditivací karboxymethylcelulózy ať už antimikrobiálním stříbrem či vitamínem C a alaptidem, který stimuluje růst granulační tkáně a urychluje epitalizační proces a průběh hojení ran.

Nedílnou součástí hojení ran je i proliferace buněk. Za účelem zvýšit proliferaci buněk byl v rámci práce navrhnut a otestován postup výroby vysoce porézní struktury, která by novotvoření a dělení buněk podporovala. Vzorky krytí ať už v textilní formě či v podobě filmů byly testovány s ohledem na jejich antibakteriální vlastnosti, testována byla rovněž adheze a proliferace buněk či toxicita testovaných materiálů.

V poslední části práce je prezentována kratší studie o využití karboxymethylcelulózy i mimo medicínské aplikace. Využity byly komplexační schopnosti karboxymethylcelulózy vůči některým kovovým iontům, což ji předurčuje k použití při odstraňování iontů těžkých kovů z odpadních vod.

### **Klíčová slova:**

Karboxymethylcelulóza, hydrogel, hojení ran, absorpce, antibakteriální vlastnosti

## **Annotation**

The dissertation deals with mapping of carboxymethylcellulose properties with the aim to propose carboxymethylcellulose treatment for its subsequent application in the medical sector more precisely in wound healing.

Part of the dissertation deals with the selection of suitable methods of crosslinking of carboxymethylcellulose to develop a hydrogel with optimal properties. A number of different chemical cross-linking agents, various physical methods of cross-linking, but also the use of radiation are presented in the thesis. In addition to the development of the hydrogel, which ensures optimal healing conditions in the wound, the work also deals with the addition of whether antimicrobial silver or vitamin C and alaptide, which stimulates the growth of granulation tissue and accelerates the epitalization process and wound healing.

Cell proliferation is an integral part of wound healing. In order to increase cell proliferation, the process of manufacturing a highly porous structure was designed and tested to support the formation and division of cells. Covering samples, whether in textile form or in the form of film, were tested for their antibacterial properties, cell adhesion and proliferation, and the toxicity of test materials were also tested.

The last part of the thesis presents a shorter study about the use of carboxymethylcellulose outside of medical applications. The complexation capabilities of carboxymethylcellulose against some metal ions have been used, which makes it suitable for use in removing heavy metal ions from wastewater.

### **Keywords:**

Carboxymethylcellulose, hydrogel, wound healing, absorption, antibacterial properties

# Obsah

|            |                                                       |           |
|------------|-------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>Úvod.....</b>                                      | <b>7</b>  |
| <b>2</b>   | <b>Předmět a cíle disertační práce.....</b>           | <b>7</b>  |
| <b>3</b>   | <b>Přehled současného stavu problematiky .....</b>    | <b>8</b>  |
| <b>3.1</b> | <b>Celulóza .....</b>                                 | <b>8</b>  |
| 3.1.1      | Modifikace celulózy .....                             | 8         |
| <b>3.2</b> | <b>Karboxymethylcelulóza .....</b>                    | <b>8</b>  |
| 3.2.1      | Výroba.....                                           | 9         |
| 3.2.2      | Struktura.....                                        | 9         |
| 3.2.3      | Biodegradabilita a kompatibilita .....                | 9         |
| 3.2.4      | Síťování CMC .....                                    | 10        |
| <b>3.3</b> | <b>Hydrogely .....</b>                                | <b>10</b> |
| <b>3.4</b> | <b>Modifikace CMC pomocí nanočástic.....</b>          | <b>10</b> |
| <b>3.5</b> | <b>3D struktury vhodné pro proliferaci buněk.....</b> | <b>11</b> |
| <b>3.6</b> | <b>Modifikace pomocí Alaptidu .....</b>               | <b>11</b> |
| <b>3.7</b> | <b>Sorpce iontů kovů .....</b>                        | <b>12</b> |
| <b>4</b>   | <b>Použité metody, popř. studované materiály.....</b> | <b>12</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Použité výchozí materiály .....</b>                | <b>12</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Metody přípravy roztoků .....</b>                  | <b>13</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Metody přípravy filmů.....</b>                     | <b>13</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Síťování .....</b>                                 | <b>13</b> |
| 4.4.1      | Fyzikálními metodami .....                            | 13        |
| 4.4.2      | Chemickými činidly .....                              | 14        |
| 4.4.3      | Radiační .....                                        | 15        |
| <b>4.5</b> | <b>Příprava 3D mikroporézní struktury .....</b>       | <b>15</b> |
| <b>4.6</b> | <b>Modifikace pomocí nanočástic stříbra .....</b>     | <b>15</b> |
| <b>4.7</b> | <b>Metody hodnocení .....</b>                         | <b>16</b> |
| 4.7.1      | Měření obsahu či uvolňování stříbra .....             | 16        |
| 4.7.2      | Měření struktury.....                                 | 16        |
| 4.7.3      | Testování stupně zesítnění .....                      | 17        |
| 4.7.4      | Testování antibakteriálních vlastností .....          | 18        |
| 4.7.5      | Testování toxicity.....                               | 19        |
| 4.7.6      | Termoizolační vlastnosti .....                        | 20        |
| 4.7.7      | Další analýzy .....                                   | 20        |
| <b>5</b>   | <b>Přehled dosažených výsledků.....</b>               | <b>21</b> |

|            |                                                                                                                                             |           |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5.1</b> | <b>Sít'ování CMC za účelem vytvoření hydrogelu s optimálními vlastnostmi .....</b>                                                          | <b>21</b> |
| <b>5.2</b> | <b>Testování absorpce v tlumivých roztocích .....</b>                                                                                       | <b>24</b> |
| <b>5.3</b> | <b>Příprava 3D mikroporézní struktury vhodné pro proliferaci buněk.....</b>                                                                 | <b>25</b> |
| 5.3.1      | Test cytotoxicity.....                                                                                                                      | 27        |
| <b>5.4</b> | <b>Modifikace CMC substrátů nanočásticemi stříbra – antibakteriální krytí.....</b>                                                          | <b>28</b> |
| 5.4.1      | Redukce nanočástic stříbra teplem.....                                                                                                      | 28        |
| 5.4.2      | Redukce nanočástic stříbra pomocí UV .....                                                                                                  | 29        |
| <b>5.5</b> | <b>Porovnání vzorku CMC s obsahem stříbra, CMC lyofilizátu, CMC filmu upraveného plazmatem a CMC filmu zesít'ovaného pomocí BDDGE .....</b> | <b>31</b> |
| 5.5.1      | Test biocidity/biodegradability .....                                                                                                       | 31        |
| 5.5.2      | Testování cytotoxicity.....                                                                                                                 | 32        |
| <b>6</b>   | <b><i>Zhodnocení výsledků a nových poznatků.....</i></b>                                                                                    | <b>35</b> |
| <b>7</b>   | <b><i>Seznam použité literatury.....</i></b>                                                                                                | <b>36</b> |
| <b>8</b>   | <b><i>Práce autora se vztahem ke studované problematice .....</i></b>                                                                       | <b>37</b> |
| 8.1        | Publikace v odborných časopisech.....                                                                                                       | 37        |
| 8.2        | Příspěvek ve sborníku z konference .....                                                                                                    | 37        |
| <b>9</b>   | <b><i>Práce autora mimo studovanou problematiku.....</i></b>                                                                                | <b>38</b> |
|            | <b><i>Citace .....</i></b>                                                                                                                  | <b>39</b> |
|            | <b><i>Curriculum Vitae.....</i></b>                                                                                                         | <b>40</b> |
|            | <b><i>Stručná charakteristika dosavadní odborné, výzkumné a vědecké činnosti .....</i></b>                                                  | <b>41</b> |
|            | <b><i>Zápis o vykonání státní doktorské zkoušky .....</i></b>                                                                               | <b>43</b> |
|            | <b><i>Vyjádření školitele doktoranda .....</i></b>                                                                                          | <b>44</b> |
|            | <b><i>Oponentské posudky disertační práce .....</i></b>                                                                                     | <b>45</b> |

## 1 Úvod

Současné dominující metody hojení ran a kožních defektů jsou založeny na tradičních krycích materiálech nebo na vlhkém hojení. Vlhká krytí (např. hydrokoloidy, hydrogely, polyuretany, vlhčená krytí) vytvářejí pro hojení optimální prostředí (vlhkost, teplo, odstranění mrtvé tkáně, absorpce exsudátu a bakterií, bariérový efekt). Riziko vlhkého hojení je vznik infekce, a proto se tato krytí kombinují zejména s baktericidním stříbrem.

## 2 Předmět a cíle disertační práce

Experimenty v rámci disertační práce jsou navrhovány tak, aby výsledné produkty byly vhodné pro použití ve zdravotnických aplikacích. Navržené metody jsou zaměřeny zejména na materiálový výzkum, tj. přípravu nových biokompatibilních materiálů. Materiálovou složkou vzorků je celulózová matrice, a to ve formě filmů, vláknitých a prostorových struktur nebo gelových struktur. Celulózové materiály nabízejí širokou možnost přípravy různých matric, které mohou nalézt široké uplatnění v hojení ran a regenerativní medicíně. Matricové systémy založené na látkách přírodního původu (karboxymethylcelulóza) umožňují vytvořit přípravky minimalizující bolest při manipulaci (nepřílnavé přípravky). Kromě vyvinutí materiálů vhodných pro krytí ran bylo snahou vyvinout materiál, který by byl vhodný pro růst a proliferaci buněk. Takovéto matrice by měly mít strukturu vzájemně propojených pórů a vysokou porozitu, aby zajistila pronikání buněk a dostačující přísun živin buňkám v průběhu formování, difúzi odpadních produktů ven z matrice i vyloučení produktů degradace matrice. Zpracováním antimikrobiálních látek do matricových systémů lze získat prostředky nejen účinné proti mikroorganismům, ale též vytvořit prostředí podporující hojení v ráně.

Za cíl si tato disertační práce klade:

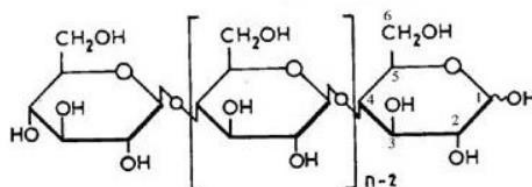
- 1) nalézt optimální podmínky síťování karboxymethylcelulózové matrice za účelem vytvoření hydrogelu s co nejvyšším poměrem absorpce/rozpustnosti
- 2) optimalizovat metodu přípravy 3D porézních struktur vhodných pro proliferaci buněk
- 3) modifikovat polymerní materiál pomocí alaptidu a vitamínu C za účelem podpory ráně se lépe hojit
- 4) modifikovat polymerní materiál pomocí nanočástic stříbra za účelem zvýšení antimikrobiální aktivity
- 5) uplatnění CMC na textilním nosiči v jiných než medicínských aplikacích

### 3 Přehled současného stavu problematiky

#### 3.1 Celulóza

Krystalická povaha celulózy byla odhalena v roce 1913, kdy byl zaznamenán první rentgenový vzor z vláknitých svazků různých rostlin. Jeden z prvních molekulárních modelů celulózy byl navrhnut v roce 1937, spočíval v antiparalelních řetězcích zabalených do monoklinické buňky. Celulóza jako taková byla objevena v roce 1938 francouzským chemikem Anselmem Payenem, který izoloval celulózu z rostlinného materiálu a určil chemický vzorec celulózy. Polymerní struktura celulózy byla určena v roce 1920 Hermannem Staudingerem. V roce 1994 začalo studium přípravy celulóзовých nanovláken, které byly nakonec připraveny ve vodném prostředí. [1]

Celulóze přísluší vzorec  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Je to polysacharid, jehož základní stavební jednotkou je  $\beta$ -glukopyranóza spojená do polymeru 1,4 – glykosidovými vazbami. Tyto vazby udávají celulóze tyčinkovitý charakter. Celulózu tak tvoří šestičlenné cykly, zvané pyranóza. Obr. 1 zobrazuje chemickou strukturu celulózy. [2]



Obr. 1: Vzorec celulózy [3]

##### 3.1.1 Modifikace celulózy

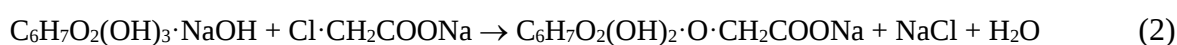
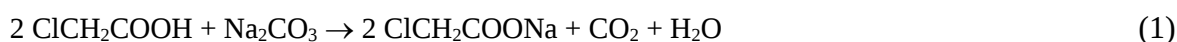
Samotná celulóza je ve vodě nerozpustná díky existenci mnoha silných vodíkových vazeb, které se tvoří mezi jednotlivými vlákny celulózy. Substitucí celulózy dosáhneme toho, že vznikne modifikace celulózy, která je rozpustná ve vodě. Rozpustnost těchto celulóзовých polymerů je přisuzována zmenšenému počtu vodíkových interakcí. Mezi tuto modifikaci řadíme MC a HPMC. Tyto modifikace mají velké uplatnění. Jsou součástí zahušťovadel, váží na sebe vodu, uplatňují se ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. [4] [5]

#### 3.2 Karboxymethylcelulóza

Je derivát celulózy získaný chemickou modifikací přírodní celulózy. Karboxymethylcelulóza (CMC) je ve vodě rozpustný polysacharid obsahující karboxylové a hydroxylové skupiny.

### 3.2.1 Výroba

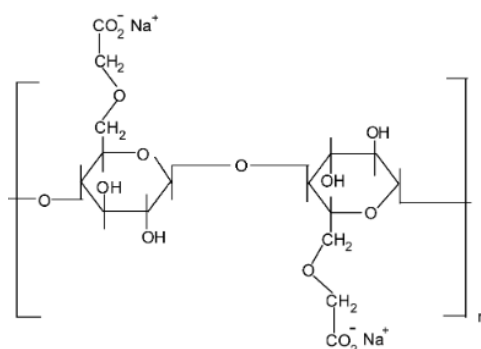
CMC byla prvně vyrobena v Německu na konci první světové války E. Jansenem, který celý proces výroby popsal v patentu z roku 1918. [6] Tento proces výroby CMC byl později vylepšen pány J.K. Chowdhury a F. Hopplerem. [7] [8] CMC se vyrábí z celulózy, převedené působením hydroxidu sodného na reaktivní alkaliceleulózu, která se esterifikuje chloracetátem sodným (viz rovnice 1 a 2). Chloracetát sodný se připravuje reakcí kyseliny monochloroctové s uhličitánem sodným. V druhé fázi přípravy CMC je možno použít i kyselinu chloroctovou nebo její sodnou sůl. [8]



### 3.2.2 Struktura

Struktura je postavená na  $\beta(1,4)$  glukopyranózovém polymerním řetězci celulózy. Přípravou je možné dosáhnout různých stupňů substituce. Nejčastěji se však pohybují v rozmezí 0,5 – 1,5 funkčních skupin na jednu monomerní jednotku. Obecně jsou makromolekuly CMC kratší než makromolekuly nativní celulózy.

Karboxymethylové skupiny vyčnívají ze základního řetězce, a proto nedovolují hydroxylovým skupinám se dostatečně přiblížit a vytvořit vodíkovou vazbu s vedlejšími molekulami. To zapříčiňuje, že se voda může dostat mezi molekuly CMC. Makromolekuly se působením vody oddělují a hydratovaná CMC přechází do formy roztoku. Molekulární struktura CMC je uvedena v Obr. 2. [9]



Obr. 2: Vzorec CMC [4]

### 3.2.3 Biodegradabilita a kompatibilita

CMC nemá žádný negativní vliv na životní prostředí. Rychlost degradace závisí na molekulové hmotnosti. CMC je kompatibilní se širokou škálou neionogenních derivátů

celulózy. Při výrobě směsí je vhodné zvolit takový derivát, který má přibližně stejnou hodnotu viskozity jako má CMC. [10] Dermatologické a toxikologické studie podle nezávislých laboratoří ukazují, že sodná sůl CMC není toxická pro bílé potkany, psy, morčata, nebo lidské bytosti. Testy na lidské pokožce ukázaly, že sodná sůl není dráždivá ani senzibilizující. [11]

### **3.2.4 Sít'ování CMC**

Pod pojmem sít'ování rozumíme vzájemné spojování polymerních řetězců hlavními a vedlejšími valencemi na „nekonečně“ velké makromolekuly. Struktura makromolekul CMC s početnými funkčními skupinami podél řetězce je pro sít'ující reakce velmi příznivá. Jako reaktivní centra přicházejí v úvahu především volné hydroxylové skupiny. Tvorba dostatečně stabilních sít'ových struktur je výsledkem reakcí činidel poskytujících můstky mezi sousedními makromolekulárními řetězci. Zvýšení stupně zesíťení systému vyúsťuje v stabilnější gel. Nicméně vyšší stupeň sít'ování vytváří křehčí strukturu. Optimálním stupněm sít'ování lze dosáhnout relativně silného, a přitom pružného hydrogelu. [11]

Existuje více způsobů sít'ování – fyzikální (termické), chemické a radiační.

### **3.3 Hydrogely**

Hydrogely jsou trojrozměrné, hydrofilní polymerní sítě, které mohou pojmut velké množství vody nebo biologických kapalin. Sítě jsou tvořeny z homopolymerů nebo kopolymerů a jsou nerozpustné v důsledku chemického sít'ování nebo fyzikálního sít'ování, jako jsou spletence či krystaly. Ty dávají síti strukturu a fyzikální integritu. Tyto hydrogely vykazují termodynamickou kompatibilitu s vodou, která jim umožňuje se zvětšit ve vodném prostředí. Základní vlastností pro toto neobvyklé chování hydrogelů je jejich přechod od skelného na pružný stav kdy při kontaktu s termodynamicky kompatibilním rozpouštědlem. Hydrogely připomínají přírodní živé tkáně více než jiné syntetické biomateriály. To je díky jejich vysokému obsahu vody a měkké konzistenci, která je podobná přírodní tkáni. Kromě toho vysoký obsah vody v materiálu přispívá k jejich biokompatibilitě. A proto lze hydrogely použít jako kontaktní čočky, membrány pro biosenzory, vyzdívky pro umělá srdce, materiály pro umělou kůži a zařízení pro doručování léků. [12]

### **3.4 Modifikace CMC pomocí nanočástic**

Význam nanomateriálů a nanotechnologií prudce vzrůstá vzhledem k širokému aplikačnímu potenciálu a použití v různých průmyslových odvětvích, konzumních produktech a zdravotní péči. V biomedicině přináší nanotechnologie doslova revoluci, neboť jejich

produkty mají schopnost pronikat k orgánům a tkáním s jejich následným ovlivněním. Některé nanomateriály jsou natolik malé, že mohou snadno pronikat do jednotlivých buněk. Takže mohou fungovat jako nosiče léčiv, nosiče kontrastních látek pro zobrazování tkání nebo diagnostiku některých onemocnění. Nanomateriály se, podle počtu rozměrů, v nichž nabývají hodnot pod 100 nm, mohou vyskytovat ve formě nanočástic, nanovláken a nanovrstev. Nejširší aplikační využití a s tím i plynoucí vyšší pravděpodobnost expozice živých organismů mají právě nanočástice. Základní odlišností nanomateriálů od konvenčních chemických látek je velikost částic a jejich povrchu. S klesající velikostí částic nepřímo úměrně roste plocha jejich povrchu a volná Gibbsova energie, která odráží reaktivitu daných částic. [13]

### **3.5 3D struktury vhodné pro proliferaci buněk**

Konvenční kultivace buněk *in vitro* poskytují pouze dvourozměrný prostor pro buněčnou proliferaci, migraci a diferenciaci. Takový model však neodpovídá fyziologickému stavu. Proto se v oblasti tkáňového inženýrství v současné době rozšiřuje příprava a používání trojrozměrných nosičů. Současně s přípravou takového nosiče je pak možné přímo do materiálu či na jeho povrch nanést aktivní látky. Lyofilizované materiály mají potenciál jako systémy pro dodávání léčiv do ran. [14] [15]

Lyofilizace (vymrazování) je proces dehydratace obvykle používaný pro zachování netrvanlivých materiálů, nebo aby se materiál lépe přepravoval například: zlepšení stability labilních léčiv. Lyofilizace probíhá zmrazením materiálu a pak se snižováním okolního tlaku, dochází k sublimaci zmrazené vody v materiálu přímo z pevné fáze do plynné fáze. Vymrazování může trvat několik dní nebo dokonce týdnů, pokud sublimační proces není optimalizován. [15]

### **3.6 Modifikace pomocí Alaptidu**

Jedním ze způsobů podání léčiva do organismu je transdermální aplikace, jejíž využití se v současnosti nebývale rozvíjí. Vnější vrstva kůže (*stratum corneum*) chrání tělo proti průniku cizorodých látek včetně léčiv. Byly však nalezeny různé způsoby překonání této bariéry. Jednou z možností je využití chemických permeačních enhancerů (CPE) neboli akceleračních transdermální permeace. CPE mohou být považovány za excipienty specificky ovlivňující mezibuněčný prostor mezi korneocyty (modifikujícími korneocyty) a hydratací nebo denaturací keratinu. Přesný mechanismus účinku CPE není doposud znám, ale CPE ovlivňují penetraci/permeaci léčiv, určených jak pro lokální působení, tak pro systémový účinek. [16]

Ve vztahu k účinku alaptidu jako potenciálního CPE, je důležité poznamenat, že melanocyty významně ovlivňují tvorbu a funkci keratinocytů pomocí melanosomů. [16]

Alaptid na základě hojného počtu různých studií vykazuje velký potenciál pro léčbu či regeneraci lokálně poraněné kůže nebo sliznice. Alaptid však vykazuje nízkou rozpustnost, a tedy i bio dostupnost. [16]

### **3.7 Sorpce iontů kovů**

Konvenční způsoby odstraňování těžkých kovů zahrnují chemické srážení, iontovou výměnu, elektrodialyzaci, membránové separace, reverzní osmózu a extrakci rozpouštědlem. V současnosti se hledají nové, efektivní a ekonomické technologie, které zahrnují odstraňování toxických kovových iontů z odpadních vod (biosorpci), založené na vazebných kapacitách různých biologických materiálů s malými nebo žádnými náklady. [17]

Jak již bylo zmíněno dříve, CMC se sráží se v přítomnosti solí s oxidačním číslem 2 a 3. Náhradou alkalických iontů vodíkovými vzniká nerozpustná kyselá forma CMC. Je známo, že sodná sůl CMC je derivát celulózy, který je bezbarvý, bez zápachu a chuti, je fyziologicky inertní, chemicky stabilní, není nebezpečný pro zdraví a životní prostředí a je rozpustný ve vodě. Má také dobrou komplexační schopnost pro některé kovové ionty a je využívána jako makromolekulární komplexační činidlo pro selektivní odstranění mědi z vody v komplexotvorném mikrofiltračním procesu. [18]

## **4 Použité metody, popř. studované materiály**

V této kapitole je v krátkosti popsán postup řešení práce, včetně metod přípravy, síťování a modifikací vzorků. Rovněž je popsána základní charakteristika metod hodnocení.

### **4.1 Použité výchozí materiály**

- Sodná sůl CMC v práškové formě (CMC- $\text{Na}^+$  - MW 250 000, DS 0,7)
- Od firmy VWR, katalogové číslo : 9004-32-4, Čistota 99,5 %
- Sodná sůl CMC ve vlákenné formě (CMC- $\text{Na}^+$ - pH 6,5 – 7,0; DS 0,22 – 0,35)
- Kyselá forma CMC ve vlákenné formě (pH 4,0 – 4,3; DS 0,36 – 0,38)

Obě vlákenné formy CMC byly vyrobeny v poloprovozních podmínkách firmou Holzbecher s.r.o. metodou, která je popsána v kapitole o výrobě CMC. V obou případech se jedná o plošnou netkanou textilií typu spunlace o plošné hmotnosti  $60 \text{ g} \cdot \text{m}^2$ .

## 4.2 Metody přípravy roztoků

Sodná sůl CMC byla použita v práškové formě (CMC- $\text{Na}^+$ , DS 0,7). Sůl byla rozmíchána ve vodě k dosažení koncentrace 20 či 30  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Roztok byl rozmíchán pomocí laboratorního hřídelového míchadla Heidolph RZR 2051 po dobu 15 minut, poté se roztok ponechal 3 dny odležet, aby byl roztok homogenní a CMC se úplně rozpustila.

Další použitou variantou byla výroba filmů z rozpuštěné sodné soli CMC ve vlákenné podobě (pH 6,6; DS 0,35). Netkaná textilie byla rozmíchána ve vodě k dosažení koncentrace 17  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Do obou zmíněných variant bylo možné přidat glycerin, filmy poté byly tvárné a pružné.

## 4.3 Metody přípravy filmů

Z výše popsaných roztoků byly připraveny filmy vylitím přesně definovaného množství do plastové petriho misky. Množství použitého gelového roztoku bylo odvozeno od velikosti misek, tak aby se zachovala stejná tloušťka filmů po vyschnutí roztoku. Schnutí probíhalo za běžné laboratorní teploty i vlhkosti.

## 4.4 Síťování

Síťování bylo prováděno za účelem vytvoření hydrogelu s optimálními vlastnostmi. Preferovaným požadavkem všech experimentů bylo dosažení vysoké absorpce s co nejnížší rozpustností materiálu. Síťování bylo testováno na roztocích či filmech práškové formy sodné soli CMC.

### 4.4.1 Fyzikálními metodami

#### 4.4.1.1 *Mrazicí cykly*

Prvním zvoleným způsobem síťování vzorků byla v práci použita metoda, spočívající na rozdílných teplotních skocích mezi chladicím boxem ( $-16 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a pokojovou teplotou ( $20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Tato metoda byla zvolena s ohledem na studii, která je uvedena v kapitole 2.4.3.1.1 (viz. Disertační práce), přičemž podmínky experimentu byly modifikovány.

Vzorky filmů o definované hmotnosti byly před umístěním do mrazicího boxu smočeny destilovanou vodou o definovaném objemu. Časový interval 1 cyklu trval 16 hodin (8 hod. v chladu, 8 hod. při pokojové teplotě). Počet testovaných cyklů 1 – 10.

#### 4.4.1.2 *Vysokou teplotou*

Další způsob síťování spočíval v expozici vzorků filmů zvýšeným teplotám. Testované teploty byly 150 – 200  $^{\circ}\text{C}$ . Testován byl i vliv doby působení tepla na stupeň zesítnění.

CMC je rozpustná ve vodě, a proto je nutno ji stabilizovat. Z důvodu předpokládaného použití v medicíně bylo žádoucí se vyhnout použití chemických síťovadel, proto k zesílení byla použita tepelná fixace. Která je založena na zesílení esterových skupin v CMC a odstranění karboxymethylových skupin z CMC.

#### 4.4.2 Chemickými činidly

##### 4.4.2.1 *1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDGE) [19]*

V experimentu byl pro přípravu filmů využit roztok čisté CMC ( $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), 1,4 butanediol diglycidyl ether a 10 % roztok persíranu draselného ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ). BDDGE byl vůči CMC a persíranu dávkován v různých koncentracích (do 20 ml roztoku CMC bylo přidáno 0,2 ml persíranu draselného a 0,02 – 1 ml BDDGE). Reakční teplota  $80^\circ\text{C}$  po dobu 1 hodiny.

##### 4.4.2.2 *Karboxylové kyseliny*

Karboxylové kyseliny byly pro síťování zvoleny díky jejich počtu –  $\text{COOH}$  skupin. Při reakci karboxylových kyselin a CMC dochází k tzv. esterifikaci. K reakci byly použity kyselina citrónová a jantarová o různých koncentracích. Reakční teplota byla  $130^\circ\text{C}$  po dobu 10 minut, poté se teplota snížila na  $80^\circ\text{C}$  po dobu 1 hodiny. Testován byl vliv použitého množství kyselin na stupeň zesílení ( $0,015 - 1,00 \text{ g}/0,045 \text{ g CMC}$ ).

##### 4.4.2.3 *Kationaktivní prostředek*

KP není stejně jako EDMA + AIBN klasické síťovadlo, ale díky jeho použití dojde k deaktivaci –  $\text{COOH}$  skupin což omezuje přístup vody k CMC. Použité koncentrace KP  $10 - 100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Film CMC byl v roztoku KP, u všech testovaných koncentracích, ponořen po dobu 1 hodiny.

##### 4.4.2.4 *Etylen-dimetakrylát/2,2'-azobisisobutyronitril (EDMA/AIBN) [20]*

Mezi síťovacím činidlem EDMA a aktivátorem AIBN došlo k radikálové polymeraci. Při této reakci došlo k aktivaci dvojně vazby molekuly monomeru. AIBN se důsledkem zahřátí v horkovzdušné sušárně ( $70^\circ\text{C}$ ) rozpadlo na radikály, které zanikly a vytvořily se dvojně vazby nenasyceného monomeru. Rychlost celé polymerace je závislá na času rozpadu aktivační látky, teplotě a stabilitě jednotlivých radikálů. Sledován byl vliv reakční doby na stupeň zesílení (1 – 10 hodin).

##### 4.4.2.5 *Epichlorhydrin*

Pro porovnání byl proveden i experiment s epichlorhydrinem. Bylo smícháno 5 g suchého granulátu NaCMC a 50 g 17,5 % hydroxidu sodného ( $\text{NaOH}$ ). Tento roztok bylo

zapotřebí zahřát na 50 °C a za stálého míchání zahřívát po dobu 20 minut. Poté se do zahřátě směsi přidalo 50 g epichlorhydrinu a 50 g amoniaku (NH<sub>3</sub>). Reakční teplota 40 °C po dobu 4 hodin. Výsledný gel bylo nutné přefiltrovat pomocí ethanolu.

#### 4.4.3 Radiační

##### 4.4.3.1 Sít'ování gama zářením

Ozařování vzorků probíhalo ve spolupráci s firmou ÚJV Řež, a.s. Použit byl intenzivní zdroj úzkého svazku gama záření radioizotopu <sup>60</sup>Co v ochranném obalu. Sít'ování pomocí gama záření bylo provedeno na vzorcích filmů, roztoků i netkaných textilií. Dávky ozaření byly stanoveny na 5, 10, 15, 20 a 25 kGy.

##### 4.4.3.2 Sít'ování plazmatem

Sít'ování bylo provedeno v kyslíkové atmosféře. Byly použity dva druhy plazmatu pro porovnání, a to přesněji atmosférická (od firmy MSV) a vakuová plazma (RF PA-CVD/MS). Doba, po kterou byly vzorky plazmovány byla v případě vakuové plazmy 1 – 90 s. (tlak 13 Pa, výkon zdroje 26 W, předpětí 250 V, průtok plynu 15 SCCM (cm<sup>3</sup><sub>[t=25°C]</sub>/min).

#### 4.5 Příprava 3D mikroporézní struktury

V první studii byl použit laboratorní lyofilizátor Krista, typ Epsilon 2 - 6D, nosiče o celkové ploše 0,27 m<sup>2</sup> (VUOS a.s.). Všechny další experimenty byly již zhotovovány pomocí lyofilizátoru Telstar lyoQuest -85 (TUL). Lyofilizace byla provedena na vzorcích filmů, roztoků i netkaných textilií. Mimo podmínek lyofilizace (tlak, čas, teplota) na výslednou strukturu materiálu má výrazný vliv stupeň substituce, doba ponoření a forma CMC.

#### 4.6 Modifikace pomocí nanočástic stříbra

Modifikace byla provedena na vzorcích roztoků, netkaných textilií a popřípadě dalších substrátů, na které se nanese roztok CMC. V rámci této studie bylo pracováno s krystalky dusičnanu stříbrného (AgNO<sub>3</sub>), který byl rozpuštěn ve vodě či v roztoku CMC. Testované koncentrace 0,1 – 2 g·l<sup>-1</sup>. Redukce nanočástic stříbra z dusičnanu stříbrného byla provedena různými způsoby:

- 1) teplem (180 °C a 200 °C)
- 2) UV světlem v uzavřené komoře s využitím žárovky Osram Ultra Vitalux 300 W E27 (UVA (315 - 400 nm) 13,6 W, UVB (280 - 315 nm) 3,0 W) či běžného denního světla.

- Osram Ultra Vitalux: I = 204,00 [W·m<sup>-2</sup>]

Pro porovnání: Denní světlo (zima): I = 300,00 [W·m<sup>-2</sup>],

Denní světlo (zamračeno):  $I = 100,00 \text{ [W} \cdot \text{m}^{-2}]$

3) kyselinou askorbovou ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ).

## **4.7 Metody hodnocení**

### **4.7.1 Měření obsahu či uvolňování stříbra**

#### **4.7.1.1 ICP (OES, MS)**

K analýzám byly využity dva iontové chromatografy Perkin Elmer Optima 2100 DV a DIONEX ICS 90. Jedná se o spektrometrii s indukčně vázanou plazmou. Měření anorganických látek, kontaminantů ve velmi nízkých koncentracích. [21]

#### **4.7.1.2 Energiově disperzní spektroskopie EDS**

Výsledkem energiově disperzní spektroskopie je spektrum frekvencí signálů v rentgenových energetických oknech, které obsahují charakteristické píky, které korespondují s jednotlivými elementy (jejich výška odpovídá koncentraci daného prvku ve vzorku). Spektroskopie byla provedena na přístroji 1) X-MAX 50 (silikonový detektor, SDD) Oxford Instruments, který je kontrolován systémem INCA. 2) součást SEM mikroskopu Carl Zeiss ULTRA Plus, který obsahuje systém pro mikroanalýzu od firmy Oxford Instruments X-MAX 25, který je kontrolován systémem Aztec.

### **4.7.2 Měření struktury**

#### **4.7.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie SEM**

K analýzám skenovací elektronové mikroskopie byl použit mikroskop s vysokým rozlišením emisního pole UHR FEG-SEM Carl Zeiss ULTRA Plus (detektory SE2, InLens SE, ASB+ESB). Jedná se o mikroskop s katodou Cold FEG.

#### **4.7.2.2 E-SEM**

Pro enviromentální SEM analýzu nebyla využita žádná speciální úprava vzorků (lyofilizace, dehydratace alkoholovou řadou) z důvodu možnosti úpravy struktury či vlastností testovaných vzorků. Samotné testování vzorků proběhlo pomocí skenovacího elektronového mikroskopu FEI QUANTA FEG 250, měření bylo provozováno v E-SEM módu s použitím SE detektoru (LFD, GSED). Vzorky byly předchlazeny na teplotu -5 až -7 °C. Tlak v komoře byl nastaven na 100 Pa. Ovládání mikroskopu a zpracování snímků bylo uskutečněno pomocí softwaru xT microscope control v6.2.4. build 3069-supervisor. Testované vzorky o rozměru

1·1 cm byly ponořeny do růstového média s buňkami fibroblastů (2 ml), poté byly ponechány v inkubátoru po dobu 48 hodin.

#### 4.7.2.3 *Mikroskopie atomárních sil AFM*

Mikroskopie atomárních sil, která se využívá k reálnému nasnímání topografie povrchu s možností 3D zobrazení. Jak již vlastní název napovídá, je povrch zkoumaného vzorku snímán pomocí sondy. Tato sonda se pohybuje v těsné blízkosti (řádově 100 nm) nad povrchem, kde působí meziatomární síly. Ke snímání povrchu dochází postupně po řádcích. Výsledný snímek je složen právě z těchto řádků. Díky tomu, že se sonda pohybuje v takovéto blízkosti povrchu, lze dosáhnout velmi velkého rozlišení a to tzv. subatomárního rozlišení. Analýzy provedeny na přístroji JPK NanoWizard III. [22]

#### 4.7.2.4 *Transmisní elektronová mikroskopie TEM*

Transmisní elektronová mikroskopie byla provedena na přístroji JEOL 1011 vybaveném CCD kamerou Veleta (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH). Tato metoda umožňuje pozorování vzorků tloušťky v řádu 100 nm při vysokém zvětšení (až asi  $10^6$ ) a rozlišení (v řádu několika desetin nm).

### 4.7.3 *Testování stupně zesílení*

#### 4.7.3.1 *Měření absorpce a rozpustnosti*

Testování probíhalo namáčením vzorků v Petriho miskách s destilovanou vodou. Zaznamenávány byly váhové změny vzorků. Z naměřených hodnot byly vypočteny Absorpce a rozpustnost. Experiment byl realizován za běžných teplotních i vlhkostních laboratorních podmínek.

$$\% \text{ Rozpustnost} = (M_2 - M_1) / M_2 \cdot 100 \quad (3)$$

$$\% \text{ Absorpce} = (M_3 - M_2) / M_2 \cdot 100 \quad (4)$$

kde:  $M_1$  - hmotnost po namočení a sušení,  $M_2$  - hmotnost vzduchosuchého vzorku

$M_3$  - hmotnost po namočení

Při návrhu kinetických modelů aproximujících bobtnání a rozpustnost CMC byly použity jednoduché exponenciální vztahy používané např. v popisu kinetiky barvicího procesu.

$$1) \quad M_v(t) / M_p = (M_v \infty / M_p) \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (5)$$

$$2) \quad M_v(t) / M_p = (M_v \infty / M_p) \cdot (\sqrt{1 - e^{-kt}}) \quad (6)$$

kde:  $M_v$  - hmotnost vody,  $M_p$  - hmotnost polymeru,  $k$  - rychlostní konstanta,  $t$  - čas

Druhý model vychází dle hodnocení pomocí metody nejmenších čtverců lépe. Z toho důvodu jsou data absorpce a rozpustnosti aproximována právě tímto modelem.

#### **4.7.3.2 *Testování stupně zesíťení dle normy ČSN EN ISO 10147***

Jedná se o normu – Trubky a tvarovky ze síťovaného polyethylenu (PE-X). Posouzení stupně zesíťování stanovením obsahu gelu. Tato norma byla v rámci práce použita z důvodu nedostatku norem či návodů pro stanovení obsahu gelu (rozpustnosti) polymerních materiálů. Parametry dané normy byly upraveny pro potřeby hodnocení vzorků z CMC. Testování probíhalo ve fyziologickém roztoku. K testování vzorků byl použit přístroj s termostatickou lázní, která byla nastavena na teplotu  $37 \pm 2$  °C.

#### **4.7.4 *Testování antibakteriálních vlastností***

##### **4.7.4.1 *AATCC Test Method: 100–2004***

Touto metodou (Antibacterial activity Assessment of Textile materials) je hodnocen faktor redukce, který udává, o kolik procent došlo ke snížení inokulované koncentrace bakterií. Počítá se počet obnovených bakteriálních kolonií – vždy vzhledem k neupravenému standardu. Kvalitativní hodnocení.

##### **4.7.4.2 *AATCC Method 147–2004***

Jedná se o metodu orientační (An American Standard 1993), u které se hodnotí velikost tzv. halo zóny, tedy oblasti okolo testovaného vzorku. Bakteriální inokulum je očkováno na krevní agar. Kvantitativní hodnocení.

– Testované kmeny (pro obě AATCC metody): *E. coli* (CCM 2024) a *Staphylococcus aureus* (CCM 299) – dle ALE-G18, ČSNI.

##### **4.7.4.3 *Test viability na základě neporušenosti plazmatické membrány***

Tyto testy jsou založeny na schopnosti neporušené plazmatické membrány nepropouštět určitá barviva do nitra buňky. V případě poškození plazmatické membrány se tato barviva navážou na vnitřní strukturu buňky a dojde k zesílení fluorescence. Tvorba bakteriálního biofilmu probíhala v médiu pro růst bakterií (Lysogeny Broth medium - 1 % Peptone G, 1 % Yeast extract, 0,5 % NaCl). Použitá barviva: Live/dead BacLight™ Bacterial Viability Kit.

##### **4.7.4.4 *Test biocidity/biodegradability***

Respirační aktivita bakterií byla měřena na přístroji Micro-Oxymax Respirometer-Columbus Instruments International. K testování metabolické aktivity bakteriální populace

bylo využito respirometrické metody (hodnocení O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>). Vzorky byly připraveny v souladu s normou ČSN EN ISO 9408.

– Testovaný kmen *E. coli*. Počáteční absorbance 0,076 (600 nm) ~ cca. 0,5 McFarland ( $1,5 \cdot 10^8$  CFU·ml<sup>-1</sup>). Přidáno 0,243 g·l<sup>-1</sup> glukózy, provedeno v BSM (minerální médium).

#### 4.7.5 Testování toxicity

##### 4.7.5.1 Příprava buněk

Buňky byly zvoleny s ohledem na předpokládanou aplikaci materiálů při hojení ran.

Pro testování byly použity 1) primární kožní fibroblasty dospělého člověka (ATCC<sup>®</sup> PCS-201-012<sup>™</sup>), které jsou bipolární a refraktilní a 2) myší fibroblasty 3T3 fibroblasty (ATCC, pasáž 7).

##### 4.7.5.2 Stanovení viability buněk - XTT

XTT metoda se používá pro stanovení viability buněk. Solubilní sloučenina XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid) je v živých buňkách redukována na ve vodě rozpustný oranžový formazan. Stupeň zabarvení roztoku získaného redukcí XTT je přímo úměrný počtu živých buněk ve vzorku. Absorbance při spektrofotometrickém stanovení se měří při vlnové délce 475 nm.

###### 4.7.5.2.1 Test

Médium s buňkami o koncentraci 10<sup>6</sup> se po počítání rozdělí do malých 15 ml falkon. Falkony se dají následně centrifugovat (3000, 5 min.). Poté se z falkon odsálo médium a přidaly se extrakty vzorků (1,2 ml). Z každé falkony bylo následně pomocí mikropipety odebráno 12·100 µl (do 12-ti jamek). Experimenty byly provedeny s použitím 96-ti jamkových E- destiček. Do řady B až G byly přidány extrakty s buňkami. Takto připravené destičky se nechaly inkubovat po dobu 48 hodin. Po uplynutí doby inkubace se z jamek odsál extrakt a jednotlivé jamky se 2krát promyly pufrem. Poté se do každé jamky aplikovalo 50 µl reakčního XTT kitu a destičky se opět vrátily do inkubátoru na dobu 2 – 4 hodiny.

Specifická absorbance se poté vypočítala =  $A_{475}(\text{test}) - A_{475}(\text{blank}) - A_{660}(\text{test})$ .

##### 4.7.5.3 Live/dead (Testy viability využívající aktivity esteráz)

Live/Dead test zkoumá životnost buněk. Ta se dá měřit pomocí vitálních barviv. Použitými vitálními barviv v tomto experimentu byly Calcein AM (C<sub>46</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>23</sub>) pro živé buňky (zelená fluorescence indikuje intracelulární esterázovou aktivitu) a Ethidium bromide

( $C_{21}H_{20}BrN_3$ ) pro buňky mrtvé (červená fluorescence indikuje ztrátu integrity plasmatické membrány).

#### 4.7.5.4 *Testování adheze a proliferace buněk*

##### 4.7.5.4.1 MTT

Je kolorimetrický test, který měří metabolickou aktivitu buněk a je vhodný pro analyzování jejich proliferace, viability a cytotoxicity materiálu. Je založen na redukci žluté solubilní tetrazoliové soli MTT (3-(4, -dimethylthiazol-2-yl)-2,5 difenyltetrazolium bromid) na nerozpustný formazan, který je ve formě fialových krystalků. Reakce probíhá na mitochondriální membráně vlivem mitochondriálních dehydrogenáz živých buněk. Počet živých buněk je tedy indikován množstvím redukováného MTT. Formazanové krystalky se následně rozpustí přidáním okyseleného izopropanolu a spektrofotometricky se stanoví hodnota absorpance roztoku.

#### 4.7.6 *Termoizolační vlastnosti*

##### 4.7.6.1 *Měření tepelné vodivosti ( $\lambda$ ), tepelné jímavosti ( $b$ ) a tepelného odporu ( $r$ )*

Měření bylo provedeno na přístroji ALAMBETA s tlakem 200 Pa. Měření tepelných vlastností na přístroji ALAMBETA spočívá v průchodu tepelných toků  $q_1(t)$  a  $q_2(t)$  povrchy vzorku od neustáleného stavu k ustálenému ( $t_1$  je teplota měřicí hlavice,  $t_2$  je teplota vzorku, základny přístroje).

##### 4.7.6.2 *Inovativní zařízení pro měření termoizolačních vlastností*

Zařízení využívá klimatizační komoru, ve které byl umístěn dutý válec, který byl zahříván na teplotu 35 °C (simulace teploty lidské pokožky). Teplota materiálu, který byl umístěn na válci, byla měřena pomocí digitálního infračerveného teploměru. Teplota v komoře byla nastavena na  $-20 \pm 0,1$  °C s 80 % vlhkostí.

#### 4.7.7 *Další analýzy*

##### 4.7.7.1 *FTIR*

Infračervená spektroskopie je analytická technika určená především pro identifikaci a strukturní charakterizaci organických sloučenin a stanovení anorganických látek. Při této metodě se měří pohlcení infračerveného záření o různé vlnové délce zkoumaným materiálem. Analýzy byly provedeny na přístroji iN10 MX s vedlejším vzorkovacím prostorem iZ10 FTIR.

#### 4.7.7.2 *Testování prodyšnosti*

Měření prodyšnosti byla provedena pomocí přístroje FX 3300 Air Permeability Tester III od společnosti TexTest. Celá metodika měření probíhala v souladu s normou EN/ISO 9237 (použitý tlak 100 Pa).

#### 4.7.7.3 *Výpočetní tomografie (CT)*

K analýze byl použit stolní mikro-tomograf SkyScan 1272, který je schopen nedestruktivní analýzy a zobrazuje strukturu materiálů (Image Pixel Size = 1,28  $\mu\text{m}$ ; Exposure = 530 ms; Source Voltage = 40 kV).

#### 4.7.7.4 *Změna jasu*

Barevnost byla hodnocena měřením reflektance za použití spektrometru Datacolor spectraflash 600.

#### 4.7.7.5 *Stanovení molekulové hmotnosti vláknenných forem CMC*

Byl použit HPLC systém Ultimate 3000 firmy dionex s připojeným ELSD detektorem 385-LC firmy Varian a RALS/LALS detektorem 1260 Infinity II firmy agilent. Separace probíhala na koloně Shodex Asahipak GF 7M s délkou 300 mm a vnitřním průměrem 7,8 mm. Přístroj byl ovládán softwarem Chromeleon verze 6.80 SR12.

Byla použita mobilní fáze obsahující 200 mM mravenčan amonný 25 mM TFA a 5 % MeOH ve vodě okyselená kyselinou mravenčí na pH 4. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,6  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Kolona byla udržována při teplotě 35 °C. Bylo nastříkováno 30  $\mu\text{l}$  vzorku. Teplota nebulizéru ELSD detektoru byla nastavena na 90 °C, teplota evaporátoru na 80 °C. Průtok dusíku byl nastaven na 1,6  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

## 5 Přehled dosažených výsledků

### 5.1 Sítování CMC za účelem vytvoření hydrogelu s optimálními vlastnostmi

Testování sítování pomocí mrazících cyklů ukázalo, že počet mrazících cyklů, po které je vzorek střídavě vystaven chladu a teplu nemá na stupeň zesítnění výrazný vliv. Bez ohledu na počet cyklů byl stupeň zesítnění spíše ovlivněn množstvím vody, která je přidána před samotným sítováním. Pro následné porovnání byl vybrán vzorek, který obsahoval 1:1 (voda/CMC) a absolvoval 3 mrazící cykly.

Výsledky síťování pomocí tepla (vzduchosuchá sušárna) poskytly optimální teplotu a čas působení tepla s ohledem na co nejvyšší poměr absorpce/rozpustnosti. Optimální teplota byla experimentálně stanovena na 180 °C po dobu 15 minut.

Během síťování pomocí BDDGE bylo testováno 10 různých koncentrací použitého síťovacího činidla (0,02 - 1,00 g/0,06 g CMC). I při této metodě se podařilo stanovit optimální hodnotu použité koncentrace síťujícího činidla a to sice 0,06 g/ 20 ml roztoku CMC s ohledem na nízkou rozpustnost takto připraveného filmu. Toto síťovací činidlo bylo dále testováno pro jeho velký potenciál ve zdravotnických aplikacích. [23]

Výsledky síťování pomocí karboxylových kyselin byly pro obě použité kyseliny téměř shodné. Z toho důvodu bude v následném porovnání použita pouze kyselina citrónová. Za optimální hodnotu hmotnosti použitého síťovacího činidla s ohledem na poměr absorpce/rozpustnosti byla stanovena hmotnost 0,015 g/ 15 ml roztoku CMC.

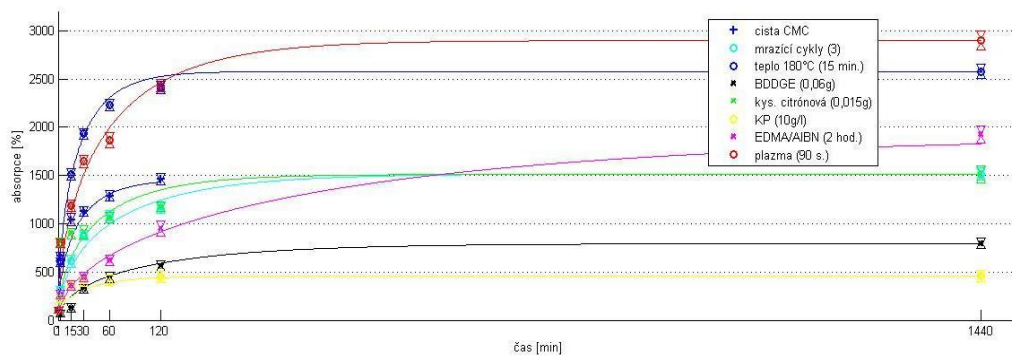
Při použití kationaktivního prostředku jako síťovacího činidla byly testovány 4 koncentrace roztoků KP, do kterých byl následně ponořen film z CMC. Jako optimální koncentrace použitého KP byla experimentálně stanovena hodnota 10 g·l<sup>-1</sup>.

Z výsledků experimentů použití EDMY jako síťovacího činidla a AIBN jako reakčního činidla byla stanovena optimální doba reakce na 2 hodiny s ohledem na poměr absorpce/rozpustnosti.

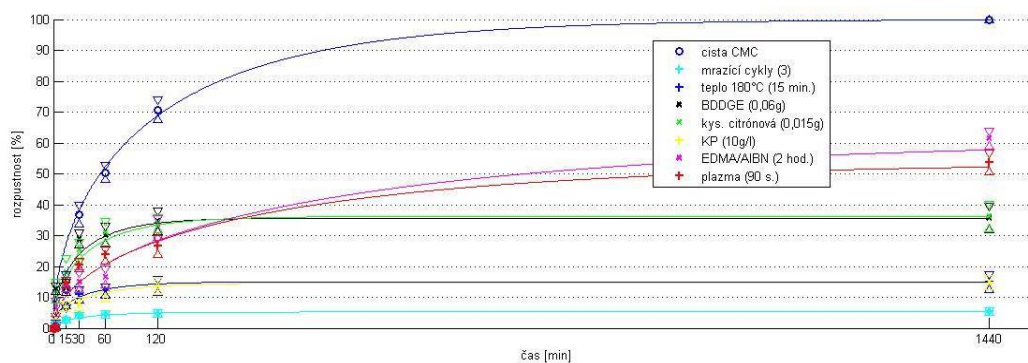
Síťování pomocí gama záření neposkytlo výsledky dle očekávání (dle literatury). Maximální výše dávek ozařování byla stanovena s ohledem na dávky, které se běžně používají ke sterilizaci. Během ozařování filmů a roztoků CMC došlo k degradaci a materiály se po vložení do vody téměř ihned rozpustily. U vzorků netkaných textilií po ozařování nedošlo k žádným změnám v absorpci či rozpustnosti. Vzorky síťované s využitím radiačního záření nebudou podrobeny dalšímu testování.

Během experimentů s plazmatickým síťováním vyplynulo, že vakuové plazma poskytuje účinnější síťovací efekt než plazma atmosférické. To je pravděpodobně způsobeno výkonem plazmatu a čistotou prostředí. Nejlepší hodnoty absorpce/rozpustnosti byly stanoveny při plazmování po dobu 90 sekund.

Jako velice účinná metoda síťování se ukázala metoda s využitím plazmatu (viz Tab. 1). Z Tab. 2 je zřejmé, že fyzikální metody síťování jsou z hlediska poměru absorpce/rozpustnosti nejúčinnější síťovací metody.



Graf 1: Absorpce CMC po síťování vybranými metodami



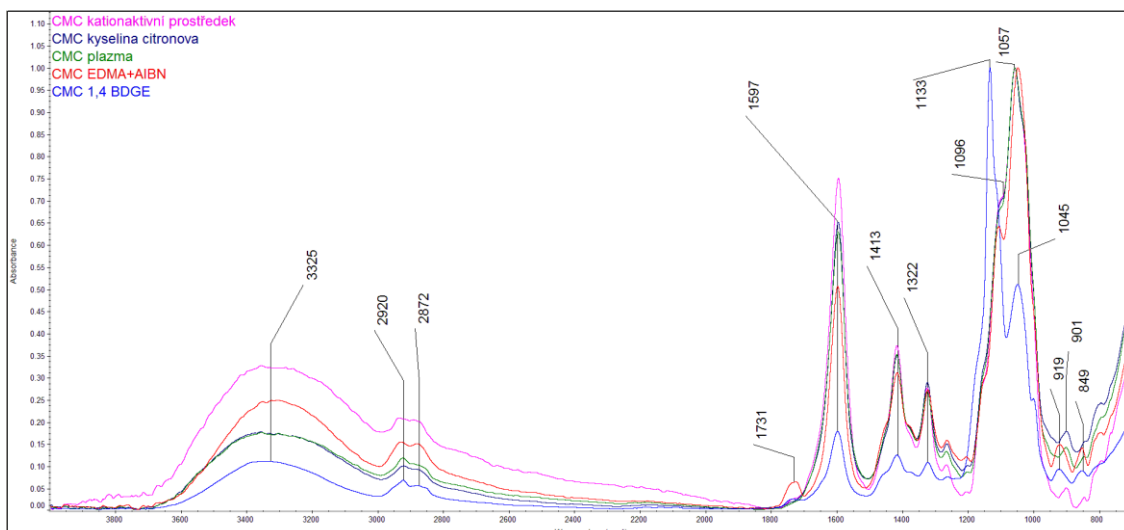
Graf 2: Rozpustnost CMC po síťování vybranými metodami

Tab. 1: Výsledky vybraných síťovadel na stupeň zesítení dle normy ČSN EN ISO 10147

| Vzorek                                                          | Obsah gelu (podíl nerozpuštěné složky) [%] |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Čistá CMC                                                       | 46                                         |
| EDMA + AIBN (2 hod.)                                            | 51                                         |
| 1,4-butanediol diglycidyl ether (0,06 g)                        | 42                                         |
| Kationaktivní prostředek ( $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) | 49                                         |
| Kyselina citrónová (0,015 g)                                    | 42                                         |
| Plazma (90 s)                                                   | 78                                         |

Tab. 2: Poměr absorpce/rozpustnost  $\pm$  směrodatná odchylka

|                                           | Absorpce/Rozpustnost [%] (24 hodin) |
|-------------------------------------------|-------------------------------------|
| Čistá CMC                                 | $19,7 \pm 1,7$                      |
| Mrazicí cykly (3 cykly)                   | $206,8 \pm 16,9$                    |
| Teplo ( $180^\circ \text{C}$ , 15 min.)   | $129,8 \pm 8,2$                     |
| BDDGE (0,06g)                             | $16,0 \pm 0,7$                      |
| Kys. Citrónová (0,015g)                   | $39,1 \pm 2,8$                      |
| KP ( $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) | $38,7 \pm 0,3$                      |
| EDMA/AIBN (2 hod.)                        | $13,6 \pm 2,0$                      |
| Epichlorhydrin                            | $11,5 \pm 0,8$                      |
| Plazma (90 s.)                            | $81,4 \pm 3,3$                      |

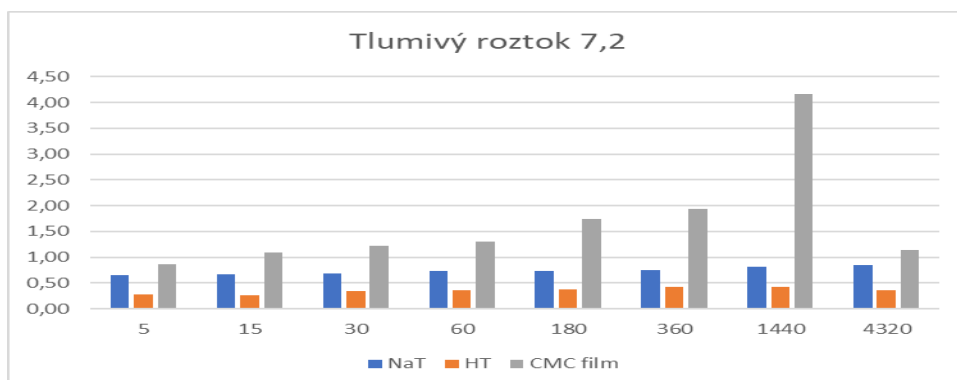


Graf 3: Souhrnné spektrum chemicky a radiačně upravených filmů

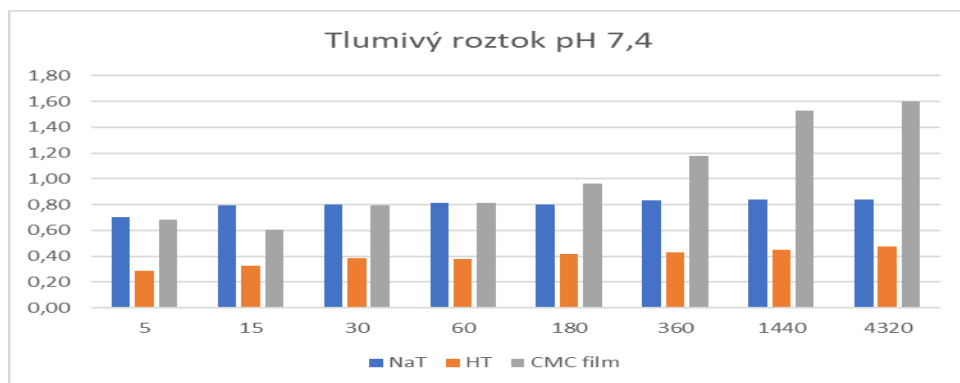
Výraznější rozdíl ve spektrech je patrný u vzorku s BDDGE a to tím, že došlo ke změně skeletu. Zároveň byla v tomto rozmezí naměřena nejnižší hodnota, která vykazuje vyšší stupeň zesítení (viz Graf 3).

## 5.2 Testování absorpce v tlumivých roztocích

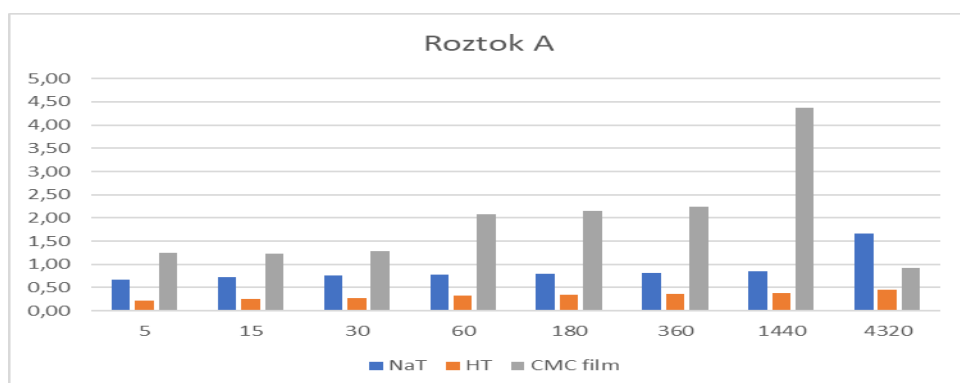
V experimentu byla testována nasákavost vzorků karboxymethylcelulózy ve třech různých roztocích, které jsou složením a poměrem elektrolytů podobné krevní plasmě. Testována byla nasákavost vzorků v časovém intervalu od 5 minut do 3 dnů. Každý vzorek byl před ponořením do roztoku zvážen, poté byl umístěn do petriho misky s 20 ml roztoku a po uplynutí doby ponoření byl opětovně zvážen. Rovněž byla ověřována rozpustnost vzorku vysušením vzorku po namočení při 105 °C do dosažení konstantní hmotnosti. Výsledky jsou zobrazeny v Grafech 4 až 6.



Graf 4: Absorpce vzorků CMC v tlumivém roztoku s pH 7,2 (hmotnostní přívažek [g])



Graf 5: Absorpce vzorků CMC v tlumivém roztoku s pH 7,4 (hmotnostní přivažek [g])



Graf 6: Absorpce vzorků CMC v tlumivém roztoku A (hmotnostní přivažek [g])

### 5.3 Příprava 3D mikroporézní struktury vhodné pro proliferaci buněk

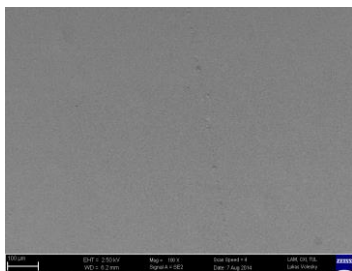
Z výsledků experimentů vyplývá, že vzorky s nižším stupněm substituce absorbují nižší množství vody před lyofilizací. Z toho důvodu je i nárůst tloušťky výsledné struktury nižší. Rovněž experimenty přinesly poznatek o tom, že výsledná 3D mikroporézní struktura je u lyofilizátů s nižším stupněm substituce více prodyšná a má horší termoizolační vlastnosti. Lyofilizace má rovněž vliv na sorpční vlastnosti materiálů, přesněji navlhavost a rozpustnost ve vodě či fyziologickém roztoku klesá přibližně o 10 %.

#### Příklad

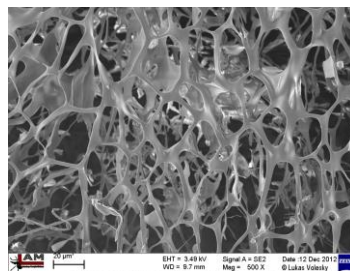
Z práškové formy sodné soli byl připraven roztok o koncentraci  $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , z kterého byl sušením připraven film. Vlákenná podoba sodné soli CMC (DS 0,345, pH 6,6) byla použita jak v podobě textílie, tak byla rovněž rozpuštěna ve vodě pro dosažení roztoku o koncentraci CMC  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , z kterého byl posléze rovněž připraven film. Upravená struktura vlivem lyofilizace je zobrazena na snímcích z elektronové mikroskopie viz Obr.3 až Obr.8.

Podmínky lyofilizace:

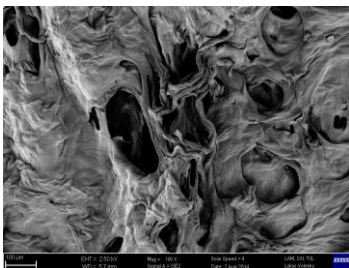
1. mražení – 4 hodiny
2. vakuum – 18 hodin (1,000 mbar (100 Pa))
3. ohřev políc – 1 hodina (0,500 mbar (50 Pa))



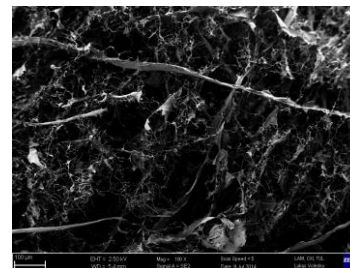
Obr. 3: Struktura CMC filmu před lyofilizací



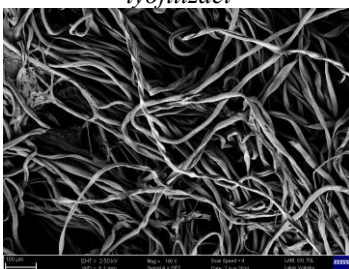
Obr. 4: Struktura CMC filmu po lyofilizaci



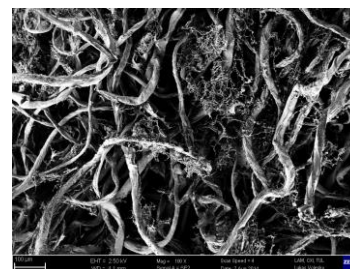
Obr. 5: Struktura CMC filmu tvořeného rozpuštěním netkané textilie před lyofilizací



Obr. 6: Struktura CMC filmu tvořeného rozpuštěním netkané textilie po lyofilizaci



Obr. 7: Struktura CMC netkané textilie před lyofilizací



Obr. 8: Struktura CMC netkané textilie po lyofilizaci

Z Obr.4 a Obr.6 je zřejmé, že v případě CMC filmu po lyofilizaci nastaly výrazné změny ve struktuře. Všechny tři testované materiály mají gelový charakter. Gelující oblasti v materiálech vytvořily „nanostrukturu“ za nízkého tlaku.

Tab. 3: Termoizolační vlastnosti ( $\pm$  směrodatná odchylka)

|        | Tepelná vodivost                | Tepelná<br>jíímavost                          | Tepelný odpor                | Tloušťka        | CTS (-20 °C)    |
|--------|---------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|
|        | $\lambda \cdot (10^{-3})$       | $b$                                           | $r \cdot (10^{-3})$          | $h$             |                 |
| Vzorek | $[W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}]$ | $[W \cdot s^{1/2} \cdot m^{-2} \cdot K^{-1}]$ | $[W^{-1} \cdot K \cdot m^2]$ | $[mm]$          | $[^{\circ}C]$   |
| 1      | $32,40 \pm 0,8$                 | $94,53 \pm 1,4$                               | $40,43 \pm 0,5$              | $1,15 \pm 0,1$  | $22,50 \pm 1,1$ |
| 2      | $48,03 \pm 1,1$                 | $40,16 \pm 0,4$                               | $192,00 \pm 1,3$             | $9,20 \pm 0,3$  | $-2,40 \pm 0,3$ |
| 3      | $102,57 \pm 1,4$                | $305,33 \pm 1,7$                              | $29,87 \pm 0,2$              | $1,45 \pm 0,2$  | $15,90 \pm 0,8$ |
| 4      | $83,27 \pm 1,4$                 | $86,00 \pm 1,2$                               | $102,30 \pm 0,9$             | $14,19 \pm 0,6$ | $-6,90 \pm 0,4$ |
| 5      | $34,06 \pm 0,9$                 | $78,23 \pm 0,9$                               | $36,00 \pm 0,2$              | $1,21 \pm 0,1$  | $18,90 \pm 0,6$ |
| 6      | $41,66 \pm 0,4$                 | $56,63 \pm 0,7$                               | $112,00 \pm 0,6$             | $3,37 \pm 0,2$  | $-0,40 \pm 0,1$ |

V případě vysoké hodnoty tepelné jímavosti má materiál na dotyk studený omak a naopak, je-li hodnota nízká je materiál na dotyk hřejivý. Vyšší hodnota tepelného odporu

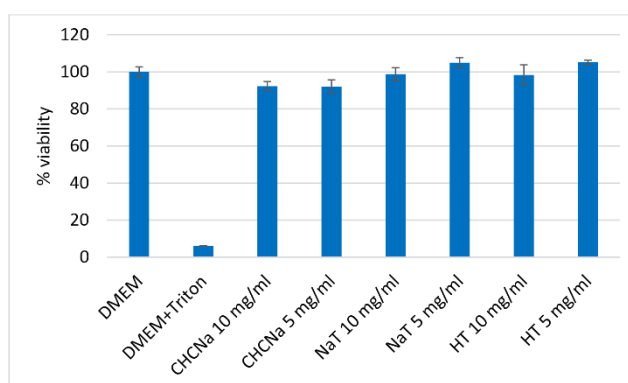
znamená, že je materiál méně schopný odvádět teplo. To ukazuje na dobrou schopnost materiálu teplo udržet (viz. Tab. 3). Vyšší teplota měřená digitálním infračerveným teploměrem (CTS) znamená horší tepelně izolační vlastnosti. Prodyšnost vzorků filmů se po lyofilizaci mírně zvýšila viz Tab.4.

Tab. 4: Prodyšnost

| Vzorek                | 1         | 2          | 3         | 4           | 5            | 6          |
|-----------------------|-----------|------------|-----------|-------------|--------------|------------|
| [l/m <sup>2</sup> /s] | 0,0 ± 0,0 | 62,4 ± 1,3 | 0,0 ± 0,0 | 137,6 ± 1,6 | 1660,0 ± 3,5 | 29,6 ± 1,2 |

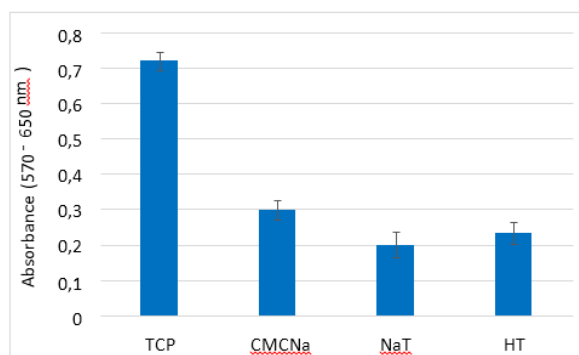
### 5.3.1 Test cytotoxicity

Před samotným *in vitro* testováním byly vzorky nastříhány na čtverce o velikosti přibližně 1·1 cm a vysterilizovány ethylen oxidem. Po dvou týdnech odvětrávání byl proveden test cytotoxicity dle metodiky ISO 10993-5 s mírnými modifikacemi a test buněčné adheze a proliferace po 48 hodinách inkubace. Oba testy byly provedeny s myšimi 3T3 fibroblasty (ATCC, pasáž 7). Výsledky testu jsou zobrazeny v Graf7. Žádný z materiálů nevykazoval cytotoxické působení na buněčnou linii myších fibroblastů.



Graf 7: Viabilita fibroblastů po inkubaci buněk s kontrolami a s testovanými extrakty materiálů (n=6)

Výsledky buněčné viability vyjádřené jako hodnota rozdílů absorbancí jsou zobrazeny v Graf8.



Graf 8: Metabolická aktivita buněk měřená pomocí MTT testu na dně kultivační jamky a v jamkách s testovanými materiály (n≥6)

## 5.4 Modifikace CMC substrátů nanočásticemi stříbra – antibakteriální krytí

V této kapitole je prezentována příprava materiálů, které obsahují nanočástice stříbra v polymerní matici, která je schopna absorbovat extrémní množství vody.

### 5.4.1 Redukce nanočástic stříbra teplem

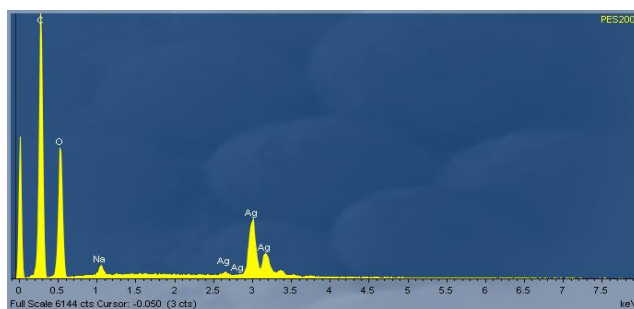
Použitá metoda přípravy nanočástic stříbra je založena na redukci stříbrné soli. Z této studie vyplynulo, že během reakce stříbrných iontů s CMC se vytváří málo rozpustná stříbrná sůl CMC. Následné zahřívání vedlo k redukci nanočástic stříbra ve hmotě CMC.

#### *Příklad*

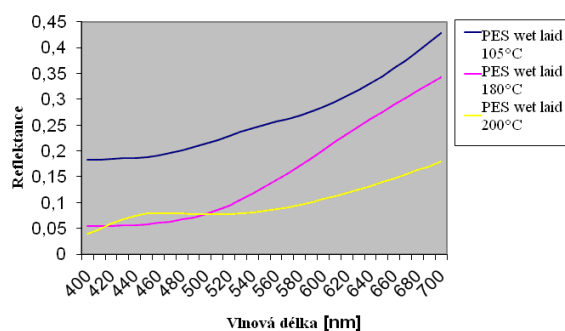
Sodná sůl CMC byla použita v práškové formě, která byla rozmíchána ve vodě k dosažení koncentrace roztoku  $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Krystalky  $\text{AgNO}_3$  byly rozpuštěny ve vodě k získání koncentrace  $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Stejně množství obou zmíněných roztoků bylo smícháno dohromady tak, aby výsledný roztok obsahoval  $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  CMC a  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  dusičnanu stříbrného.

Takto připravený roztok byl nanesen klocovací technikou na textilní materiál (PES wet-laid (textilie vyrobená za mokra) –  $m_s 32 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ , tloušťka 1 mm), vzorky byly poté umístěny do sušárny, kde byly sušeny při  $105^\circ\text{C}$  a fixovány při  $180^\circ\text{C}$  a  $200^\circ\text{C}$  po dobu 5 – 30 minut.

Z výsledků experimentů je patrné, že při nižších teplotách vzniká stříbrná sůl CMC, a naopak při vyšších teplotách jsou redukovány stříbrné nanočástice. EDS analýza (viz Graf 9) ukazuje, že nanočástice stříbra jsou v CMC rozmístěny ve formě velmi malých částic nebo iontů v celulóze matici. Snímky z elektronové mikroskopie jsou vyobrazeny na Obr.9 a 10.



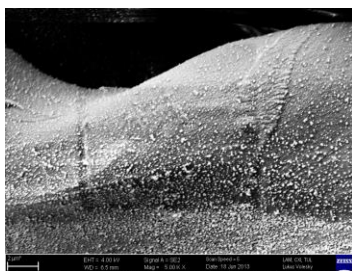
Graf 9: EDS spektrum vzorku PES wet laid, sušeného a fixovaného při  $200^\circ\text{C}$  po dobu 15 minut



Graf 10: Změna jasu PES vatelínu

Existuje korelace mezi teplotou a viditelným tmavnutím testovaných vzorků. Tmavnutí vzorků je znázorněno na Graf 0. Výsledný produkt obsahuje málo rozpustné stříbro ve formě nanočástic a málo rozpustné stříbrné soli CMC.

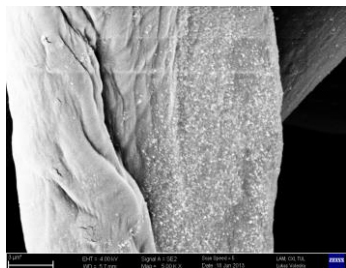




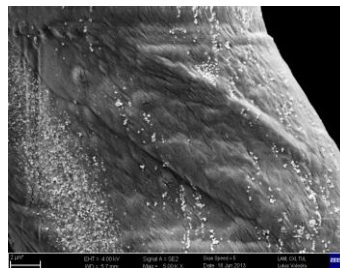
Obr. 11: vzorek 1 - Vitalux



Obr. 12: vzorek 1- denní světlo



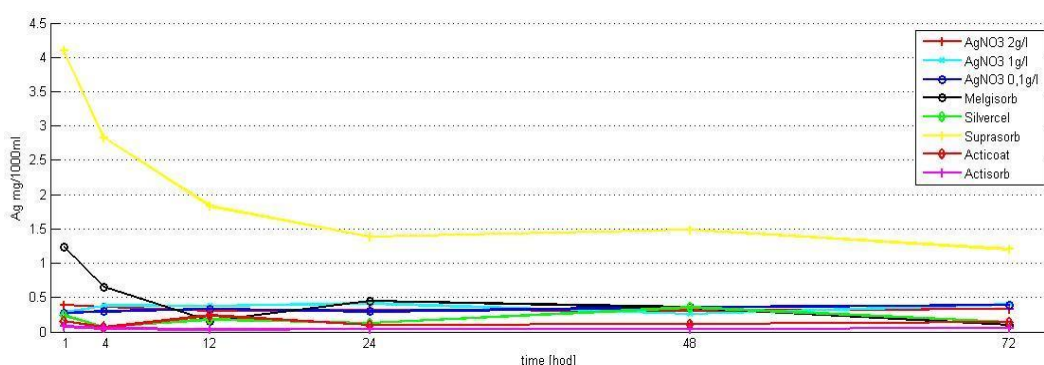
Obr. 13: vzorek 2 - Vitalux



Obr. 14: vzorek 2 - denní světlo

Snímky z elektronové mikroskopie jsou vyobrazeny v Obr. 11 až Obr.14. Rozdíl mezi metodami je v čase vystavení obou typům záření. Vzorky, které byly umístěny do UV skříně, byly vystaveny záření po dobu 2 hodin. Přičemž vzorky, které byly ponechány na denním světle, byly záření vystaveny po dobu 24 hodin. Doba ozařování byla stanovena podle změny barevnosti vzorku.

Z výsledků ICP analýzy (Graf11) vyplývá, že z CMC netkané textilie obsahující nanočástice a ionty stříbra se uvolňuje množství stříbra nezávisle na době louhování či množství použitého dusičnanu stříbrného (množství uvolněného stříbra  $0,3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Komerčně prodávaná krytí s obsahem stříbra uvolňují  $0,03 - 4,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  stříbra.



Graf 11: ICP – množství vylouhovaného stříbra ze vzorků

## 5.5 Porovnání vzorku CMC s obsahem stříbra, CMC lyofilizátu, CMC filmu upraveného plazmatem a CMC filmu zesíťovaného pomocí BDDGE

Všechny testované polymerní vzorky jsou na bázi karboxymethylcelulózy. Testovány byly 4 vzorky, které byly v podobě netkané textilie či filmu.

### *Vzorek č. 1*

První vzorek (plošná hmotnost  $60 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ , DS 0,385, pH 4,1), který je funkcionalizovaný nanočásticemi stříbra ( $\text{AgNO}_3$  o koncentraci 1 a  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Redukce nanočástic stříbra byla provedena pomocí UV záření. Ozařování se provedlo v uzavřené komoře s použitím vysoce výkonné halogenové lampy vytvářející silné záření v UVB oblasti (280 až 315 nm) a v oblasti UVA (315 - 380 nm). Vzorek byl ozařován po dobu 3 hodin.

### *Vzorek č. 2*

Druhý vzorek je opět z netkané textilie neutrálního charakteru (plošná hmotnost  $60 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ , DS 0,345, pH 6,6), která byla zlyofilizována za účelem dosažení mikroporézní hřejivé struktury dle parametrů uvedených v kapitole 5.3.

### *Vzorek č. 3*

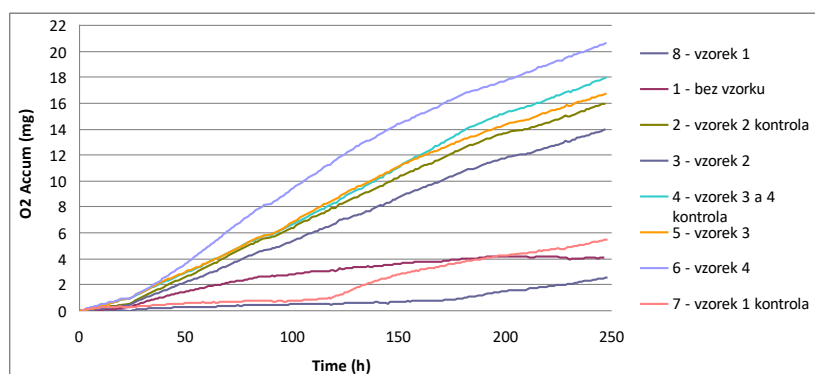
Třetí vzorek je film vyrobený z roztoku sodné soli karboxymethylcelulózy ( $\text{Na}^+\text{CMC}$ , DS 0,7) o koncentraci  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Roztok byl sušen v silikonové formě při pokojové teplotě po dobu 7 dní. Takto připravený film byl následně plazmaticky upraven dle parametrů uvedených v kap. 4.4.3.2. Vzorek byl plazmatu vystaven po dobu 90 s.

### *Vzorek č. 4*

Pro přípravu vzorku byl využit roztok čisté CMC o koncentraci  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDGE) a dále 10% roztok persíranu draselného ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ). Do 20 ml roztoku CMC bylo přidáno 0,06 g BDDGE a 2 ml 10 %  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ . Takto připravený vzorek byl umístěn do horkovzdušné sušárny nastavené na reakční teplotu  $80^\circ\text{C}$  po dobu 8 hodin.

#### 5.5.1 Test biocidity/biodegradability

Nejnižší respirace byla pozorována u vzorku č. 1 – vzorek obsahující stříbro. Zvýšená respirace u daného vzorku nastala až v čase cca. 170, do této doby lze vzorek považovat za zcela „antibakteriální“, degradace nosiče nenastává. Po čase 170 hodin dochází k pozvolnému nárůstu počtu bakterií, tj. respirace se mírně zvyšuje. Přítomnost nanočástic v případě vzorku č. 1 snižuje respirační aktivitu bakterií oproti kontrole (Graf12). Tento výsledek koresponduje s výsledky předchozího měření tvorby bakteriálního biofilmu.



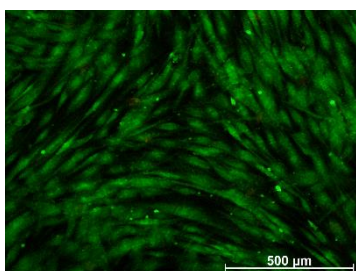
Graf 12: Kumulativní spotřeba kyslíku

## 5.5.2 Testování cytotoxicity

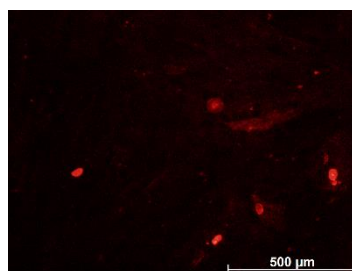
### 5.5.2.1 Live/Dead

Použitými vitálními barvivy v tomto experimentu byly Calcein AM pro živé buňky (zelená fluorescence – indikuje intracelulární esterázovou aktivitu) a Ethidium bromide pro mrtvé buňky (červená fluorescence – indikuje ztrátu integrity plasmatické membrány).

#### Kontrolní vzorek



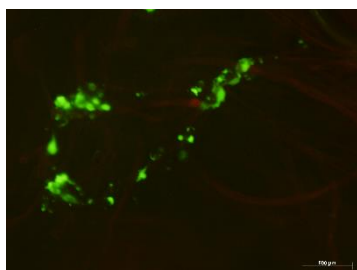
Obr. 15: Kontrolní vzorek – živé buňky



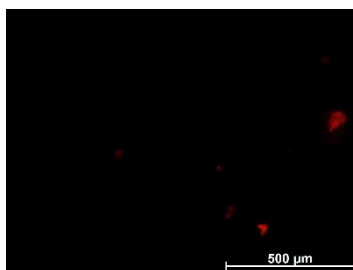
Obr. 16: Kontrolní vzorek – mrtvé buňky

Z výše uvedených obrázků (Obr.5, Obr.16) je zřejmé, že fibroblasty dobře udržují zelený Calcein v cytoplazmě a vykazují normální morfologii.

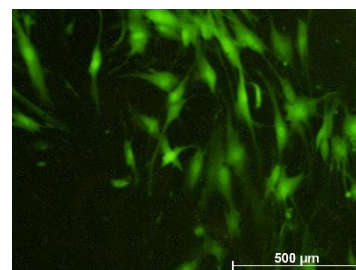
#### Vzorek č. 1



Obr. 17: Vzorek č. 1 – živé buňky



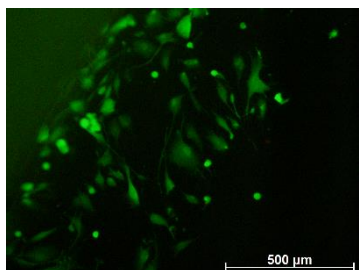
Obr. 18: Vzorek č. 1 – mrtvé buňky



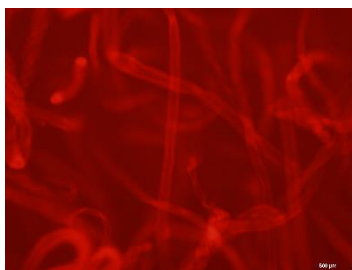
Obr. 19: Vzorek č. 1 – živé buňky, jamka pod vzorkem

Na vzorku č. 1 (Obr.17 až Obr.19) je malé množství živých buněk. Mrtvé buňky jsou špatně zobrazitelné díky fluorescenci samotného vzorku. V okolí vzorku jsou přítomny živé buňky, ačkoli je vzorek ovlivňuje.

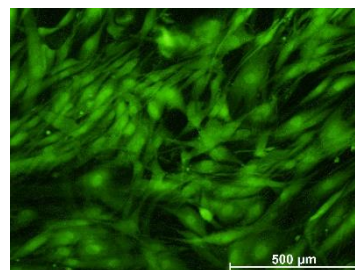
#### ***Vzorek č. 2***



Obr. 20: Vzorek č. 2 – živé buňky



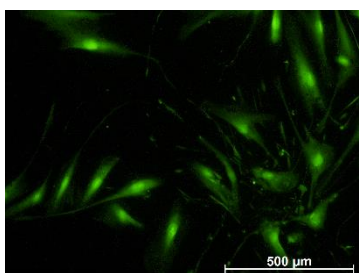
Obr. 21: Vzorek č. 2 – mrtvé buňky



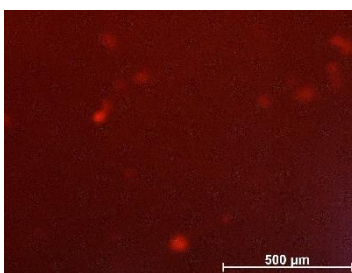
Obr. 22: Vzorek č. 2 – živé buňky, jamka pod vzorkem

Ze snímků vzorků č. 2 (Obr.20 až Obr.22) je patrný vyšší výskyt živých buněk jak na samotném vzorku, tak i v jeho okolí. Nebyla nalezena žádná mrtvá buňka.

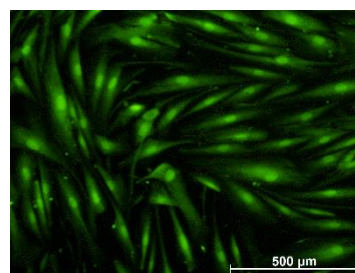
#### ***Vzorek č. 3***



Obr. 23: Vzorek č. 3 – živé buňky



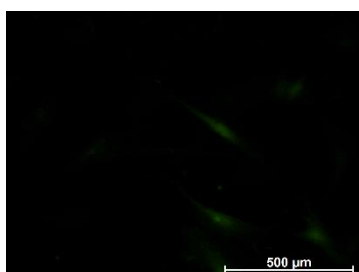
Obr. 24: Vzorek č. 3 – mrtvé buňky



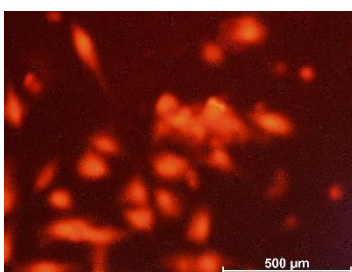
Obr. 25: Vzorek č. 3 – živé buňky, jamka pod vzorkem

Na vzorku č. 3 (Obr.3 až Obr.5) se vyskytují živé i mrtvé buňky. Živé buňky fibroblastů mají značnou převahu nad mrtvými. Vzorek výrazným způsobem neovlivňuje životaschopnost buněk v okolí vzorku.

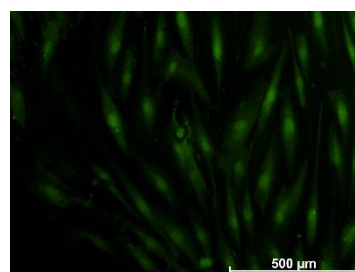
#### ***Vzorek č. 4***



Obr. 27: Vzorek č. 4 – živé buňky



Obr. 28: Vzorek č. 4 – mrtvé buňky



Obr. 29: Vzorek č. 4 – živé buňky, jamka pod vzorkem

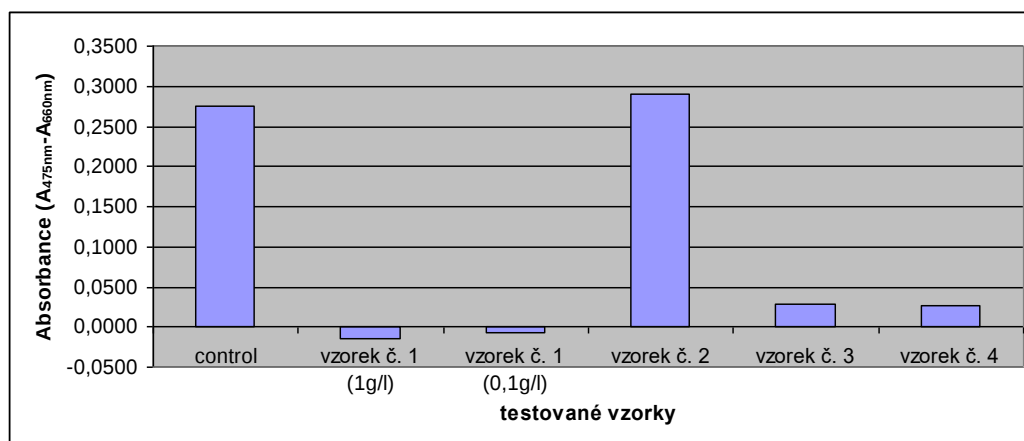
Na vzorku č. 4 (Obr.27 až Obr. 29) se opět vyskytují živé i mrtvé buňky. Mrtvé buňky fibroblastů mají v tomto případě značnou převahu nad živými. Vzorek ovlivňuje životnost buněk v okolí vzorku, ale i přesto jsou buňky schopny přežít.

#### 5.5.2.2 XTT

Tento experimentů byl 5x zopakován. Pro všechny provedené testy byl reakční čas v inkubátoru 3 hodiny a 40 minut. Následně byla měřena absorbance jednotlivých jamek za použití filtru pro specifickou absorbanci 475 nm a filtru pro nespecifickou absorbanci 660 nm. Výsledky neměřené specifické absorbance jsou uvedeny v Tab.6. Vyšší naměřená hodnota absorbance znamená vyšší množství živých buněk.

Tab.6: Specifická absorbance

| Absorbance ( $A_{475nm}-A_{660nm}$ ) |                                                |                                                  |             |             |             |
|--------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| kontrola                             | vzorek č. 1 ( $1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) | vzorek č. 1 ( $0,1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) | vzorek č. 2 | vzorek č. 3 | vzorek č. 4 |
| 0,2754                               | -0,0144                                        | -0,0077                                          | 0,2911      | 0,0277      | 0,0275      |



Graf 13: Výsledky XTT

Z výsledků XTT testu (Graf13) vyplývá, že vzorek č. 1 (obě koncentrace použitého dusičnanu stříbrného) je pro buňky fibroblastů silně toxický. Výsledky vzorky č. 2 jsou lepší než naměřené výsledky u kontrolního vzorku. Naměřená absorbance je u vzorku č. 3 a 4 téměř shodná. Oba tyto vzorky jsou pro buňky fibroblastů toxické, ale i přesto zhruba desetina buněk přežila v porovnání s kontrolním vzorkem.

## 6 Zhodnocení výsledků a nových poznatků

Cílem disertační práce bylo vytvořit CMC hydrogel v různých formách, některé pro růst buněk jiné naopak pro antimikrobiální krytí.

V rámci práce byly navrženy a zavedeny metody pro síťování CMC a testování CMC hydrogelů. Za nejlepší metodu síťování CMC považují síťování fyzikálními metodami (mrazíciemi cykly, vysokou teplotou). Kritériem výběru byl co možná nejvyšší poměr absorpce/rozpuštěnost, což odpovídá zamýšlené aplikaci jako krytí ran. Další zajímavá metoda síťování se dle výsledků jeví síťování s využitím vakuového plazmatu. Testování absorpce bylo provedeno i v různých tlumivých roztocích podobných krevní plazmě.

Připravené hydrogely byly testovány pro jejich vhodnost pro růst buněk a jako nosiče nanočástic. Nanočástice byly redukovány z dusičnanu stříbrného, a to zvýšenou teplotou, UV zářením či kyselinou askorbovou. Dle předpokladu vzorky ve svém objemu obsahují stříbrné ionty i nanočástice kovového stříbra. Přičemž byla prokázána i antibakteriální aktivita kyselé formy CMC (i bez nanočástic) nebo neutrální formy, která byla okyselena kyselinou askorbovou. Výsledky uvolňování stříbra ze vzorků textilií do fyziologického roztoku poskytly informaci o tom, že množství uvolněného stříbra ze vzorku netkané textilie kyselého typu CMC (s koncentrací použitého dusičnanu stříbrného  $0,1 - 2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) je obdobné množství uvolněného stříbra z komerčně prodávaných vzorků antibakteriálních krytí s obsahem stříbra. Z důvodu podpory rány se lépe hojit byl do CMC rovněž přidán alaptid. Byla provedena celá řada biologických experimentů na stanovení toxicity připravených vzorků či na vhodnost vzorků k proliferaci buněk.

Díky schopnosti CMC absorbovat extrémní množství vody byla navržena metoda tvorby mikroporézní struktury pomocí lyofilizace (mrazová sublimace), kdy se voda odpařuje ze zmražených vzorků. V principu se jedná o sublimaci krystalků ze zmrzlého produktu za sníženého tlaku. Vzniklé páry prochází sušenou částí produktu na povrch a dále pokračují komorou přístroje do kondenzátoru. Právě při tomto průchodu par skrz vzorek dochází k otevírání struktury vzorku a tvorbě mikroporézní „pěnové“ struktury. Tato vysoce porézní struktura odpovídá všem požadavkům na materiály vhodných pro proliferaci buněk.

Celkově lze shrnout, že CMC je velmi perspektivní materiál, který je netoxický a biodegradabilní. Právě pro tyto vlastnosti je předurčen pro použití ve zdravotnických aplikacích. Z časových důvodů nebylo možné v práci obsáhnout více možných aditiv, které by podpořily hojení tkání a růst buněk. S ohledem na tuto skutečnost bych v budoucnu doporučila vyzkoušet více aditivních látek namísto nanočástic.

## 7 Seznam použité literatury

- [1] Roohani, M., Habibi, Y., Belgace, N. M., Ebrahim, G., Karimi, A. N., Dufresne, A.: *European polymer journal*. doi:10.1016/j.eurpolymj.2008.05.024
- [2] Hladík, V., a kolektiv: *Textilní vlákna*. SNTL, Praha, 1971
- [3] Blažej, A., Šutá, Š.: *Vlastnosti textilních vláken*. Alfa, Bratislava, 1981
- [4] Bodvik, R., Dedinaite, A., Karlson, L., Bergström, M., Bäverbäck, P., Pedersen, J., Edwards, L., Karlsson, G., Varga, I., Claesson, P.: *Aggregation and Network Formation of Aqueous Methylcellulose and Hydroxypropylmethylcellulose Solutions*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects (2008), doi:10.1016/j.colsurfa.2009.09.040
- [5] Paljevac, M., Primožič, Habulin, M., Novak, Z., Knez Ž.: *Hydrolysis of carboxymethyl cellulose catalyzed by cellulase immobilized on silica gels at low and high pressures*. Journal of Supercritical Fluids 43, 2007
- [6] Deutsche Celluloid Fabrik (Jansen). DE Patent 332,203, Jan 22, 1921
- [7] Chowdhury, J.K.: *Biochem. Z.* 148, pp. 76-97, 1924
- [8] Höppler, F.: *Chem.-Ztg.*, 66, pp. 132-135, 1942
- [9] Hollabaugh, C., Leland, H., et al.: *Carboxymethylcellulose*, Hercules Powder company, 943, October 1943
- [10] Huarong, N., Mingzhu, L., et al.: *Carbohydrate Polymers*, Sciencedirect, Vol.58, 2004, pp. 185-189
- [11] Ginkel, C.G., Gayton, S.: *The biodegradability and nontoxicity of carboxymethyl cellulose (DS 0,7) and intermediates*. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 15, No. 3, p. 270-274, 1996
- [12] Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H.: *Hydrogels in pharmaceutical formulations*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 50, 2000
- [13] Kreibitz, U., Boennemann, H., et al.: *Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials*, Vol. 3 (H. S. Nalwa, ed.), Academic Press, San Diego, pp. 1-87, 2001
- [14] Matthews, K.H., Stevens, H.N.E., Auffret, A.D., Humphrey, M.J., Eccleston, G.M.: *Lyophilized wafers as a drug delivery system for wound healing containing methylcellulose as a viscosity modifier*. International Journal of Pharmaceutics 289, pp. 51-62, 2005
- [15] Blomfeldt, T.O.J., Olsson, R.T., Menon, M., Plackett, D., Johansson, E., Hedenqvist, M.S.: *Novel foams based on freeze-dried renewable vital wheat gluten*. Macromol. Materials and Engineering 295, pp. 796-801, 2010
- [16] Jampilek, J., Opatřilová, R., Řezáčová, A., et al. inventors: *Alaptide: methods of effecting its solubility, membrane penetration and pharmaceutical composition for human and veterinary applications*. University of Veterinary and Pharmaceutical Science Brno, PV 2011-232
- [17] Pokorná, M.: *Sorpční schopnosti huminových kyselin*. DP 2011. Dostupné z: [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=36681](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=36681) [cit. 25.02.2018]
- [18] <https://www.knowyourbody.net/stratum-basale.html> [cit. 20.02.2019]
- [19] Wiley, J.: *Polymer Grafting and Crosslinking*. Public Health of Belgrade, Bul.Despota Stefana 54a and Paramita RayCopyright.2009.
- [20] Jaber, F.: *New routes for synthesis of environmentally friendly superabsorbent polymers*. Thesis, An-Najah National University, Palestine, 2012
- [21] Mihaljevič, M., Strnad, L., Šebek, O.: *Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii*. Chemické listy 98, pp. 123-130, 2004
- [22] Mikroskopie atomárních sil. „[http://nanometrologie.cz/cz/techs\\_afm.php](http://nanometrologie.cz/cz/techs_afm.php)“ [online]. [cit.12.02.2019]
- [23] Leonardis, M., Palange, A., Dornelles R., Hund, F.: *Use of cross-linked carboxymethyl cellulose for soft-tissue augmentation: preliminary linical studies*. Clinical Interventions, pp. 317-322, 2010

## 8 Práce autora se vztahem ke studované problematice

### 8.1 Publikace v odborných časopisech

1. Boruvkova, K., Wiener, J.: Water absorption in carboxymethyl cellulose. *Autex Research Journal*, 11/2011, vol. 11, No. 4, pp. 110-113, ISSN 1470-9589, IP 0,405
2. Boruvkova, K., Wiener, J., Kukreja S.: Thermal self cross-linking of carboxymethyl cellulose. *ACC Journal*, XVIII, 1/2012, Issue A, pp. 30-40, ISSN 1803-9782
3. Boruvkova, K., Wiener, J.: Properties of modified carboxymethyl cellulose prepared by lyophilization. *13th Autex World Textile Conference*, 05/2013 - *Autex research journal*, No. 3/2013, ISSN 1470-9589, IP 0,618

### 8.2 Příspěvek ve sborníku z konference

4. Boruvkova, K., Wiener, J., Mullerova, J.: Testing of carboxymethyl cellulose in fiber form. *13th International Conference Strutex*, 11/2011, Liberec, Czech republic, ISBN 978-80-7372-786-4
5. Boruvkova, K., Wiener, J., Ramadan, A., Saskova, J.: Surface modification of polyester fabric by silver nanoparticles in cellulose matrix. *Nanosmat*, Praha, 9/2012
6. Boruvkova, K., Wiener, J., Jakubickova, M.: Preparation and properties of microporous structures based on CMC. *Nanocon*, Brno, 10/2012, ISSN 978-80-87294-32-1
7. Boruvkova, K., Wiener, J.: Preparation of microporous structures based on CMC. *19th International Conference Strutex*, 11/2012, Liberec, Czech republic, ISBN 978-80-7372-913-4
8. Boruvkova, K., Wiener, J.: Preparation and properties of microporous structures based on carboxymethyl cellulose modified by silver nanoparticles. *XXIII IFATCC International Congress*, 05/2013, ISBN 9789639970335
9. Boruvkova, K., Wiener, J., Nemeckova, J., Safarova, V.: Synthesis of gold nanoparticles in the polymer matrix. *Nanocon*, 2013, ISBN 978-80-87294-44-4
10. Boruvkova, K., Wiener, J., Ramadan, A., Šašková, J.: Modification of nonwoven fabric by silver nanoparticles in a cellulose matrix, *Fiber Society Spring 2014 Conference*, Liberec, pp. 159-160, 5/2014
11. Boruvkova, K., Wiener, J., Kolinova, M.: Changes in selected properties of carboxymethyl cellulose materials after lyophilization. *Nanocon*, 2014, ISBN 978-80-87294-55-0
12. Boruvkova, K., Wiener, J.: Ion removal from waste water, *PAPN*, 2013, ISBN 978-80-7372-988-2
13. Boruvkova, K., Wiener, J., Kaminska, M., Kolinova, M.: Suitability of lyophilized polymers based on CMC for cell proliferation, *Nanocon*, 2015, 7th International Conference on Nanomaterials – Research and Application, Conference Proceedings, pp. 565-570

*Ostatní:*

14. Boruvkova, K., Wiener, J.: Preparation of microporous structures based on CMC by freeze drying. *Zpravodaj Spolku textilních chemiků a koloristů*, 4/2012, p. 27-31, ISSN 1214-8091

15. Boruvkova, K. Preparation of microporous structures containing silver nanoparticles. *Světlanka*, 2013 - *Workshop pro doktorandy FT a FS TUL*, ISBN 978-80-7372-987-5
16. Boruvkova, K.: Crosslinking of carboxymethyl cellulose by plasma treatment, *Světlanka*, 2014 - *Workshop pro doktorandy FT a FS TUL*, ISBN 978-80-7494-100-9
17. Boruvkova, K., Wiener, J.: Polymer films based on cellulose containing silver nanoparticles and vitamin C – ACC journal 1/2015

## 9 Práce autora mimo studovanou problematiku

18. Messiry, E. M., Al-Oufy, Fadel, N., Wiener, J., Boruvkova, K.: Investigation of plasma-NaOH/Thiourea/urea treatment on Moisture Management Properties of Knitted Polyester/ Lycra Sportswear Fabric 3rd CNCTI, 03/2015
19. Voleský, L., Borůvková, K., Bakalová, T., Kovačič, V., Louda, P.: Impregnating emulsion containing nanoparticles (TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> and ZrO<sub>2</sub>) reducing wear and improving the hydrophobic properties of various surfaces, *Nanocon*, 2015, 7th International Conference on Nanomaterials – Research and Application, Conference Proceedings, pp. 366-372
20. Bakalova, T., Svobodová, L., Rosická, P., Voleský, L., Borůvková, K.: Impact of natural nanoadditives SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> on the quality of machining process fluids and bactericidal properties, *Nanocon*, 2015, 7th International Conference on Nanomaterials – Research and Application, Conference Proceedings, pp. 331-336
21. Bakalova, T., Louda, P., Voleský, L., Borůvková, K., Svobodová, L.: Nanoadditives SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> in process fluids, *Manufacturing Technology*, 15(4), pp. 502-508, 2015
22. Boruvkova, K., Bakalova, T., Volesky, L., Louda, P.: The influence of nanoadditives on the biological properties and chemical composition of process fluids - *Journal of Physics: Conference Series*, 709(1), 012001, 2016
23. Voleský, L., Bakalova, T., Borůvková, K., Louda, P.: The impact of the deposition parameters on the mechanical properties of thin carbon layers – *Defect and Diffusion Forum* 368, pp. 95-98, 2016
24. Bakalova, T., Svobodová, L., Rosická, P., Voleský, L., Louda, P., Borůvková, K.: The application potential of SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> or AG nanoparticles as fillers in machining process fluids, *Journal of Cleaner Production*, 142, pp. 2237-2243, 2017
25. Kaczmarek, L., Kula, P., Warga, T., Pawlovski, W., Zawadzki, P., Borůvková, K.: Creation of a 3D structures based on the high strength metallurgical graphene, *Surface Review and Letters*, 2018, IP 0.734

## Citace

Databáze Scopus – 14 příspěvků

Databáze Web of Science – 10 příspěvků (IP 3x)

*h-index – 4 (dle databáze Scopus)*

*h-index – 2 (dle databáze Web of Science)*

Práce autora citovány ve 27 publikacích (bez autocitací).

Př.:

Bahrpaima, K., Fatehi, P.: Synthesis and Characterization of Carboxyethylated Lignosulfonate, *ChemSusChem* 11(17), pp. 2967-2980, 2018

Pinming, C., Sukgorn, N., Suhatcho, T., Chalapat, K., Siraleartmukul, K.: Humidity sensor using carboxymethyl cellulose hydrogel membrane, *13th International Conference on Electrical Engineering/Electronics, Computer, Telecommunications and Information Technology*, ECTI-CON 2016 7561435, 2016

Adusei-Gyamfi, J., Acha, V.: Carriers for nano zerovalent iron (nZVI): Synthesis, application and efficiency, *RSC Advances* 6(93), pp. 91025-91044, 2016

## Curriculum Vitae

---

Osobní údaje: **Ing. Karolína Voleská**

Datum narození: 28. 08. 1985

Národnost: ČR

Adresa: F.L.Čelakovského 4269/5, Jablonec nad Nisou 466 04

Telefon: +420 737 248 704

Email: karolina.voleska@tul.cz

---

Vzdělání:

- |              |                                                                                                                                                                                 |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2001 - 2005  | Střední odborná škola a Vyšší odborná škola obalové techniky Štětí<br>- Obalová technika – Maturitní studijní program                                                           |
| 2006 - 2009  | Technická Univerzita v Liberci<br>- Technologie a design – Bakalářský studijní program,<br>Bakalářská práce na téma: Pevnost šitých spojů vojenských taktických vest            |
| 2009 - 2011  | Technická Univerzita v Liberci<br>- Produktový management – Navazující Magisterský studijní program,<br>Diplomová práce na téma: Chemické modifikace celulóзовých vláken        |
| 2011 - dosud | Technická Univerzita v Liberci<br>- Textilní technika a materiálové inženýrství – Doktorské studium,<br>Disertační práce na téma: Karboxymethylcelulóza v textilních aplikacích |
- 

Certifikáty:

Trinity Entry Level Certificate in ESOL Skills for Life – anglický jazyk

Státní základní jazyková zkouška z anglického jazyka (B2)

## Stručná charakteristika dosavadní odborné, výzkumné a vědecké činnosti

### Doktorské studium

|                |                                                                                                                                                                                                      |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Studium        | Studium v prezenční formě doktorského studijního programu Textilní inženýrství, v oboru Textilní technika na Fakultě textilní Technické univerzity v Liberci.                                        |
| Seznam zkoušek | Makromolekulární chemie 04.12.2014<br>Experimentální technika v oboru 26.02.2015<br>Matematická statistika a analýza dat 02.08.2013<br>Specializace v oboru 01.07.2013<br>Sorpční procesy 04.07.2012 |
| SDZ            | Státní doktorská zkouška vykonána dne 22.06.2016 s celkovým hodnocením prospěl(a).                                                                                                                   |

### Pedagogická činnost

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Výuka          | Barvení a tisk textilií – asistence u cvičení<br>Textilní chemie – asistence u cvičení<br>Údržba textilií – asistence u cvičení                                                                                                                                                                                                            |
| Vedení DP a BP | Shezi, N.A.: <i>Carboxymethylcellulose in fiber form</i> , DP 2012<br>Jakubičková, M.: <i>Uvolňování prachových částic z bavlněné textilie po poškození</i> , DP 2013<br>Čermáková, P.: <i>Analýza vlastností vláken z králičí srsti</i> , DP 2014<br>Dohnalová, M.: <i>Struktury založené na síťované karboxymethylcelulóze</i> , DP 2015 |

**Výzkumné projekty** „Modifikované materiály pro léčbu chronických a akutních ran a  
Prevenici chirurgických infekcí ve zdravotnictví“ – TAČR, Program  
ALFA – Laboratorní technik  
„Dětská univerzita“ – Lektor  
„Ekologicky přijatelné způsoby plstění“ – MPO TIP (FR-TI4/296)  
– Laboratorní technik  
„Vodní nanodisperze pro funkční povrchové úpravy“ – TAČR,  
Program ALFA – Laboratorní technik  
TONAK a.s. – Hlavní řešitel projektu (FR-TI4/296)  
„Matricové systémy pro hojení kožních defektů pro humánní a  
veterinární použití“ – TAČR, Program ALFA (TA04010065)  
– Laboratorní technik  
„Optimalizace užitečných vlastností procesních kapalin s využitím  
nanostruktur“ – IA 05 (reg. č. – CZ.1.05/3.1.00.0306) – Technik  
specialista  
„Most vzdělávání, vědy a praxe“ – (reg. č. CZ.1.07/2.3.00/45.0030)  
– Lektor  
„Pokročilé hybridní pásy pro výrobu kompozit přesným vinutím“  
TAČR, program ZÉTA (TJ01000292) – Technický pracovník  
„Hybridní materiály pro hierarchické struktury“ - Operační program  
Výzkum, vývoj a vzdělávání  
(reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000843) – Technický  
pracovník

#### **Ostatní projekty**

SGS projekty:

2012 - Mikroporézní struktury na bázi celulózových derivátů (4871)

2013 - Vlastnosti polyfenolů sorbovaných do celulózových  
materiálů

2014 - Příprava mikroporézních struktur na bázi CMC pomocí  
lyofilizace (21026)

2015 - Recyklace vláknenných materiálů na bázi PAN

## **Zápis o vykonání státní doktorské zkoušky**

## **Vyjádření školitele doktoranda**

## **Oponentské posudky disertační práce**