Využití proteinových hydrolyzátů jako nosičů aktivních látek

Zdenka Šimková

Bakalářská práce
2016

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství polymerů
akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Zdenka Šimková**
Osobní číslo:	**T14703**
Studijní program:	**B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor:	**Polymerní materiály a technologie**
Forma studia:	**prezenční**
Téma práce:	**Využití proteinových hydrolyzátů jako nosičů aktivních látek**

Zásady pro vypracování:

Cílem práce bude vypracovat rešerši o proteinových hydrolyzátech a jejich využití jako nosičů aktivních látek použitelných v potravinářství, lékařství a farmacii.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

WOOL, Richard P. Bio-based polymers and composites. Amsterdam: Elsevier Academic Press, c2005, 620 s. ISBN 01-276-3952-7.
SIMPSON, W a G CRAWSHAW. Wool: science and technology. Cambridge, England: Woodhead, c2002, 368 s. ISBN 08-493-2820-9.
GENNADIOS, Aristippos. Protein-based films and coatings. Boca Raton: CRC Press, 2002, 650 s. ISBN 15-871-6107-9.
DALEV, Pencho G. Utilisation of waste feathers from poutry slaughter for production of a protein concentrate. Bioresource Technology. 1994, 48(3), 265-267.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Ondřej Krejčí, PhD.**
Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání bakalářské práce: **15. ledna 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2016**

Ve Zlíně dne 1. března 2016

doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická
L.S.

Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ……Obor: …….

P R O H L Á Š E N Í

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně ....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT:

Tato práce pojednává o proteinových hydrolyzátech a jejich využití v oborech potravinářství, lékařství a farmacii. V úvodní části je souhrn obecných informací o proteinech a jsou zde rozepsány některé vlastnosti kolagenu a keratinu, na které je tato práce cílena. Dále jsou v práci popsány nejběžnější způsoby hydrolýzy proteinů a informace o aktivních látkách a nosičích. Stěžejní je část věnující se využití keratinových a kolagenních hydrolyzátů v různých oborech a aplikacích.

Klíčová slova: aktivní látka, nosič, keratinový hydrolyzát, kolagenní hydrolyzát, želatina

ABSTRACT:

This thesis discusses the protein hydrolysates and their use in the fields of the food, medicine and pharmacy. The first part is a summary of general information about proteins and there are specified some properties of collagen and keratin, which is the work focused. Further, there are described the most common processes for the hydrolysis of proteins and information active substances and carriers. The main part is dedicated to the use of keratin and collagen hydrolyzate in various fields and applications.

Keywords: active substance, carrier, keratin hydrolyzate, collagen hydrolyzate, gelatin

Tímto chci poděkovat svému vedoucímu Ing. Ondřeji Krejčímu za odborné vedení, čas, který strávil nad pročítáním této bakalářské práce, jakož i za jeho rady a připomínky při výběru vhodných zdrojů a tvorbě textu.

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

OBSAH

I. TEORETICKÁ ČÁST 11
1 PROTEINY 12
1.1 KLASIFIKACE PROTEINŮ 12
1.1.1 SPECIFICKÁ FUNKCE 12
1.1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ 13
1.1.3 ROZDĚLENÍ PODLE TVARU A ROZPUSTNOSTI 13
1.1.4 ROZDĚLENÍ PODLE LOKALIZACE V ORGANISMU 13
1.2 STRUKTURNÍ PROTEINY 13
1.2.1 KERATINY 13
1.2.2 KOLAGENY 14
1.3 HYDROLÝZA PROTEINŮ 16
1.3.1 KYSELÁ HYDROLÝZA 16
1.3.2 ALKALICKÁ HYDROLÝZA 16
1.3.3 ENZYMOVÁ HYDROLÝZA 16
2 AKTIVNÍ LÁTKY 17
2.1 TENZIDY 17
2.1.1 IONTOVÉ TENZIDY 17
2.1.2 NEIONTOVÉ TENZIDY 18
2.2 AKTIVNÍ SLOŽKY LÉČIV 19
2.3 AKTIVNÍ SLOŽKY HNOJIV 20
3 NOSIČE AKTIVNÍCH LÁTEK 21
3.1 PROTEINOVÉ NANOČÁSTICE 21
3.2 HYDROGELOVÉ NOSIČE 22
4 PROTEINOVÉ HYDROLYZÁTY JAKO NOSIČE 23
4.1 KERATINOVÉ HYDROLYZÁTY 23
4.1.1 KERATINOVÉ FILMY 23
4.1.2 FILMY, VLÁKNA, PĚNY A LEPIDLA 25
4.1.3 HYDROGEL PRO BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE 27
4.2 KOLAGENNÍ HYDROLYZÁTY 28
4.2.1 ŽELATINOVÝ NOSIČ KOSTNÍCH FRAGMENTŮ 28
4.2.2 REKOMBINANTNÍ ŽELATINA VE VAKCÍNÁCH 30
4.2.3 RYCHLE SE ROZKLÁDAJÍCÍ LÉKY 32
ZÁVĚR 35
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 36
SEZNAM OBRÁZKŮ 39
SEZNAM TABULEK 40

ÚVOD

Proteiny jsou přírodní biopolymery sestávající z několika set až tisíc aminokyselin. Proteinogenních aminokyselin je 20 druhů, z toho 9 je pro člověka esenciálních. Proteiny plní v lidském těle hned několik důležitých funkcí, podílejí se například na hormonální regulaci systému, jsou součástí enzymů, pomáhají při komunikaci buněk, tvoří některé ochranné a obranné látky, zajišťují aktivní transport molekul přes buněčné membrány, podílí se na výstavbě organismu a v případě krajní nutnosti mohou sloužit i jako zdroj energie (po vyčerpání sacharidových a lipidových zásob).

V této práci jsou stěžejní dva proteiny, a to kolagen a keratin, které řadíme mezi strukturní proteiny, protože jsou nedílnou součástí buněk. Oba jsou nerozpustné ve vodě a mají do jisté míry odolnost vůči chemikáliím. Kolagen tvoří hlavně chrupavky, vazy, šlachy, kosti, cévní stěny, je součástí obalů orgánů, a jiné. Keratin se uplatňuje zejména při tvorbě vlasů, nehtů, chlupů, rohoviny a peří.

Jejich hydrolýzou (štěpení bílkovin, přesněji jejich peptidových vazeb, což vede k rozpadu struktury až na aminokyseliny) je možné rozšířit jejich uplatnění v různých oborech. Proteinové hydrolyzáty lze získat několika způsoby, nejpoužívanější je však kyselý, alkalický a enzymový způsob. Jak už je zřejmé z jejich názvu, liší se použitým činidlem, kterým je kyselina, hydroxid, nebo enzym. Výsledné produkty se od sebe liší některými vlastnostmi, což je dáno odlišnými reakcemi s činidlem a rozšiřuje se tak jejich uplatnění do několika různých odvětví. Keratinové hydrolyzáty našly své uplatnění v zemědělství, potravinářství, farmacii, ale hlavně v kosmetickém průmyslu. Kolagenní hydrolyzáty, zejména želatina, mají široké uplatnění ve farmaceutickém průmyslu.

Povrchově aktivní látky se dokážou shlukovat na rozhraní dvou fází a tím ovlivnit vzájemnou mezifázovou energii. Řadíme sem většinu organických látek. Tenzidy, jak se jim jinak říká, mají tendenci shlukovat se v micely, což je dáno tím, že ve své molekule mají část hydrofobní s část hydrofilní., a proto je pro ně tento stav energeticky výhodný. Z hlediska schopnosti disociace ve vodném prostředí se dělí na iontové a neiontové.

Aktivní složky léčiv jsou látky, které se dají různě upravovat tak, aby v těle působily specificky v místě určení. Svým působením ovlivňují fyziologické děje, mohou tlumit bolest, nebo jen pomáhají při prevenci.

Naproti tomu aktivní látky hnojiv podporují růst a vývoj rostlin. Nejčastěji jsou zastoupeny prvky dusík, fosfor a draslík, objevovat se však ve hnojivech mohou i stopové prvky, jako je například síra, které rovněž ovlivňují vývoj rostliny. Přidáním proteinů se docílí lepšího vstřebávání výživových a podpůrných složek hnojiv.

Nosiče jsou látky, které jsou schopné navázat aktivní složku a napomáhají jí v distribuci a uvolňování v místě určení, přičemž navázání může být povrchové, nebo vnitromolekulární. V kapitole o nosičích jsou zmíněny dvě skupiny, nanonosiče a hydrogely. U obou forem se s výhodou používá jako výchozí materiál želatina, protože je dostupná, levná, snadno se zpracovává a má dobré vlastnosti, jako je třeba biologická rozložitelnost a inertnost.

Poslední kapitola této práce se zabývá hydrolyzáty a jejich aplikací v různých odvětvích. U keratinů se jedná hlavně o filmy, které mohou být použity jako obalový materiál potravin, ale i léčiv, protože mají dobrou rozpustnost a nemají žádnou chuť ani vůni, kterými by ovlivnily obalovaný materiál. Keratinové filmy, nebo hydrogely lze využít i jako konstrukci pro buňky při medicínských aplikacích. Svůj význam mají keratiny i v kosmetickém průmyslu, ve kterém se využívají hlavně při regeneraci a úpravě vlasů a pozitivnímu vlivu na pokožku.

Kolagenní hydrolyzáty, zejména želatina se nejvíce uplatňují ve farmacii, kde jsou nedílnou součástí léků, ale i vakcín. V lécích se využívá hlavně jako nosič, může mít dokonce vliv na aktivní látku (upravuje její rozpustnost), ale nesmí žádným způsobem měnit její biologickou aktivitu. Ve vakcínách se želatina používá spíše jako stabilizátor a má za úkol uchovat nezměněnou aktivitu stěžejní látky vakcíny.

Cílem práce je vypracovat rešerši o proteinových hydrolyzátech jako nosičích aktivních látek a jejich uplatnění ve farmacii, lékařství, kosmetickém a zemědělském průmysl. Obsahem by měl být souhrn obecných informací o proteinech a jejich hydrolýze, o aktivních látkách a jejich možných nosičích a konkrétní příklady využití proteinových hydrolyzátů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 PROTEINY

Proteiny, nebo též synonymně bílkoviny, jsou vysokomolekulární látky-biopolymery, jejichž relativní molekulová hmotnost je vyšší než 10 000. Jejich základem je polypeptidový řetězec, tvořený vzájemnou vazbou sta až několika tisíc aminokyselin. *[1]*

V buňkách existuje několik tisíc typů různých proteinů, které jsou složeny pouze z 20 proteinogenních aminokyselin. Velký počet druhů bílkovin je dán různým pořadím těchto aminokyselin. *[2]*

1.1 Klasifikace proteinů

Proteiny se dělí podle různých kritérií, základní je rozdělení do čtyř skupin podle:

- Specifické funkce
- Chemického složení
- Tvaru a rozpustnosti
- Lokalizace v organismu

1.1.1 Specifická funkce

Katalytické bílkoviny (enzymy): Podílí se prakticky na všech chemických reakcích v těle.

Regulační bílkoviny: Součást proteohormonů, regulace exprese genů, vytváření prostorové struktury DNA, sbalování proteinů do nativní formy, přenos buněčného signálu.

Ochranná funkce: U savců primárně imunoglobuliny rozpuštěné v tělních tekutinách.

Zdroj a zásobárna AMK: Např. kasein je zdroj aminokyselin pro sající mláďata, proteiny v semenech rostlin slouží jako náhrada proteinů živočišných (sójový protein).

Skladovací funkce: Proteiny schopné na sebe specificky navázat potřebné nízkomolekulární látky či ionty (svalový protein myoglobin na sebe váže molekulový kyslík).

Transportní funkce: Přenos látek (přeprava kyslíku z krve do tkání pomocí hemoglobinu).

Strukturní funkce: Úkolem strukturních proteinů je podílet se na výstavbě buněk, orgánů, ale i celých organismů. Patří sem zejména kolageny a keratiny. *[2]*

1.1.2 Chemické složení

Proteiny dělíme z chemického hlediska na jednoduché a složené (konjugované). Složené bílkoviny obsahují kromě základního polypeptidového řetězce i nepeptidové složky.

Glykoproteiny: Obsahují mono nebo oligosacharidy (enzymy, hormony, bílkoviny krevní plasmy, aj.).

Fosfoproteiny: Obsahují zbytky H_3PO_4 (esterová vazba, vázány na tyrosin, treonin, serin).

Metaloproteiny: Obsahují ionty kovů (koordinační vazba, nejčastěji Fe, Zn, Mg, Mn, Ni).

Chromoproteiny: Obsahují barevnou část (jsou schopny absorbovat elektromagnetické záření ve viditelné oblasti).

Lipoproteiny: Komplexy s lipidy (v krevní plasmě, cytoplasmě, vaječném žloutku aj.).

Nukleoproteiny: Komplexy s nukleovými kyselinami (podílejí se na procesech ukládání a přenosu genetické informace). *[2]*

1.1.3 Rozdělení podle tvaru a rozpustnosti

Globulární bílkoviny (sféroproteiny): Mají nepravidelný kulovitý či elipsoidní tvar. Jsou rozpustné ve vodě a zředěných roztocích neutrálních solí (v podstatě micelární struktura)

Fibrilární proteiny (skleroproteiny): Mají vláknitý tvar, jsou nerozpustné ve vodě a ve zředěných roztocích solí. Mají vysoký obsah periodických sekundárních struktur. *[2]*

1.1.4 Rozdělení podle lokalizace v organismu

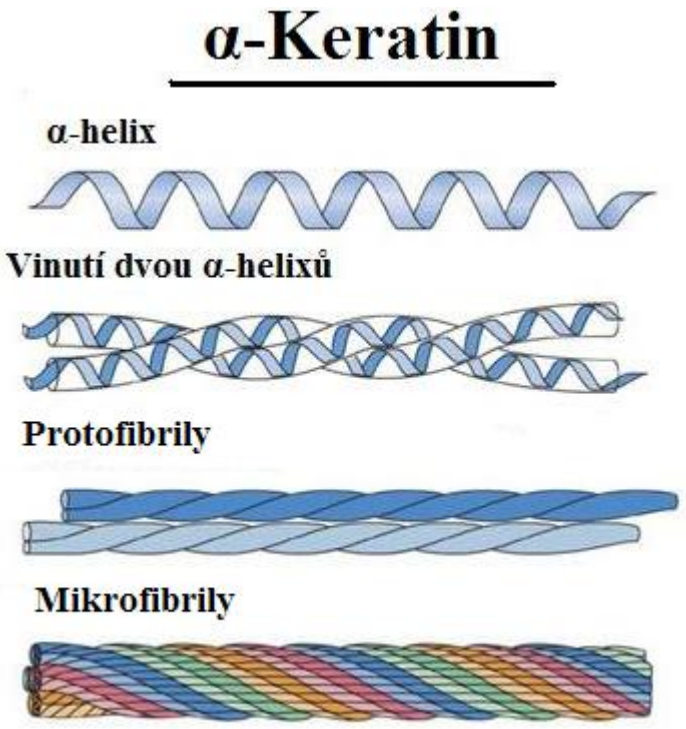
Z tohoto hlediska se proteiny dělí především na intracelulární (vnitrobuněčné) a extracelulární (mimobuněčné). Do tohoto dělení můžeme přidat i podskupinu proteinů sérových (plasmových, plasmatických), či mléčné proteiny (kaseiny a syrovátkové bílkoviny). *[2]*

1.2 Strukturní proteiny

1.2.1 Keratiny

Významná skupina fibrilárních bílkovin. Jsou nerozpustné ve vodě a odolné vůči chemickým a fyzikálním vlivům. Podílejí se na výstavbě vláken cytoskeletu vlasů, chlupů, nehtů, rohů a peří.

Hlavní skupinou keratinů jsou α-keratiny. Jejich struktura je tvořena zejména α-helixem (dva α-helixy vytváří levotočivou šroubovici). Tvrdost, pružnost a nerozpustnost jim dodávají četné disulfidové můstky. Nabotnávání keratinu ve vodném prostředí závisí na jeho složení (stupeň uspořádání, orientace), přičemž se voda váže do míst s nejmenším působením kohezních sil. V těchto místech najdeme především velké množství polárních zbytků aminokyselin. Keratiny obsahují vysoký podíl glycinu, serinu a cysteinu. *[2, 3]*



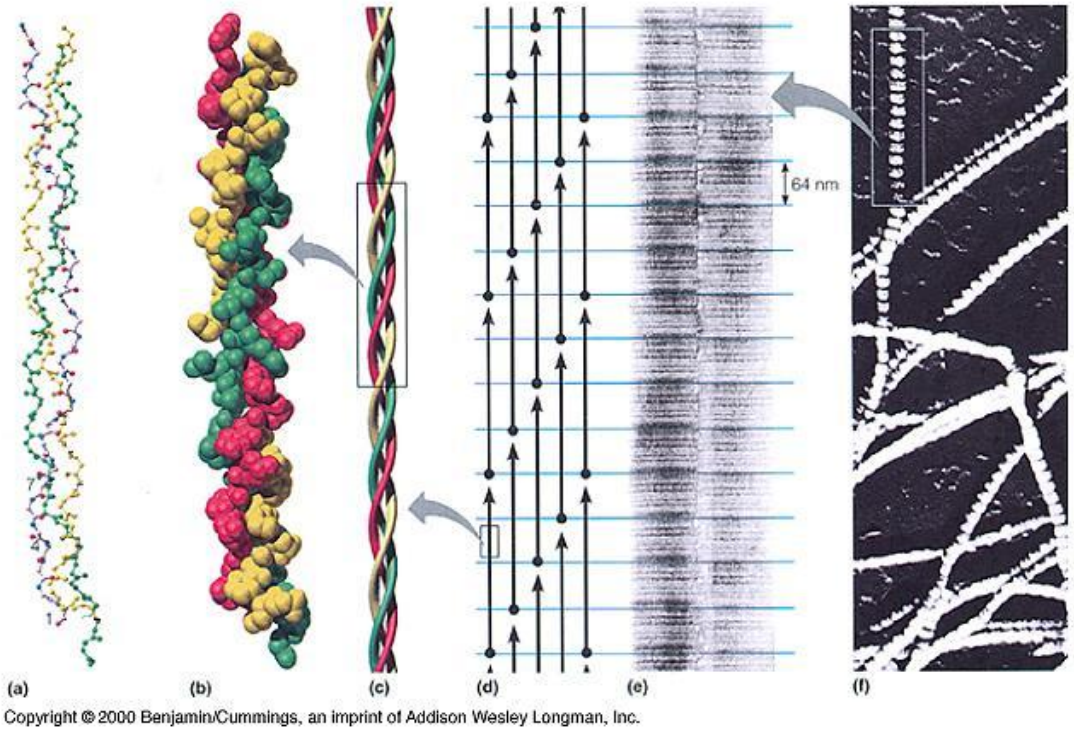
Obrázek 1. Struktura α-keratinu *[7]*

1.2.2 Kolageny

Kolageny jsou extracelulární bílkoviny fibrilárního tvaru. Stálé, nerozpustné ve studené vodě, roztocích solí slabých kyselin a zásad a organických rozpouštědlech. Charakteristická je pro ně vysoká pevnost v tahu (dáno jejich strukturou). Jsou základem pojivových a vazivových tkání, jako je kůže, chrupavky, kosti, cévní stěny, šlachy a zuby.

Kolageny jsou schopny vázat vodu. Tato schopnost závisí na typu kolagenu a také na pH. Působením teplé vody se kolageny mění ireverzibilně na želatinu či klihy.

Základem jsou jednotky tropokolagenu, které se stáčí do podoby pravotočivého superhelixu. Navíc jsou tropokolagenní jednotky v lineárním seřazení posunuty o asi ¼ délky. U kolagenu jsou nejvíce zastoupeny aminokyseliny glycin, prolin a hydroxyprolin. *[2,4]*



Obrázek 2. Struktura kolagenu *[8]*

(a-c) tři podjednotky (vlákna) kolagenu se vzájemně stáčí do trojité šroubovice

(d - e) přilehlé kolagenní molekuly jsou rozloženy svými konci 67 nm od sebe (posun o cca ¼ délky), vytváří viditelné pruhy ve struktuře kolagenu.

Želatina

Získává se hydrolýzou kolagenu, který je obsažen hlavně v kůži a pojivových tkáních. Existují dva hlavní typy želatiny, A a B. Liší se typem hydrolýzy, což ovlivňuje vlastnosti jako je molekulová hmotnost, isoelektrický bod, složení aminokyselin, a viskozitu. Želatina je netoxická, má nízkou antigenicitu, je dobře metabolizovatelná, levná na výrobu a snadno se síťuje. Uvolňování léčiva z želatinového nosiče je ovlivnitelné stupněm zesítění a zvoleným typem želatiny (A nebo B). *[21]*

1.3 Hydrolýza proteinů

Podstatou hydrolýzy bílkovin je štěpení peptidových vazeb, což vede k samotné izolaci AMK. Proteinový hydrolyzát lze získat několika způsoby, třemi nejvyužívanějšími jsou: Kyselá, alkalická a enzymová hydrolýza. Hydrolýza proteinů je obtížná, není snadné získat čisté hydrolyzáty. Předpokladem je v některých případech špatná rozpustnost požadované aminokyseliny ve vodě (záleží to na druhu aminokyseliny, který chceme získat). K izolaci některých aminokyselin se využívá tvorba nerozpustných sloučenin. Naráz lze izolovat jednu nebo jen několik aminokyselin z celé směsi. *[1]*

1.3.1 Kyselá hydrolýza

Vzorek je uveden do varu společně s kyselinou chlorovodíkovou, která se z hydrolyzátu nakonec oddestiluje, nebo kyselinou sírovou, která je z hydrolyzátu odstraněna ve formě síranu. Nevýhodou této metody je destrukce tryptofanu a vznik huminových látek odbouráváním cukerných složek (ovlivnitelné kovovým cínem, kyselinou mravenčí apod.).

1.3.2 Alkalická hydrolýza

Vzorek je vařen pod tlakem společně s hydroxidem barnatým, který je poté z hydrolyzátu odstraněn účinkem oxidu uhličitého nebo se k vysrážení použije přesně vypočítané množství kyseliny sírové. Při této metodě dochází k rozkladu sirných aminokyselin (cystein), hydroxyaminokyselin (serin, treonin) a argininu. Proto je tento druh hydrolýzy nejméně využíván.

1.3.3 Enzymová hydrolýza

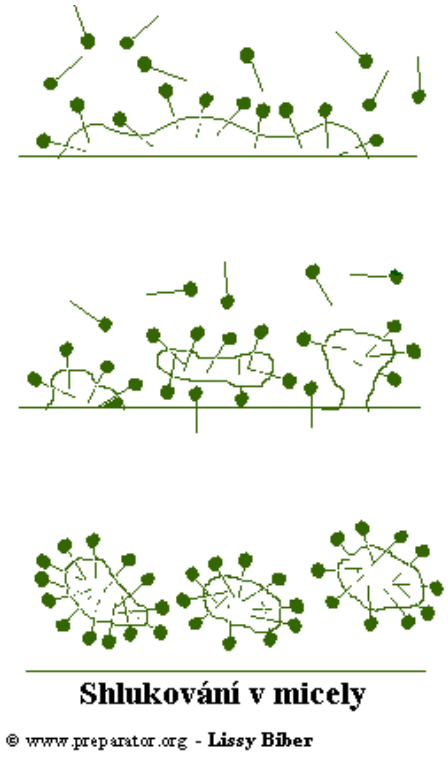
Nejšetrnější způsob štěpení peptidových vazeb; nedochází zde k destrukci uvolňovaných aminokyselin. Metoda je založena na specifickém štěpení peptidové vazby mezi určitými aminokyselinami. K tomu se zpravidla využívá směs proteolytických enzymů. Tato metoda je velmi citlivá, proto se často provádí ve sterilních podmínkách či za přidání antibiotik do reakční směsi. *[1]*

2 AKTIVNÍ LÁTKY

2.1 Tenzidy

Většina organických látek vykazuje v roztocích povrchovou aktivitu, což znamená, že se dokážou hromadit na rozhraní dvou prostředí a tím ovlivnit jejich vzájemnou mezifázovou energii. Existuje však skupina látek, která má tyto vlastnosti již při velmi malých koncentracích (10^{-5} – 10^{-1} hm. %).

Z hlediska struktury jsou to převážně lineární látky. Významnou vlastností je tzv. amfipatie, což znamená, že molekula obsahuje jak část hydrofobní, tak část hydrofilní. Mají tendenci shlukovat se v micely. Klasifikujeme je zejména z hlediska schopnosti disociovat ve vodě na iontové a neiontové. *[5]*



Obrázek 3. Jak tenzidy pracují *[9]*

2.1.1 Iontové tenzidy

Aniontické tenzidy

Nositel povrchové aktivity je zde anion (záporně nabitý ion). V technické praxi jsou nejrozšířenější. Nejlepších vlastností a nejvyššího účinku dosahují v alkalickém prostředí.

Jsou klasifikovány podle charakteru polárních skupin a jejich způsobu navázání na molekulu. Ten může být buď přímo na hydrofobní část, nebo je látka navázána pomocí můstku.

Využívají se hlavně kvůli smáčecím, detergenčním, emulgačním a suspenzačním schopnostem. Řadíme sem karboxylové kyseliny, deriváty sulfonových kyselin, deriváty kyseliny sírové a deriváty kyseliny fosforečné. *[5]*

Kationtické tenzidy

Nositel povrchové aktivity je zde kation (kladně nabitý ion). Do této skupiny řadíme především látky typů primárních, sekundárních a terciárních aminů a kvarterních amoniových zásad. Liší se od sebe především rozpustností ve vodě. První tři typy se rozpouští pouze v kyselém prostředí, kvarterní amoniové soli se rozpouští v kyselém, neutrálním i zásaditém prostředí. V oděvním a koželužském průmyslu se využívají hlavně kvůli změkčujícím účinkům na vlákno a velkému antistatickému účinku. Mají také dobré antikorozní a antimikrobní vlastnosti. Řadíme sem zejména aminosloučeniny s bazickým dusíkem a sloučeniny sulfonového typu. *[5]*

Amfoterní tenzidy

Jedná se o sloučeniny s jednou či více funkčními skupinami a schopností disociovat ve vodném prostředí. Podle pH roztoku tvoří kationový (kyselé pH) nebo anionový (zásadité pH) tenzid. Díky svým vlastnostem jsou velmi často využívány. V alkalickém prostředí mají vlastnosti anionických tenzidů, v prostředí kyselém zase kationických. Nevýhodou může být ztráta vlastností v izoelektrickém bodě. Řadíme sem hlavně alkylované aminokyseliny a hydrolyzáty proteinů. *[6]*

2.1.2 Neiontové tenzidy

Tyto tenzidy nemají schopnost disociovat ve vodném prostředí. Dělí se na tenzidy rozpustné ve vodě a v olejích, potažmo organických rozpouštědlech (ve vodném prostředí emulgují vodu). Rozpustnost je závislá na teplotě, citlivě reagují i na pH prostředí a tvrdost vody. Polární skupiny těchto tenzidů tvoří hlavně étericky vázaný kyslík a hydroxylová skupina. Využívají se v textilním a kožedělném průmyslu pro své smáčecí, emulgační, detergenční a mazací vlastnosti. Rovněž mají antistatický účinek a sníženou schopnost vytvářet pěny. Řadíme sem soli karboxylových kyselin a vícevazebných kationtů (mýdla), alkoholy (velká hydrofobní část), estery, étery. *[5]*

2.2 Aktivní složky léčiv

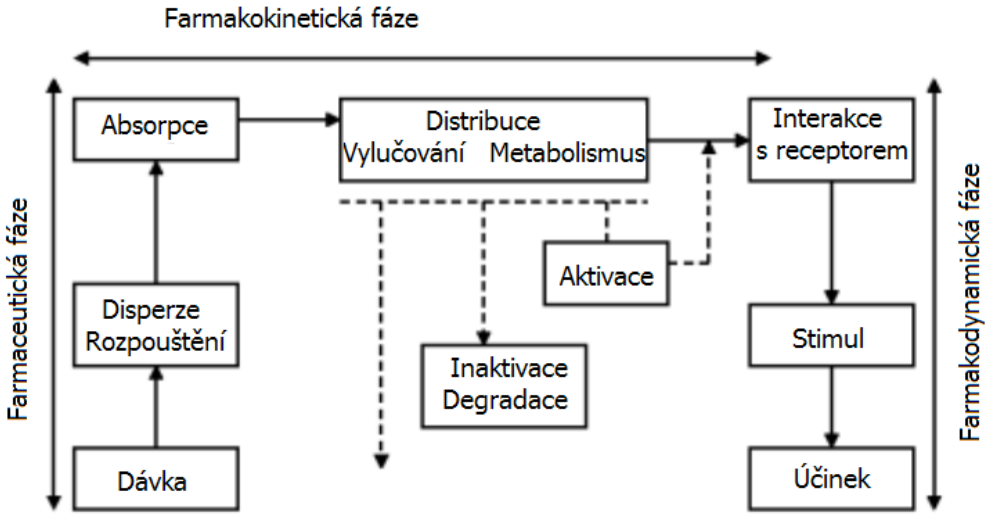
Aktivní látka je zde jakákoli složka léčiva vykazující farmakologickou aktivitu nebo jiný účinek při diagnóze choroby, léčení, zmírnění příznaků, ošetření, nebo prevenci. Aktivní složky léčiv se mohou podrobit chemickým změnám při jejich výrobě a v léčivu jsou ve své modifikované formě, která zajišťuje jejich specifickou aktivitu a účinek. *[24]*

Aktivní látky často obsahují nečistoty, ty se dělí do třech základních skupin:

1) Zbytková rozpouštědla (jejich množství je limitováno podle toho, o jaké rozpouštědlo se jedná. Ke stanovení se využívá plynová chromatografie).
2) Anorganické nečistoty (zejména těžké kovy, jejichž hodnota je rovněž limitována).
3) Organické nečistoty (ty mohou vznikat při výrobě aktivní látky, nebo při skladování jako produkty rozkladných reakcí).

Léčivo obsahující aktivní látku prochází v organismu několika fázemi, při kterých dochází k uvolnění léčivé látky z nosiče a její působení v místě určení.

a) Farmaceutická fáze, při které dochází k uvolnění aktivní složky z léku.
b) Farmakokinetická fáze, při které se rozhoduje o koncentraci látky v místě určení.
c) Farmakodynamická fáze, při které aktivní látka reaguje s příslušnými receptory a projevuje se její farmaceutický účinek. *[25]*



Obrázek 4. Fáze přeměn léčiva v organismu *[25]*

2.3 Aktivní složky hnojiv

Zdravý růst a vývoj rostliny je závislý na různých živinách, z nichž nejdůležitějšími jsou dusík (růst listů a produkce proteinů), fosfor (podporuje kořenový systém) a draslík (reguluje koloběh živin a vody v rostlině). Součástí hnojiv mohou být i stopové prvky, jako je například síra (syntéza proteinů) a hořčík (podílí se na tvorbě chlorofylu), dále pak vápník, sodík, železo, mangan, měď, zinek, kobalt a jiné. Aby mohly rostliny využít látky z hnojiv, musí mít pro ně přijatelnou podobu. Dusík je ve hnojivech zastoupen jako dusičnan amonný, kombinace dusičnanu amonného s vápencem (cca 80 % dusičnanu amonného a 20 % uhličitanu vápenatého) nebo ve formě močoviny. Fosfor se dodává jako vápenatý dihydrogenfosfát, nebo fosforečnan amonný, draslík se aplikuje jako chlorid draselný a síra v podobě síranu amonného a jiných sulfátových solí, nebo přímo elementární. *[26]*

Proteinové hydrolyzáty přidávané do hnojiv mají funkci ochranného koloidu, který napomáhá udržovat stabilitu hnojiva a vytváří na povrchu rostlin tenké ochranné vrstvy. Tyto kolagenové filmy umožňují přenášet stopové prvky a působí jako biostimulátor. *[27]*

Hydrolyzovaný protein slouží také jako promotor pro zlepšení vstřebávání všech primárních složek hnojiva, tedy fosforu, draslíku a dusíku. Zdrojem bílkoviny mohou být sója a jiné obilniny, nebo jakýkoli jiný produkt, který produkuje polypeptidy, peptidy a přirozeně se vyskytující aminokyseliny (alanin, arginin, cystin, glycin, histidin, hydroxyprolin, leucin a izoleucin, prolin, kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou, a jiné). Hydrolýza může být v tomto případě kyselá, alkalická i enzymová. Používané koncentrace NPK složek a hydrolyzátu se pohybují okolo 3 % až 4 % dusíku, 16 % až 18 % fosforu, 16 % až 18 % draslíku a 1 % až 2 % proteinového hydrolyzátu. Horní hranice hydrolyzátu je určena rozpustností, s výhodou se používá poměr polyfosforečnanu na hydrolyzát v rozmezí od asi 200:1 až 20:1. *[28]*

3 NOSIČE AKTIVNÍCH LÁTEK

3.1 Proteinové nanočástice

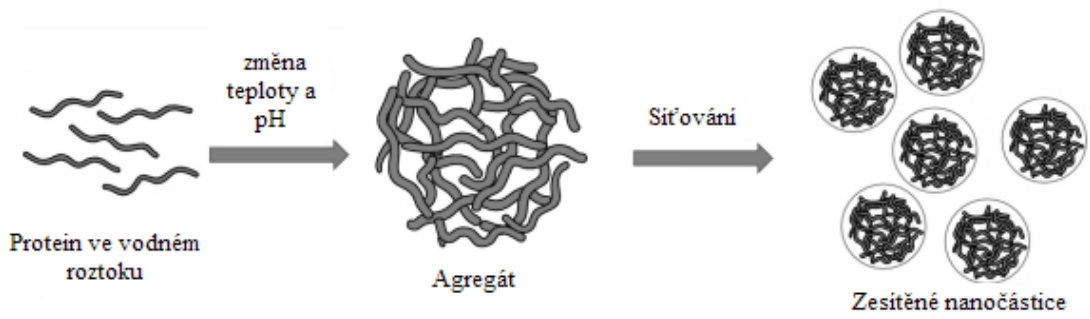
Nanočástice jsou koloidní částice o velikosti 10-1000 nm. Při vytváření nanočástic je kontrolována hlavně velikost částic, její povrchové vlastnosti a schopnost uvolňovat aktivní látku tak, aby měla požadovanou rychlost rozpouštění a dávkování v určeném místě. Dalšími dobrými vlastnostmi je jejich biokompatibilita, biologická rozložitelnost a antigenicita. Výhodou je možnost přenosu malých molekul (hydrofilních, nebo hydrofobních), proteinů, peptidů a nukleových kyselin. Nanonosiče mohou pozitivně ovlivňovat i průběh uvolňování aktivní látky, její rozpustnost a stabilitu. Pro výrobu nosiče lze použít například polymery, polysacharidy, lipidy a proteiny.

Proteiny jsou ideálním materiálem pro výrobu nanočásticového nosiče, protože dobře reagují jak s léčivem, tak s rozpouštědly. Jsou snadno biologicky odbouratelné, dobře zpracovatelné pro povrchové úpravy a umožňují snadné uchycení léčiv a jiných cílových látek. Použít lze například albumin, elastin, želatinu, zein, sójové proteiny, mléčné a syrovátkové proteiny, a mnoho dalších. *[21]*

Příprava nanočástic je založena na vyrovnávání přitažlivých a odpudivých sil v proteinu. Protein prochází konformačními změnami v závislosti na jeho složení, zesítění a podmínkách přípravy, jako je pH a typ rozpouštědla. Rozkládání proteinů probíhá například interakcí s thioly. Poté následuje tepelné nebo chemické zesítění, při kterém jsou již na povrch zachyceny molekuly aktivní látky.

Pro výrobu proteinových nanonosiču se hojně využívá koacervace. Principiálně je založena na rozpustnosti proteinů v rozpouštědlech. Přídavkem činidla dojde ke změně konformace a následnému vysrážení proteinu. Po vytvoření nanočástic dochází k zesítění chemickými činidly (například glutaraldehyd), nebo k tepelnému síťování. Organická rozpouštědla, jako je aceton a etanol, se používají jako anti-rozpouštědla pro přípravu proteinových nanočástic. Hodnota pH před reakcí je kritickým faktorem, který určuje velikost částic (vyšší hodnota pH umožňuje výrobu menších částic).

Aktivní látky mohou být na povrch částic vloženy povrchovou adsorpcí, nebo jsou zabudovány do částice během procesu přípravy. *[21]*



Obrázek 5. Příprava proteinových nanočástic koacervací *[21]*

3.2 Hydrogelové nosiče

Použití hydrogelů jako nosičů je výhodné, protože jsou inertní vůči látkám, které se na ně vážou. Nevýhodou je však uvolňování látky z hydrogelového nosiče, které je velmi rychlé a nemůže tak působit dlouhodobě, což je v některých aspektech léčby požadováno. K dosažení prodlouženého uvolňování se využívá molekulárních interakcí, které znehybní aktivní látku na nosiči. Doba rozpadu může být ovlivněna použitím poly-iontového komplexu (hydrogel reaguje s nabitými makromolekulami), který zajišťuje postupné uvolňování aktivní látky. Hydrogely se s výhodou připravují z želatiny, která má obecně velmi dobré vlastnosti. Další jedinečnou předností je její elektrická povaha, které se liší způsobem zpracování kolagenu. Alkalickou hydrolýzou se tvoří želatiny, které mají vysokou hustotu karboxylových skupin. Ty tvoří molekulu želatiny s negativním nábojem. Kyselá želatina je chemicky zesítěná pro přípravu hydrogelu. Obsah vody v hydrogelu se snižuje zvyšováním koncentrace síťovacího činidla. Želatinové hydrogely jsou biologicky rozložitelné, ale nerozkládají se mimotělně, protože na ně nepůsobí žádný enzym. Hydrogel ztrácí svou hmotnost s narůstajícím časem v těle a nakonec zmizí z místa implantace úplně. Rychlost degradace je dána obsahem vody v hydrogelu (čím více vody, tím rychlejší degradace). Pro aktivní látky, které by mohly při zesítění hydrogelu podléhat degradaci, se využívá uchycení na lyofilizovaný hydrogelový nosič. *[22]*

4 PROTEINOVÉ HYDROLYZÁTY JAKO NOSIČE

4.1 Keratinové hydrolyzáty

Keratinové hydrolyzáty lze využít v mnoha různých oblastech, jako je například zemědělství, kosmetický průmysl, potravinářství a lékařství. Uplatnění v zemědělství našly keratiny a jejich hydrolyzáty zejména jako krmiva, protože jsou to bílkoviny s vysokým obsahem esenciálních mastných kyselin. Vysoký obsah dusíku je řadí i mezi dobrá hnojiva.

Kosmetický průmysl využívá zejména jejich regeneračních účinků na vlasy i kůži, protože keratiny jsou základní složkou jak kůže, tak vlasového vlákna. Jsou součástí šampónů, balzámu, kondicionérů, nebo například krémů. *[15]*

Pro svou schopnost tvořit filmy a fólie se keratinové hydrolyzáty využívají i jako obalové materiály potravin. Jsou nezávadné, snadno rozpustné a nemají vliv na chuť, barvu ani pachy potravin.

Zajímavé je využití keratinových materiálů ve tkáňovém inženýrství. Uplatňují se jako prostorová síť pro hojení poraněné kůže, nebo jako konstrukce pro jiné látky či podporu růstu buněk.

Podle účelu použití je důležité zkoumat vlastnosti hydrolyzátu, jako je například molekulová hmotnost, rozpustnost, schopnost tvořit film, tepelná stálost a další. *[15]*

4.1.1 Keratinové filmy

Možná výroba roztoku keratinu

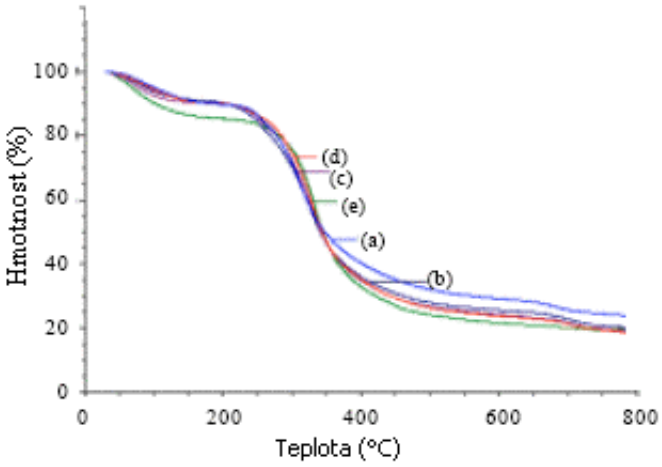
Tento postup se zaměřuje na získání keratinu z peří. Peří se očistí a odmastí v etheru. Poté se nadrtí na menší kousky a reaguje s mírně kyselým rozpouštědlem po dobu 4-6 hodin při teplotě okolo 30 °C. Roztok se podrobí filtraci k odstranění tuhých částí peří a následně i centrifugaci, aby byly odstraněny malé částečky. Do vzniklého supernatantu se po kapkách přidává roztok síranu amonného, který zapříčiní vysrážení proteinu. Přídavkem síranu dochází k barevným změnám roztoku, jakmile se barva roztoku ustálí, je ukončeno i přidávání síranu. Roztok se odstředí při 10000 ot/min po dobu 5 minut, přičemž se separuje sraženina požadovaného keratinu. Sraženina se promývá deionizovanou vodou a následně se upravuje dle potřeby. Může se sušit, lyofilizovat, nebo uchovávat v roztoku. *[19]*

Léčba rohovky

Keratin obsažený ve vlasech a vlně může být vhodným materiálem pro výrobu filmů nebo konstrukcí pro kultivaci buněk při opravách očního povrchu. Extrahovaný keratin je geneticky upravován, podroben neutrální a alkalické dialýze, sušení a vytvrzování. Keratin, extrahovaný z lidských vlasů, tvoří průhledné a stabilní filmy, které podporují adhezi a proliferaci epiteliálních buněk. Vlastnosti filmu mohou být různé, čehož se docílí změnou složení proteinu, přidáním změkčovadel, nebo změnou teploty a doby vytvrzování. *[16]*

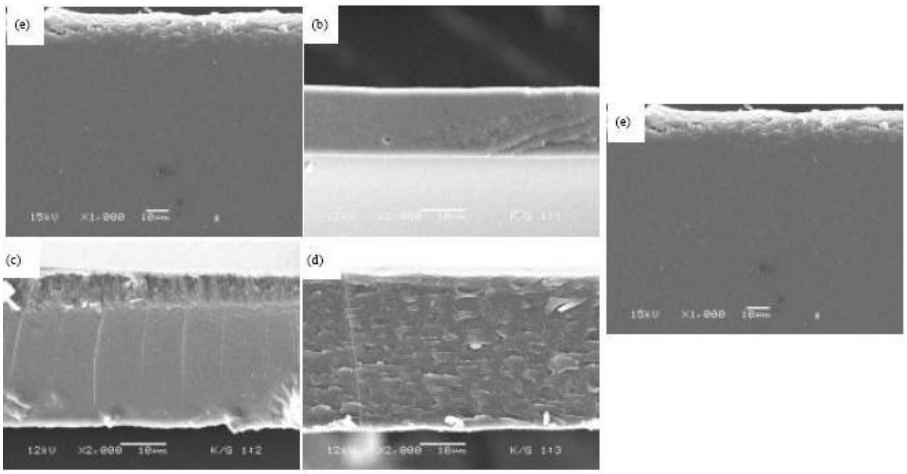
Keratin-želatinové filmy

Tyto filmy se připravují smísením roztoků keratinu a želatiny. Jejich výsledný roztok se poté nalije na polystyrénovou desku a suší se v peci při teplotě 40 °C po dobu 3 dnů, aby vznikl požadovaný film. Pro dosažení nejlepších vlastností produktu a také nejlepší mísitelnosti obou složek je doporučován poměr 1:1. Výsledný film je homogenní směsí, kombinující vlastnosti nativní želatiny a nativního keratinu, zejména v oblasti teplotní odolnosti a hladkosti filmu. *[17]*



Obrázek 6. TG křivky různých filmů: Nativní keratinový film (a), keratin-želatinový film v poměru 2: 1 (b), 1: 1 (c), 1: 2 (d) a film z nativní želatiny (e). *[17]*

Na grafu jsou vidět teplotní křivky pro dané filmy. Kombinace želatiny a keratinu, v poměru 1:1, posunuje teplotní vlastnosti filmu do středu, mezi křivku méně odolného keratinu a houževnaté želatiny. *[17]*



Obrázek 7. Povrchová hladkost filmu (SEM mikroskop); (a) nativní keratin, (b) keratin-želatina v poměru 1: 1, (c) 1: 2, (d) 2: 1 a (e) nativní želatina. *[17]*

Na snímcích pořízených skenovacím elektronovým mikroskopem je viditelný rozdíl hladkosti (drsnosti) povrchů jednotlivých filmů. Kombinace keratin-želatina v poměru 1:1 dává nejhladší povrch. *[17]*

4.1.2 Filmy, vlákna, pěny a lepidla

Pro tyto aplikace se používají sulfonované keratiny.

Keratiny se mohou dělit do dvou tříd: měkké keratiny (pokožka, tkáně) a tvrdé keratiny (drápy, vlasy, rohovina, peří). Mezi přední vlastnosti tzv. tvrdých keratinů patří jejich houževnatost, odolnost vůči degradaci a nerozpustnost, což jsou velmi žádaná kritéria. Kromě toho, keratiny jsou biologicky snadno odbouratelné a vyrábí se z udržitelného zdroje. To jim dává velký potenciál pro nahrazení polymerů na bázi oleje v mnoha aplikacích, jako jsou filmy, vlákna a lepidla.

Keratinový zdroj je podroben sulfonaci a je následně extrahován do vodného prostředí. Extrakce ve vodném prostředí zajistí separaci rozpustné a nerozpustné části keratinu. Následuje re-extrakce nerozpustného keratinu za vzniku sulfonovaného keratinového derivátu. Ten se dále zpracovává a vytváří se z něj fólie, pěny, vlákna, nebo lepidla. *[20]*

Filmy:

Pro přípravu filmů je vhodné připravit 5% roztok sulfonovaného keratinu ve vodě a přidat bázi (hydroxid sodný, amoniak). Takto připravená suspenze se míchá po dobu asi dvou

hodin. Po uplynutí této reakční doby se případně centrifugací odstraní pevná fáze a zbylý roztok se lije na rovné pláty, například na skleněné desky, kde je umožněno odpaření vody a hydroxidu (amoniaku) a vytvoří se film. Ten má vysoký stupeň jasnosti a zvýšenou pevnost v mokrém stavu, aniž by byla omezena jeho pružnost. Pro zlepšení vlastností materiálu za mokra se vyrobený film ponoří na 30 minut do 1M kyseliny chlorovodíkové, nebo je možné použít thioglykolát amonný, který znovu vytvoří disulfidové vazby mezi vlákny keratinu. Poté se promyje vodou a nechá volně uschnout. Mohou se přidávat i různá změkčovadla, jako je například glycerol nebo polyethylenglykol, které mají za následek plastifikaci filmu a tím i zlepšení jeho flexibility. *[20]*

Vlákna:

Roztoky sulfonovaného keratinu se mohou používat k výrobě keratinových vláken.

Při použití metody mokrého zvlákňování se materiál vytlačuje do koagulační lázně, ve které je nerozpustný. Procentuální zastoupení sulfonovaného keratinu v roztoku se při mokrém zvlákňování pohybuje mezi 6-15 %, zbytek roztoku tvoří voda a báze (hydroxid sodný). Hodnota pH je okolo 9-10. V koagulační lázni mohou být použita například redukční činidla, která vedou ke znovuvytvoření disulfidových vazeb mezi vlákny keratinu, a tím se stává nerozpustným. Při použití kyselých činidel dochází k protonaci a následně ke vzniku nerozpustné fáze. Koagulační lázně mohou také obsahovat vysoké koncentrace solí a rozpouštědel, které podporují tvorby vlákna.

Pří suchém zvlákňování se materiál vytlačuje tryskami směrem dolů do komory. Složení roztoku je typicky 6-10 % sulfonovaného keratinu, 50 % rozpouštědla (aceton, etanol, izopropylalkohol), 1-3 % změkčovadla a zbývající podíl tvoří voda a báze (hydroxid sodný). Hodnota pH roztoku je i zde okolo 9-10. Takto připravený roztok se vytlačuje do komory, ve které je zajištěn kontinuální proud horkého vzduchu, který velmi rychle odpařuje rozpouštědlo a dochází ke vzniku vlákna. *[20]*

Pěny

Vytvoření pěny ze sulfonovaného keratinu je dosaženo lyofilizací roztoku, připraveného stejně jako při odlévání keratinových filmů. Pro vytvoření pěny se roztok nanese na vhodný povrch a je zmražen. Po zmražení následuje lyofilizace, která vede ke tvorbě porézní sítě (pěny). Stejně jako u filmů, je i zde možné použít redukční činidlo (thioglykolát amonný), které zapříčiní tvorbu disulfidových vazeb, čímž se snižuje rozpustnost a zároveň zvyšuje pevnost pěny za mokra. Možné je i přidání síťovacího činidla (formaldehyd, glutaraldehyd). *[20]*

Lepidla:

Sulfonované keratiny, získané z vlny a peří, mají výrazné adhezivní vlastnosti, neobsahují kovalentní příčné vazby a vodíková vazba je výrazně oslabena. Adhezní vlastnosti mohou být zlepšeny reformováním disulfidové příčné vazby, čehož dosáhneme přidáním redukčního činidla.

Roztok sulfonovaného keratinu o koncentraci 5 % (stejný roztok, který je využíván k přípravě filmů) se může použít k lepení dřevěných třísek. Mísení je v poměru 1 ml roztoku na 1 g štěpky. Směs se lisuje a zahřívá (3 MPa, 180 °C), stejně jako při použití jiných lepidel. Výsledkem je pevná, dřevotřísková deska. Stejný roztok sulfonovaného keratinu lze použít pro lepení vlněných textilií, kdy je roztok nanesen na jednu textilii a ta se lisuje s další textilií. Po vysušení je výsledkem vázaná textilie. *[20]*

4.1.3 Hydrogel pro biomedicínské aplikace

Výroba hydrogelu

Pro výrobu keratinové konstrukce lze použít jak lidské vlasy, tak i zvířecí srst (pokud pacient netrpí alergiemi na živočišné produkty). Při použití lidských vlasů je stáří dárce 12-20 let, kvůli nižší pevnosti struktury keratinu. Vlasy (srst) se promývají deionizovanou vodou a nechají se uschnout na vzduchu. Při zpracování 30 gramů promytých vlasů se použije 500 ml 32 % kyseliny peroctové, teplota 4 °C a doba trvání 24 hodin. Při tomto procesu dochází k částečné oxidaci disulfidových vazeb. Použity mohou být i jiná činidla, například peroxid vodíku a měnit se mohou i teploty a doba reakce. Vlasy se z roztoku izolují filtrací přes fritu s velkými póry a důkladně promyjí deionizovanou vodou, dokud promývací roztok nedosáhne přibližně pH 6,0. Vlasy se následně dokonale vysuší při teplotě mezi 20 °C a 50 °C. Vysušené vlasy se poté drtí na jemný prášek, který je suspendován v thioglykolátu amonném. Suspenze se zahřívá až do úplného rozpuštění rozpustných frakcí vlasů (například při teplotě 60 °C po dobu 4 hodin), po čemž následuje ochlazení na pokojovou teplotu. Frakce, nerozpustné v suspenzi, se odstraní odstředěním. Hustý, rosolovitý supernatant, který obsahuje rozpustné keratinové frakce je oddělen a čištěn, k čemuž se používá dialýza. Takto vzniklý a pročištěný keratin je připraven pro zesítění a vznik hydrogelu. Oxidační prostředky, které zajistí síťování, jsou například peroxykyseliny, uhličitany a jiné. Zvolené oxidační činidlo se smíchá s keratinem, dobře se promíchá a nechá se stát několik dní. Tekutý roztok zhoustne a převede se na zesítěný hydrogel. *[18]*

Obrázek 8. Možný vzhled hydrogelu*[23]*

Vlastnosti hydrogelu

Keratinový hydrogel obsahuje zbytky kyseliny sulfonové. Ty jsou hydrofilní a zajišťují vázání vody v hydrogelu. Ten je vhodný k hojení ran, pro použití jako konstrukce k růstu buněk v oboru tkáňového inženýrství a může být použit i jako živný materiál pro lepší proliferaci buněk. Dalším využitím může být péče o pleť. Anti-bakteriální přísady, růstové faktory, kolageny, a mnoho dalších, mohou být přidány do keratinového hydrogelu a zlepšovat tak jeho vlastnosti nebo rozšiřovat možnou aplikaci. *[18]*

4.2 Kolagenní hydrolyzáty

4.2.1 Želatinový nosič kostních fragmentů

Kostní roubování je postup prováděný k regeneraci tkáně v místě postiženém traumatem, nemocí či deformací. Roubované materiály mohou být vyrobeny z kostního štěpu pacienta, z transplantátu kostí dárců tkání, nebo ze syntetických materiálů (porézní keramika a polymery). Nosič by měl být dobře vstřebatelný v místě určení během několika týdnů a neměl by žádným způsobem ovlivňovat či měnit biologickou aktivitu účinné látky. Výhodou je obsah látek napomáhajících regeneraci. *[10]*

Předchůdce želatiny-DBM

Demineralizovaná kostní matrice (DBM) je zvláštním typem kostního štěpu, který aktivně stimuluje tvorbu kosti díky přítomnosti růstových faktorů ve své struktuře. Její částicový charakter struktury znemožňuje snadné doručení a správné uvolnění v místě potřeby. Pro zlepšení manipulace byly vyvinuty produkty kombinující DBM s gelovitou strukturou. Příkladem je DBM s glycerolem (tvoří plastický tmel, ale glycerol je velmi dobře

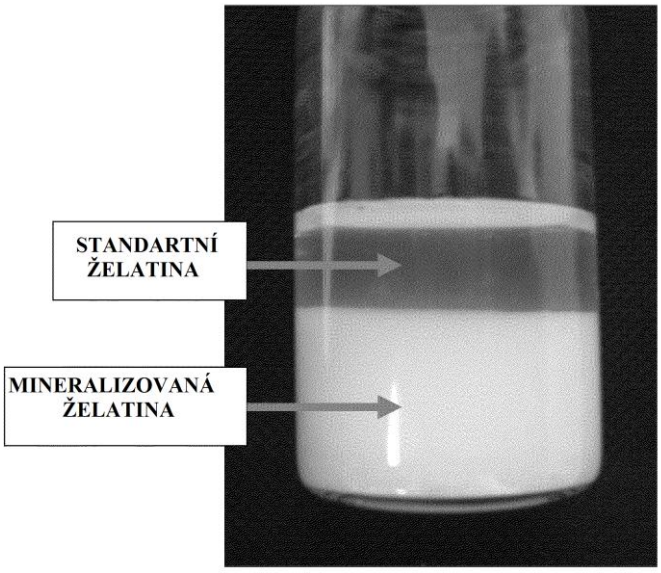
rozpustný ve vodě a dochází ke snadnému smytí z místa štěpu), kombinace DBM a tepelně reverzibilního kopolymeru (lepší rozpustnost nosiče, ale má proměnlivou biologickou aktivitu) a kombinace DBM se síranem vápenatým, karboxymethylcelulózou a vodou (dlouhá resorpce materiálu, která může zhoršovat hojení). Těmto gelům chybí přirozené minerální složky nacházející se v kostech. Buňky, které vytvářejí novou tkáň, musí tvořit zralou kost, což zahrnuje i její remineralizaci. *[10]*

Mineralizovaná želatina a její výhody:

Použitím mineralizované kosti získáme želatinu (želatinový nosič) obsahující ionty vápníku a fosfátů, které jsou důležité pro remineralizaci kosti. Proces získávání mineralizovaného želatinového nosiče je prováděn sérií extrakčních kroků (kombinace kyselin, tepla a ultrazvukového míchání). Tyto procesy nejen chemicky a tepelně degradují kolagen na želatinové fragmenty, ale také rozpustí vápenaté kostní minerály. Ochlazením roztoku želatiny dojde k přechodu v mineralizovaný gel, který umožňuje efektivní použití jako nosič pro částice DBM (udržení štěpu v místě chirurgického zákroku a podstatná mineralizační schopnost). Výhodná je forma tzv. DBM houby, kde je DBM tmel nebo gel formován do požadovaného tvaru a pak je lyofilizován. Výsledkem je materiál schopný absorbovat další kapalinu (rehydratovat sterilní fyziologický roztok, krev, plazmu, buněčné suspenze). *[10]*

Příprava želatinového nosiče:

Kortikální kost je smíchána s kyselinou chlorovodíkou a zahřívána v sušárně 1 hodinu při teplotě asi 85 °C a poté na ni působí ultrazvuk při teplotě asi 60 °C po dobu 1 hodiny. To se opakuje dvakrát (celková doba extrakce je asi 4 hodiny). Extrakční roztok je oddělen od zbytkového množství kosti (dekantace, filtrace), pro získání prvního extraktu. Ten může být zmražen (zabránění dalšímu rozdělení želatinových fragmentů), nebo může být okamžitě neutralizován. Zbytkové množství kosti je smícháno s roztokem kyseliny chlorovodíkové a stejně jako první roztok je i tento vložen do sušárny na 1 hodinu, po čemž následuje sonikace při 60 °C rovněž po dobu 1 hodiny. Takto získaný druhý extrakt může být zmražen, kombinován s prvním extraktem (před jeho neutralizací), nebo může být neutralizován. Způsoby provedení extrakce mohou být pozměněny, a to podle potřeby a požadovaných vlastností (složení) nosiče. Změněna může být teplota, množství a typ kyseliny, použití soli, doba a intenzita sonikace, počet extrakčních opakování. Produkt může být ve formě kapalné, práškové lyofilizované, nebo ve formě chlazeného gelu. *[10]*



Obrázek 9. Želatinový roztok *[10]*

Želatina může být použita jako nosič pro kostní štěpy kortikální i spongiózní části kosti, syntetické kostní štěpy, růstové faktory (např. BMP, TGF-β, VEGF, FGF), či buňky (buňky kostní dřeně, kmenové buňky, buňky chrupavky), a to i v jejich kombinaci.

Tyto látky mohou napomáhat k opravě kostí, chrupavek, vazů a šlach, menisku a jiné. Navíc lze ovlivňovat použitá množství látek a tím vytvořit unikátní štěp přesně podle potřeby pacienta. *[10]*

4.2.2 Rekombinantní želatina ve vakcínách

Pojem vakcína:

Vakcíny jsou používány za účelem zabránit infekci či snížit její závažnost. Jsou to roztoky mikroorganismů, které jsou modifikovány tak, aby nezpůsobili infekci ve svém plném rozsahu, ale pouze umožnili stimulaci imunitní odpovědi a vytvoření protilátek. Obsahují často proteiny, peptidy a nukleové kyseliny. Aktivní vakcíny obsahují mikroorganismy zbaveny schopnosti vyvolat onemocnění, ale zůstává jim schopnost vyvolat reakci imunitního systému. V inaktivovaných vakcínách jsou mikroorganismy zbaveny své nukleové kyseliny, aniž by došlo k ovlivnění imunogenecity (vyvolaní odpovědi imunitního systému) nebo antigenicity (schopnost specificky kombinovat produkty imunitního systému). Vakcíny obsahují další látky, které mohou napomáhat jejich stabilitě, zachovávat integritu a mohou i podporovat jejích schopnost vyvolat odpověď imunitního systému. *[11]*

V současné době jsou díky očkování téměř vymýceny některé nemoci, které dříve měly na svědomí velkou úmrtnost. Je to například záškrt, černý kašel, spalničky, plané neštovice, zarděnky, dětská obrna, hepatitida B. Vakcíny mohou být podávány různými formami (injekce, orální podání). *[11]*

Želatina je ve vakcínách používána prvotně jako stabilizátor v množství okolo 0,03-15,5 mg/dávka. Stabilizátor slouží k uchování biologické aktivity účinných látek v takové podobě, aby dokázaly vyvolat imunitní odpověď. Používají se sacharidy (laktóza, dextróza, sacharóza), nebo právě želatina. Tyto látky mají schopnost krystalizovat a vytváří tak nosnou strukturu pro aktivní složky. *[12]*

Výroba želatiny:

Želatina je derivát získávaný denaturací kolagenu z ryb, koní, kuřat, ale nejčastější je zpracování kůží a kostí skotu a prasat. Dělí se na typ A a B. Ty se od sebe liší základnou a typem extrakce. Typ A zahrnuje kyselé zpracování vepřové kůže a typ B alkalické či vápencové zpracování hovězí kosti a kůže.

Na želatinu, která je dále používána ve farmacii, jsou kladeny vysoké nároky na její čistotu a absolutní nezávadnost. Ve výrobcích ze zvířecích zdrojů jsou obsaženy i tzv. želatinové nečistoty, jako jsou lipidy, nežádoucí proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny a podobně. Extrahovaná želatina podstupuje chemické zpracování zahrnující vystavení vysoce kyselým nebo alkalickým roztokům. Čištění může také zahrnovat praní a filtraci, tepelné úpravy a sterilizaci. Nejzávažnější je však riziko patogenů a toxinů, které se mohou vyskytovat v produktu i po všech extrakčních a čistících krocích. Vakcíny obsahující hovězí želatinu vyvolávali četné anafylaktické reakce z důvodu alergie subjektů právě na hovězí želatinu, a proto bylo používání hovězí želatiny zakázáno. *[11]*

Rekombinantní želatina:

Řešením nedostatků a rizik spojených s používáním zvířecí želatiny je použití rekombinantní želatiny. Jedná se totiž o homogenní směs složenou z polypeptidů jedné molekulové hmotnosti a neobsahuje žádné patogeny. Výhodu představuje také možnost upravit podmínky výroby a získat želatiny s různými teplotami tání, molekulovou hmotností, pevností gelu, nebo složením AMK.

Rekombinantní želatina se získává řízenou expresí polynukleotidových sekvencí v hostitelské buňce, přičemž je exprimován kolagen jednoho typu. Tato želatina je tedy

vyrobena přímo z pozměněné kolagenové matrice, která může být živočišného, ale i lidského původu. Použití nativní sekvence lidského kolagenu snižuje riziko imunogenicity a antigenicity a řízená výroba snižuje riziko infekce (bakteriemi i viry), včetně expozice endotoxinů a patogenů. *[11]*

Hostitelskou buňkou může být například termofilní organismus neumožňující tvorbu trojitých spirálových struktur, ale propagující aktivitu prolylhydroxylázy (enzym zodpovídající za hydroxylaci prolinu na hydroxyprolin). Kolagenový konstrukt může obsahovat mutace, delece nebo inhibitory, které zabraňují vytvoření trojité šroubovice.

Jako hostitelskou buňku lze využít i prokaryota, a to díky vysoce vyvinutému expresnímu systému. Výhodnější je však produkce přímo z pozměněných kolagenních konstruktů za použití kvasinkového systému. Kvasinky *Pichiapastoris* mají výhodu vysoké výtěžnosti kvalitního rekombinantního proteinu. *Pichia* systémy zahrnují výhody prokaryotických soustav (vysoká úroveň exprese, rychlý a levný růst) a eukaryotických soustav (zpracování výsledného proteinu a post-translační úpravy). *[11]*

Rekombinantní želatina může být pro zlepšení svých vlastností zesíťována, a to jak chemickou (za použití síťovadel), tak biologickou cestou. Stupeň zesítění je libovolný a ovlivňuje vlastnosti výsledného produktu (bod tání, viskozita nebo pevnost gelu). Lze ji použít ve všech typech vakcín a navíc je želatina vyrobena z jiného než hovězího a vepřového materiálu, tudíž může být podána i lidem, kterým náboženství zakazuje použití těchto živočišných zdrojů.

Další využití může být u anastomózy (vkládání umělé spojky mezi duté orgány, např. cévy či orgány zažívacího ústrojí), vaskulárních transplantací, nebo jako materiál pro obalování stentů a štěpů (rekombinantní želatina může podporovat uchycení buněk, ale neobsahuje aktivní látky, které by zapříčinily shlukování krevních destiček, a tím vyvolaly nepříznivou reakci organismu). *[11]*

4.2.3 Rychle se rozkládající léky

Želatiny získané ze savčích matric jako je kůže, šlachy, vazy a kosti má (kromě jiných vlastností zmíněných výše) nepříjemnou chuť, a proto je nutné použít sladidla, aby byla tato nežádoucí pachuť potlačena. Kromě toho je při použití savčí želatiny nutno ohřát ji na 60 °C, aby vznikl želatinový roztok, do kterého může být přimíchána aktivní složka a jiné sekundární látky. To zvyšuje dobu přípravy a náklady. *[13]*

Při použití negelující rybí želatiny, která se získává ze studenovodních ryb, tento krok odpadá, protože je možné ji uchovávat při koncentraci do 40 % i při teplotách okolo 20 °C, aniž by tvořila gel. Negelující schopnost má díky nižšímu procentu prolinu a hydroxyprolinu, které způsobují zesíťování a vytváření gelu. Srovnání hovězí a rybí želatiny, z hlediska obsahu aminokyselin, je uvedeno v tabulce. *[13]*

Tabulka 1: Aminokyselinové složení různých druhů želatiny (v g AMK /kg želatiny) *[13]*

AMK	**Rybí želatina**		**Hovězí želatina**
	Gelující	**Negelující**	
Asparagovákys.	46,0	52,0	46,0
Threonin	26,0	25,0	16,9
Serin	37,0	69,0	36,5
Glutamovákys.	66,0	75,0	70,7
Prolin	119,0	102,0	129,0
Glycin	343,0	345,0	333,0
Alanin	121,0	107,0	112,0
Valin	17,0	19,0	20,1
Methionin	9,5	13,0	5,5
Isoleucin	8,0	11,0	12,0
Leucin	23,0	23,0	23,1
Tyrosin	3,0	3,5	1,5
Phenylalanin	12,0	13,0	12,3
Histidin	9,5	7,5	4,5
Lysin	25,0	25,0	17,8
Arginin	54,0	51,0	46,2
Hydroxyprolin	76,0	53,0	97,6
Hydroxylysin	7,5	6,0	7,5

Vzniklá negelující rybí želatina má tedy lepší chuť (ač se tato vlastnost zdá nedůležitá, je velkou výhodou zejména s využitím pro léky podávané dětským pacientům) a rychlejší dobu rozpadu. Odpadá zde nutnost přidávání náhradních sladidel a ochucovadel, které byly nezbytnou součástí přípravků ze savčí želatiny, což vede k dalšímu snížení celkových nákladů na výrobu léku. *[13]*

Výroba želatiny

Prvním krokem při výrobě želatiny je očištění ryb, separace masa, vnitřností a jiných materiálu, ze kterých se želatina nedá získat. Směs kůže a kostí se podchladí na nízké

teploty a vystaví se účinkům enzymu proteáza, která zlepšuje fyzikální vlastnosti a napomáhá k dosažení čistšího produktu. *[14]*

Po pročištění enzymem se roztok promyje vodou a reaguje se zředěných roztokem zásady (NaOH, KOH, nebo $Ca(OH)_2$ o koncentraci 2-5 %) nejméně 2 hodiny. Následně se roztok opětovně promývá vodou. Dalším krokem je reakce se slabou kyselinou (HCl, H_2SO_4, kyselina octová, nebo kyselina citrónová o koncentraci 2-5 %), a to také po dobu 2 hodin a následuje opětovné promývání. Všechny tyto operace se provádějí za teplot v rozmezí od 4 °C do 15 °C. Posledním krokem je extrakce želatiny ze směsi při teplotě od 40 °C do 70 °C a neutrálním pH. Tento způsob výroby želatiny je možný, ne však jediný. Ostatní extrakce jsou založeny na podobných principech. U této extrakce je stěžejní působení enzymu. *[14]*

Vlastnosti produktu:

Vzniklý farmaceutický prostředek obsahuje inertní nosič a účinnou látku. Ta se velmi rychle uvolňuje (do 60 sekund, ideálně do 10 sekund) při kontaktu s kapalinou (sliny, tělní tekutiny). Výhodná je tedy aplikace jak orální, tak aplikace na navlhčenou kůži. Přesné množství účinné látky se liší podle zvoleného léčiva. Její množství se může pohybovat od 0,2 % do 95 %, typicky od 1 % do asi 20 % (vztaženo na hmotnost sušené lékové formy). Aktivní látky, kterým negelující rybí želatina může sloužit jako nosič, jsou např. analgetika, antitusika, antiarytmika, antihypertenziva, antikoagulancia, antidiabetika, antiepileptika, protinádorové látky, antivirotika, antidepresiva, sedativa, hypnotika, uměle podávané pohlavní hormony antikoncepce a mnoho dalších. Do výsledného produktu mohou být přidány také sekundární složky – antioxidanty, živočišné a rostlinné proteiny, sacharidy, barviva, ochucovadla, konzervační látky, povrchově aktivní látky zvyšující viskozitu, modifikátory pH. Rybí želatina může být samozřejmě použita i ve vakcínách. *[13]*

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vypracovat rešerši o proteinových hydrolyzátech a jejich využití jako nosičů aktivních látek. Práce se zabývá shrnutím obecných vlastností proteinů, jako je jejich složení a dělení do skupin, a to podle specifické funkce, chemického složení, tvaru a rozpustnosti a lokalizaci v organismu. Popsána je zde i hydrolýza proteinů, při které dochází ke štěpení peptidových vazeb mezi jednotlivými aminokyselinami, což vede k rozpadu struktury. Štěpení proteinů může být prováděno několika způsoby, nejčastější je však způsob kyselý, alkalický a enzymatický.

Další část práce se věnuje aktivním látkám a jejich nosičům. Mezi aktivní látky řadíme tenzidy, které vykazují povrchovou aktivitu, mohou se shromažďovat na rozhraní dvou fází a tím ovlivňují například průchodnost molekul membránami. Aktivní složky léčiv jsou takové látky, které vyvolávají imunitní odpověď, působí v organismu na určeném místě a v určitém čase. Ve hnojivech jsou aktivními složkami prvky, které jsou nezbytně potřebné pro zdravý růst a vývoj rostlin. Jejich lepší uvolňování je podpořeno přídavkem proteinů a jejich hydrolyzátů, které mohou mít i biostabilizační funkci. Nosiči všech těchto aktivních složek mohou být různé látky, od sacharidů přes lipidy až po proteiny. V této práci jsou popsány hlavně kolagenní a keratinové nosiče v podobě nanočástic a hydrogelů.

Poslední část je věnována příkladům uplatnění proteinových hydrolyzátů. U keratinových hydrolyzátů je zmíněno využití hydrogelů pro biomedicínské aplikace, shrnuta výroba a použití keratinových filmů, vláken, pěn a lepidel, přičemž filmy lze použít jako materiál pro podporu růstu epiteliálních buněk oční rohovky, nebo je možné vytvářet kombinované filmy z keratinu a želatiny pro získání lepších vlastností. Želatina je hydrolyzátem kolagenu, který se hojně využívá ve farmacii. Příkladem je nosič pro kostní buňky a minerály, které jsou nezbytné k regeneraci, nebo jako stabilizátor a nosná struktura aktivních složek vakcín. S výhodou se používá do lékových forem s rychlým nástupem účinku, kde nese aktivní složku a napomáhá k jejímu rychlému vstřebávání v organismu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] ŠÍCHO, Vladislav, Zdeněk VODRÁŽKA a Blanka KRÁLOVÁ. Potravinářská biochemie: učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické. 2., dopln. a přeprac. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1981.

[2] KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Vydání první. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-927-3.*

[3] BLAŽEJ, Anton a kol. Štruktúra a vlastnosti vláknitých bielkovín. *Bratislava: Veda, 1978.*

[4] ŠKÁRKA, Bohumil a Miroslav FERENČÍK. Biochémia. 1.vydání. *Bratislava: Alfa, vydavatelstvo technickej a ekonomickej literatúty, 1983.*

[5] LANGMAIER, Ferdinand, Milan MLÁDEK a Michael RADIL. Pomocné přípravky kožedělného průmyslu: vysokoškolská příručka*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985.*

[6] Tenzidy. In: Pharmito [online]. San Francisco (CA): WikimediaFoundation

[cit. 2016-04-11]. Dostupné z: https://www.pharminfo.cz/technologie/tenzidy

[7] In: Quizlet [online]. [cit. 2016-04-11]. Dostupné z:

https://quizlet.com/29628765/biochem-ex2-secondary-and-tertiary-structure-proteins-flash-cards/

[8] In: Massachusetts Institute of Technology [online]. [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: http://web.mit.edu/3.082/www/team1_f02/collagen.htm

[9] Toxikologie. In: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno [online].

[cit. 2016-04-12]. Dostupné z: http://cit.vfu.cz/fvhe/toxikologie/web/czech/toxcz6.htm

[10] BORDEN, Mark. GLOBUS MEDICAL, INC, PENNSYLVANIA. Bone graft materials derived from mineralized gelatin. *Pensylvánie, USA. US8394419 B2. Přihlášeno 6. 1. 2011. Uděleno 12. 3. 2013.*

[11]CHANG, Robert C., Kari I. KIVIRIKKO, Thomas B. NEFF, David R. OLSEN a James W. POLAREK. FIBROGEN, INC. Recombinant gelatin in vaccines. *Kalifornie, USA. EP 1232262 B1. Přihlášeno 10.11.2000. Uděleno 20.08.2008.*

[12] PETRÁŠ, Marek. Složení vakcín. *Vakciny.net [online]. 2003 [cit. 2016-04-16]. Dostupné z: http://www.vakciny.net/principy_ockovani/pr_13.htm#TOP*

*[13] GREEN, Richard, Owen MURRAY, Michael HALL a Patrick KEARNEY. R.P. SCHERER TECHNOLOGIES, LLC.*Fast-dispersingdosageformscontainingfishgelatin. *Nevada, USA. US9192580 B2. Přihlášeno 14.10.2003. Uděleno 24.11.2015.*

[14] BARVE, Shrikant. Methodofproducinggelatinfromfish. *WO2012160575 A2. Uděleno 19.11.2012. Zapsáno 17.5.2012.*

[15] MOKREJŠ, Pavel a Svatopluk SUKOP. Chemické listy: Charakterizace keratinových hydrolyzátů připravených z kuřecího peří *[online]. 2014, **108**(s1) [cit. 2016-04-27]. ISSN 1213-7103, 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/common/content-issue_s1-volume_108-year_2014.html*

[16] REICHL, Stephan, Maria BORRELLI a Gerd GEERLING. Biomaterials: Keratin films for ocular surface reconstruction *[online]. 2011, **32**(13) [cit. 2016-04-27]. ISSN 0142-9612.*

Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961211000792?np=y

[17] PRASONG, Srihanam a Tessanan WASAN. Pakistan Journal of Biological Sciences: Preparation and Characterization of Hair Keratin/Gelatin Blend Films *[online]. 2011, **14**(5) [cit. 2016-05-05]. DOI: 10.3923/pjbs.2011.351.356. Dostupné z: http://scialert.net/abstract/?doi=pjbs.2011.351.356*

[18] BLANCHARD, Cheryl R., Scott F. TIMMONS a Robert A. SMITH. Keratin-basedhydrogelforbiomedicalapplications and methodofproduction. *Texas, USA. US5932552. Přihlášeno 26.11.1997. Uděleno 3.8.1999.*

[19] GUPTA, arun a Ramanan PERUMAL. UNIVERSITI MALAYSIA PAHANG. Processforextracting keratin. *Malajsie. US20120130048 A1. Přihlášeno 30.8.2011. Uděleno 24.5.2012.*

[20] KELLY, Robert J., Alisa D. RODDICK-LANZILOTTA, Douglas A. RANKIN a Warren G. BRYSON. Productionof biopolymer film, fibre, foam and adhesive materials from soluble s-sulfonated keratin derivatives. *Colorado, USA. US20090069541 A1. Přihlášeno 15.9.2008. Uděleno 12.3.2009.*

[21] LOHCHAROENKAL, Warangkana, Liying WANG, Yi Ch. CHEN a Yon ROJANASAKUL. BioMedResearch International: Protein Nanoparticles as Drug

DeliveryCarriersforCancerTherapy*[online]*. *2014, 2014 [cit. 2016-04-29]*. *ISSN 2314-6141*.

[22] TABATA, Yasuhiko, Masaya YAMAMOTO a Yoshito IKADA. Pure and AppliedChemistry: Biodegradable hydrogels for bone regeneration through growth factor release *[online]*. *1998, 70(6) [cit. 2016-04-29]*.

[23] WANG, Shuai, Jia Min LEE a WaiYee YEONG. International Jouraj of Bioprinting: Smart hydrogelsfor 3D bioprinting *[online]*. *2015, **1**(1) [cit. 2016-04-28]*. *Dostupné z: http://ijb.whioce.com/index.php/int-j-bioprinting/article/view/01005*

[24] U.S. FDA Drug Definitions. In: RegistrarCorp *[online]*. *Virginie, USA: RegistrarCorp, ©2003-2016 [cit. 2016-05-04]*. *Dostupné z: http://www.registrarcorp.com/fda-guidance/fda-definitions/drugs.jsp*

[25] KUCHAŘ, Miroslav. Výzkum a vývoj léčiv *[online]. 1 vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2008 [cit. 2016-05-04]*. *ISBN 978-80-7080-677-7. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-978-80-7080-677-7/pages-img/020.html*

[26]Fertilizers. In: The Essential Chemical Industry *[online]*. *York, Velká Británie: CIEC Promoting Science atthe University of York, 2013 [cit. 2016-05-09]*. *Dostupné z: http://www.essentialchemicalindustry.org/materials-and-applications/fertilizers.html*

[27] SIRBU, C., T. CIOROIANU a M. DUMITRASCU. New fertilizers with protein structure with fitostimulator role *[online]*. *2009, **52**(1) [cit. 2016-05-09]*. *ISSN 1454-7414. Dostupné z: http://www.revagrois.ro/PDF/2009_1_475.pdf*

[28] ASHMEAD, Harvey H. a Hsin-Hung HSU. Potassium polyphosphate protein hydrolysate fertilizer. *Utah, USA. US4491464 A. Uděleno 1.1.1985. Zapsáno 17.5.1983.*

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Struktura α-keratinu 14
Obrázek 2. Struktura kolagenu 15
Obrázek 3. Jak tenzidy pracují 17
Obrázek 4. Fáze přeměn léčiva v organismu 19
Obrázek 5. Příprava proteinových nanočástic koacervací 22
Obrázek 6. TG křivky různých filmů 24
Obrázek 7. Povrchová hladkost filmu 25
Obrázek 8. Možný vzhled hydrogelu 28
Obrázek 9. Želatinový roztok 30

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Aminokyselinové složení různých druhů želatiny..... 33