

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VLIV PODMÍNEK SKLADOVÁNÍ NA VYBRANÉ VLASTNOSTI OXYCELULOSY

MARKÉTA PIŠLOVÁ, MICHAELA OPLTOVÁ,
KATEŘINA KOLÁŘOVÁ, VLADIMÍRA
VOSMANSKÁ a VÁCLAV ŠVORČÍK

Ústav inženýrství pevných látek, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha
pislovam@vscht.cz

Došlo 23.2.16, přijato 24.3.16.

Klíčová slova: oxycelulosa, hemostatikum, podmínky
skladování, povrchová analýza, rentgenová fotoelektronová
spektroskopie, skenovací elektronová mikroskopie,
antibakteriální vlastnosti

Úvod

Celulosa je nejrozšířenějším obnovitelným zdrojem na Zemi. Je široce využívána v papírenském, textilním, chemickém, potravinářském, kosmetickém, farmaceutickém a medicínském průmyslu^{1,2}. Celulosa vyniká především svými biologickými vlastnostmi: je bezpečná, biodegradabilní a biokompatibilní³ a díky tomu se u celulosových materiálů obvykle neobjevují problémy se zánětlivými reakcemi případně toxicitou⁴. Mezi jejich další výhody patří také cenová dostupnost a následně nízké náklady na zpracování⁵.

Celulosa je lineární polysacharid složený z anhydroglukosových jednotek spojených β -1,4 glykosidickými vazbami. Každá jednotka obsahuje tři hydroxylové skupiny, jednu primární a dvě sekundární, díky nimž může celulosa podléhat řadě reakcí, např. dochází ke vzniku nitrátů, esterifikaci, etherifikaci či oxidaci³. Právě oxidace je jedinou reakcí, která umožňuje vyrobit z celulosy oxidovanou celulosu, tj. oxycelulosu, což je materiál resorbovatelný v lidském těle. Oxidace hydroxylové skupiny na karboxylovou probíhá na uhlíku C-6; neprobíhá však zcela selektivně, protože může docházet i ke vzniku aldehydických či ketonických skupin na uhlících C-2 a C-3 (cit.^{6,7}).

Oxidací vzniká kyselá forma oxycelulosy, což je dáno přítomností karboxylových skupin na uhlíku C-6. Je relativně dobře rozpustná v závislosti na pH prostředí (typicky nad pH 7 (cit.⁸)). Lze ji proto rozpustit ve vodných roztocích organických bází (především v aminech), koncentro-

vaných alkáliích a hydroxidu amonném. Nerozpustná je naopak ve vodě, kyselinách a běžných organických rozpouštědlech³. Měla by být skladována v chladu (doporučuje se nepřekračovat teplotu 25 °C). V ideálním případě by se teplota skladování měla pohybovat do 10 °C, neboť již při laboratorní teplotě může docházet k pomalé degradaci. Rovněž přímé světlo při skladování podporuje degradační procesy².

Důležitost oxycelulosy tkví v její hemostatické funkci, kdy je zástava krvácení doprovázena jejím značným nabobtnáním při styku s tělními tekutinami a vytvořením efektivní „zátky“. To je podpořeno i koagulací krevních globulinů a albuminu v důsledku poklesu pH díky jejímu kyselému charakteru. Oxycelulosu lze s výhodou použít i u pacientů s poruchou koagulace krve³.

Tato práce studuje vliv skladování oxycelulosy za vhodných/nevhodných podmínek na vlastnosti v souvislosti s její hemostatickou funkcí (nasákavostí). Bylo studováno její chování ve vodných roztocích: (i) gravimetricky byla měřena nasákavost a (ii) potenciometricky pH. Povrchová morfologie byla sledována skenovací elektronovou mikroskopií (SEM) a změny chemického složení povrchu byly měřeny rentgenovou fotoelektronovou spektroskopií (XPS). Pro zjištění antibakteriální aktivity byly provedeny *in vitro* testy na environmentálním bakteriálním kmenu *S. epidermidis*.

Experimentální část

Používané chemikálie

V práci byly použity následující chemikálie: chlorid sodný (Lach-ner, Česká republika), fosfátový pufr (PBS) ve formě tablet (Sigma-Aldrich, USA) a destilovaná voda.

Používané materiály a jejich značení

Oxycelulosa (Synthesia, Česká republika), nesterilní tkanina světle žluté barvy, byla skladována dvěma způsoby za definovaných podmínek: (i) správné skladování v laboratorní chladničce (4 °C, vlhkost 70–85 %), (ii) nevhodné skladování v laboratoři (24 °C, vlhkost 40–60 %) po dobu dvou let. V obou případech byly vzorky uchovány v polyethylenových sáčkách na vzorky se zipovým uzávěrem a bez přístupu světla. Abychom prověřili míru degradace oxycelulosy, studovali jsme i urychlenou degradaci správně skladované celulosy a špatně skladované oxycelulosy a to po dobu 72 h při 60 °C. Pro snadnější orientaci budou vzorky v dalším textu označeny následovně: nedegradovaná oxycelulosa (A), degradovaná oxycelulosa (B), urychleně degradovaná oxycelulosa (C) a degradovaná oxycelulosa následně podrobená urychlené degradaci (D).

Analýza vzorků

Nasákavost vzorků byla stanovena standardním postupem⁷, kdy absorpce vody byla vypočítána jako rozdíl hmotnosti nasáklého a suchého vzorku vztaženého na hmotnost suchého vzorku. Vzorek byl po zvážení ponořen na 1 min do kádinky s destilovanou vodou. Poté byl vzorek vyjmut a ponechán po dobu 1 min ve svislé poloze okapat a poté opět zvážen. Kvůli statistice měření bylo váženo 10 vzorků.

Potenciometrické stanovení pH bylo měřeno na přístroji Orion Star A211 (Thermo Scientific). Vzorky o velikosti 5×5 cm² byly ponořeny do 50 ml destilované vody a PBS (pH 7,4) a hodnoty pH byly měřeny v kontinuálním režimu sběru dat každých 15 s po dobu 10 min.

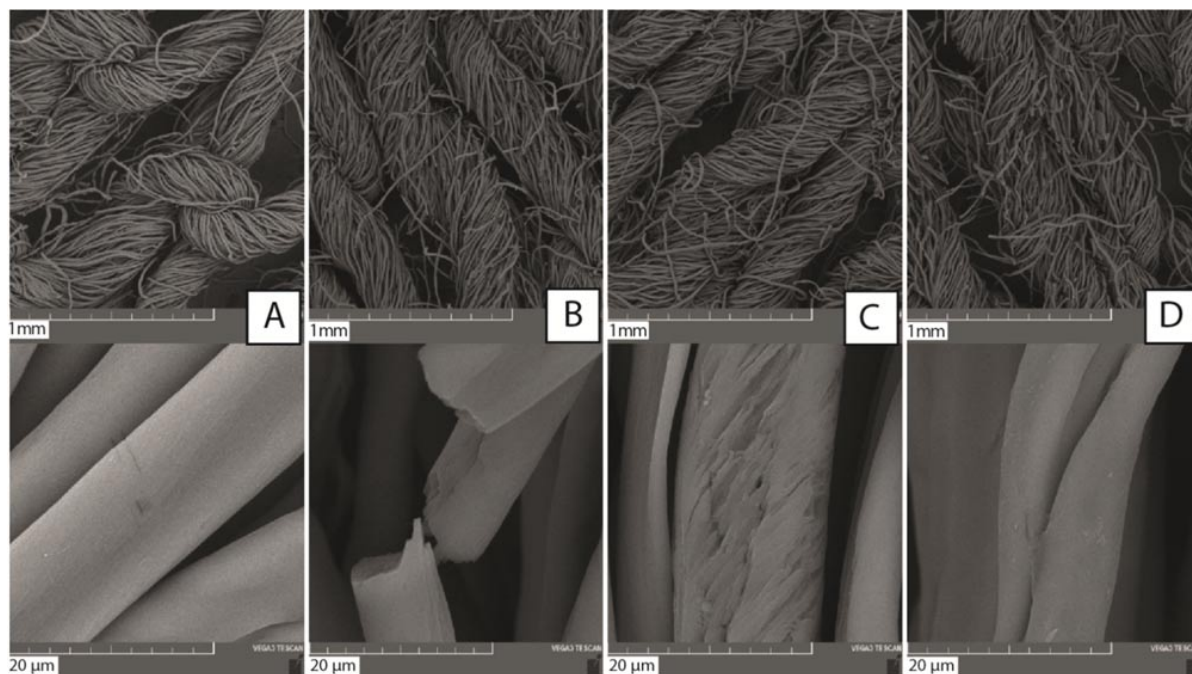
Chemické složení povrchu vzorků bylo studováno rentgenovou fotoelektronovou spektroskopií⁹ (XPS, ESCAProbeP spectrometr, Omicron Nanotechnology Ltd., Německo). Rozměr exponované oblasti byl 2×3 mm². Byl použit monochromatický zdroj rentgenového záření (1486,7 eV) s měřícím krokem 0,05 eV a vzorky byly měřeny pod úhlem 0° vzhledem k normále povrchu. Záření pronikalo do hloubky 1 nm. Měření byla provedena v ultravysokém vakuu.

Povrchová morfologie oxidované celulosy byla studována technikou skenovací elektronové mikroskopie¹⁰ (SEM, VEGA 3 LMU, TESCAN, Česká republika), při napětí 20 eV. Před vlastním měřením byly kvůli vodivosti vzorky pokoveny vrstvou 15 nm zlata.

Testy antibakteriálních vlastností byly provedeny *in vitro* na bakteriálním kmenu *S. epidermidis* (DBM 3179) z kolekce mikroorganismů VŠCHT Praha¹¹. Bakteriální kultury byly kultivovány 12 h v médiu Luria Bretani (LB) při 37 °C na orbitální třepačce. V den experimentu byla změřena optická hustota při 600 nm (OD₆₀₀) a inokulum bylo zředěno sterilním fyziologickým roztokem na hodnotu OD₆₀₀ = 1. *S. epidermidis* byl rozetřen na předsušené misky s LB agarem. Disky vzorků o ploše 0,785 cm² byly poté umístěny na misky. Všechny vzorky byly inkubovány za statických podmínek 24 h při 37 °C. Byly provedeny i kontroly (tj. misky bez vzorků). Každý vzorek i kontrola byly testovány po třech separátních kusech. Po uplynutí 24 h byly misky vyfotografovány a zóny vyhodnoceny v programu ImageJ 1.43 software (NIH, USA). Antibakteriální testy probíhaly za sterilních podmínek.

Výsledky a diskuse

Povrchová morfologie vzorků oxycelulosy byla studována metodou SEM. Ze snímků na obr. 1 je patrná změna způsobená degradací. U vzorku nedegradované oxycelulosy (obr. 1A) jsou zřejmá nepoškozená propletená vlákna. Naopak, u vzorku degradované oxycelulosy (obr. 1B) jsou patrná vlákna rozvolněná, rozštěpená a popraskaná. Dále byl pozorován vliv přirozené a urychlené degradace vzorků. Vlákna se během přirozené degradace lámou, za-



Obr. 1. Snímky oxycelulos pořízených pomocí SEM: nedegradovaná oxycelulosa (A), degradovaná oxycelulosa (B), urychleně degradovaná oxycelulosa (C) a degradovaná oxycelulosa podrobená urychlené degradaci (D)

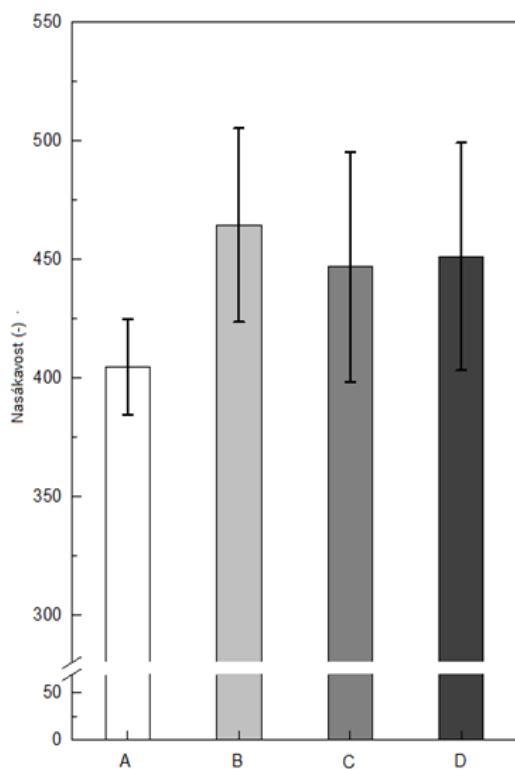
Tabulka I

Koncentrace sledovaných prvků (C a O) a jejich koncentrační podíl (O/C) stanovený metodou XPS ve studovaných vzorcích oxycelulosity

Vzorek	Koncentrace prvku [at. %]		Podíl O/C
	C (1s)	O (1s)	
Nedegradovaná oxycelulosa	70,60	29,40	0,42
Degradovaná oxycelulosa	68,16	31,84	0,47
Urychleně degradovaná oxycelulosa	69,18	30,82	0,45
Degradovaná oxycelulosa podrobená urychlené degradaci	67,99	32,01	0,47

tímco urychlenou degradací (obr. 1C) dochází ke vzniku trhlin ve struktuře jednotlivých vláken. Z obr. 1D je patrné, že u degradované oxycelulosity podrobené následné urychlené degradaci dochází k jakémusi „rozbalování“ vláken. Lze předpokládat, jak bude potvrzeno dále, že díky štěpení a poškození jednotlivých vláken dochází ke snížení pH a také ke zvýšení rozpustnosti vzorků oxycelulosity.

Nasákavost patří mezi jednu z nejdůležitějších vlastností oxycelulosity při její aplikaci v medicíně. Díky nasákavosti dokáže oxidovaná celulosa zabránit odtoku krve mechanickou cestou, protože dochází k jejímu nabobtnání



Obr. 2. Nasákavost oxycelulosity v PBS: nedegradovaná oxycelulosa (A), degradovaná oxycelulosa (B), urychleně degradovaná oxycelulosa (C) a degradovaná oxycelulosa podrobená urychlené degradaci (D)

a vytvoření efektivní „zátky“³. Z obr. 2 je patrné, že nejnižší hodnotu nasákavosti má nedegradovaná oxycelulosa a nejvyšší hodnotu má degradovaná oxycelulosa. I u vzorků, které byly podrobeny urychlené degradaci, se nasákavost mírně zvýšila.

Degradované vzorky byly hydrofilnější než nedegradovaná oxycelulosa, což by mohlo být způsobeno např. oxidací oxycelulosity při degradaci. Povrch vzorků oxycelulosity se z chemického hlediska skládá z uhlíku, vodíku a kyslíku. Míru oxidace a složení vzorků lze studovat metodou XPS. Výsledky XPS analýzy všech vzorků jsou uvedeny v tab. I. Byla sledována koncentrace C a O v povrchové vrstvě vzorku (6–8 atomových vrstev) a poměr O/C. Čím vyšší poměr byl stanoven, tím vyšší je míra oxidace vzorků. Nedegradovaná oxycelulosa skladovaná za správných podmínek měla nejnižší hodnotu poměru O/C. Během degradace došlo u urychleně degradované oxycelulosity (72 h při 60 °C) k oxidaci vzorku. Degradovaná oxycelulosa skladovaná za laboratorních podmínek po dobu 2 let a degradovaná oxycelulosa podrobená urychlené degradaci skladovaná za laboratorních podmínek po dobu 2 let a vystavená podmínkám urychlené degradace (72 h při 60 °C) měly stejnou hodnotu poměru O/C. Z těchto výsledků je patrné, že degradace oxycelulosity způsobená skladováním za laboratorních podmínek po dobu 2 let a urychlená degradace v laboratoři (72 h při 60 °C) vede k velice podobným změnám. Ale nedochází ke stejné významné oxidaci jako v případě nevhodně skladovaných vzorků, tudíž proces degradace nebyl zcela dokončen. Degradovaná celulosa vystavená podmínkám urychlené degradace již nevykazovala vyšší míru oxidace. Z toho lze vyvodit závěr, že po 2 letech byl materiál již zdegradován.

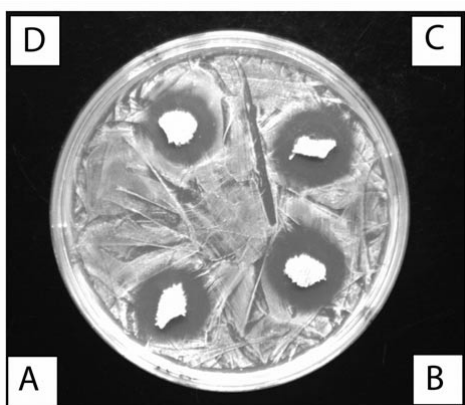
Diskový test je typický experiment pro zjišťování antibakteriálních vlastností materiálů. Antibakteriální účinek se hodnotí podle inhibiční zóny (zóny s nulovým růstem bakterií) vzniklé kolem materiálu během kultivace bakterií¹². Testy ukázaly, že antibakteriální účinek oxycelulosity není negativně ovlivněn degradací. Naopak – vliv degradace byl pozitivní a po degradaci oxycelulosity se inhibiční zóna zvětšila (obr. 3). Největší inhibiční zóna byla pozorována u vzorku degradované oxycelulosity a následně urychleně degradované oxycelulosity (tab. II).

To lze vysvětlit zvýšenou kyselostí materiálu, která byla prověřena chováním v destilované vodě a v PBS

Tabulka II

Průměrné velikosti inhibičních zón při antibakteriálních testech při nasazení na kmen *S. epidermidis* na studovaných vzorcích oxycelulosa

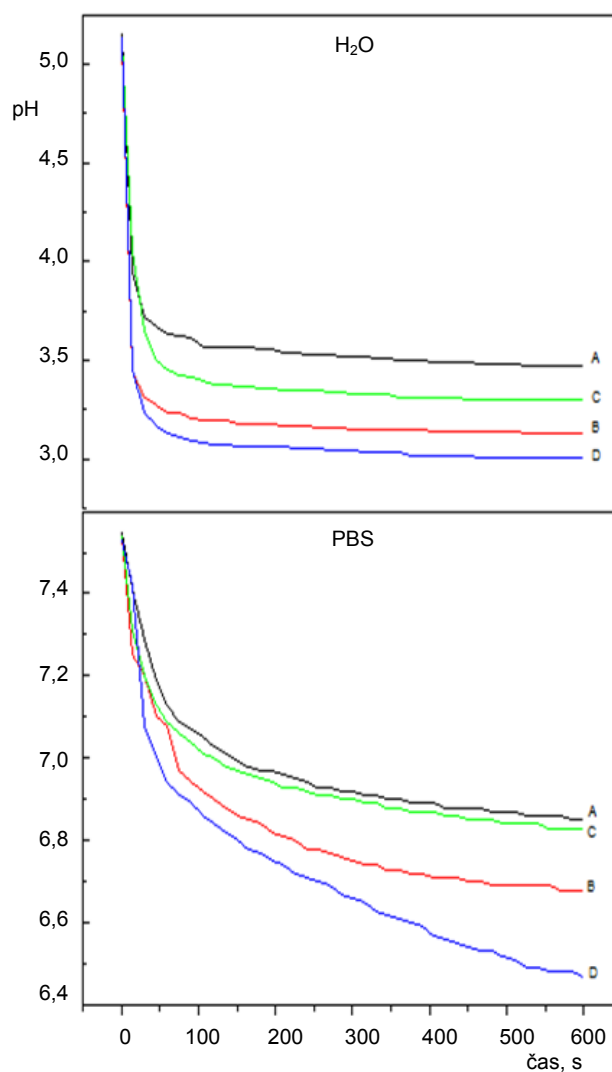
Vzorek	Průměr [mm]	Odchylka
Nedegradovaná oxycelulosa	1,96	± 0,03
Degradovaná oxycelulosa	2,18	± 0,01
Urychleně degradovaná oxycelulosa	2,10	± 0,01
Degradovaná oxycelulosa podrobená urychlené degradaci	1,88	± 0,08



Obr. 3. Diskový test antibakteriálních vlastností na kmen *S. epidermidis*: nedegradovaná oxycelulosa (A), degradovaná oxycelulosa (B), urychleně degradovaná oxycelulosa (C) a degradovaná oxycelulosa podrobená urychlené degradaci (D)

(obr. 4). Zvýšená kyselost je dána vznikem kyselých funkčních skupin – zejména karboxylových a hydroxylových – vlivem oxidativní degradace. Dobrým ukazatelem oxidace je poměr O/C, který s rostoucí mírou oxidace materiálu narůstá (tab. I). Výsledek je podpořen našimi předchozími studiemi, kdy oxycelulosa byla modifikována v argonovém plazmatu a také docházelo k oxidativní degradaci⁷. Nejmenší inhibiční zóna byla pozorována u degradované oxycelulosa podrobené urychlené degradaci a to navzdory nejnižšímu pH (obr. 3).

Oxycelulosa je jedním z nejrychleji degradujících polymerů při fyziologickém pH. Je dokonce označována také jako bioerodovatelný materiál, který se rozkládá v organismu i bez enzymatické podpory. Oxycelulosa se ve fosfátovém pufru kompletně rozkládá do 21 dní a v podmínkách *in vivo* se rozloží 80 % během 14 dní (cit.¹³). Na obr. 4 je znázorněna závislost pH prostředí na době expozice jednotlivých vzorků v destilované vodě a v PBS pufru. V obou roztocích byl pozorován stejný trend, tzn. nejvyšší hodnotu pH má nedegradovaná oxycelulosa. Naopak nejnižší hodnotu vykazuje degradovaná oxycelulosa podrobená urychlené degradaci. Důvodem nízkých hodnot pH u různým způsobem degradovaných vzorků je oxidace materiálu. Díky degradaci poškozeným



Obr. 4. Závislost hodnoty pH prostředí na době expozice oxycelulosa v destilované vodě (nahore) a v PBS (dole) pro nedegradovanou oxycelulosu (A), degradovanou oxycelulosu (B), urychleně degradovanou oxycelulosu (C) a degradovanou oxycelulosu podrobenou urychlené degradaci (D)

vláknům u těchto vzorků dochází také ke zvýšení rychlosti rozpouštění.

Z výsledků je zřejmé, že degradovaná oxycelulosa by mohla být použita k zástavě krvácení, pokud byla při skladování dodržena sterilita. Pro bezpečné použití degradované oxycelulosity by bylo nutné ověřit, zda nárůst aldehydic- kých skupin neirituje lidské buňky (to bude následně studováno). I na našem pracovišti bylo prokázáno, že celulosa a její deriváty jsou perspektivním materiálem v oblasti tkáňového inženýrství^{14–20}.

Závěr

Vlivem degradace oxycelulosity byly zaznamenány změny povrchové morfologie. Tyto změny však neovlivnily materiál v makroměřítku, neboť nedochází k jeho rozpadání ani masivnímu třepení vláken. Skenovací elektronovou mikroskopií bylo zjištěno, že morfologie degradované a nedegradované oxycelulosity je odlišná. Vlákna se „přirozenou“ degradací lámou, zatímco urychlenou degradací dochází ke vzniku trhlin ve struktuře jednotlivých vláken. Materiálové vlastnosti oxidované celulosity se vlivem degradace nezhoršily. Naopak vyšší nasákavost a nižší pH v destilované vodě a v prostředí simulované tělní tekutiny jsou v souvislosti s hemostatickou funkcí materiálu výhodnými změnami. Vzorky oxycelulosity skladované „nesprávným“ způsobem po dobu 2 let a urychleně degradované oxycelulosity se rozpouštěly v simulované tělní tekutině rychleji, než se rozpouštěly vzorky „správně“ skladované. Podle prvkové analýzy (XPS) povrchové vrstvy oxycelulosity bylo zjištěno, že degradace vlivem nesprávného skladování vede ke zvýšení množství kyslíku, tzn. k vyšší oxidaci. Vzorky si díky tomu zachovaly své antibakteriální vlastnosti způsobené právě kyselým pH a v případě degradované oxycelulosity se dokonce zlepšily. Závěrem lze říci, že i degradovaná celulosa by mohla být použita k zástavě krvácení, pokud byla při skladování dodržena sterilita.

Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentury ČR v projektu P108/12/1168 a AZV ČR 15-33018A.

LITERATURA

- Hou Q., Liu W., Liu Z., Duan B., Bai L.: *Carbohydr. Polym.* 74, 235 (2008).
- Gajdziok J., Chalupová M., Masteiková R.: *Čs. Slov. Farm.* 56, 259 (2007).
- Bajerová M., Krejčová K., Rabišková M., Gajdziok J., Masteiková R.: *Adv. Polym. Technol.* 28, 199 (2009).
- Kollar P., Suchý P., Muselík J., Bajerova M., Havelka P., Sopuch T.: *Čs. Slov. Farm.* 57, 11 (2008).
- Siqueira G., Bras J., Dufresne A.: *Polymers* 2, 728 (2010).
- Kolářová K., Vosmanská V., Rimpelová S., Švorčík V.: *Cellulose* 20, 953 (2013).
- Vosmanská V., Kolářová K., Rimpelová S., Švorčík

- V.: *Cellulose* 21, 2445 (2014).
- Pendharkar S. Hemostatic wound dressing containing aldehyde-modified polysaccharide: Google Patents; 2002.
- Slepička P., Vasina A., Kolská Z., Luxbacher T., Macková A., Malinský P., Švorčík V.: *Nucl. Instrum. Methods B* 268, 2111 (2010).
- Švorčík V., Rybka V., Hnatowicz V., Smetana K.: *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 8, 435 (1997).
- Siegel J., Kolářová K., Vosmanská V., Rimpelová S., Leitner J., Švorčík V.: *Mater. Lett.* 113, 59 (2013).
- Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C., Turck M.: *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493 (1966).
- Dimitrijevič D., S., Tatarko M., Gracy R., W., Linsky C., B., Olsen C.: *Carbohydr. Res.* 195, 247 (1990).
- Pišlová M., Kolářová K., Vosmanská V., Kvítek O., Švorčík V.: *Chem. Listy* 109, 942 (2015).
- Vosmanská V., Kolářová K., Rimpelová S., Kolská Z., Švorčík V.: *RSC Adv.* 5, 17690 (2015).
- Slepička P., Slepičková Kasálková N., Siegel J., Kolská Z., Bačáková L., Švorčík V.: *Biotechnol. Adv.* 33, 1120 (2015).
- Báčáková L., Filová E., Pařízek M., Ruml T., Švorčík V.: *Biotechnol. Adv.* 29, 739 (2011).
- Vosmanská V., Barb R. A., Kolářová K., Rimpelová S., Heitz J., Švorčík V.: *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, DOI:10.1080/1023666X.2016.1156897
- Kolářová K., Vosmanská V., Rimpelová S., Ulbrich P., Švorčík V.: *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15, 10120 (2015).
- Novotná K., Havelka P., Sopuch T., Lisá V., Bačáková L., Kolářová K., Vosmanská V., Švorčík V.: *Cellulose* 20, 2263 (2013).

M. Pišlová, M. Opltová, K. Kolářová, V. Vosmanská, and V. Švorčík (*Department of Solid State Engineering, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Influence of Storage Conditions on Selected Properties of Oxidized Cellulose**

In this research, influence of storage conditions on properties of oxidized cellulose was studied with respect to its haemostatic function. The aim was to examine changes of the properties of oxidized cellulose stored properly and that stored at laboratory conditions for 2 years. We studied surface morphology and chemical composition, as well as absorption of the simulated body fluid, behaviour in aqueous environment via potentiometric measurement of pH, and antimicrobial activity *in vitro* on the *S. epidermidis* bacteria. It was found out that the material properties of oxidized cellulose did not deteriorate. Higher absorption of simulated body fluid, lower pH in water and simulated body fluid represented positive changes with respect to the haemostatic function. Due to the acidic nature of the material, degraded oxidized cellulose preserved its antibacterial properties.