

Vlastnosti filmů připravených z kolagenu s přídavkem elastinu a keratinu

Bc. Alena Marková

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Alena Marková**
Osobní číslo: **T13989**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vlastností filmů připravených z kolagenu s přídavkem elastinu a keratinu**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracujte studii o interakcích a síťování bílkovin.
2. Popište podmínky a mechanismy síťování kolagenu síťovačly vhodnými zejména pro potravinářské aplikace.
3. V praktické části se zaměřte na přípravu filmů z kolagenu s přídavkem hydrolysátů elastinu a keratinu a studujte vliv technologických podmínek při přípravě filmů na vlastnosti filmů.
4. Vyhodnoťte vhodnými metodami vlastnosti filmů (např. teplota smrštění, bobtnací testy, infračervená spektroskopie).
5. Zpracujte výsledky s využitím statistických technik, proveďte diskusi a zhodnoťte přínos práce pro praxi.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. **Vědecké články z databází Web of Science, ScienceDirect a další; databáse elektronických knih (např. Knovel).**
2. **Park, J. B., Bronzino, J. D. Biomaterials: Principles and Applications. CRC Press: Boca Raton, 2002.**
3. **Schrooyen, P. Feather keratins: Modification and Film Formation. FEBODRUK BV: Enschede, 1999, 161 p.**
4. **Gennadios, A. Protein-Based Films and Coatings. CRC Press: Boca Raton, 2002.**

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Pavel Mokrejš, Ph.D.

Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

18. května 2015

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: MARKOVÁ ALENA

Obor: RTDI

PROHLÁŠENÍ

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 ...6.5.15.....

..... Marková

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 nevydělečně 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 nahlázení 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 díla vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu 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 užit 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 přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

ABSTRAKT

Kolagen je přírodní materiál, který je vhodný pro použití např. v medicíně a potravinářství. Ačkoliv má poměrně dobré mechanické a chemické vlastnosti, není to pro mnoho medicínských a potravinářských aplikací optimální. Proto se přistupuje ke zlepšení vlastností síťováním, které může být chemické, enzymové nebo fyzikální. Pro lékařství a potravinářství se může použít pouze netoxicky zesíťovaný kolagen. Cílem této diplomové práce je ověřit účinnost síťování kolagenního gelu kolagen-elastinovým a keratinovým hydrolyzátem, a také jejich kombinace s glutaraldehydem. Byly připraveny filmy, u kterých byla stanovována teplota smrštění, tahová síla, poměrné prodloužení a bobtnání. Kolagen-elastinový hydrolyzát a keratinový hydrolyzát poskytly vysoké teploty smrštění výsledného materiálu. Kombinované síťování s glutaraldehydem poskytuje filmy o lepších mechanických vlastnostech.

Klíčová slova: kolagen, želatina, filmy, glutaraldehyd, kolagen-elastinový hydrolyzát, keratinový hydrolyzát

ABSTRACT

Collagen is a natural material, which is suitable for use, e. g., in medicine and food industry. Though it has quite good mechanical and chemical properties, this is not suitable for many medicine and food applications. Therefore, improving of collagen properties with crosslinking chemical, enzymatic or physical is necessary. For medicine and food industry only non-toxic crosslinked collagen can be used. The aim of this thesis is to verify the effectiveness of crosslinking of collagen gel with collagen-elastin and keratin hydrolysate, as well as their combination with glutaraldehyde. Films were prepared, shrinkage temperature, tensile strength, elongation at break and swelling tests were conducted. Collagen-elastin and keratin hydrolysate provide high shrinkage temperature of the resulting material. Combined crosslinking with glutaraldehyde provides films of better mechanical properties.

Keywords: collagen, gelatin, films, glutaraldehyde, collagen-elastin hydrolysate, keratin hydrolysate

Chtěla bych poděkovat vedoucímu doc. Ing. Pavlu Mokrejši, Ph. D. za veškerou pomoc a ochotu, kterou mi poskytl při tvorbě a zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat paní laborantce, jež mi byla milou společnicí při strávených hodinách v laboratoři. V neposlední řadě děkuji své rodině za velkou podporu v mých studiích.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracoval samostatně a veškerou použitou literaturu jsem citovala.

Ve Zlíně 6. 5. 2015

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 MECHANISMY SÍŤOVÁNÍ BÍLKOVIN	12
1.1 CHEMICKÉ SÍŤOVÁNÍ	12
1.1.1 Homobifunkční síťující látky	13
1.1.2 Heterobifunkční síťující látky	13
1.1.3 Fotoaktivní síťující látky	13
1.2 ENZYMOVÉ SÍŤOVÁNÍ	15
1.2.1 Transferázy	15
1.2.2 Oxidoreduktázy	15
1.3 FYZIKÁLNÍ SÍŤOVÁNÍ	17
1.3.1 UV záření	17
1.3.2 Dehydrotermální způsob	18
1.3.3 Gama záření	18
2 CHEMICKÉ SÍŤOVÁNÍ KOLAGENU	20
2.1 KOLAGEN JAKO BIOMATERIÁL	20
2.2 NETOXICKÉ SÍŤUJÍCÍ LÁTKY	20
2.2.1 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid.....	20
2.2.2 N-hydroxysukcimid.....	22
2.2.3 Imidoestery	24
2.2.4 Genipin	25
2.2.5 Další přírodní síťující látky	26
2.2.6 Hydrolyzáty	28
2.3 TOXICKÉ SÍŤUJÍCÍ LÁTKY	29
2.3.1 Glutaraldehyd	29
2.3.2 Hexamethyldiisokyanát	32
2.3.3 Polyepoxydy	32
2.3.4 Formaldehyd	32
2.3.5 4,4-dimethyl-1,3-oxazolidin.....	34
3 CHARAKTERIZACE STUPNĚ ZESÍŤOVÁNÍ BÍLKOVINNÉHO SUBSTRÁTU	36
3.1 TEPLOTA SMRŠTĚNÍ	36
3.2 BOTNACÍ TESTY	36
3.3 INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE	36
3.4 STANOVENÍ OBSAHU AMINOSKUPIN	37
3.5 MECHANICKÉ VLASTNOSTI	37
3.6 POVRCHOVÁ MIKROSKOPIE	37
4 ZHODNOCENÍ LITERÁRNÍ STUDIE A CÍLE PRÁCE	39
II PRAKTICKÁ ČÁST	40
5 MATERIÁLY A METODY	41

5.1	MATERIÁL, PŘÍSTROJE, POMŮCKY A CHEMIKÁLIE.....	41
5.2	PLÁN EXPERIMENTŮ A STATISTICKÁ ANALÝZA.....	41
5.3	METODY NA HODNOCENÍ STUPNĚ ZESÍTĚNÍ	42
5.3.1	Stanovení teploty smršnění	42
5.3.2	Botnací test.....	42
5.3.3	FTIR	42
5.3.4	Stanovení mechanických vlastností	43
5.3.5	Stanovení sušiny.....	43
6	POSTUP PRÁCE	44
6.1	INTERAKCE VLÁKNITÉHO KOLAGENU S KOLAGEN-ELASTINOVÝM HYDROLYZÁTEM	44
6.2	INTERAKCE VLÁKNITÉHO KOLAGENU S KOLAGEN-ELASTINOVÝM HYDROLYZÁTEM A GLUTARALDEHYDEM.....	44
6.3	INTERAKCE VLÁKNITÉHO KOLAGENU S KERATINOVÝM HYDROLYZÁTEM.....	44
6.4	INTERAKCE VLÁKNITÉHO KOLAGENU S KERATINOVÝM HYDROLYZÁTEM A GLUTARALDEHYDEM	45
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
7.1	SÍŤOVÁNÍ VLÁKNITÉHO KOLAGENU KOLAGEN-ELASTINOVÝM HYDROLYZÁTEM	46
7.1.1	Teplota smršnění	47
7.1.2	Mechanické vlastnosti	50
7.1.3	FTIR	52
7.1.4	Botnací test.....	54
7.2	SÍŤOVÁNÍ VLÁKNITÉHO KOLAGENU KOLAGEN-ELASTINOVÝM HYDROLYZÁTEM A GLUTARALDEHYDEM.....	56
7.2.1	Teplota smršnění	57
7.2.2	Mechanické vlastnosti	60
7.2.3	FTIR	62
7.2.4	Botnací test.....	64
7.3	SÍŤOVÁNÍ VLÁKNITÉHO KOLAGENU KERATINOVÝM HYDROLYZÁTEM	66
7.3.1	Teplota smršnění	67
7.3.2	Mechanické vlastnosti	70
7.3.3	FTIR	72
7.3.4	Botnací test.....	74
7.4	SÍŤOVÁNÍ VLÁKNITÉHO KOLAGENU KERATINOVÝM HYDROLYZÁTEM A GLUTARALDEHYDEM	76
7.4.1	Teplota smršnění	77
7.4.2	Mechanické vlastnosti	80
7.4.3	FTIR	82
7.4.4	Botnací test.....	84
8	ZHODNOCENÍ ÚČINKŮ SÍŤOVANÉ SLEDOVANÝMI SÍŤOVADLY	86

8.1	ÚČINEK SÍŤOVÁNÍ VLÁKNITÉHO KOLAGENU KOLAGEN-ELASTINOVÝM HYDROLYZÁTEM	86
8.2	ÚČINEK SÍŤOVÁNÍ VLÁKNITÉHO KOLAGENU KOLAGEN-ELASTINOVÝM HYDROLYZÁTEM A GLUTARALDEHYDEM.....	86
8.3	ÚČINEK SÍŤOVÁNÍ VLÁKNITÉHO KOLAGENU KERATINOVÝM HYDROLYZÁTEM	87
8.4	ÚČINEK SÍŤOVÁNÍ VLÁKNITÉHO KOLAGENU KERATINOVÝM HYDROLYZÁTEM A GLUTARALDEHYDEM	88
	ZÁVĚR	89
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	91
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	95
	SEZNAM OBRÁZKŮ	97
	SEZNAM TABULEK.....	100
	SEZNAM PŘÍLOH.....	101

ÚVOD

Kolagen se dostal do popředí zájmu při hledání biologicky kompatibilních materiálů s lidským organismem. Jelikož je přirozenou součástí lidského organismu, splňuje požadavky pro lékařské a potravinářské účely. Samotný kolagen ale nemusí být dostatečně pevný, pružný, odolný vůči teplotě, tlaku nebo prostředí, ve kterém je aplikován, a proto se přistupuje k úpravám jeho vlastností, např. síťováním, kdy se používají různé síťující látky nebo metody pro získání kolagenního materiálu s ideálními vlastnostmi. Síťování ale s sebou někdy nese riziko toxicity (síťující látky) nebo negativního vlivu na lidský organismus (fyzikální síťování).

V současné době se stále hledají nové síťující látky, které by nebyly toxické, a přitom se docílilo dobrých mechanických vlastností. Důležité je nejenom jaká látka se použije, ale i dávka této látky. Při použití látek přírodního charakteru je pozitivní stránkou netoxicity, ale nedosáhne se zase optimálního stupně zesílení, které je nutné pro dosažení dobrých mechanických vlastností. Síťování syntetickými látkami poskytuje substráty s dobrými mechanickými vlastnostmi; negativem je většinou určitá toxicita.

Při hledání optimální síťující látky se ukázalo, že i množství síťující látky ovlivňuje stupeň zesílení a výsledné vlastnosti zesíleného substrátu.

Velkou práci při hledání netoxických kolagenních materiálů provedli lékaři v humánní medicíně, např. očním lékařství, léčbě ran; dále pak v odvětví obalových materiálů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MECHANISMY SÍŤOVÁNÍ BÍLKOVIN

Síťování proteinů je využíváno zejména ke stabilizaci proteinů, zlepšení mechanických vlastností, zvýšení jejich odolnosti vůči vnějším podmínkám a dle aplikace i biokompatibility s tkáněmi [1]. Síťováním látkami přírodního charakteru lze získat zvýšenou pevnost v tahu a odolnost vůči proteolýze. Jenže jejich rekonstituované formy nemají dobré mechanické vlastnosti. Při aplikaci v tkáňovém inženýrství je důležité, aby kolagenní matrice vydržela, dokud jej nenahradí kolagen hostitele. Síťovací reakcí vnější látkou se tohoto cíle dosáhne [2]. Nahrazení syntetických neodbouratelných produktů je cílem mnoha oborů, jako je např. obalové materiály pro potraviny, za příznivou cenu výroby. [3, s. 25]

1.1 Chemické síťování

Chemické síťování je přímý způsob zesíťení. Zahrnuje to tvorbu kovalentní vazby mezi dvěma molekulami proteinu bifunkčními činidly, které obsahují dvě reaktivní koncové skupiny. Tyto reaktivní skupiny pak reagují s funkčními skupinami daných molekul. Funkčními skupinami mohou být jak primární aminoskupiny, tak sulfhydrylové aminokyselinové zbytky, jak je uvedeno v tabulce č.1. Síťující látky jsou vybírány na základě jejich chemické reaktivity. Síťující látky jsou vyráběny kombinací dvou nebo více reaktivních skupin, jež jsou zakomponovány do jediné molekuly. Slučováním s dalšími vlastnostmi, jako je prostor mezi reaktivními konci a rozměry, se nabízí velké množství možných síťujících látek. [1]

Tabulka č.1 – Síťující látky. [1]

Funkční cílová skupina	Reaktivní skupina
Karboxyl	Carbodiimid
Amin	NHS ester, imidoester, hydroxymetyl fosfin
Sulfhydryl	Maleimid, haloacetyl (bromo- nebo jodo-), pyridyldisulfid, vinyl sulfon
Aldehyd (karbonyl)	Hydrazin
Jiné skupiny (neselektivní)	Diazirin (foto-reaktivní), aryl azid (foto-reaktivní)
Hydroxyl (nevodný)	Isokyanát

Chemické síťující látky jsou dvojího typu: homobifunkční nebo heterobifunkční [1].

1.1.1 Homobifunkční síťující látky

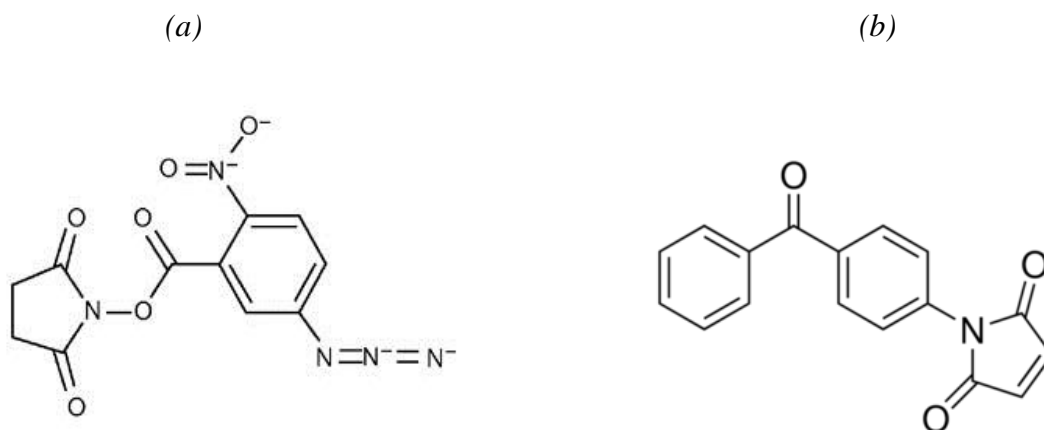
Je složena ze dvou stejných koncových reaktivních skupin na distančních ramenech, jež tvoří prostor. Jejich použití obecně bývá v jednom reakčním kroku [1]. Koncové reaktivní skupiny jsou obvykle 2 thioly, 2 aminy, 2 alkoholy nebo 2 kyseliny. Vytváří převážně intramolekulární síť [4].

1.1.2 Heterobifunkční síťující látky

Koncové reaktivní skupiny jsou různé. Mohou být využité v jednom nebo i více reakčních krocích. Tak je zabráněno vzniku nepožadovaného nebo i vlastního zesíťení [1]. Jejich řízení je lépe zvládnutelné. Navíc dává možnost vzniku vazby s různými funkčními skupinami [4]. Síťující heterobifunkční látky existují ve velkém množství kombinací. Mezi nejčastější kombinace patří NHS ester s maleimidem, aryl azidem, haloacetylem nebo diaziridinem. [1Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.]

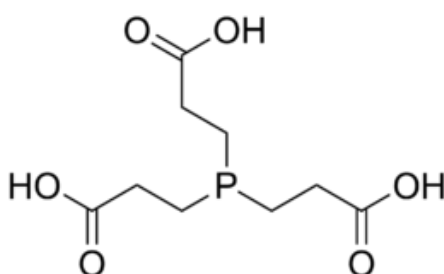
1.1.3 Fotoaktivní síťující látky

Vazby mezi molekulami se také mohou tvořit síťujícími látkami, jež se aktivují světlem. Takovými látkami bývají heterobifunkční benzofenony nebo aryl azidy. Podmínkou je připojení na proteiny prostřednictvím lysinu či cysteinu. Světlo musí mít krátkou vlnovou délku (250–350 nm) a být intenzivní. Výhodou použití tohoto síťujícího činidla je snadná kontrola účinnosti na daný protein. Jelikož potřebujeme jen krátké světelné záření, doba působení světla bývá řádově v sekundách. Při této metodě ale mohou vzniknout různé produkty s malými stupni zesíťení. Častými komerčně dostupnými látkami je 4-maleimidobenzofenon (MPB, obrázek č.1b) a N-5-azido-2-nitrobenzoyloxysukcimid (ANB-NOS, obrázek č.1a). [5]



Obrázek č.1 – Struktura *N*-5-azido-2-nitrobenzoyloxysukcimid (a) [6] a 4-maleimidobenzofenonu (b). [7]

Jelikož thioly patří mezi vysoce reaktivní, můžeme je zavést do molekuly pro snadnější řízení zesílení. Molekula s thiolovou skupinou pak reaguje s -NH_2 skupinou druhé molekuly za prostřednictví heterobifunkční síťující látky. Existuje několik způsobů, jak zavést -SH skupinu do molekuly: snížením disulfidů v molekule, přeměnu aminu nebo karboxylové kyseliny na thiol. Redukce disulfidů se může provádět pomocí dithiothreitolu (DDT), jehož přebytek musí být šetrně odebrán, nebo i pomocí tris(2-karboxyethyl)fosfinu (TCEP, obrázek č.2), u něhož nadměrné množství být odebráno nemusí. Při odebírání nadbytku DDT mají být podmínky takové, které opět nekonvertují disulfidy na původní formu. Navíc je DDT citlivější na vzduchu. TCEP je vůči vnějším podmínkám odolnější. Přeměnu aminu může zprostředkovat i sukcinimidyl ethylthioacetát (SATA), jehož acetylová skupina se pak odstraní hydroxylaminem v pH 7. Karboxylová skupina konvertuje na thiol působením 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu s cystaminem a redukcí disulfidu pomocí DDT nebo TCEP. [4]



Obrázek č.2 – Struktura tris(2-karboxyethyl)fosfinu. [8]

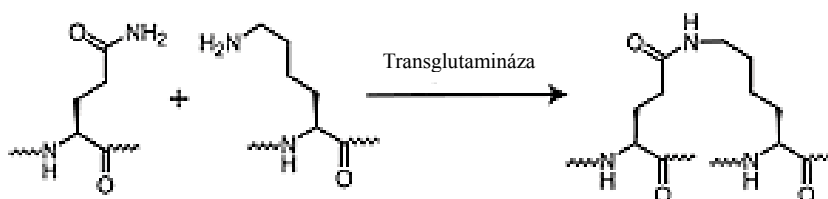
1.2 Enzymové síťování

Připravené materiály pro potravinářství se vyrábí za použití transglutaminázy, tyrozinázy a laccázy. Enzymy jsou nejreaktivnější v mírně vodném prostředí. Síťující reakce lze regulovat teplotou a pH.

1.2.1 Transferázy

Síťující reakce probíhá za použití transglutaminázy probíhá přes meziprodukt protein-enzym-thioester. Jedná se o kovalentní vazbu v aktivním místě enzymu. Amin skupina jiného proteinu se váže na karbonylovou skupinu thioesteru, a tím dojde k uvolnění proteinu z enzymu. Oba proteiny se následně spojí peptidovou vazbou. [9]

Transglutamináza pracuje jako katalyzátor transamidace mezi glutamovými a lysynovými zbytky síťovaných proteinů. Nejprve proběhne deaminace glutaminu, vznikne formace protein-glutamin-thioester, na který pak působí $-NH_2$ skupina lysinu jiného proteinu. Je využívána jako spojovadlo masa. Je také snadno dostupný, pracuje v širokém pásmu pH a odolný až do $50\text{ }^\circ\text{C}$ [9]. Mechanismus jeho reakce je popsán na obrázku č.3.



Obrázek č.3 – Mechanismus reakce transglutaminázy s proteiny. [10]

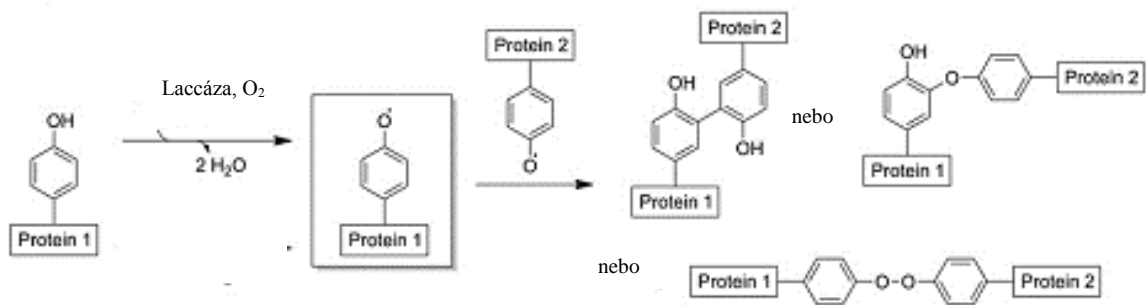
Počátkem reakce katalyzované peptidázou je kovalentní spojení peptidázy a $-COOH$ skupiny substrátu. Substrátem bývají použity syntetické proteinové estery. Atak $-NH_2$ skupiny proteinu na síťovaný protein uvolňuje acyl z enzymu, což vede ke spojení proteinů. [9]

1.2.2 Oxidoreduktázy

Běžné oxidoreduktázy nepodporují vznik kovalentního spojení proteinů. Jejich reakce probíhá s mnoha malými molekulami a makromolekulami. Pokud se kovalentní vazba vytváří, je tvořena přes 2 chemické kroky. Jen první krok reakce se substrátem je za pomoci oxidoreduktázy. Produkty z prvního kroku následně projdou přeměnou za vytvoření kovalentní

vazby. Nevýhodou je druhý krok reakce, který již nelze kontrolovat a umožňuje vznik různých kovalentních vazeb. [9]

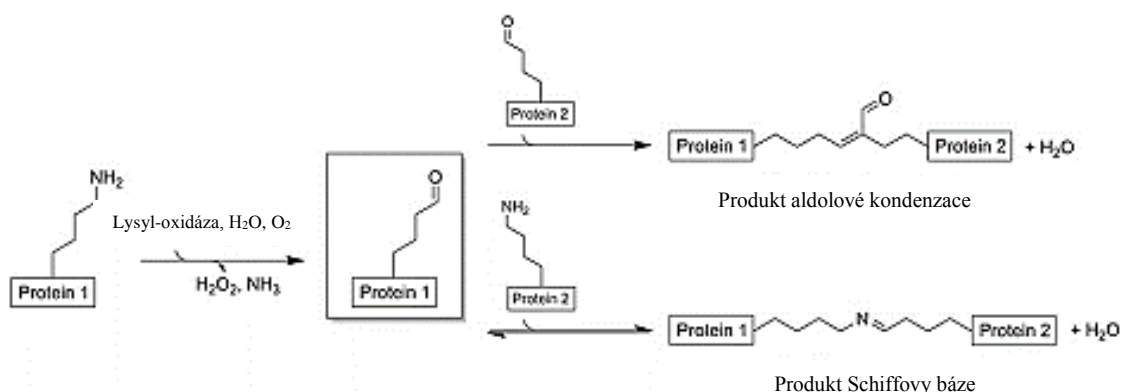
Laccáza ve své struktuře obsahuje 4 měděné atomy. Substrátovou oxidací 4 molekul vytváří radikály (odstranění atomu kyslíku za vzniku vody), a ty se poté spojují do kovalentních vazeb. Substrátem pro oxidaci jsou tyrosinové skupiny proteinu, ze kterých vznikají fenoxi skupiny, jež se následně sít'ují [9]. Reakce je zobrazena na obrázku č.4.



Obrázek č.4 – Mechanismus reakce laccázy s proteiny. [9]

V peroxidázách jsou prostetické hemové skupiny, jež přenášejí elektrony z aromatických (tyrosinových) substrátů. Při oxidaci substrátů dochází k tvorbě vody z peroxidu vodíku. Z tyrosinu vznikající fenoxi skupiny se pak spojují zesíťováním.

Lysyl-oxidázy ve vyšších eukaryotních organismech sít'ují kolagenní a elastinové řetězce v extracelulárním matrixu. Pomáhají sít'ovat proteiny ve fyziologických podmínkách. Ke svému působení požadují 2 kofaktory: kovalentně vázaný kofaktor lysyl-tyrosin-chinon a měděný ion. První oxidovanou skupinou je $-NH_2$ skupina přístupná lysinovým zbytkům, kdy vznikají aldehydy. Aldehydy pak reagují na kovalentně vázaný produkt Schiffovy báze ($-N=CH-$) nebo aldolové kondenzace, viz. obrázek č.5. [9]



Obrázek č.5 – Mechanismus reakce lysyl-oxidázy s proteiny. [9]

1.3 Fyzikální síťování

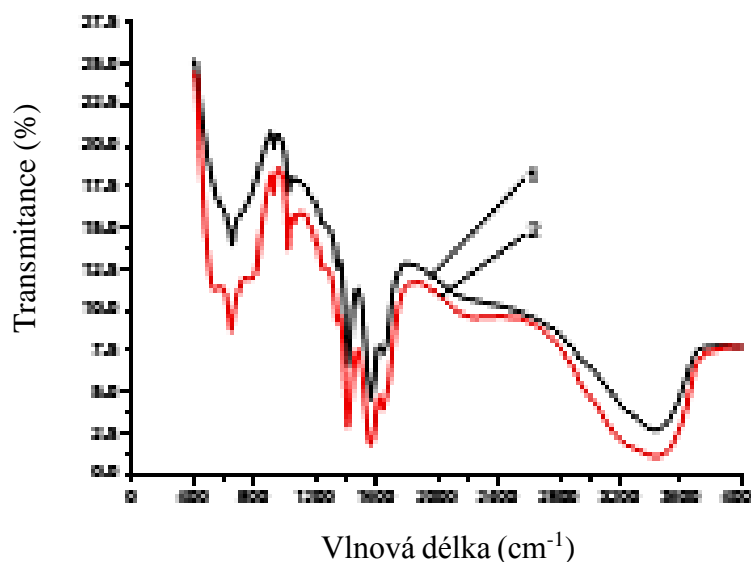
Pokud použijeme fyzikální síťování, nemusíme dosáhnout takových mechanických vlastností, jaké požadujeme. Výhodou je nezavádění potenciálně toxických zbytků látek [12]. Mezi fyzikální metody síťování patří dehydrotermální způsob (DHT), UV záření nebo gama záření.

1.3.1 UV záření

UV záření vytváří zesíťení volnými radikály na zbytcích aromatických aminokyselin. V důsledku toho je zesíťení omezené. V kolagenu se totiž nachází jen určitý počet tyrosinu a fenyalaninu, proto je čas potřebný pro maximum příčných vazeb krátký. UV zářením (při 254 nm) se zvýší teplota smrštění, odolnost vůči degradaci a zatížení (obrázek č.7); nevýhodou je, že dochází k denaturaci kolagenu [2]. Avšak UV záření je stále lepší varianta oproti gama záření. [13]

Ze začátku působení dochází ke zvýšení pevnosti v tahu, ale poté strmě klesá. Zhoršení mechanických vlastností může nastat díky štěpení intramolekulárních i intermolekulárních vodíkových vazeb za uvolnění vody [14]. Výsledný produkt je po ošetření substrátu UV zářením méně rozpustný. [15]

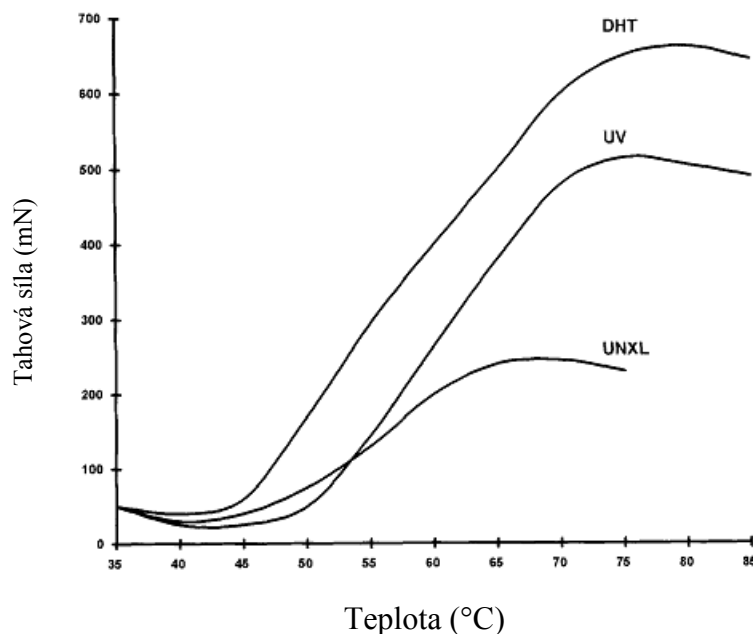
Rozdíly mezi původní strukturou kolagenu a kolagenem po UV záření je znázorněno na obrázku č.6.



Obrázek č.6 – Spektrum FTIR kolagenu (1) a kolagenu po UV záření (2). [15]

1.3.2 Dehydrotermální způsob

Touto metodou se prostřednictvím kondenzační reakce vytváří vazba mezi $-\text{COOH}$ a $-\text{NH}_2$ skupinou [15]. Zvyšuje se teplota smrštění a odolnost vůči tlaku (průběh odolnosti vůči tlaku je zobrazen na obrázku č.7), ale přitom dochází k destrukci struktury kolagenu [2]. Tento způsob síťování však na zlepšení mechanických vlastností není dostatečný. [13]



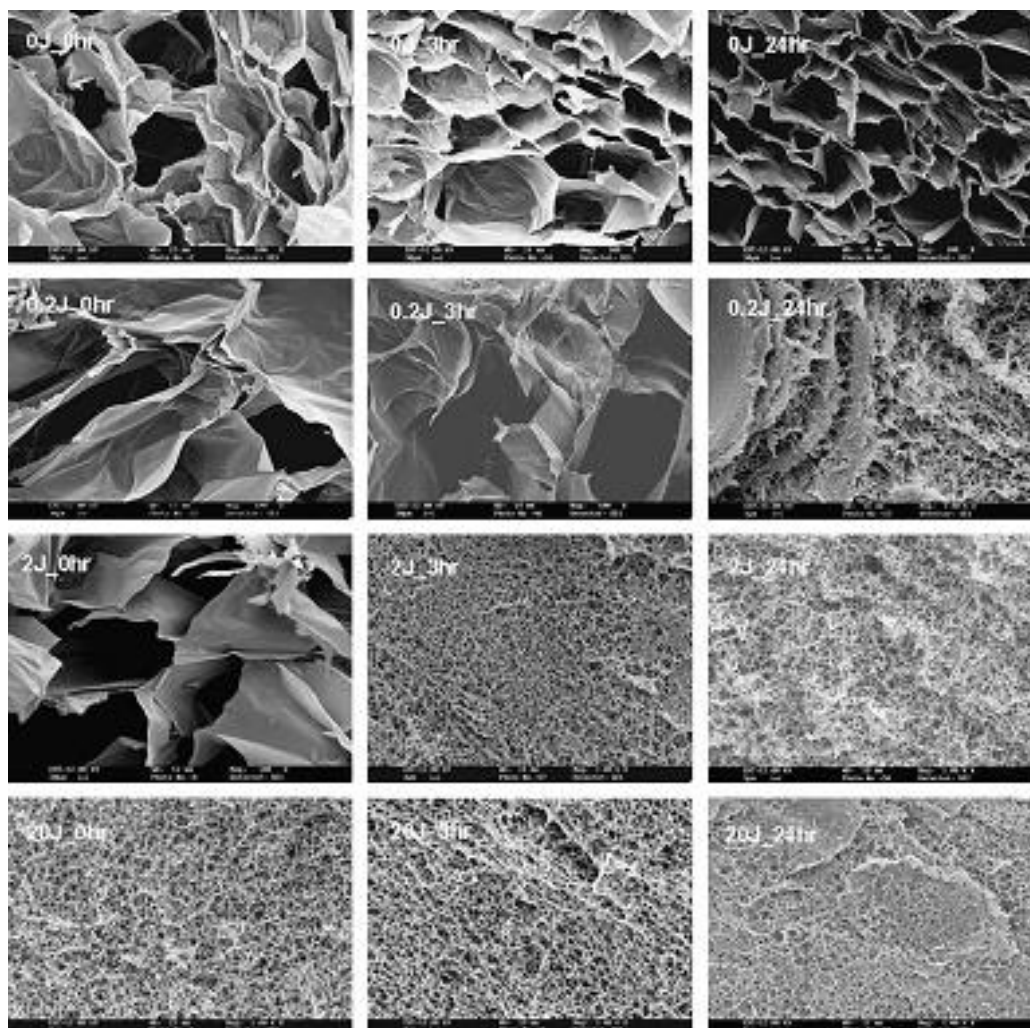
Obrázek č.7 – Vliv DHT a UV záření na odolnost kolagenu při zatížení v porovnání s kolagenem bez fyzikálního ošetření (UNXL). [14]

1.3.3 Gama záření

Jedná se ionizující záření [13], jež je alternativní způsob sterilizace zdravotnických prostředků, kostních štěpů nebo při zpracování potravin. Jelikož se jedná o záření, musela se stanovit maximální dávka, jež může být použita, aby nedošlo ke zdravotnickým komplikacím [17]. Pro sterilizaci tkáně se využívá od 10 kGy do 35 kGy. Při použití příliš vysokých dávek se docílí spíše zhoršení mechanických vlastností a slabé odolnosti vůči proteolýze, kvůli snížení hustoty příčných vazeb. Čím větší dávka gama záření byla použita, tím více byly zhoršeny požadované vlastnosti. [18]

Na obrázku č.8 je zobrazený účinek měnící se dávky a doby působení laseru na kolagenní strukturu. Při použití 20 J stačil na tvorbu mikropórů krátký čas, zatímco při použití 2 J musel

být čas delší. Nejvíce podobné makropóry s kolagenním substrátem bez ošetření měl kolagenní substrát při aplikování 0,2 J. [19]



Obrázek č.8 – Fotochemicky zesítěný kolagen. [18]

2 CHEMICKÉ SÍŤOVÁNÍ KOLAGENU

Při použití síťovacích látek k tvorbě zesíťované struktury získáme materiál s dobrými mechanickými vlastnostmi. Tyto materiály ale mohou být toxické, a proto nemohou být použité v medicíně nebo v potravinářství.

2.1 Kolagen jako biomateriál

Jakož přirozená složka lidského těla se jeví kolagen jako vynikající biomateriál pro tkáňové inženýrství. S nízkou toxicitou a dobře prostudovanými chemickými, strukturálními, fyzikálními a imunologickými vlastnostmi. Snadno izolovatelný a možnost zpracování v různých formách podle potřeby nahrává jeho častému použití pro tkáňové inženýrství. Nicméně jeho schopnost tvořit sloučeninu s dobrými mechanickými vlastnosti není úspěšná, tudíž je nutné použít síťující látky k dosažení požadovaných mechanických vlastností [12]. Síla zesíťování samotného kolagenu je zvyšována věkem a jeho schopnosti se následně mění tímto zesíťováním. Stejně tak rozpustnost tohoto kolagenu v mírných podmínkách. [2] Síťování kolagenu je prováděnou metodou již nějakou dobu. V mnoha studiích se použily jako síťovadla: glutaraldehyd, formaldehyd, diisokyanáty, karbodiimidy a mnoho dalších. [20, s.132]

2.2 Netoxické síťující látky

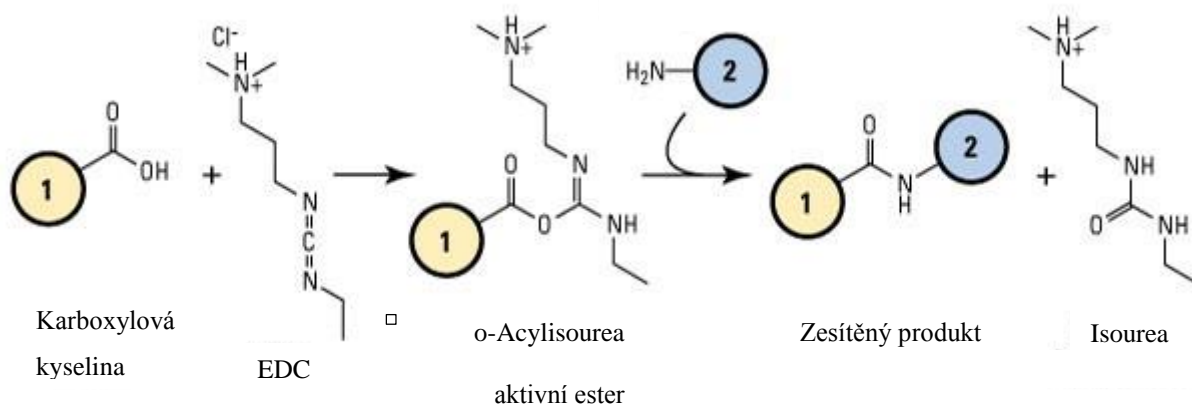
Látky přírodního nebo syntetického původu, které síťují kolagenní nebo želatinový substrát. Výsledný produkt je bez toxických reziduí a lze je tedy využít v medicíně a potravinářství.

2.2.1 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid

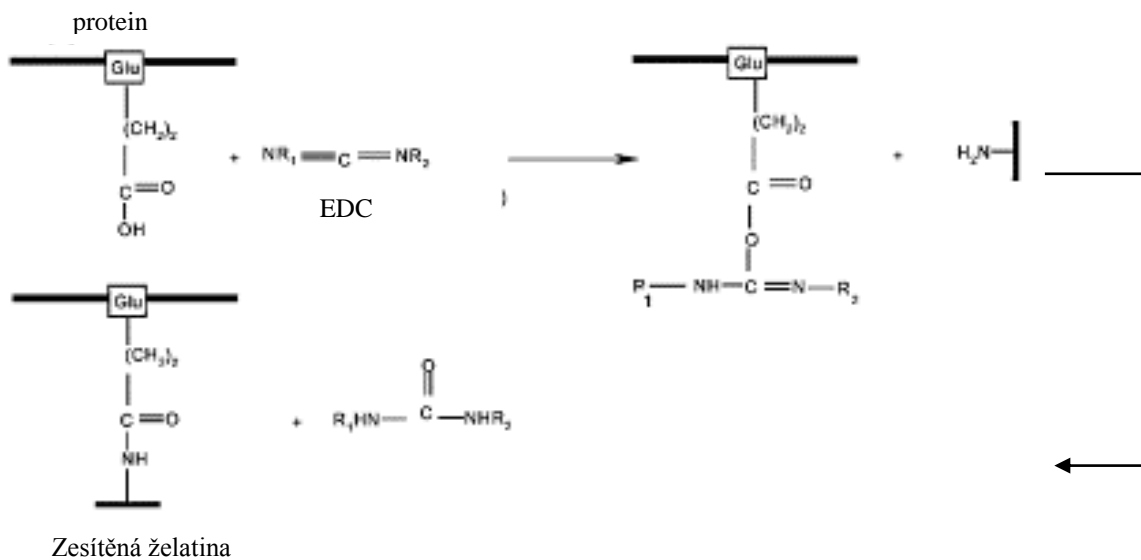
Sloučenina 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC), jenž je bifunkční látka, je nejrozšířenější ve vodě rozpustný karbodiimid [20]. EDC je známý pro svou netoxicitu a biokompatibilitu, jelikož není začleněn do výsledné struktury, ale je vyloučen ve formě rozpustného derivátu močoviny během síťování. Jeho biokompatibilita je uváděna, jak *in vitro*, tak *in vivo* [21]. Při reakci $-COOH$ skupin proteinu s EDC dochází ke vzniku meziprojektu *o*-Acylisourea, jenž je ve vodném prostředí nestabilní a je snadno vytlačen $-NH_2$ jiného polypeptidového řetězce [20]. Tato reakce je zobrazena na obrázku č.9.

EDC zastupuje skupinu síťujících látek s nulovou délkou, protože se nezačleňuje do sítě, ale je vyloučen jako močovina. Pouze zprostředkovává kovalentní spojení dvou molekul. [4]

Nejllepších výsledků se dosahuje při nízkých hodnotách pH (4,5) a v čistých pufrch, bez přítomnosti rušivých látek (např. 4-morfolinoethansulfonová kyselina). Za neutrálních hodnot pH má reakce nižší účinek, avšak pro dosažení lepší účinnosti můžeme zvýšit obsah EDC. [20]



Obrázek č.9 – Mechanismus reakce EDC s karboxylovou skupinou proteinu. [20]

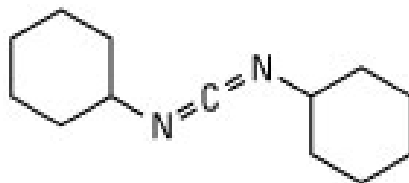


Obrázek č.10 – Reakce mezi EDC a želatinou. [21]

Podmínkou pro úspěšné zesítnění, je přítomnost požadovaných $-NH_2$ skupin a $-COOH$ skupin v síťovaném proteinu. [20]

Může být použit jako síťovací látka mezi proteiny, ke znehybnění makromolekul pro detekci a analýzu proteinů, k tvorbě biomolekulárních sond [20] nebo při léčbě defektu břišní stěny [2]. Při síťování kolagenových fólií EDC se ale získaly špatné mechanické vlastnosti. [12]

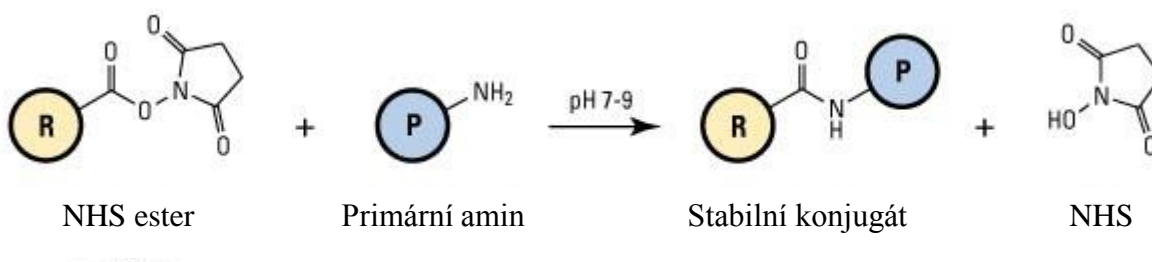
Pokud síťujeme v nevodném prostředí, můžeme použít dicyklohexylkarbodiimid (DDC, struktura je zobrazena na obrázku č.11). Jeho mechanismus reakce je stejný jako u EDC. Jelikož se však jedná o ve vodě nerozpustnou látku, nepoužívá se v běžných laboratorních podmínkách, ale v organických syntézách a může být stabilizován v práškové formě. [20]



Obrázek č.11 – Struktura dicyklohexylkarbodiimidu. [20]

2.2.2 N-hydroxysukcimid

N-hydroxysukcimid (NHS) patří do skupiny amin-reaktivních síťovacích činidel. Aktivní estery NHS se syntetizují reakcí karboxylové kyseliny a NHS za přítomnosti karbodiimidu. Reakce probíhá za fyziologických pH a dochází k uvolnění NHS, viz. obrázek č.12.

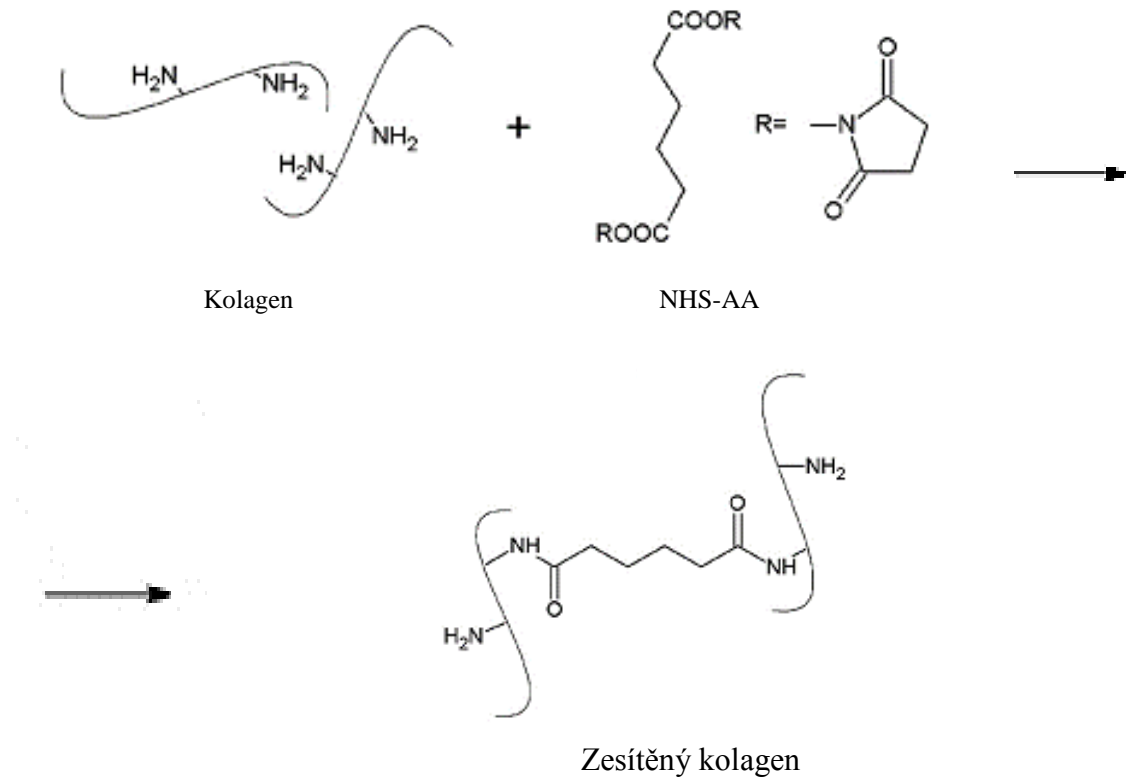


Obrázek č.12 – Mechanismus reakce NHS esteru s primárním aminem proteinu.

[20]

Jestli jsou estery NHS rozpustné nebo ne, závisí na podmínkách reakce (složení pufru, vlastnosti zbytků molekulové struktury). Nesulfonové formy NHS bývají ve vodě nerozpustné, a proto musí být před přidáním do vodné reakce rozpuštěny v organickém rozpouštědle, jenž se může smísit s vodou. [20]

Pro studie se získala nová odnož NHS-AA. Ta obsahovala NHS, karbodiimid a kyselinu adipovou. Jeho účinnost zesílení byla dokázána zvýšením molekulové hmotnosti. Reakce NHS-AA s kolagenem je ukázána na obrázku č.13.



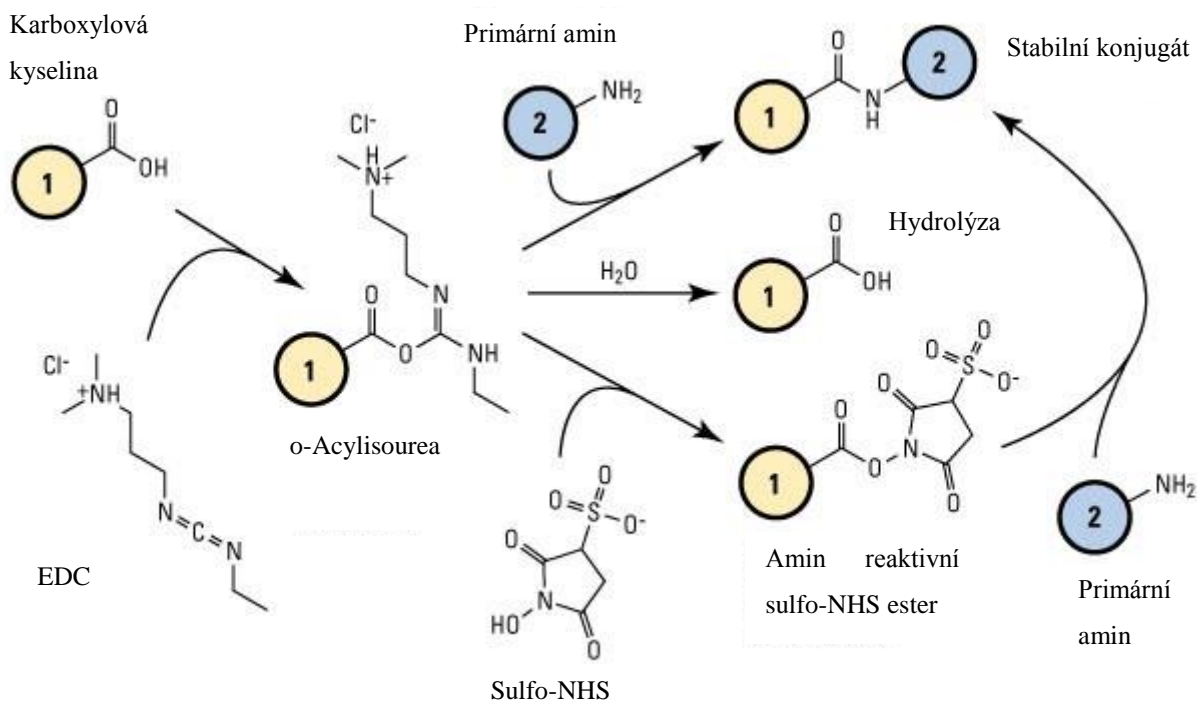
Obrázek č.13 – Mechanismus reakce kolagenu s NHS-AA. [22]

Jako alternativa k toxickým látkám na sebe upozornili hlavně jejich biokompatibilitou. [22]

NHS spolu s EDC vytváří stabilnější meziprodukt než o-Acylisourea a zvyšuje účinek. V následujícím obrázku č.14 je použit ve vodě rozpustný sulfo-NHS.

Sulfo-NHS je komplementární s estery NHS, jen s rozdílem obsahu $-\text{SO}_3\text{H}$ skupiny na N-hydroxycyklu. Tato skupiny zvyšuje rozpustnost síťovadel a navíc umožňuje zesílení buněčného povrchu, jelikož nemůže proniknout skrz buněčnou membránu.

Výhodou je průběh reakce při neutrální hodnotě pH. [20]

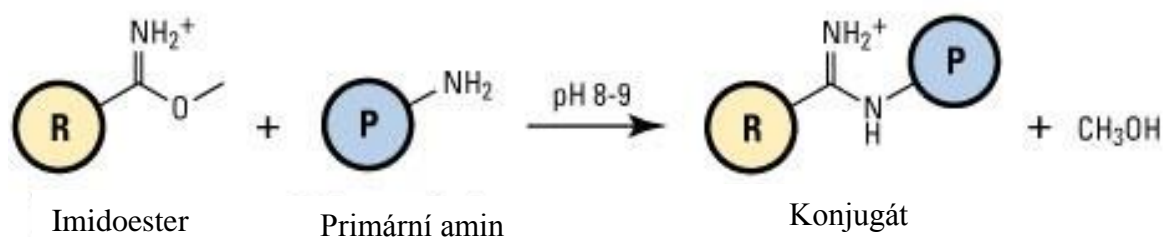


Obrázek č.14 – Mechanismus reakce sulfo-NHS, EDC a karboxylové kyseliny.

[20]

2.2.3 Imidoestery

Imidoester je homobifunkční síťující látka. S –NH₂ skupinami proteinu vytváří amidovou vazbu rychleji při vyšších hodnotách pH (pH ≥ 10). Amidová vazba se vytváří přímo, bez meziprojektu. Při pH nižším než 10 může docházet k vedlejším reakcím, což může způsobit chybné vyjádření výsledků. Reakce probíhající při pH 8–9 je na obrázku č.15. [20]



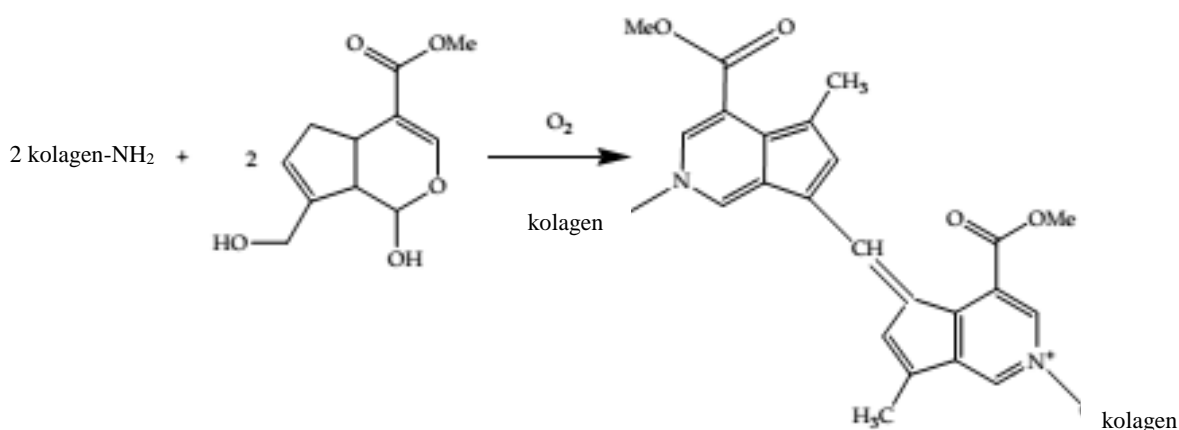
Obrázek č.15 – Mechanismus reakce imidoesteru s primární aminoskupinou proteinu. [20]

Tato látka může nahradit glutaraldehyd při fixaci tkáně. Mohou pronikat skrze buněčnou membránu a síťovat proteiny uvnitř buňky, což umožňuje studium membránové struktury a bílkovin. Jestliže se požaduje intramolekulární zesíťování, síťující látka je ve větším nadbytku (100–1000×) a koncentrace proteinu je nižší než 1 mg/ml.

Při vysokých hodnotách pH jsou amidové vazby reverzibilní, proto je v aplikacích nahradily stabilnější estery NHS. [20]

2.2.4 Genipin

O tuto sloučeninu získanou z extrakce ovoce *Gardenie* byl zájem už v roce 1998. Tato sloučenina je tradičním lékem pro léčení cukrovky, tudíž je v něm velký potenciál pro biokompatibilitu zesíťovaných biomateriálů. [23]

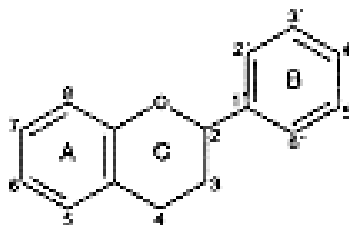


Obrázek č.16 – Mechanismus reakce genipinu s primárními aminy proteinu. [24]

Pokud porovnáme glutaraldehyd a genipin, genipin má výrazně nižší toxicitu, ale srovnatelnou schopnost zesíťování. Proto je používán pro zesíťování želatiny, kolagenu a chitosanu (obrázek č.16). Přesto zůstává obava použití genipinu do živých buněk, jelikož existují také studie, kde v malé dávce vyvolává buněčnou smrt. Posléze se zjistilo, že působí různě na různé typy buněk. Pro použití v oblasti regenerativní medicíny je nutné zjistit bezpečnou dávku a použití genipinu. V provedené studii se ukázal genipin jako toxický pro osteoblasty i chondrocyty. Jeho použití v kosterním inženýrství není příznivé. V inženýrství je doporučená dávka genipinu do 0,5 mM. [23]

2.2.5 Další přírodní síťující látky

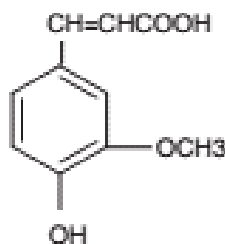
Proanthocyanidin (obrázek č.17) je přírodní síťující látka získaná z ovoce, zeleniny, semen a květin patří do polyfenolické skupiny látek, kategorie kondenzované třísloviny. Urychluje změnu rozpustného kolagenu na nerozpustnou formu během vývoje.



Obrázek č.17 – Struktura proanthocyanidinu. [25]

Využívány jsou jako antioxidanty v medicíně i potravinářství. [25]

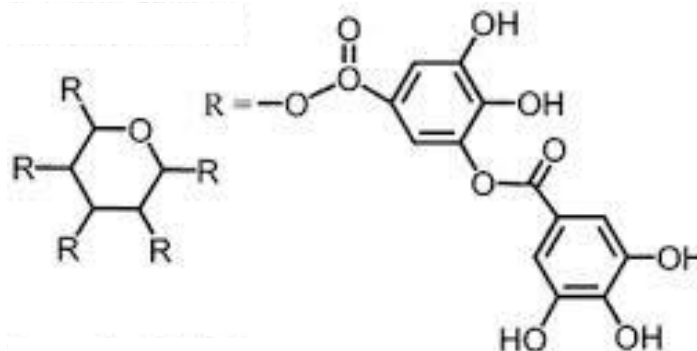
Kyselina ferulová, fenolická kyselina získaná z rostlin (obrázek č.18), reaguje s tyrosinem, lysinem nebo cysteinem. Působí antioxidantně, antimikrobní, protinádorově a redukuje cholesterol. Pro jeho netoxicitu je ideální při přípravě potravinářských filmů. Při neutrálním pH mělo maximální účinek na mechanické vlastnosti. Jelikož se jedná o přírodní látku, můžeme ji použít v biomateriálech i potravinách.



Obrázek č.18 – Struktura kyseliny ferulové. [26]

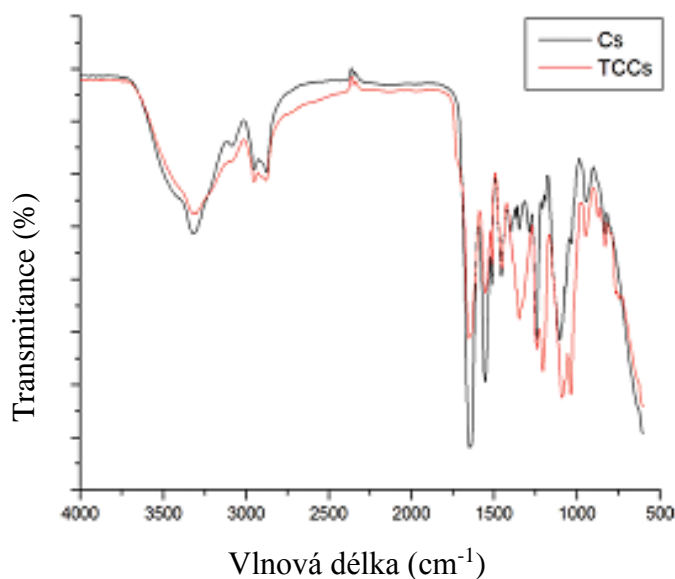
Přesto není dostatek studií použití kyseliny ferulové při síťování želatiny. [26]

Třísloviny jsou polyfenoly rostlin, jenž se používají jako stahující, antioxidantní, antimikrobní, antivirové a protizánětlivé terapeutické látky [27]. Na obrázku č.19 je ukázáno, že ve své struktuře obsahují OH skupiny.



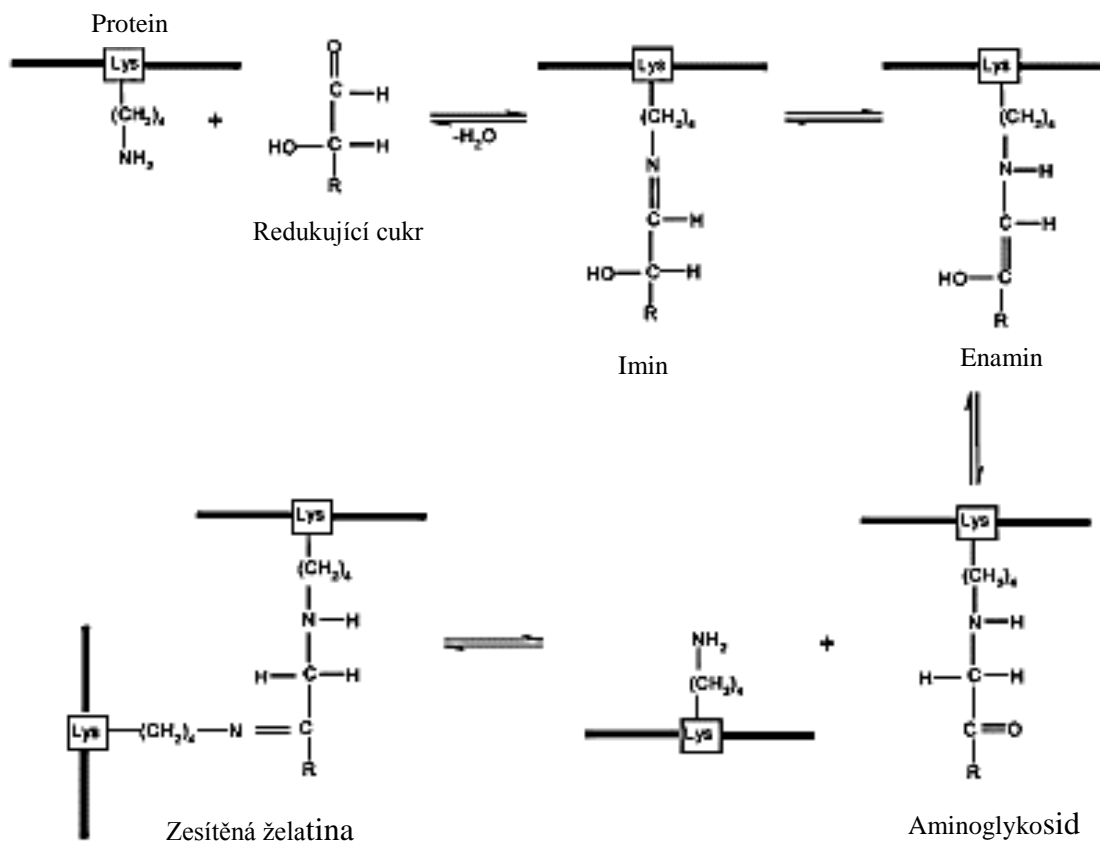
Obrázek č.19 – Struktura třísloviny. [28]

Maximální mechanické vlastnosti se projevily při pH 9. Stejně jako kyselina ferulová, jedná se o přírodní látku, která nepůsobí toxicky [26]. Rozdíly ve struktuře jsou zobrazeny na obrázku č.20.



Obrázek č.20 – FTIR spektrum kolagenu (Cs) a kolagenu po zesítní tříslovinou (TCCs). [27]

Zesítnění sacharidy je dalším možným způsobem síťující reakce. Probíhá přes aldosoé cukry. Aldehydová skupina redukujícího cukru (glukóza, fruktóza) reaguje s volnou $-NH_2$ skupinou želatiny, vzniká aminoglykosid, jenž může nadále reagovat s další $-NH_2$ skupinou, a tím vytvářet zesítnění, viz. obrázek č.21. [21]



Obrázek č.21 – Reakce mezi fruktózou a želatinou. [21]

2.2.6 Hydrolyzáty

Z tkání bohatých na elastin lze získat kolagen-elastinový hydrolyzát (KEH) 3 různými způsoby: alkalickou, neutrální nebo kyselou hydrolyzou. Každá z metod poskytuje hydrolyzáty s odlišnými vlastnostmi [29]. Elastin jako složka mnoha tkání v organismech, dává předpoklad k použití v medicíně. Jeho nativní forma je nerozpustná a vyniká vysokou pružností a chemickou odolností. V tkáňovém inženýrství se elastin využívá např. na výrobu scaffoldů, fólií, trubic, nanovláken nebo hydrogelů. Literatura rovněž uvádí přípravu výše uvedených kompozitních matic na bázi kolagenu a elastinu s tím, že rozpustný elastin síťuje kolagen [12]. Kolagen poskytuje pevnost a elastin zase pružnost. Použití v poměru 20 : 80 vykazuje vysokou pevnost v tahu [30]. KEH může i modifikovat kolagen vázáním různých chemických skupin nebo být použit při přípravě bílkovinných potravin. [28]

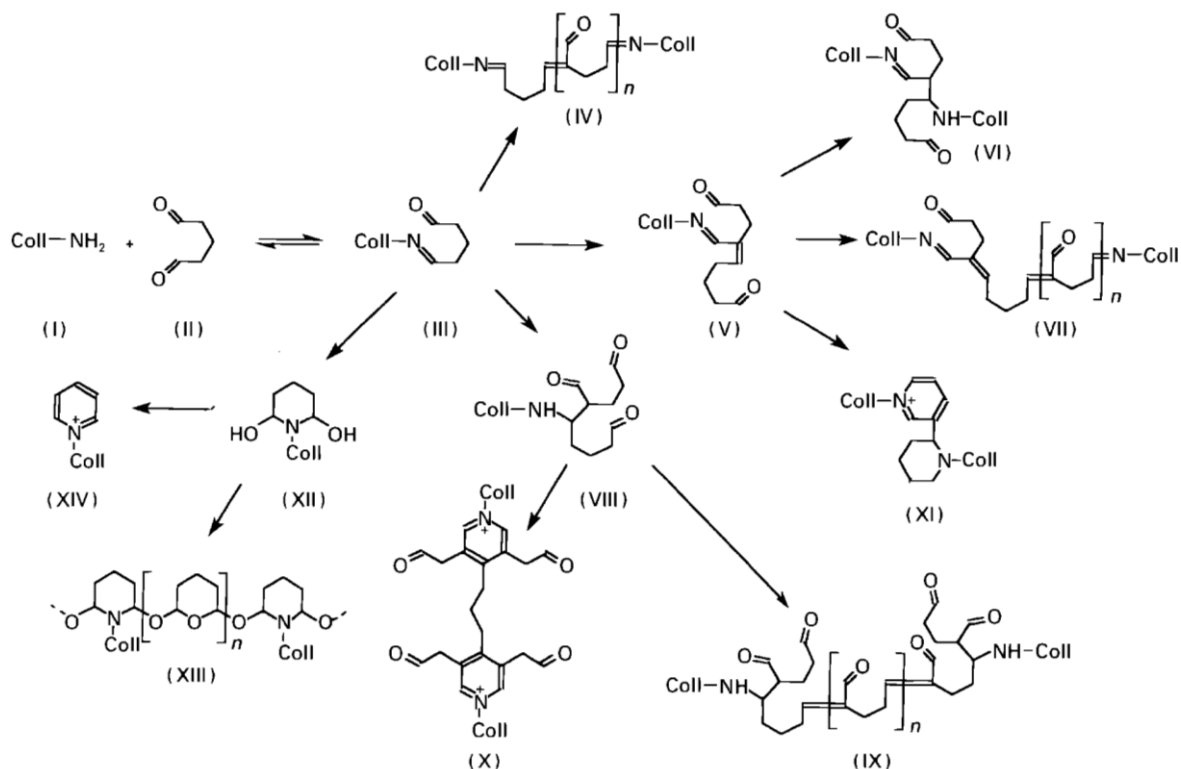
Keratin, vyskytující se v přírodních materiálech, je nerozpustný v širokém spektru rozpouštědel. Je také odolný vůči proteolýze, díky velkému množství dimerního cysteinu. Pokud je požadován rozpustný keratin, je nutné tyto vazby rozbít [32, s. 12]. Toho se docílí hydrolyzou při pH 9 [33]. Pro opětovné spojení cysteinů disulfidovou vazbou, musí dojít k chemické modifikaci. Touto modifikací může být oxidace, redukce nebo sulfitolýza. [32]

2.3 Toxické síťující látky

Toxické síťující látky jsou účinnější síťovadla než látky přírodního charakteru, ale po jejich použití se získá toxický produkt. Cytotoxicita těchto výsledných produktů je důležitý aspekt k následným aplikacím v lékařství a potravinářství.

2.3.1 Glutaraldehyd

Glutaraldehyd (GA) je jedním z nejpoužívanějších bifunkčních síťovacích činidel při použití biomateriálů na bázi kolagenu nebo i želatiny [34]. Je to lineární 5-uhlíkatý dialdehyd, který je čirou kapalinou slámové barvy, štiplavý, mastný, rozpustný ve vodě i v organických rozpouštědlech. Používá se koncentrace od 2 % až 70 % (w/w) [34]. V následujícím schématu je znázorněna jedna z možných reakcí mezi GA a kolagenem (obrázek č.22), která může nastat při této síťovací reakci. [34]



Obrázek č.22 – Reakce mezi GA a kolagenem. [35]

Reakce glutaraldehydu s volnými $-\text{NH}_2$ skupinami kolagenu vede ke vzniku skupin Schiffovy báze ($-\text{N}=\text{CH}-$), sekundárním nebo terciárním $-\text{NH}_2$ skupinám nebo pyridinovým sloučeninám spojenými kovalentními vazbami. [21]

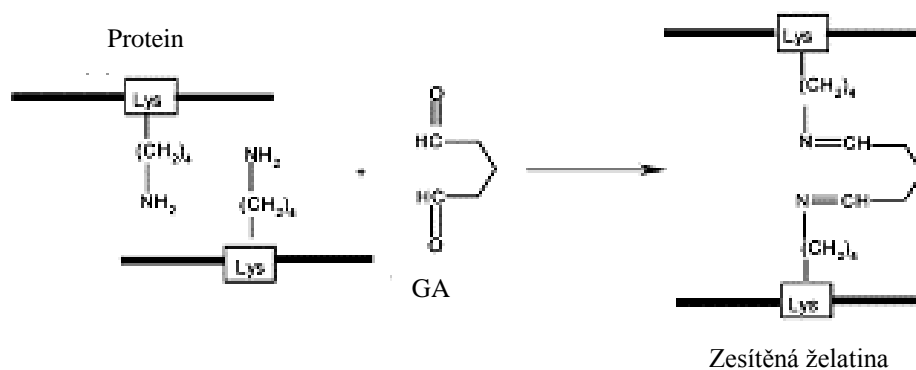
Model síťovací reakce je přes aldehydové skupiny GA (II) s ϵ -aminoskupinami lysinových nebo hydroxylsolinových zbytků (I). Touto reakcí se vytvoří meziprodukt zvaném Schiffova báze (III), jenž není za síťovacích podmínek příliš stabilní, kde je součástí i tvorba GA polymerů (IV). Schiffova báze je ukázána jako hlavní meziprodukt, ze kterého vychází následující reakce síťování. Jelikož je ve vodném prostředí nestabilní, může docházet k hydrolyze a vytvořené vazby po interakci zbytků aldehydových skupin v molekule s jinou $-\text{NH}_2$ skupinou dávají vzniknout produktům obsahujících iminové ($=\text{N}-$) skupiny jako je např. u produktu IV. Aldolovým typem kondenzace se vytváří stabilní α - β nenasycený meziprodukt Schiffovy báze (V) a pokračováním Michaelovou adicí $-\text{NH}_2$ skupiny kolagenu s nenasycenou skupinou V se dosáhne produktu VI. Dalším způsobem zesíťení je reakce mezi $-\text{NH}_2$ skupinou s volnými aldehydovými skupinami V, kdy vzniká produkt VII. Mannichovou reakcí Schiffových bází a GA vede k vytvoření sekundárního aminu (VIII). V tomto meziproduktu v důsledku možné aldolové kondenzace za kyselých podmínek a reakci $-\text{NH}_2$ skupiny

kolagenu vznikají alifatické příčné vazby (IX). Druhou možností je tvorba substituovaných kvarterních typů pyridinového zesítění (X), k němuž se dojde reakcí VIII s molekulou GA a uzavřením kruhu. Tehdy vzniká dihydropyridin, jehož následnou oxidací dle přítomného kyslíku v síťujícím roztoku se utváří produkt X. XI představuje reakci mezi α - β nenasyceným meziproduktem Schiffovy báze s volnými $-\text{NH}_2$ skupinami kolagenu. Z meziprojektu III může dále ve vodném prostředí vzniknout produkt cyklický aminový produkt XII. Reakcí XII, GA a vody se získává XIII. [34]

GA nereaguje jen s $-\text{NH}_2$ skupinami, ale i s $-\text{COOH}$, amidovými a dalšími skupinami proteinů. Jeho reakce probíhají rychle za alkalických i kyselých podmínek [21]. Nejúčinnější je v oblasti neutrálního pH. [35]

Síťování kolagenu GA významně redukuje biodegradaci při udržení anatomické integrity, pružnosti a pevnosti. Další výhodou je rychlost reakce, nízké náklady, dostupnost a vysoká rozpustnost ve vodném prostředí, čímž molekuly GA reagují s velkým počtem $-\text{NH}_2$ skupin v proteinech. V porovnání s jinými síťovadly, jsou vytvořené zesíťované produkty stabilnější [21]. Schéma reakce a želatiny je na obrázku č.23.

Jeho nevýhodou je možné uvolňování molekul GA ze zesíťovaných biomateriálů, což může vést k toxicitě. K uvolnění molekul GA může dojít při nezreagování přítomného množství GA ve vzorku nebo v následných degradacích kolagenu. U koncentrací vyšší než 0,05 % je zjištěna vysoká toxicita. [21]



Obrázek č.23 – Reakce mezi GA a želatinou. [21]

2.3.2 Hexamethyldiisokyanát

Rozpustný hexamethyldiisokyanát (HMDIC, obrázek č.24) v přítomnosti povrchově aktivních látek (PAL) tvoří příčné vazby dvou $-NH_2$ skupin skrze močovinu. Studie naznačily menší toxicitu účinků než GA. [2]

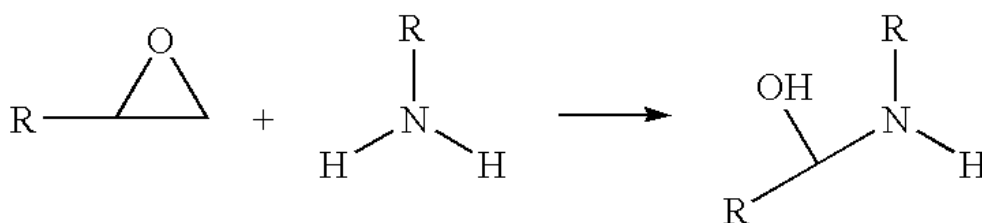


Obrázek č.24 – Struktura hexamethyldiisokyanátu. [36]

2.3.3 Polyepoxydy

Polyepoxydy jsou polyfunkční síťovací činidla [21]. Reakce probíhá mezi $-NH_2$ a epoxydicnými skupinami a jejich průběh se liší v závislosti na pH. V kyselém prostředí se přeměňuje epoxid na reaktivní produkt a při zásaditém pH se mění $-NH_2$ skupina lysinu na nukleofil.

Monofunkční epoxid nevytváří vazbu mezi proteiny, ale vícefunkční epoxid již příčné vazby mezi bílkovinami tvoří [37]. Schéma reakce je zobrazené na obrázku č.25.



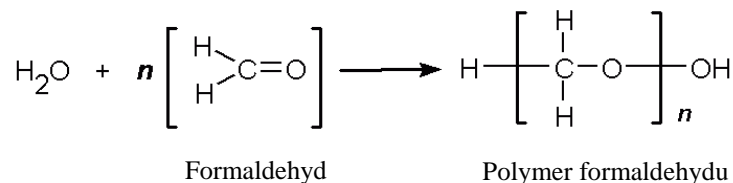
Obrázek č.25 – Mechanismus reakce mezi epoxidem a proteinem. [38]

Výhodami použití polyepoxidu je reaktivita k širokému spektru funkčních skupin ve vhodných podmínkách, relativně nízká toxicita a volně dostupná v komerční kvalitě. Jejich stabilizační schopnost je však v porovnání s GA nižší. Pro vyrovnání by se muselo použít vysoké množství polyepoxidu a dlouhé reakční doby, což je zase neekonomické. [39]

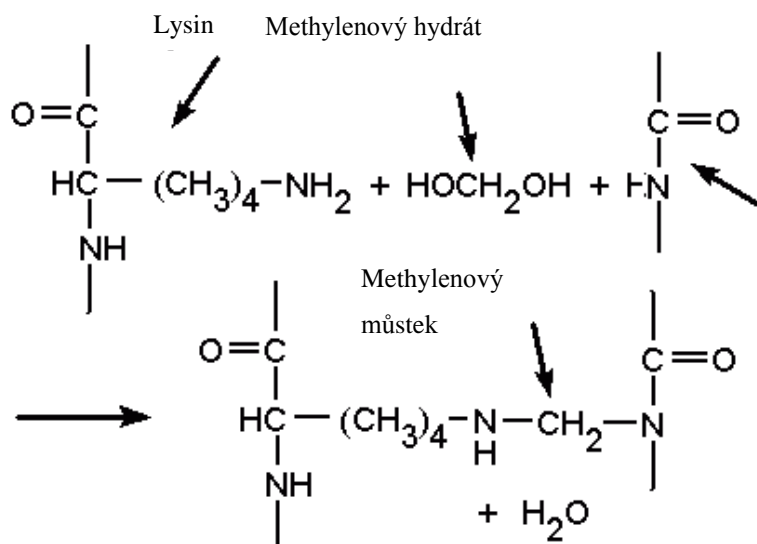
2.3.4 Formaldehyd

Formaldehyd je agresivní karbonylové plynné činidlo, jenž kondenzuje aminy skrze Mannichovu reakci. Spolu s GA bývá využit ke stabilizaci a skladování tkáně (případně buněk) pro

následné aplikace [20]. Snadno se rozpouštějí ve vodě, s níž vytváří methylenový hydrát (obrázek č.26). Methylenový hydrát je stejně reaktivní jako formaldehyd a tato molekula mezi sebou tvoří polymer. Jeho reakce s proteiny probíhá pomaleji, než jeho průnik tkáněmi, viz. obrázek č.27. [40]



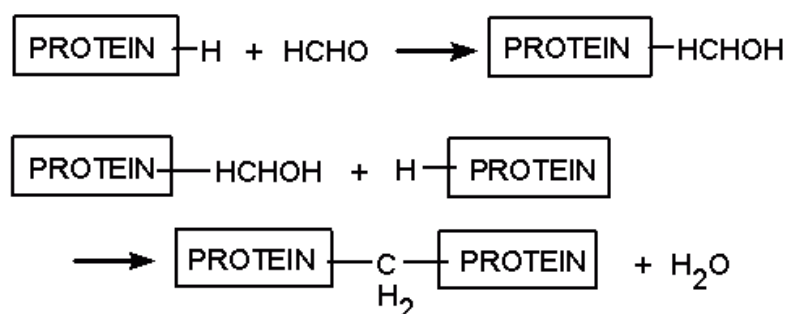
Obrázek č.26 – Reakce formaldehydu s vodou. [40]



Obrázek č.27 – Reakce methylenového hydrátu s proteinem. [40]

Pozitivní na formaldehydu je síťování suchého kolagenu a plynné síťující látky, a nikoliv kapaliny. Lysinové, hydroxylysinové zbytky kolagenu s obsaženým aldehydem reaguje za vzniku meziprojektu iminu. Imin vytváří vazbu mezi tyrosinem nebo kyselinou asparagovou, glutamovou [2]. Bylo dokázáno, že množství peptidových vazeb se po delším čase zvyšuje. Formaldehyd je k proteinu navázán za 24 hodin, viz. obrázek č.28 [40]. Při použití této látky je doba absorpce kolagenního materiálu zvyšována, ale jeho pevnost v tahu se snižuje.

I když je možno formaldehyd použít ve zdravotnictví, jeho potenciální křehkost a toxická residua jej znehodnocuje. [2]



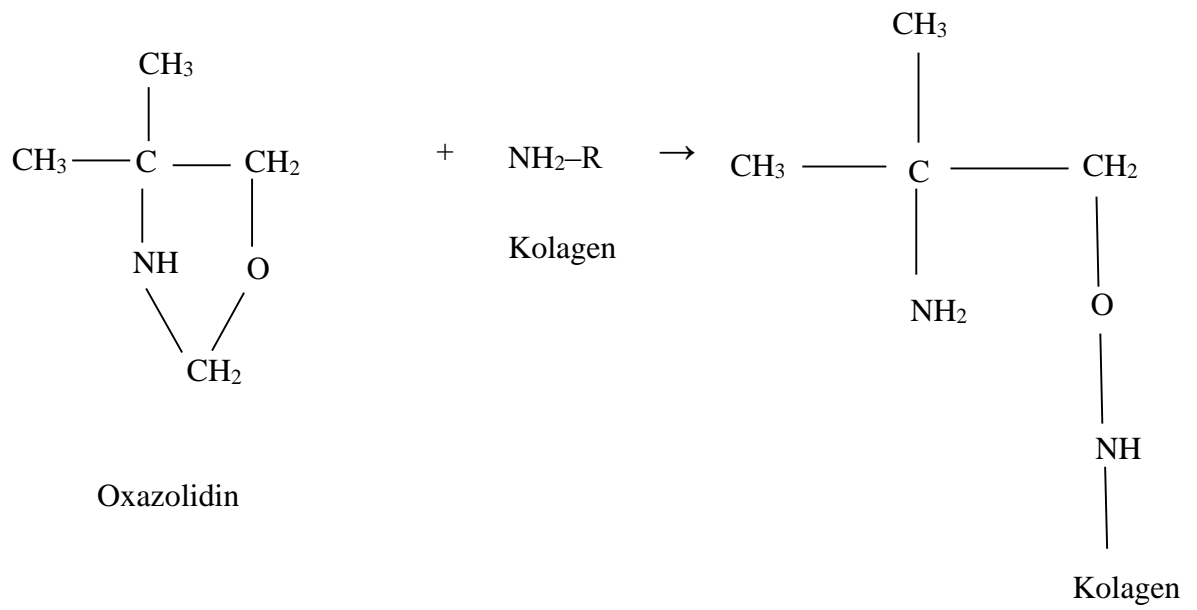
Obrázek č.28 – Reakce mezi formaldehydem a proteinem. [40]

Pro použití jako síťující látky, musíme však použít látku, jejíž hlavní složkou je monomerní formaldehyd (případně methylenový hydrát).

Formalin je zředěná forma formaldehydu o nízké polymeraci s obsahem 37–40 % formaldehydu a 60–63 % vody. Pokud se jedná o vyšší polymer, jsou distribuovány jako bílý prášek paraformaldehyd. [40]

2.3.5 4,4-dimethyl-1,3-oxazolidin

Oxazolidiny se připravují se reakcí aldehydů a hydroxyamino skupin. Jejich bifunkční charakter umožňuje těmto sloučeninám reakci s proteiny, jež je zobrazeno na obrázku č.29 [41]. Tyto heterocyklické sloučeniny se často používají při zpracování kůže v kombinaci s tříslovinami a chromem. [36]



Obrázek č.29 – Reakce 4,4-dimethyl-1,3-oxazolidinu s kolagenem. [41]

3 CHARAKTERIZACE STUPNĚ ZESÍŤOVÁNÍ BÍLKOVINNÉHO SUBSTRÁTU

3.1 Teplota smrštění

Důležitým ukazatelem stupně zesíťování síťující látkou je teplota smrštění. Pokud je síťující látka silná, dochází ke zvýšení teploty smrštění kolagenního substrátu [42, s. 208]. Při zvyšování teploty kolagenní struktura denaturuje a přeměňuje se na chaotickou. Ze struktury se uvolňují vodíky, to způsobuje rozpad řetězců, a tím dochází k pozorovatelnému smrštění na 1/3 délky kolagenního materiálu. [42, s. 97]

3.2 Botnací testy

Botnací test je gravimetrické stanovení hmotnosti v určitých časových intervalech inkubace v daném roztoku [27]. Před samotným stanovením se vzorky kolagenní matrice o daných rozměrech nejprve kalibrovali v roztoku PBS (pH 7,2–7,4) při pokojové teplotě několik hodin [43]. Vzorky se poté lehce osušily na filtračním papíru a inkubovali v roztocích s měřením v časových intervalech. Absorpce vody se pak vypočítala odečtením hmotnosti na počátku testu od hmotnosti vzorku v průběhu inkubace ku hmotnosti na počátku inkubace. [27]

3.3 Infračervená spektroskopie

Pro zjišťování obsahu látky se mohou použít 3 oblasti infračerveného záření: blízká, střední, vzdálená. Pro charakterizaci chemické látky se nejčastěji využívá střední oblast v rozmezí $4\ 000\text{--}400\ \text{cm}^{-1}$.

Při působení elektromagnetického záření na látku, dojde k částečné absorpci tohoto záření. Absorpce se vyzáří ve formě energie, jež se projeví jako vibrace molekul. Každá absorpce a její vlnová délka (a následně vibrace) je charakteristická pro jednotlivé molekuly v dané látce. Jako výsledek se získá infračervené spektrum se zobrazením chemických vazeb mezi jednotlivými molekulami. Zbývající záření se rozptýlí, odrazí nebo projde měřenou látkou.

[44]

3.4 Stanovení obsahu aminoskupin

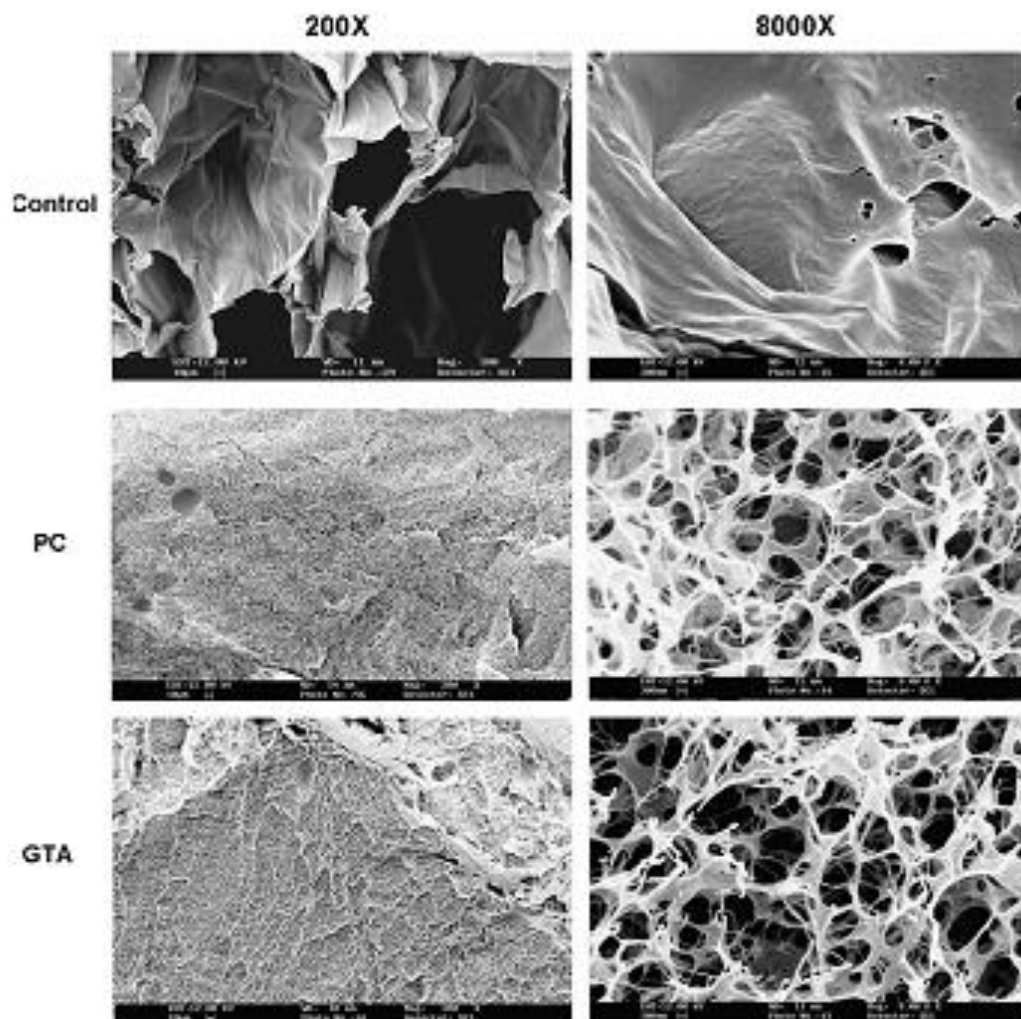
Obsah volných aminoskupin vypovídá o stupni zesítnění. Volné $-NH_2$ skupiny klesají s vyšším stupněm síťování. Jejich množství se stanovuje smícháním kolagenu, 0,5% kyseliny 2,4,6-trinitrobenzensulfonové a 4% roztoku $NaHCO_3$. Po 2 hodinové reakci při 40 °C se dále přidal 6 M HCl a teplota reakční směsi se zvýšila na 60 °C. Zhruba po 90 minutách dojde k rozpuštění kolagenu, vzorek se naředí a proměří na UV-VIS spektrofotometru při 345 nm. Výsledek se vyjádří jako procento celkového obsahu $-NH_2$ skupin. [34]

3.5 Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti se zjišťují kvůli informacím o chování výsledného produktu a jeho odolnosti vůči prostředí, ve kterém je aplikován. Pro posouzení mechanických vlastností se využívá postup ke zjištění pevnosti v tahu, kdy se z kolagenního filmu získá vzorek o rozměrech 6×10 mm a tloušťce 1 mm. Jeho pevnost se poté vypočítá z poměru maximálního zatížení vůči minimálnímu příčnému průřezu vzorkem filmu. [30]

3.6 Povrchová mikroskopie

Povrchová mikroskopie slouží jako doplňková metoda ke studiu stupně zesítnění. Pro zvětšení povrchu se používá skenovací elektronový mikroskop (SEM). Na obrázku č.30 je zobrazen kolagen bez ošetření (kontrolní), po fotochemickém síťování (PC, rose Bengal v koncentraci 9,825 μM a laser 0,2 W po dobu 100 s) a po chemickém síťování (GTA, 0,25%, 2 hodiny). Rozdíl mezi kontrolním kolagenem a kolagenem po ošetření byl statisticky významný, ale rozdíl mezi fotochemicky a chemicky zesítněným kolagenem nebyl tak očividný. [18]



Obrázek č.30 – Kolagen bez ošetření (control), po fotochemickém síťování (PC) a chemickém síťování (GTA). [18]

4 ZHODNOCENÍ LITERÁRNÍ STUDIE A CÍLE PRÁCE

I když je kolagen řádně prostudovaný, jeho schopnost interakce se síťovadly není u některých látek vůbec známá. U látek, které už jsou ověřené k získání dobrých mechanických vlastností, se hledá koncentrace, která by znamenala netoxický biomateriál. Mnoho studií se navíc při síťování kolagenu zabývá spíše metodou *in vivo*, než *in vitro*.

Poměrně často používaný a relativně prostudovaný glutaraldehyd sice zlepšuje mechanické vlastnosti, ale pro medicínské účely neposkytuje požadovanou netoxicitu, a ne vždy se docílí správného produktu. Podobnou pozornost má karbodiimid a N-hydroxysukcimid, kde se nejčastěji používá jejich kombinace.

Literatura se o mechanismech reakce kolagenu s látkami přírodního charakteru začíná více objevovat kvůli potřebě biokompatibilních materiálech zejména v medicíně. Nejedná se jen o čisté látky přírodního charakteru, ale i jejich modifikované formy. Tyto látky ale neposkytují takové mechanické vlastnosti, které jsou potřebné, a jejich výroba může být také ekonomicky náročná.

Fyzikální síťování je známé především u kolagenu v kůži. Po provedených studiích se prokázaly negativní účinky při dlouhodobém působení a omezené schopnosti síťování, ale pozitivní je nepřítomnost chemických látek. Nejvíce se používalo i používá testování účinků na kůži v kožedělném a kosmetickém průmyslu.

Literatura zmiňuje použití rozpustných hydrolyzátů elastinu k síťování kolagenu pro biomedicínské aplikace. Síťující účinky keratinového hydrolyzátu nejsou v současné literatuře zmiňovány.

Cílem této práce je připravit filmy z kolagenního gelu s přídavkem kolagen-elastinového a keratinového hydrolyzátu, připravit filmy z kolagenního gelu s přídavkem kolagen-elastinového hydrolyzátu a glutaraldehydu a keratinového hydrolyzátu s glutaraldehydem. Dále vyhodnotit stupeň zesítnění kolagenních filmů dostupnými metodami. Srovnat síťující účinky samotných hydrolyzátů a hydrolyzátů v kombinaci s glutaraldehydem a navrhnout optimální podmínky síťování.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 MATERIÁLY A METODY

5.1 Materiál, přístroje, pomůcky a chemikálie

Jako materiál k zesílení jsem použila kolagenní disperzi, kolagen-elastinový hydrolyzát, keratinový hydrolyzát a glutaraldehyd.

Kolagenní gel: Silně viskózní kolagenní gel připravený ze škůry hovězího dobytka. Dodavatel: VUP Medical Brno, Č. R. Bílkovinná disperze se skladovala v chladničce při 6 ± 1 °C. Charakteristika: 7,0 % obsah sušiny, obsah popela 1,0 %.

Kolagen-elastinový hydrolyzát: Práškový kolagen-elastinový hydrolyzát (světle žluté barvy) vyrobený z hovězích vazovic. Dodavatel: NANJING MSN Chemical Co., Ltd., JiangSu, Č. L. R. Charakteristika: obsah bílkovin 92,5 %, obsah vlhkosti 3,5 %, obsah popelovin 4,0 %.

Keratinový hydrolyzát: Práškový keratinový hydrolyzát (krémové barvy) vyrobený z drůbežního peří. Dodavatel: CN Lab Nutrition, Asian Group, Shaanxi, Č. L. R. Charakteristika: obsah bílkovin 90,5 %, obsah vlhkosti 7,0 %, obsah popelovin 2,5 %.

Glutaraldehyd: 25% čirý roztok. Dodavatel: Sigma Aldrich.

Pro vyhodnocení zvolených charakteristických vlastností byly použity následující pomůcky a chemikálie: mikrometr SOMET (Československo, ČSN 2514), topná deska IKA C–MAG HS 7 (Německo), kádinka, kalibrovaná zkumavka, závažíčko, topná deska SCHOTT GERÄTE GMBH (Německo), Satellite FTIR (Mattson, Německo), sušárna MEMMERT ULP 400 (Německo), analytické váhy KERN 770 (Německo), destilovaná voda, kádinka, plastová pinzeta, filtrační papír, závaží 5 g, dvě plastové desky formátu A4, pinzeta s plochými hroty, Instron Mini 55 (Instron, Norwood, MA, U. S. A)

5.2 Plán experimentů a statistická analýza

Na principu faktorových pokusů, které umožňují efektivní posouzení mechanických vlastností kolagenního gelu s vybranými síťovadly, jsem pro interakci zvolila 2 technologické faktory: faktor A (množství síťovadla) a faktor B (doba zrání). Tyto faktory poskytnou informace o limitech a problematických místech při síťování v minimálním množství experimentů [45]. Statistická analýza se provedla programem Minitab 15.

5.3 Metody na hodnocení stupně zesíťení

Pro vyhodnocení stupně zesíťení jsem stanovila teplotu smrštění, stupeň zbotnání a změnu plochy, sušinu, FTIR a mechanické vlastnosti.

5.3.1 Stanovení teploty smrštění

Tělisko z připraveného filmu (o rozměrech 50×6 mm) se závažičkem se zavěsilo na háček, ponořilo do vody a měřila se délka prodloužení po dobu 4 minut bez zahřívání. Po uplynutí 4 minut se aparatura zahřívá rychlostí 3,3–4,2 °C/min. Sledovala se teplota počátku smrštění tělíska o 0,5–1 mm své délky. Zkouška pokračuje, dokud se tělisko nepřetrhne, závažičko neutrhne nebo dosažení vysokých teplot (obvykle 80–90 °C). Stanovuje se dle normy ČSN 79 38 41, která je analogická normě o stanovení teploty smrštění usní.

5.3.2 Botnací test

Vzorek s přesně definovanými rozměry a hmotností (20×20 mm) se inkubovala ve vodní lázni po dobu 1 hodiny. V průběhu inkubace se vzorek několikrát změřil a zvážil. Z hodnot se následně vypočítal stupeň zbotnání a změna plochy vzorku.

Stupeň zbotnání (SZ) se vyjádří jako násobek přírůstku hmotnosti vzorku – podle vzorce (rovnice č.1):

$$SZ = \frac{m_N}{m_S} \quad (1)$$

Změna plochy vzorku (ZP) se vypočte podle vzorce (rovnice č.2):

$$ZP = \left(\frac{P_N}{P_S} * 100 \right) - 100 [\%] \quad (2)$$

Kde m_N je hmotnost nabotnalého vzorku [g], m_S je hmotnost suchého vzorku [g], P_N je plocha nabotnalého vzorku [%] a P_S je plocha suchého vzorku [%].

5.3.3 FTIR

Zapnul se FTIR spektrometr a na počítači se spustil program Winfirst. Zobrazí se tlačítko SCAN. Nastavil se Spectrometer Setup: 3 opakování, rozsah měření 600–4000 cm^{-1} a v typu IR dat se vybrala absorbance nebo transmittance. Pro nastavení pozadí nebyl v komoře žádný vzorek. V ovládacích panelech se nastavil BACKGROUND a stiskl SCAN. Po skončení měření se zobrazil spektrum. Do komory se vložil vzorek a v ovládacích panelech se zvolil SAMPLES a stiskl SCAN. Po skončení měření se zobrazilo spektrum vzorku.

5.3.4 Stanovení mechanických vlastností

Metodika byla převzata ze zkušebních předpisů podnikových laboratoří koželužen TOMA Otrokovice (dr. Vaculík, 1993). Přístroj, jenž byl použit je Instron Mini 55 (Instron, Norwood, MA, U. S. A). Ze zkoušených filmů byly vystřiženy tělesa o rozměrech 140×15 mm, které se pak upnula do čelistí přístroje (vzdálenost čelistí byla 50 mm). Rychlost posunu čelistí 50 mm/min. Každé stanovení bylo provedeno 3×. Výsledky jsou prezentovány jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou.

5.3.5 Stanovení sušiny

Malý kousek filmu se zvažil, nastříhal na drobné částičky a sušil po dobu nejméně 4 hodin. Po této době se opět zvažil a vypočítal obsah sušiny (w) podle vzorce (rovnice č.3):

$$w = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100 \% \quad (3)$$

Kde m_0 je počáteční hmotnost vzorku [g] a m_1 je hmotnost vzorku po sušení [g].

6 POSTUP PRÁCE

V následujícím textu jsou popsány postupy při síťování kolagen-elastinovým hydrolyzátem (KEH), kolagen-elastinovým hydrolyzátem s glutaraldehydem (KEH+GA), keratinovým hydrolyzátem (KH) a keratinovým hydrolyzátem s glutaraldehydem (KH+GA).

6.1 Interakce vláknitého kolagenu s kolagen-elastinovým hydrolyzátem

Dané množství kolagenní hmoty se důkladně zamíchalo se síťovadlem KEH v množství podle faktoru A (5–10–15 %). Reakční směs se poté nechala zrát v lednici (6 ± 1 °C) po dobu dle faktoru B (1, 3 a 5 dnů). Po uplynutí doby zrání se na PMMA destičkách z reakční směsi připravily filmy, které se pak sušily ve 3 stupních: 12 minut při 40 °C, zvýšení teploty na 60 °C (3 °C/min), a následné sušení po dobu 12 minut, zvýšení teploty na 80 °C (2,8 °C/min), a následné sušení po dobu 12 minut. Usušené filmy se poté z destiček odstranily a uchovávaly v PE sáčcích. Filmy byly transparentní a měly světle béžovou barvu.

6.2 Interakce vláknitého kolagenu s kolagen-elastinovým hydrolyzátem a glutaraldehydem

Dané množství kolagenní hmoty se důkladně zamíchalo se síťovadlem KEH v množství podle faktoru A (3–6–9 %). Reakční směs se poté nechala zrát v lednici (6 ± 1 °C) po dobu dle faktoru B (1, 2 a 3 dny). Po uplynutí doby zrání se do reakční směsi vmíchalo 0,5 % GA a nechalo zrát v lednici dalších 60 minut. Na PMMA destičkách z reakční směsi připravily filmy, které se pak sušily ve 3 stupních: 12 minut při 40 °C, zvýšení teploty na 60 °C (3 °C/min), a následné sušení po dobu 12 minut, zvýšení teploty na 80 °C (2,8 °C/min), a následné sušení po dobu 12 minut. Usušené filmy se poté z destiček odstranily a uchovávaly v PE sáčcích. Filmy byly transparentní a měly světle béžovou barvu.

6.3 Interakce vláknitého kolagenu s keratinovým hydrolyzátem

Dané množství kolagenní hmoty se důkladně zamíchalo se síťovadlem KH v množství podle faktoru A (3–7,5–12 %). Reakční směs se poté nechala zrát v lednici (6 ± 1 °C) po dobu dle faktoru B (1, 3 a 5 dnů). Po uplynutí doby zrání se na PMMA destičkách z reakční směsi připravily filmy, které se pak sušily ve 3 stupních: 12 minut při 40 °C, zvýšení teploty na 60 °C (3 °C/min), a následné sušení po dobu 12 minut, zvýšení teploty na 80 °C (2,8 °C/min),

a následné sušení po dobu 12 minut. Usušené filmy se poté z destiček odstranily a uchovávaly v PE sáčcích. Filmy byly transparentní a měly světle béžovou barvu.

6.4 Interakce vláknitého kolagenu s keratinovým hydrolyzátem a glutaraldehydem

Dané množství kolagenní hmoty se důkladně zamíchalo se síťovadlem KH v množství podle faktoru A (2–5–8 %). Reakční směs se poté nechala zrát v lednici (6 ± 1 °C) po dobu dle faktoru B (1, 2 a 3 dny). Po uplynutí doby zrání se do reakční směsi vmíchalo 0,5 % GA a nechalo zrát v lednici dalších 60 minut. Na PMMA destičkách z reakční směsi připravily filmy, které se pak sušily ve 3 stupních: 12 minut při 40 °C, zvýšení teploty na 60 °C (3 °C/min), a následné sušení po dobu 12 minut, zvýšení teploty na 80 °C (2,8 °C/min), a následné sušení po dobu 12 minut. Usušené filmy se poté z destiček odstranily a uchovávaly v PE sáčcích. Filmy byly transparentní a měly lehce tmavší béžovou barvu.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

V následujícím textu jsou zobrazeny výsledky zesílení kolagen-elastinovým hydrolyzátem (KEH), kolagen-elastinovým hydrolyzátem s glutaraldehydem (KEH+GA), keratinovým hydrolyzátem (KH) a keratinovým hydrolyzátem s glutaraldehydem (KH+GA).

7.1 Síťování vláknitého kolagenu kolagen-elastinovým hydrolyzátem

Tabulka č.2 – Souhrnné výsledky ukazatelů zesílení kolagenního gelu síťovaného KEH.

Experiment č.	Faktor A, Množství KEH (%)	Faktor B, Doba zrání kolagenní hmoty (dny)	Obsah sušiny filmu (%)	Tloušťka filmu (mm)	T _s po-délné (°C)	T _s příčné (°C)	F (N)	σ	ε (%)
Bez síťovadla			88,0	0,065±0,005	49,5	48,0	0,5	21,3	98,5
2 % GA			94,8	0,050±0,005	52,2	52,1	5,3	13,3	146,0
1	5	1	89,7	0,087±0,003	57,0	59,6	0,8	26,8	118,2
2	5	5	90,4	0,085±0,002	55,7	59,3	1,2	27,1	108,0
3	15	1	90,2	0,076±0,001	56,9	60,5	0,6	25,0	71,2
4	15	5	90,5	0,074±0,005	55,0	58,3	0,7	43,6	81,7
5	10	3	89,6	0,085±0,003	54,8	58,8	1,7	30,6	135,7
6	2	1	89,8	0,078±0,003	57,8	57,8	1,5	24,8	115,1
7	2	5	90,1	0,069±0,004	54,6	55,0	1,7	6,3	153,6

F – tahová síla při přetržení, σ – směrodatná odchylka pro tahovou sílu při přetržení, ε – poměrné prodloužení při přetržení

7.1.1 Teplota smrštění

V tabulce č.3 jsou zobrazené prodloužení/smrštění filmů v podélném a příčném směru.

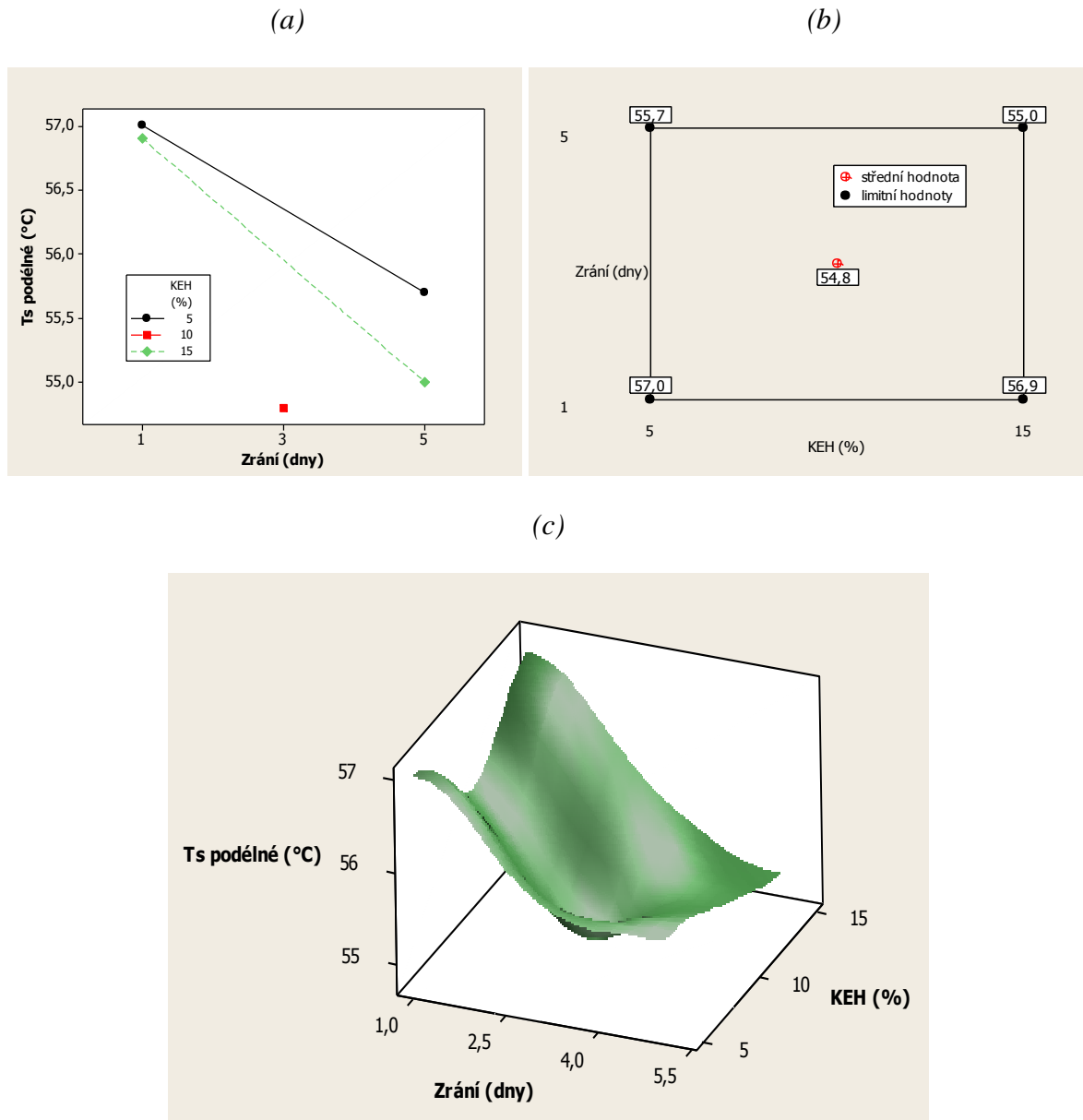
Tabulka č.3– Prodloužení/smrštění filmů síťovaných KEH v podélném a příčném směru.

Experiment č.	Prodloužení (-)/smrštění (+) filmu v podélném směru				Prodloužení (-)/smrštění (+) filmu v příčném směru			
	4 min bez zahřevu při pokojové teplotě (mm)	Tz – Ts (mm)	Ts – T (mm)	T – 90 °C (mm)	4 min bez zahřevu při pokojové teplotě (mm)	Tz – Ts (mm)	Ts – T (mm)	T – 90 °C (mm)
Bez síťovadla	-1,8	0	+15,5(T=77,4 °C)	0	-4,0	0	+2,0(T=72 °C)	0
2 % GA	0	0	+14,0	0	0	+7,0(T=70,0 °C)	0	
1	-1,3	0	+18,2(T=70,7 °C)	0	-1,3	0	+7,8(T=74,0 °C)	0
2	-1,3	0	+15,6(T=78,6 °C)	0	-3,3	0	+6,5(T=72,6 °C)	0
3	0	0	+26,7(T=86,7 °C)	0	-3,9	0	+11,7(T=87,7 °C**)	0
4	-1,3	0	+19,5(T=71,7 °C)	0	0	-0,7	+13,0(T=76,2 °C)	0
5	-1,3	-0,7	+17,6(T=82,3 °C)	0	-3,3	0	+7,8(T=74,7 °C)	0
6	-2,0	0	+16,3(T=71,3 °C)	0	-2,0	-1,3	+7,8(T=64,8 °C)	0
7	-1,3	-0,7	+16,9(T=75,3 °C)	0	-1,3	-0,7	+3,25(T=70,0 °C)	0

Tz – teplota, při které se systém začal zahřívát; Ts – teplota, při které se film začal smršťovat; T – teplota ukončení smršťování filmu, ** film se při zkoušce utrhl;

Teplota smršťení (T_s) v podélném směru je popsána regresní rovnicí:

$$T_s \text{ podélné } (^\circ\text{C}) = 57,5 - 0,0400 \text{ KEH } (\%) - 0,400 \text{ Zrání (dny)}$$

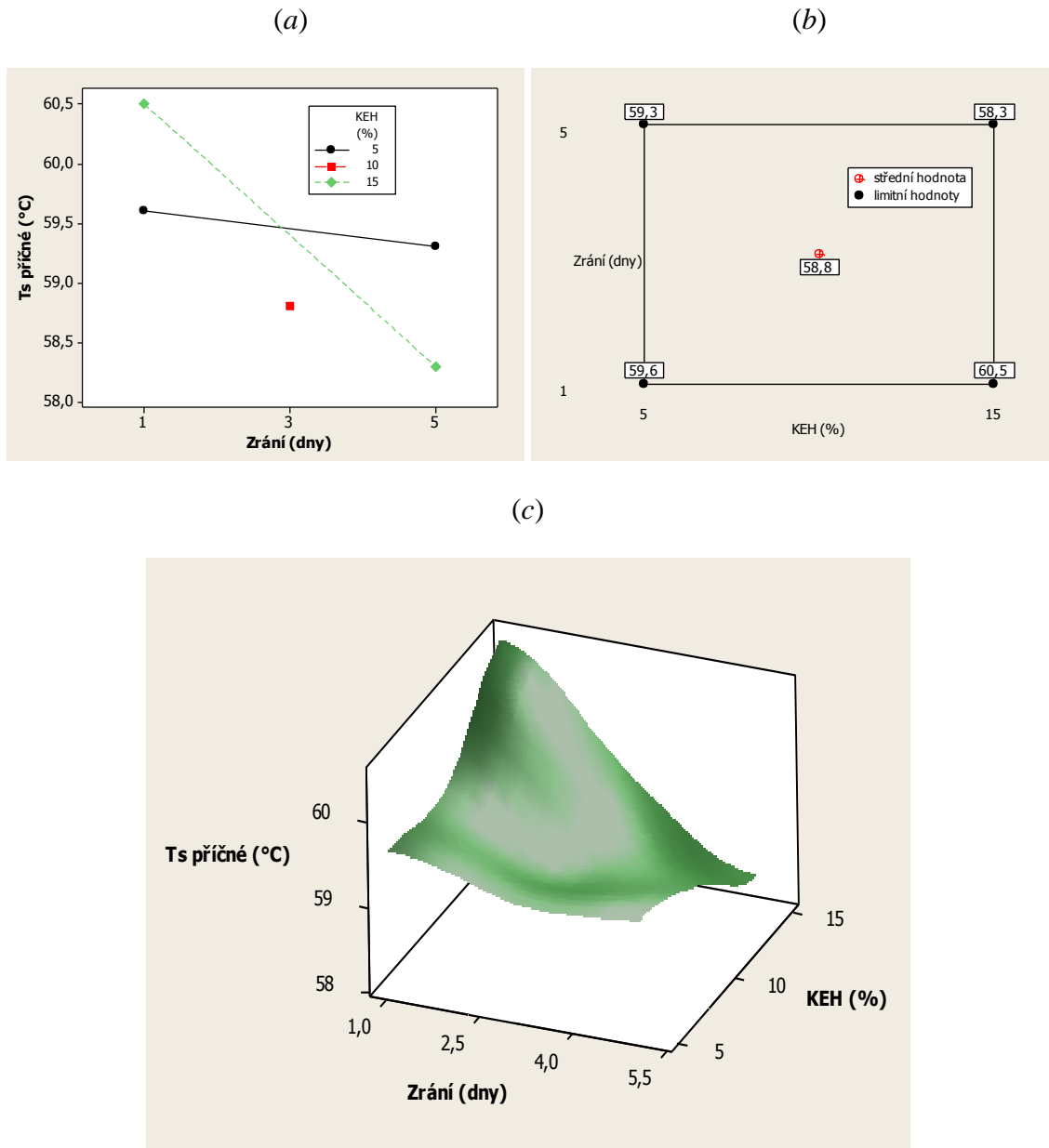


Obrázek č.31 – Vliv přídavku KEH a doby zrání na T_s v podélném směru při síťování KEH.

Grafické znázornění teploty smršťení v podélném směru (a) ukazuje snížení teploty při minimálním i maximálním přídavku. Nejvýraznější pokles byl u maximálního přídavku (15 % KEH). Nejvyšší teplotou smršťení (b) byla 57,0 $^\circ\text{C}$ (5 % KEH po 1 dni zrání), nejnižší teplotou byla 54,8 $^\circ\text{C}$ (10 % po 2 dnech zrání). Ve 3D grafu (c) můžeme vidět postupný pokles teploty v závislosti na čase. Nejvyšších hodnot teplot smršťení se dosáhlo při 1 dni zrání. S delší dobou se teplota smršťení v podélném směru zhoršovala.

Teplota smršštění v příčném směru je popsána v rovnici:

$$T_s \text{ příčné (}^\circ\text{C)} = 60,3 - 0,0050 \text{ KEH (\%)} - 0,312 \text{ Zrání (dny)}$$



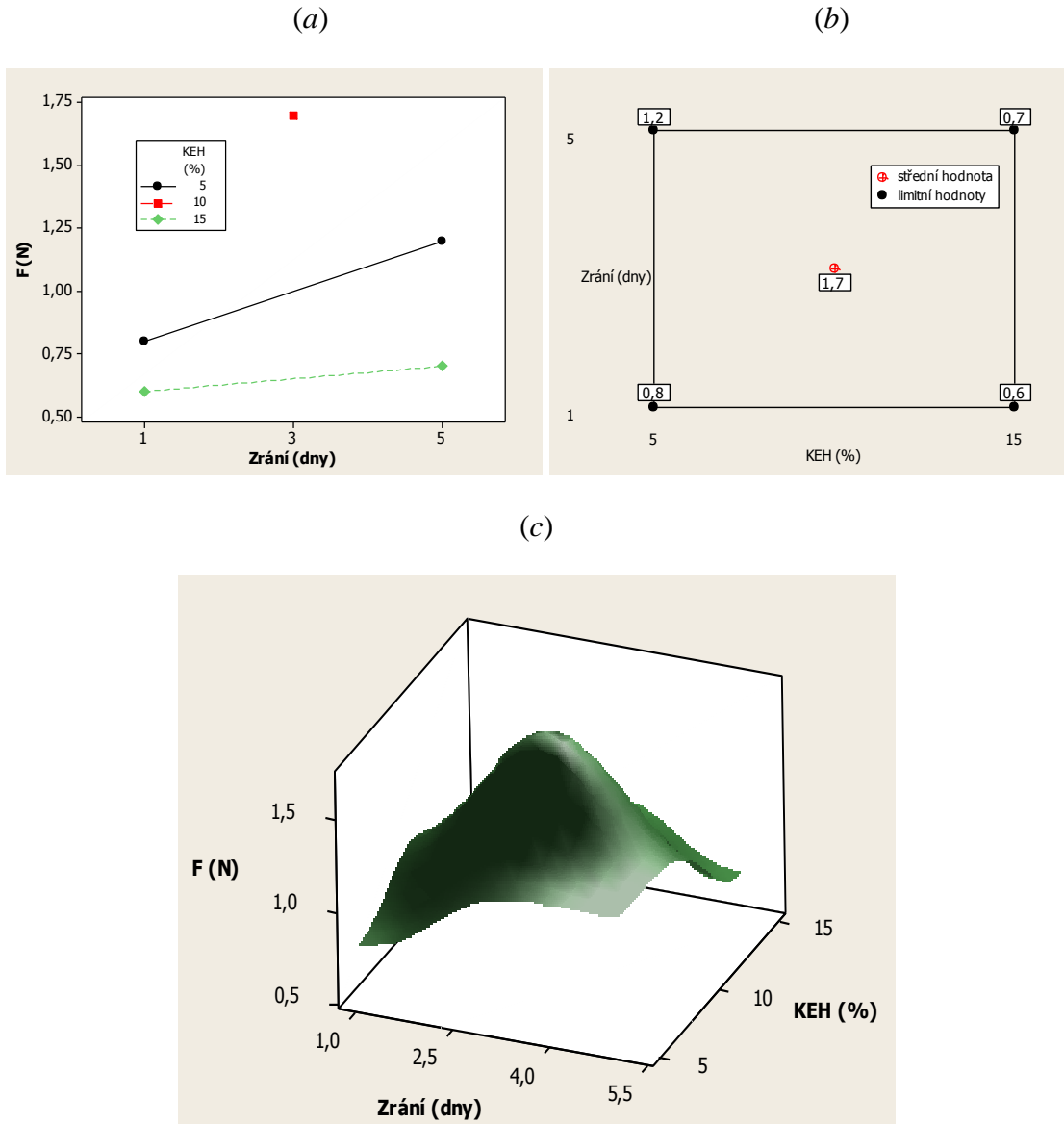
Obrázek č.32 – Vliv přídavku KEH a doby zrání na T_s v příčném směru při síťování KEH.

Na obrázku (a) je zobrazeno snížení teploty smršštění v příčném směru u všech koncentrací. Nejnižší přídavek (5 % KEH) má mírný pokles teploty, výrazný pokles teploty byl u nejvyššího přídavku (15 % KEH). Kubický graf (b) ukazuje maximální teplotu (60,5 °C) při 15 % KEH po 1 dni zrání a minimální teplotu (58,3 °C) při 15 % KEH po 5 dnech zrání. Na 3D grafu (c) je zobrazeno, že nejvyšší teploty smršštění pro všechny přídavky KEH je dosaženo po 1 dni zrání. Poté teplota klesala.

7.1.2 Mechanické vlastnosti

Tahová síla při přetržení (F) je popsána následující regresní rovnicí:

$$F \text{ (N)} = 1,16 - 0,0350 \text{ KEH (\%)} + 0,062 \text{ Zrání (dny)}$$

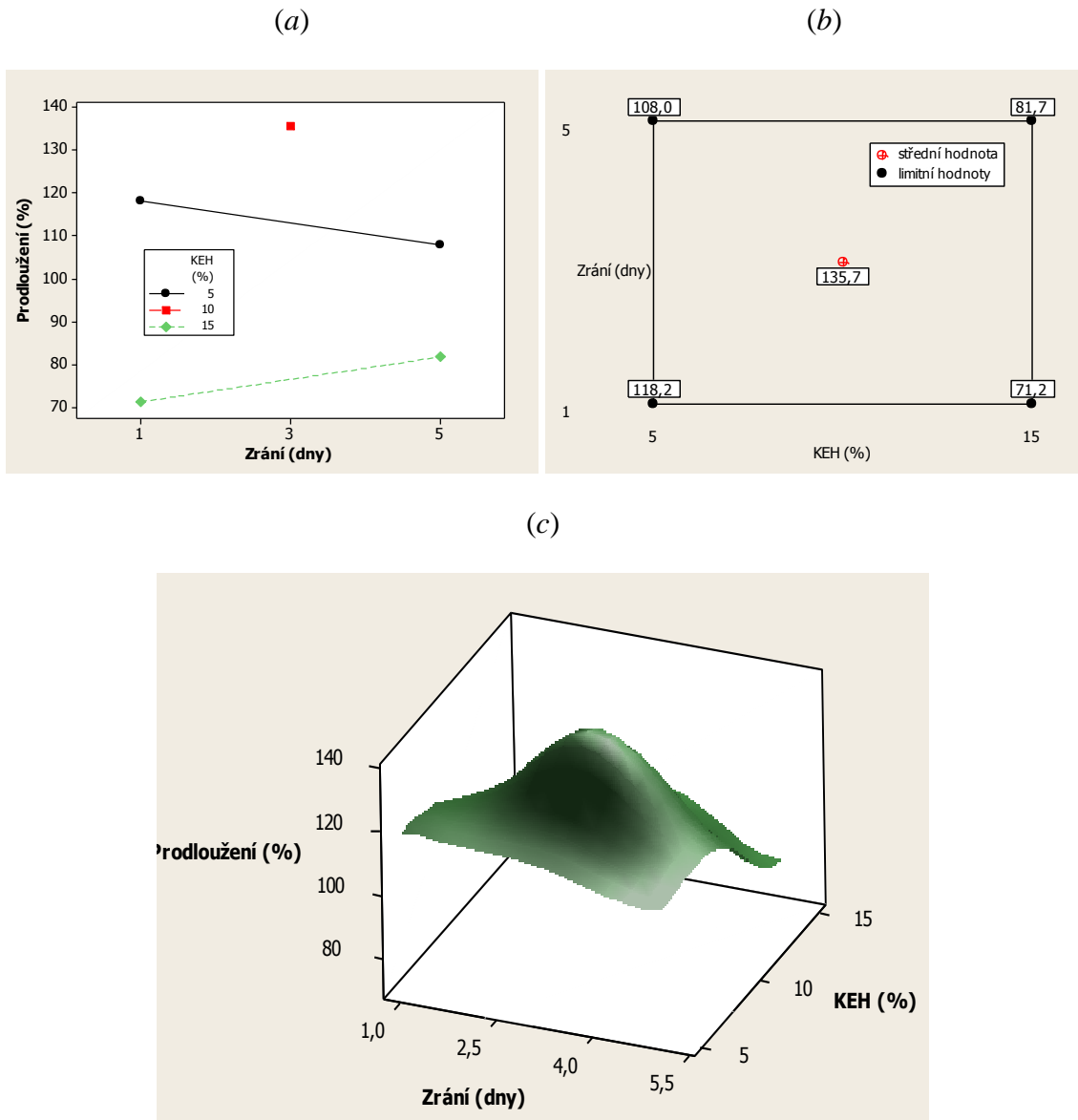


Obrázek č.33 – Vliv přídavku KEH a doby zrání na tahovou sílu při síťování KEH.

Na grafu (a) je ukázáno postupné zvyšování tahové síly při přetržení při všech přídavcích KEH po delším čase zrání. Maximální přídavek KEH (15 %) zvyšovala tahovou sílu mírněji než minimální přídavek (5 %). Tahová síla na obrázku (b) dosáhla maxima (1,7 N) při 10 % KEH po 2 dnech zrání a minima (0,6 N) při 15 % po 1 dni zrání. Ve 3D grafu (c) jsou zobrazena vysoké tahové síly po delším čase zrání.

Poměrné prodloužení při přetržení (ϵ) je popsáno rovnicí:

$$\epsilon (\%) = 139 - 3,67 \text{ KEH} (\%) + 0,04 \text{ Zrání (dny)}$$



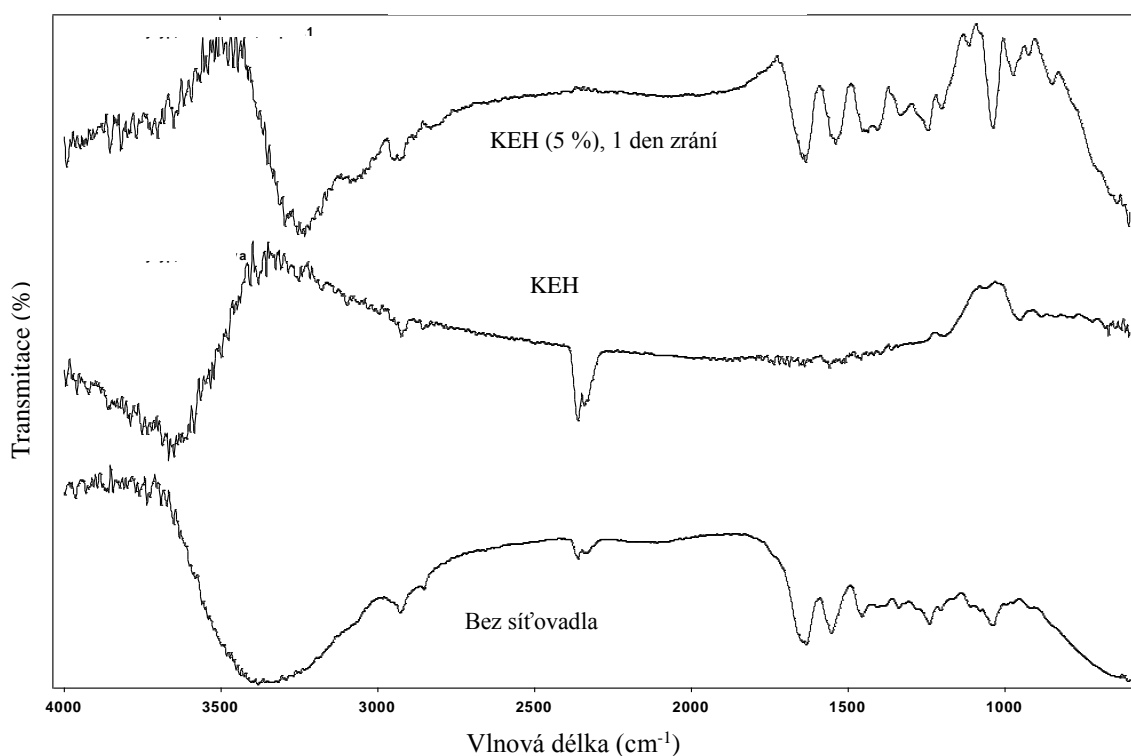
Obrázek č.34 – Vliv přídavku KEH a doby zrání na poměrné prodloužení při síťování KEH.

Poměrné prodloužení při přetržení v grafu (a) s dobou zrání při nejnižším přídavku KEH (5 %) mírně klesá, při přídavku 15 % KEH mírně stoupá. Kubické zobrazení (b) ukazuje jako maximální prodloužení 135,7 % (10 % KEH po 2 dnech zrání) a jako minimální 71,2 % (15 % KEH po 1 dni zrání). Ve 3D grafu (c) je ukázáno, že doba zrání pro přídavek 5 % KEH zhoršuje poměrné prodloužení při přetržení, ale při přídavku 15 % KEH dochází ke zlepšování hodnot poměrného prodloužení.

7.1.3 FTIR

Tabulka č.4 – Odlišnosti charakteristických piků filmů č.1–7 síťovaných KEH s piky filmu bez síťovadla.

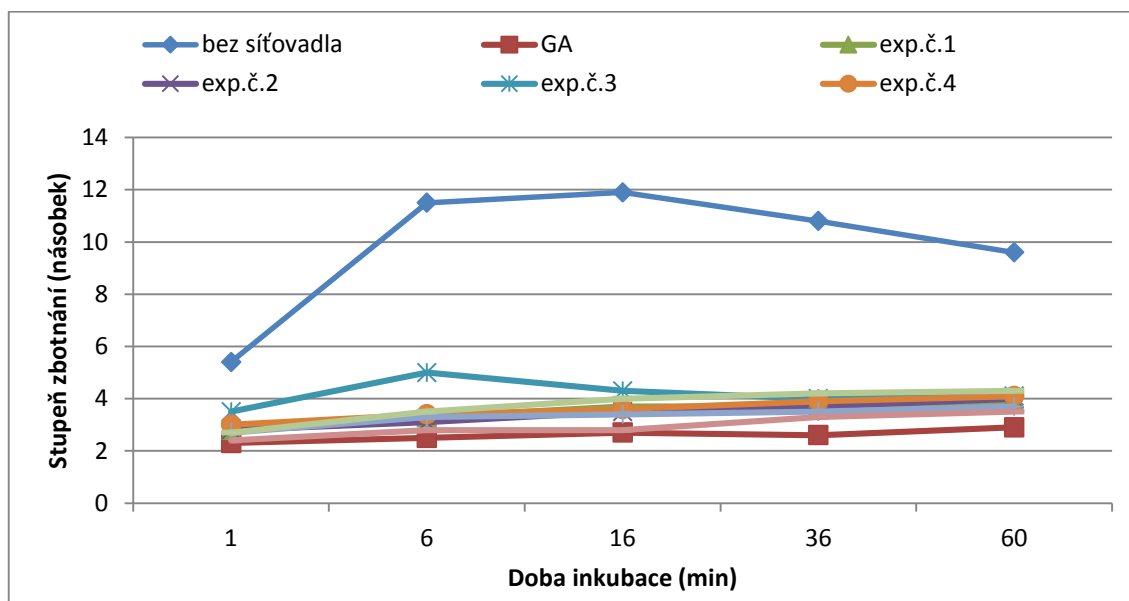
Funkční skupina	Vlnověť (cm ⁻¹)	Film						
		1	2	3	4	5	6	7
Srovnání piků filmů síťovaných KEH s piky filmu bez síťovadla								
vibrace –OH skupiny	3650–3200	Posun, slabší pik	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení
vibrace –(C)–CH ₂ , –(O)–CH ₂	2925	Posun, vyšší intenzita	Posun, nižší intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová I vazba)	1635	Stejná intenzita	Slabší intenzita	Slabá intenzita	Vymizení	Výrazně slabší intenzita	Výrazně slabší intenzita	Vymizení
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová II vazba)	1550	Stejná intenzita	Slabší intenzita	Velmi slabá intenzita	Vymizení	Vymizení	Výrazně slabší intenzita	Vymizení
vibrace –CH ₂ a –CH ₃ skupin	1455	Posun, sl. intenzita	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení
vibrace –COOH skupiny	1400	Vyšší intenzita	Posun, sl. intenzita	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení
vibrace skupiny C–N cyklického prolinu	1340	Stejná intenzita	Slabší intenzita	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová III vazba)	1240	Stejná intenzita	Posun, slabší intenzita	Posun, slabší intenzita	Posun, slabší intenzita	Vymizení	Slabší intenzita	Slabší intenzita
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová III vazba)	1204	Vyšší intenzita	Posun, vyšší intenzita	Posun, vyšší intenzita	Posun, vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita
vibrace skupiny R–NH ₂	1115	Vyšší intenzita	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení
vibrace skupiny R–NH ₂	1080	Slabší intenzita	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení
vibrace primární funkční skupina R–OH	1038	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita
vibrace –OH skupiny	920	Vyšší intenzita	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Slabší intenzita	Slabší intenzita
Nové vzniklé piky								
vibrace –(C)–CH ₂ –	2953	Střední pik	Slabý pik	Slabý pik	Slabý pik	Slabý pik	Slabý pik	Slabý pik
vibrace –CHO	1744			Slabý pik	Slabý pik	Slabý pik	Slabý pik	Slabý pik
vibrace –CH=CH–, cis	1020			Slabý pik	Slabý pik	Slabý pik	Slabý pik	Slabý pik
vibrace –CH	980–780	3>Střední pik	1× Vysoký pik, 2× Slabý pik	1× Vysoký pik, 3× Slabý pik	1× Vysoký pik, 3>Slabý pik	1× Vysoký pik, 2× Velmi slabý pik	1× Slabý pik, 2× Velmi slabý pik	1× Slabý pik, 2× Velmi slabý pik
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová III vazba)	720		Vysoký pik	Vysoký pik	Vysoký pik	Slabý pik	Velmi slabý pik	Velmi slabý pik



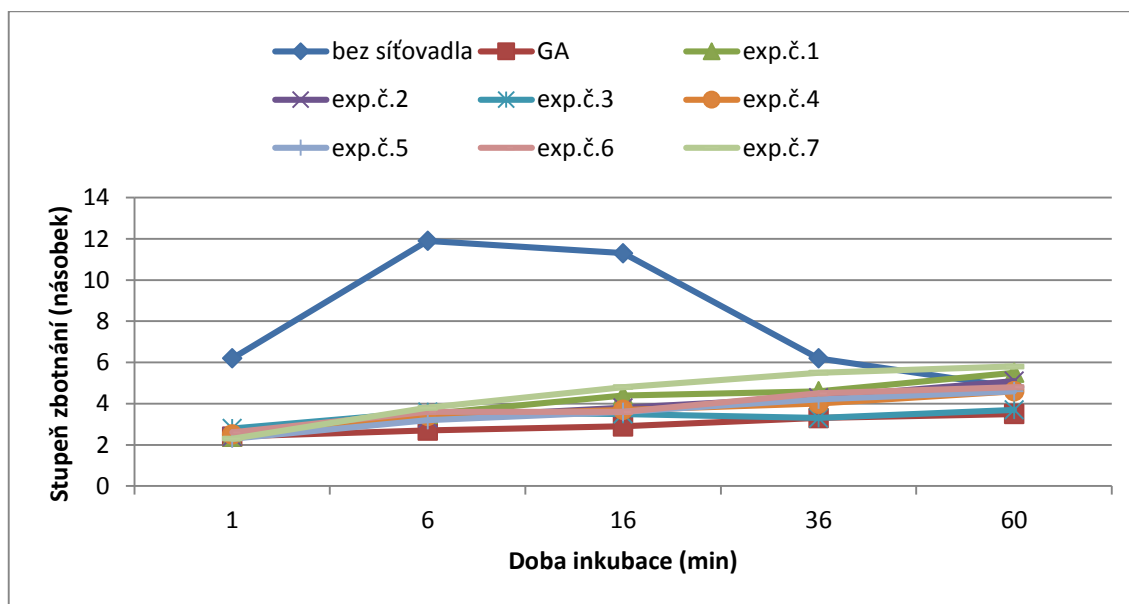
Obrázek č.35 – FTIR spektrum kolagenního filmu bez síťovadla, KEH a kolagenního filmu síťovaného KEH.

V tabulce č.4 je ukázáno, že charakteristické vibrace pro –OH skupiny (3650–3200 a 1038 cm⁻¹), amidovou I vazbu (1635 cm⁻¹), amidovou II vazbu (1550 cm⁻¹) a alifatické skupiny –CH₂ a –CH₃ (1455 cm⁻¹) zmizely, nebo byly slabé, což indikuje, že KEH reagoval s kolagenem. Snížení nebo vymizení vazeb mezi CN a NH (1340, 1115 a 1080 cm⁻¹) ukazuje na reakci kolagenu s KEH. Vibrace amidové III vazby (1204 cm⁻¹) se zvýšila.

7.1.4 Botnací test

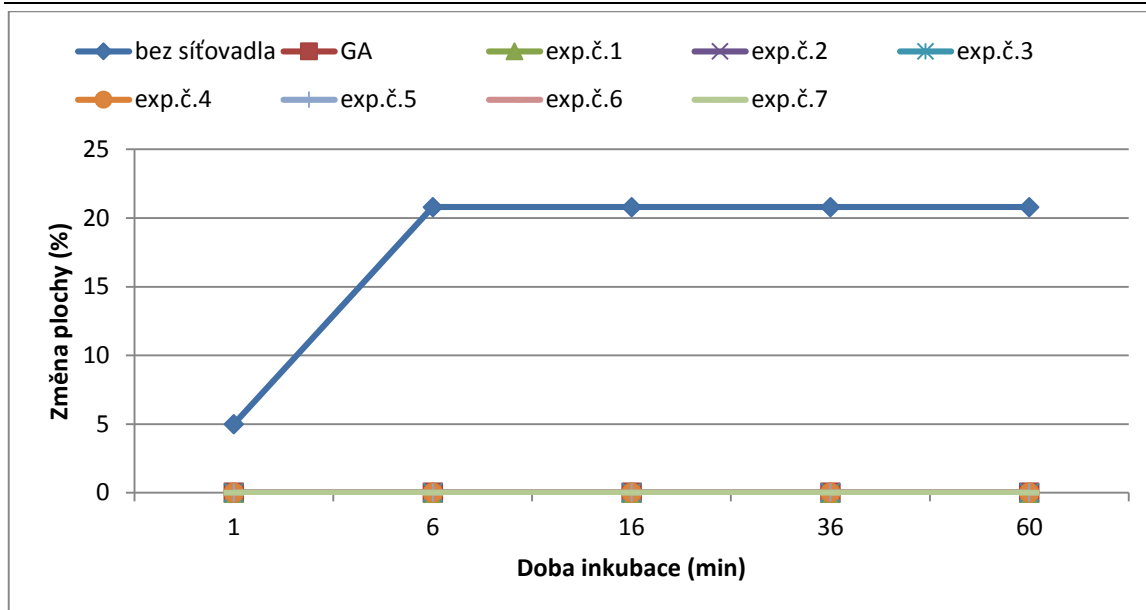


Obrázek č.36– Stupeň zbotnění filmů při 26 °C.

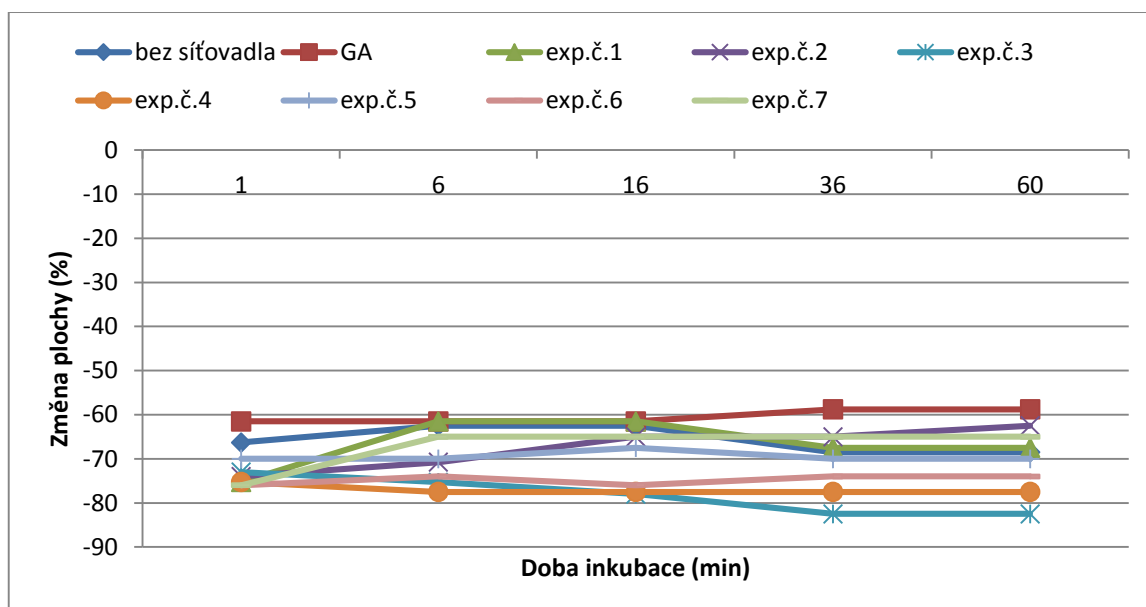


Obrázek č.37– Stupeň zbotnění filmů při 80 °C.

Při 26 °C nejvíce zbotnal kolagenní gel bez síťovadla. Jako nejvhodnější síťovadlo se ukázal GA. Vhodným síťovadlem je i experiment č.6 (2 % KEH po 1 dni zrání). Experimenty se na začátku botnacího testu lišily mezi sebou jen o desetiny stupňů zbotnění. Tento trend pokračoval během celého testu až do konce. Test při 80 °C ukázal největší stupeň zbotnění u kolagenního gelu bez síťovadla. GA společně s experimentem č.3 (15 % KEH po 1 dni zrání) měl nejmenší stupeň zbotnění. Na začátku experimentu měly všechny koncentrace téměř stejné stupně zbotnění. V průběhu experimentu začaly mezi nimi být větší rozdíly.



Obrázek č.38– Změna plochy filmů při 26 °C.



Obrázek č.39– Změna plochy filmů při 80 °C.

Při 26 °C se plocha změnila jen u kolagenního filmu bez síťovadla. U žádného z experimentů a kolagenního filmu síťovaného GA, nedošlo ke změně plochy. Nejmenší změna plochy při 80 °C byla u kolagenního gelu síťovaného GA a kolagenního film bez síťovadla. Experiment č.3 (15 % KEH po 1 dni zrání) se ukázal jako nejméně vhodný. Ke zmenšení plochy docházelo ihned po 1 minutě. Další zmenšení plochy filmů bylo po 16 minutě, a poté byly stabilní.

7.2 Síťování vláknitého kolagenu kolagen-elastinovým hydrolyzátem a glutaraldehydem

Tabulka č.5 – Souhrnné výsledky ukazatelů zesítnění kolagenního gelu síťovaného

KEH a GA.

Experiment č.	Faktor A, Množství KEH (%)	Faktor B, Doba zrání kolagenní hmoty (dny)	Obsah sušiny filmu (%)	Tloušťka filmu (mm)	T _s podélné (°C)	T _s příčné (°C)	F (N)	σ	ε (%)
Bez síťovadla									
2 % GA									
1	3	1	92,5	0,086±0,005	59,0	55,1	1,6	13,3	136,7
2	3	3	92,5	0,081±0,004	56,3	62,2	2,2	25,4	135,6
3	9	1	90,7	0,078±0,005	54,5	60,2	1,5	11,5	138,8
4	9	3	93,3	0,079±0,002	54,9	62,1	1,5	24,4	129,5
5	6	2	91,8	0,069±0,003	54,0	57,9	1,6	20,0	137,0

F – tahová síla při přetržení; σ – směrodatná odchylka pro tahovou sílu při přetržení;
ε – poměrné prodloužení při přetržení

7.2.1 Teplota smrštění

V tabulce č.6 jsou zobrazené prodloužení/smrštění filmů v podélném a příčném směru.

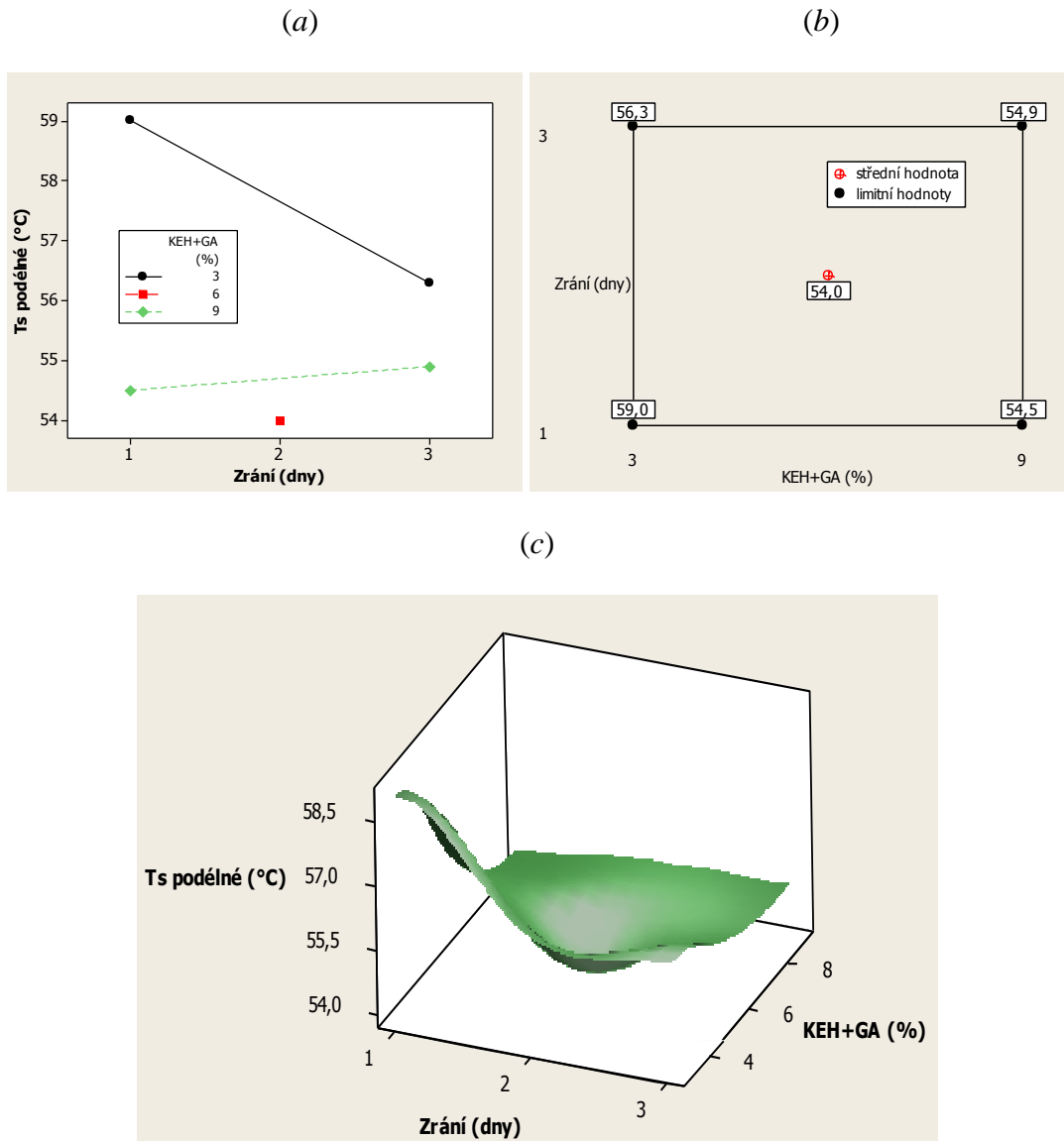
Tabulka č.6 – Prodloužení/smrštění filmů síťovaných KEH a GA v podélném a příčném směru.

Experiment č.	Prodloužení (-)/smrštění (+) filmu v podélném směru				Prodloužení (-)/smrštění (+) filmu v příčném směru			
	4 min bez záhřevu při pokojové teplotě (mm)	Tz – Ts (mm)	Ts – T (mm)	T – 90 °C (mm)	4 min bez záhřevu při pokojové teplotě (mm)	Tz – Ts (mm)	Ts – T (mm)	T – 90 °C (mm)
Bez síťovadla	-1,8	0	+15,5(T=77,4 °C)	0	-4,0	0	+2,0(T=72,0 °C)	0
2 % GA	0	0	+14,0	0	0	0	+7,0(T=70,0 °C)	0
1	-2,6	0	+16,9(T=74,4 °C)	0	-1,3	0	+10,4(T=72,0 °C)	0
2	-1,3	0	+16,3(T=73,6 °C)	0	-2,0	-2,0	+2,6(T=72,4 °C)	0
3	-1,3	0	+15,6(T=74,0 °C)	0	-1,3	-2,0	+3,9(T=63,5 °C)	+0,7
4	-1,3	0	+16,3(T=66,3 °C)	+0,7	-2,0	-2,6	+9,8(T=75,3 °C)	0
5	-2,0	-0,7	+15,0(T=78,4 °C)	0	-2,6	-1,3	+5,2(T=66,3 °C)	0

Tz – teplota, při které se systém začal zahřívát; Ts – teplota, při které se film začal smršťovat; T – teplota ukončení smršťování filmu, ** film se při zkoušce utrlh;

Teplota smrštění (T_s) v podélném směru je popsána regresní rovnicí:

$$T_s \text{ podélné } (^\circ\text{C}) = 59,8 - 0,492 \text{ KEH+GA } (\%) - 0,575 \text{ Zrání (dny)}$$

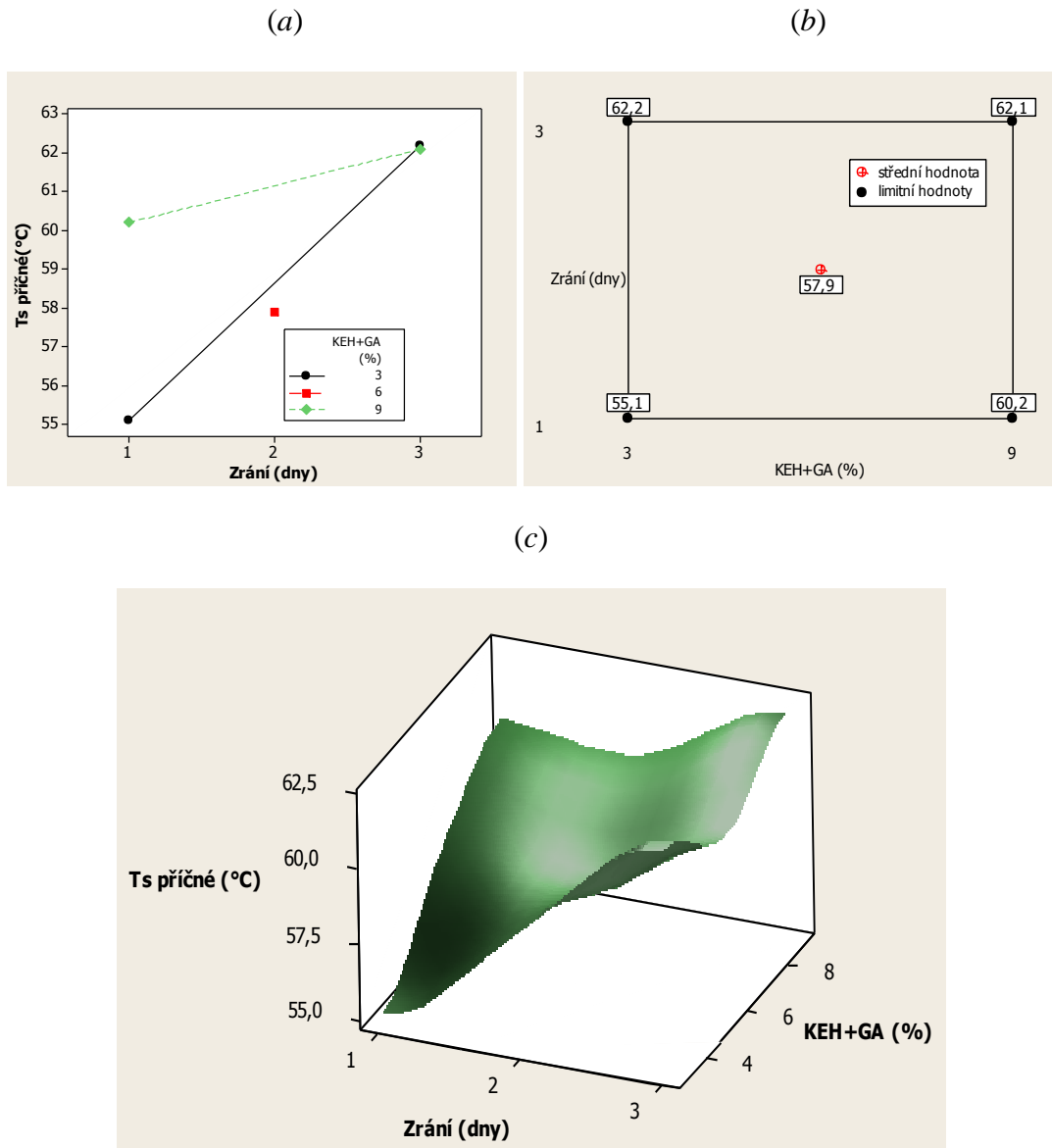


Obrázek č.40 – Vliv přídavku KEH a doby zrání na T_s v podélném směru při síťování KEH a GA.

Grafické znázornění teploty smrštění v podélném směru (a) ukazuje snížení teploty při nejnižších přídavcích. Při nejvyšším přídavku teplota mírně stoupá. Nejvyšší teplotou smrštění (b) byla 59,0 °C (3 % KEH po 1 dni zrání) a nejnižší byla 54,0 °C (6 % KEH po 2 dnech zrání). Ve 3D grafu (c) můžeme vidět postupný pokles teploty pro přídavku 3 % KEH v závislosti na čase. Teplota smrštění v podélném směru se pro přídavek 9 % KEH s delší dobou zrání zvyšuje.

Teplota smršťení v příčném směru je popsána regresní rovnicí:

$$T_s \text{ příčné (}^\circ\text{C)} = 52,5 + 0,417 \text{ KEH+GA (\%)} + 2,25 \text{ Zrání (dny)}$$



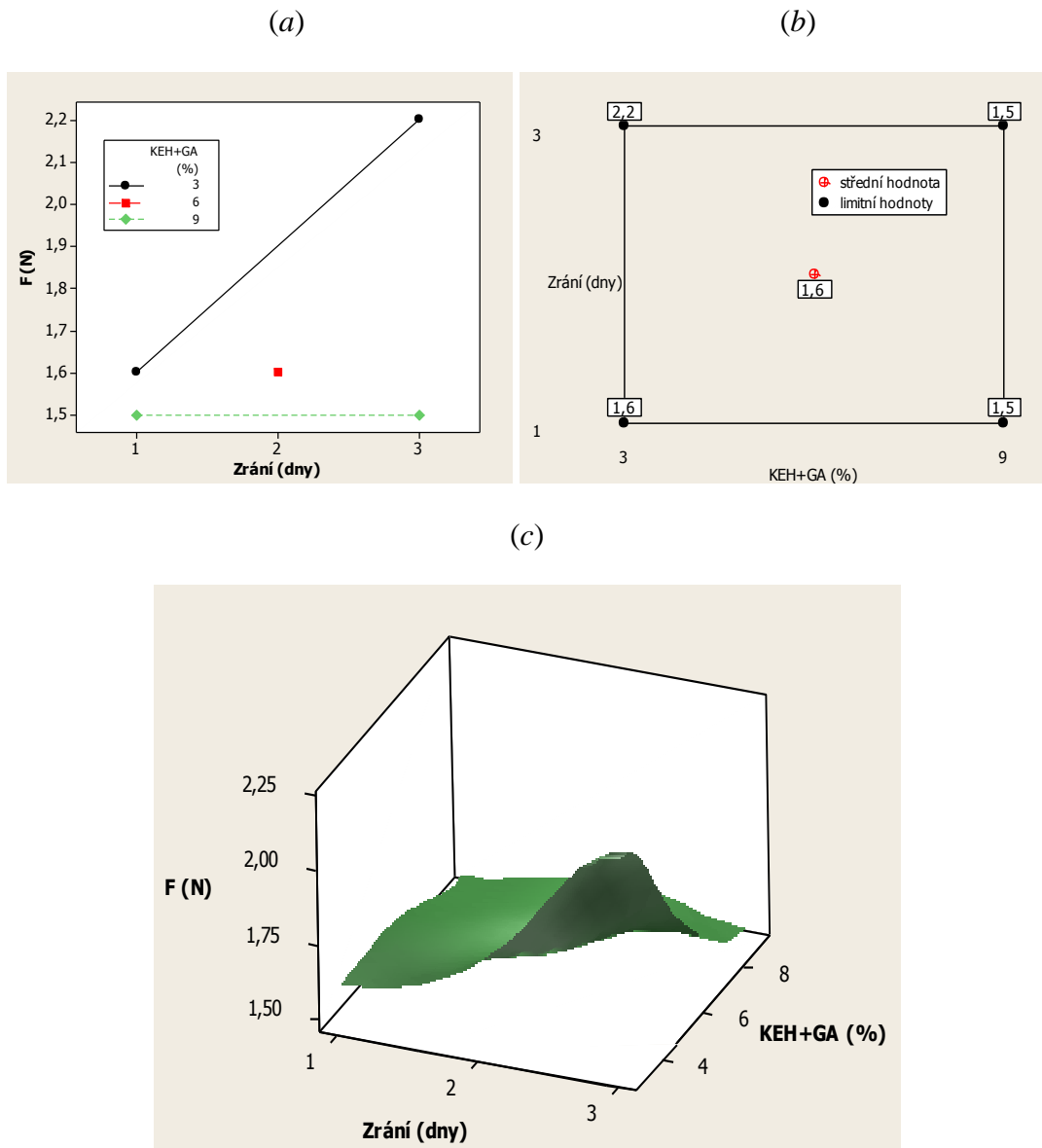
Obrázek č.41 – Vliv přidavku KEH a doby zrání na T_s v příčném směru při síťování KEH a GA.

Na obrázku (a) je zobrazeno výrazné zvýšení teploty smršťení v příčném směru u všech přídavicích. Teplota nejnižšího přídavku (3 % KEH) se zvyšuje mírněji než nejvyššího přídavku (9 % KEH). Kubický graf (b) ukazuje maximální teplotu (62,2 °C) při 3 % KEH po 3 dnech zrání a minimální (55,1 °C) při 3 % KEH po 1dnech zrání. Na 3D grafu (c) je zobrazeno, že nejvyšší teploty smršťení se dosáhlo po 3 dnech zrání.

7.2.2 Mechanické vlastnosti

Tahová síla při přetržení (F) je popsána regresní rovnicí:

$$F \text{ (N)} = 1,78 - 0,0667 \text{ KEH+GA (\%)} + 0,150 \text{ Zrání (dny)}$$

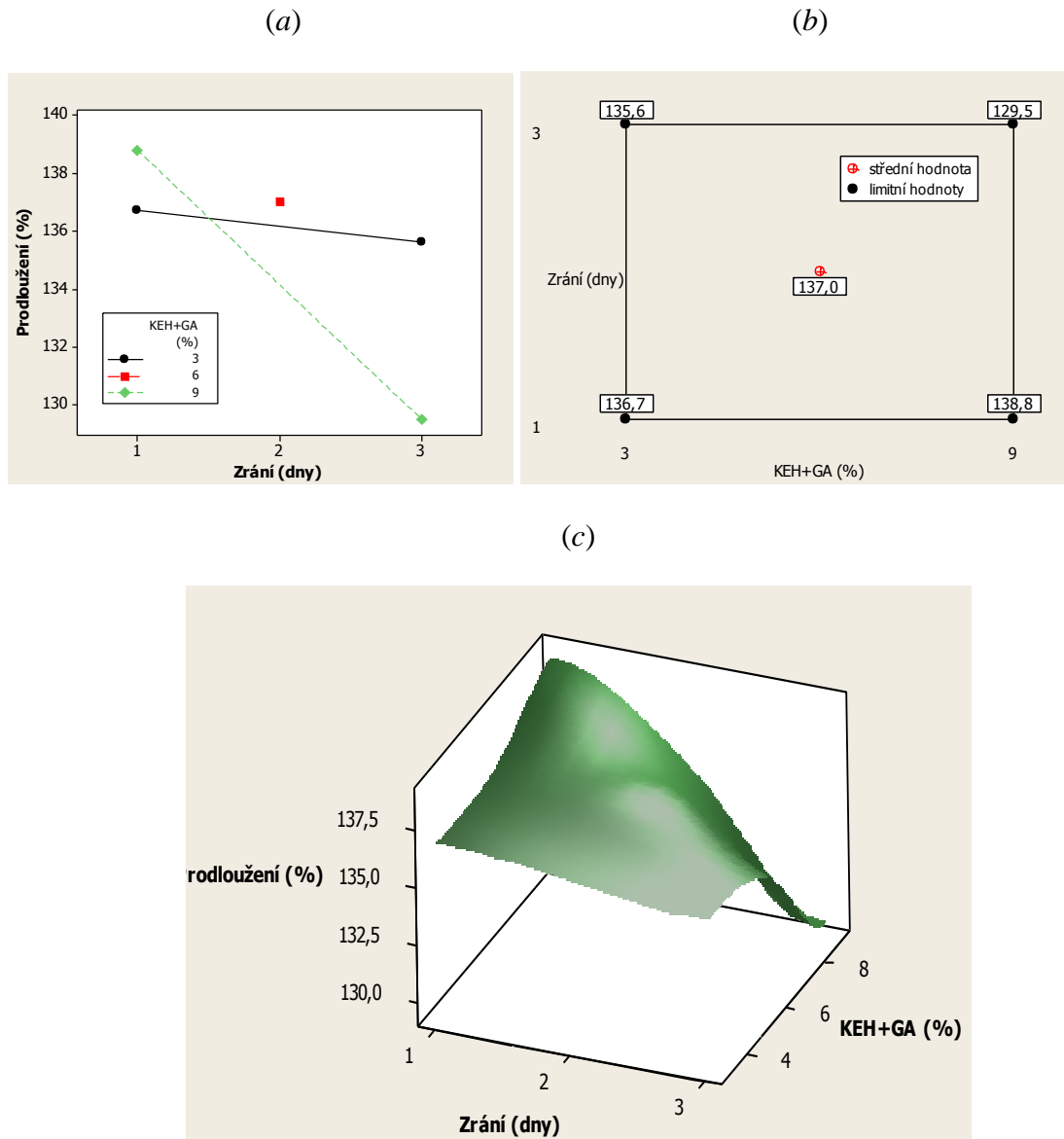


Obrázek č.42 – Vliv přídavku KEH a doby zrání na tahovou sílu při síťování KEH a GA.

Na grafu (a) je ukázáno zvýšení tahové síly při přetržení při nejnižším přídavku KEH (3 %). Nejvyšší přídavek KEH (9 %) se s delší dobou zrání nezměnila. Tahové síla (b) dosahuje maxima (2,2 N) při 3 % KEH po 3 dnech zrání a minima (1,5 N) při 9 % KEH po 1 a 3 dnech zrání. Ve 3D grafu (c) je zobrazena vysoká tahová síla při přetržení po delším čase zrání při nejnižším přídavku. Krátký čas zrání (1 den) tahovou sílu nezvyšoval.

Poměrné prodloužení při přetržení (ϵ) je popsána regresní rovnicí:

$$\epsilon (\%) = 143 - 0,333 \text{ KEH+GA } (\%) - 2,60 \text{ Zrání (dny)}$$



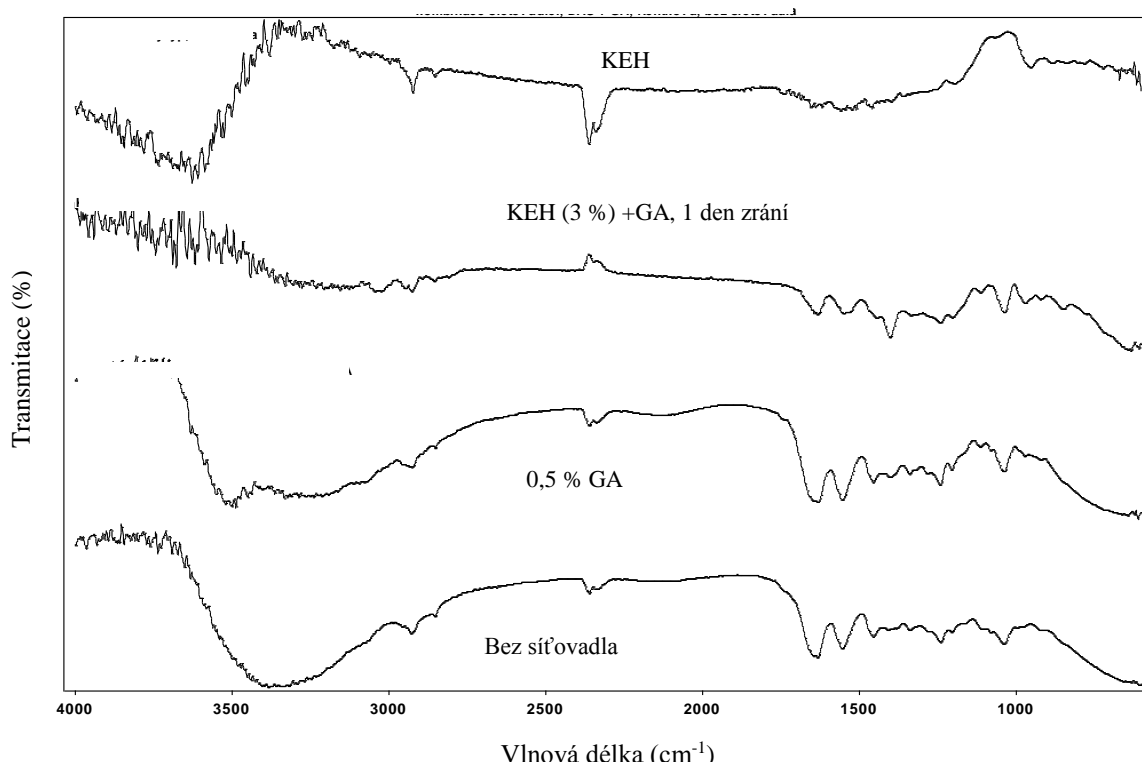
Obrázek č.43 – Vliv přídavku KEH a doby zrání na poměrné prodloužení při síťování KEH a GA.

Poměrné prodloužení při přetržení v grafu (a) s dobou zrání při nejnižším přídavku KEH (3 %) mírně klesá, při nejvyšším přídavku KEH (9 %) klesá výrazně. Kubické zobrazení (b) ukazuje jako maximální prodloužení 138,8 % (9 % KEH po 1 dni zrání) a jako minimální 129,5 % (9 % po 3 dnech zrání). Ve 3D grafu (c) je ukázáno, že doba zrání pro všechny přídavky KEH zhoršuje poměrné prodloužení při přetržení. Největší pokles byl u 9 % KEH.

7.2.3 FTIR

Tabulka č.7 – Odlišnosti charakteristických piků filmů č.1–5 síťovaných KEH a GA s piky filmu bez síťovadla.

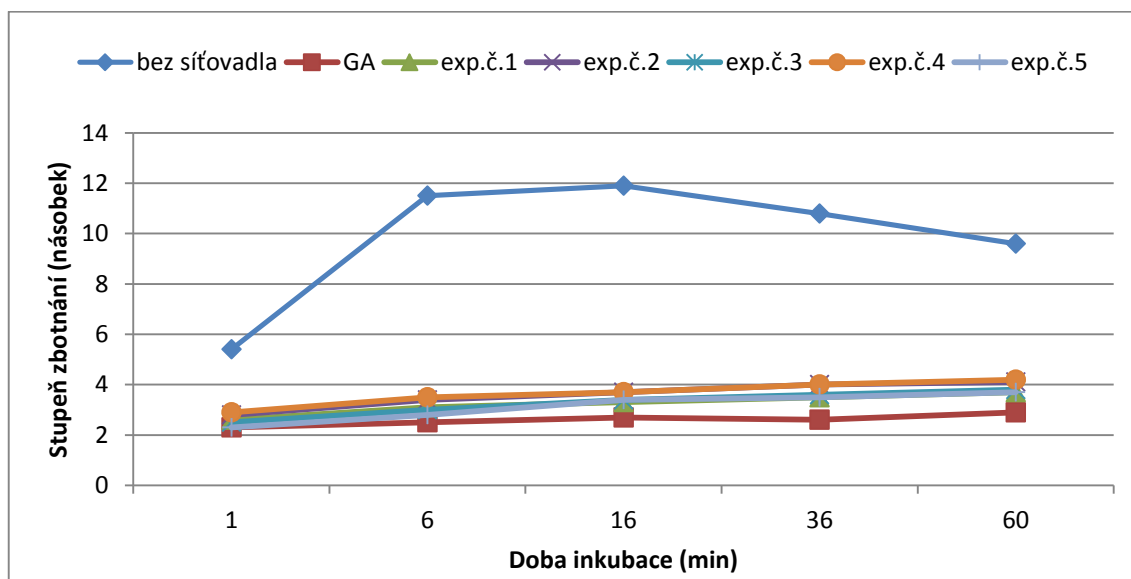
Funkční skupina	Vlnočet (cm ⁻¹)	Filmy				
		1	2	3	4	5
Srovnání piků síťovaných KEH a GA s piky filmu bez síťovadla						
vibrace –OH skupiny	3650–3200	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení
vibrace –(C)–CH ₂ –(O)–CH ₂	2925	Stejná intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová I vazba)	1635	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Slabší intenzita
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová II vazba)	1550	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita
vibrace –CH ₂ a –CH ₃ skupin	1455	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita
vibrace –COOH skupiny	1400	Vyšší intenzita	Vymizení	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Stejná intenzita
vibrace skupiny C–N cyklického prolínu	1340	Slabší intenzita	Vymizení	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Slabší intenzita
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová III vazba)	1240	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Posunutí, slabší intenzita	Posunutí, slabší intenzita	Vymizení
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová III vazba)	1204	Stejná intenzita	Posunutí, vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita
vibrace skupiny R–NH ₂	1115	Stejná intenzita	Slabší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vymizení
vibrace skupiny R–NH ₂	1080	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita
vibrace primární funkční skupina R–OH	1038	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita
vibrace –OH skupiny	920	Stejná intenzita	Vymizení	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Mírně vyšší intenzita
Nové vzniklé piky						
vibrace –(C)–CH ₂ –	2953	Slabý pik				
vibrace –CHO	2930	Slabý pik	Slabý pik	Slabý pik	Střední pik	Vysoký pik
vibrace –CH=CH ⁺ , dis	1744					Slabý pik
vibrace –CH	980–780	3×Střední pik, 2× Slabý pik	4×Slabý pik,	3×Střední pik, 3× Slabý pik	3×Střední pik, 3× Slabý pik	2×Střední pik, 4× Slabý pik
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová III vazba)	720	Slabý pik		Vysoký pik	Vysoký pik	Slabý pik



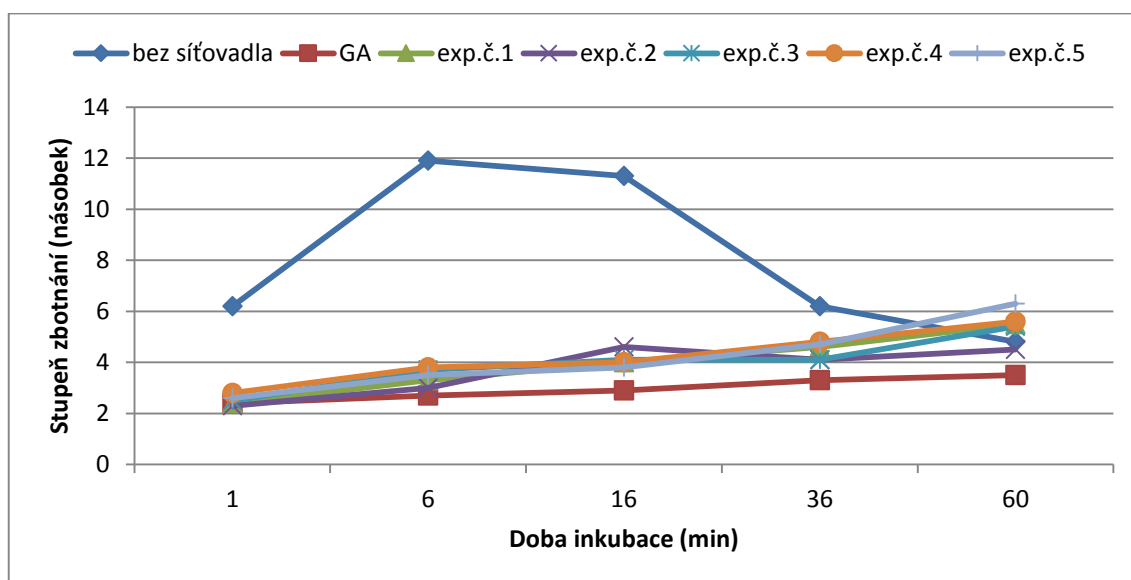
Obrázek č.44 – FTIR spektrum kolagenního filmu bez síťovadla, KEH, kolagenního filmu síťovaného 0,5 % GA a kolagenního filmu síťovaného KEH a GA.

V tabulce č.7 je ukázáno, že charakteristické vibrace pro –OH skupiny (3650–3200 cm⁻¹) vymizely. Amidová I vazba (1635 cm⁻¹), amidová II vazba (1550 cm⁻¹) a alifatická skupina –CH₂ a –CH₃ (1455 cm⁻¹) byla slabá nebo stejná, což indikuje, že KEH reagoval s kolagenem částečně nebo vůbec. Vibrace amidové III vazby (1204 cm⁻¹) se zvýšila reakcí KEH s kolagenem. Obsah –NH₂ skupin kolagenu zůstal nezměněn (1080 cm⁻¹).

7.2.4 Botnací test

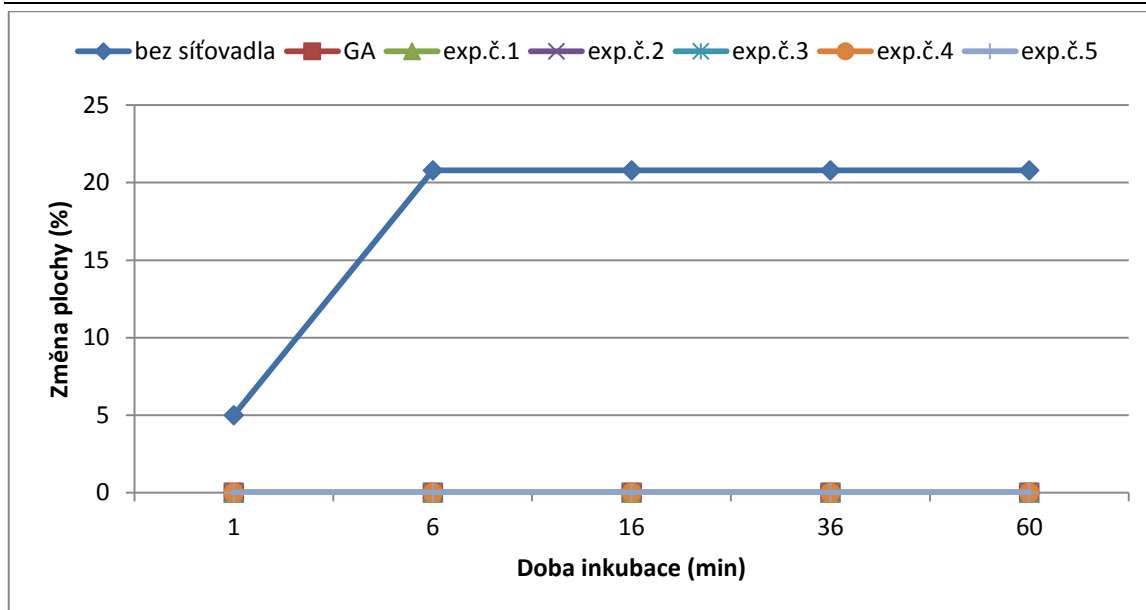


Obrázek č.45 – Stupeň zbotnění filmů při 26 °C.

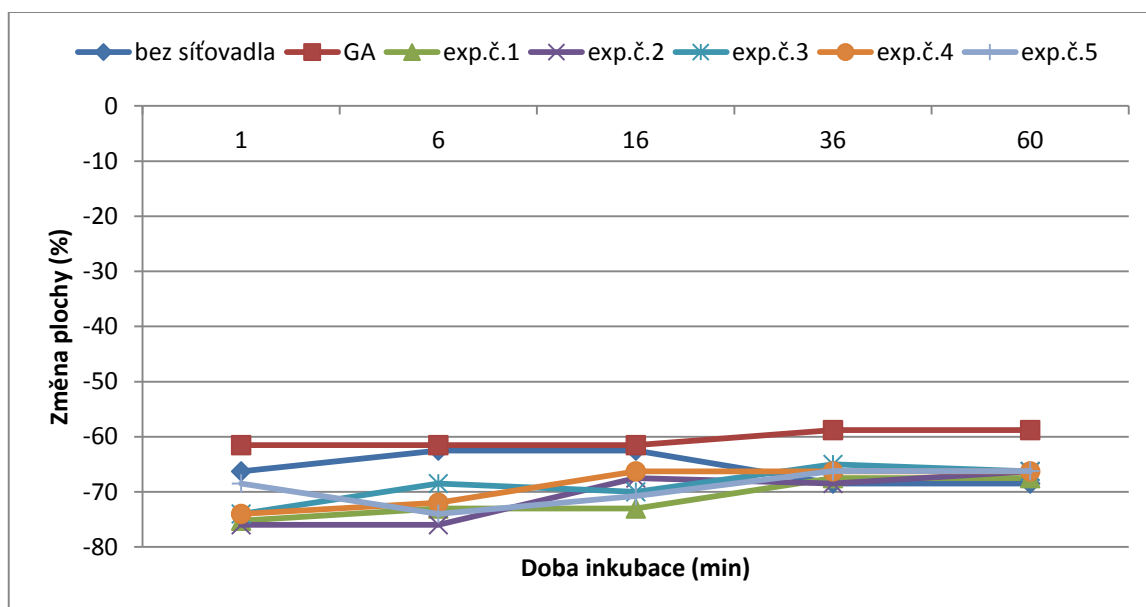


Obrázek č.46 – Stupeň zbotnění filmů při 80 °C.

Při 26 °C nejvíce zbotnal kolagenní gel bez síťovadla. Nejvhodnější síťovadlo je GA. Vhodným síťovadlem se ukázaly i experiment č.1 (3 % KEH po 1 dni zrání), experiment č.3 (9 % KEH po 1 dni zrání) a experiment č.5 (6 % KEH po 2 dnech zrání). Experimenty měly na začátku téměř stejné stupně zbotnění. Experimenty se 3 dny zrání měly stejné stupně zbotnění, stejně jako experimenty s menší dobou zrání. Test při 80 °C ukázal největší stupeň zbotnění u kolagenního gelu bez síťovadla. Nejméně zbotnal kolagenní gel s GA. Po 1 minutě testu se experimenty lišily jen o pár desetiny stupňů zbotnění. Po 16 minutě docházelo mezi experimenty k větším rozdílům.



Obrázek č.47 – Změna plochy filmů při 26 °C.



Obrázek č.48 – Změna plochy filmů při 80 °C.

Při 26 °C se plocha změnila jen u kolagenního filmu bez síťovadla. U žádného z experimentů a kolagenního filmu síťovaného GA, nedošlo ke změně plochy. Nejmenší změna plochy při 80 °C byla u kolagenního gelu síťovaného GA. Do 16 minut patřil mezi nejlepší i kolagenní gel bez síťovadla. Experiment č.2 (3 % KEH po 3 dnech zrání) a experiment č.1 (3 % KEH po 1 dni zrání) se ukázaly jako nejméně vhodné. V průběhu testu se rozdíly ve změně plochy jednotlivých experimentů začaly mírnit a sjednocovat. Po 36 minutě se plochy neměnily a byly téměř totožné.

7.3 Síťování vláknitého kolagenu keratinovým hydrolyzátem

Tabulka č.8 – Souhrnné výsledky ukazatelů zesítnění kolagenního gelu síťovaného

KH.

Experiment č.	Faktor A, Množství KH (%)	Faktor B, Doba zrání kolagenní hmoty (dny)	Obsah sušiny filmu (%)	Tloušťka filmu (mm)	T _s podélné (°C)	T _s příčné (°C)	F (N)	σ	ε (%)
Bez síťovadla			88,0	0,065±0,005	49,5	48,0	0,5	21,3	98,5
2 % GA			94,8	0,050±0,005	52,2	52,1	5,3	13,3	146,0
1	3	1	91,6	0,077±0,005	57,4	63,6	0,8	34,3	130,5
2	3	5	91,8	0,065±0,004	56,5	62,9	1,2	28,1	155,6
3	12	1	92,9	0,062±0,002	56,6	64,6	0,7	27,0	100,9
4	12	5	93,8	0,070±0,001	56,6	61,2	0,7	24,4	95,4
5	7,5	3	93,2	0,058±0,003	58,3	56,8	1,0	23,5	109,4

F – tahová síla při přetržení; σ – směrodatná odchylka pro tahovou sílu při přetržení;
 ε – poměrné prodloužení při přetržení

7.3.1 Teplota smrštění

V tabulce č.9 jsou zobrazené prodloužení/smrštění filmů v podélném a příčném směru.

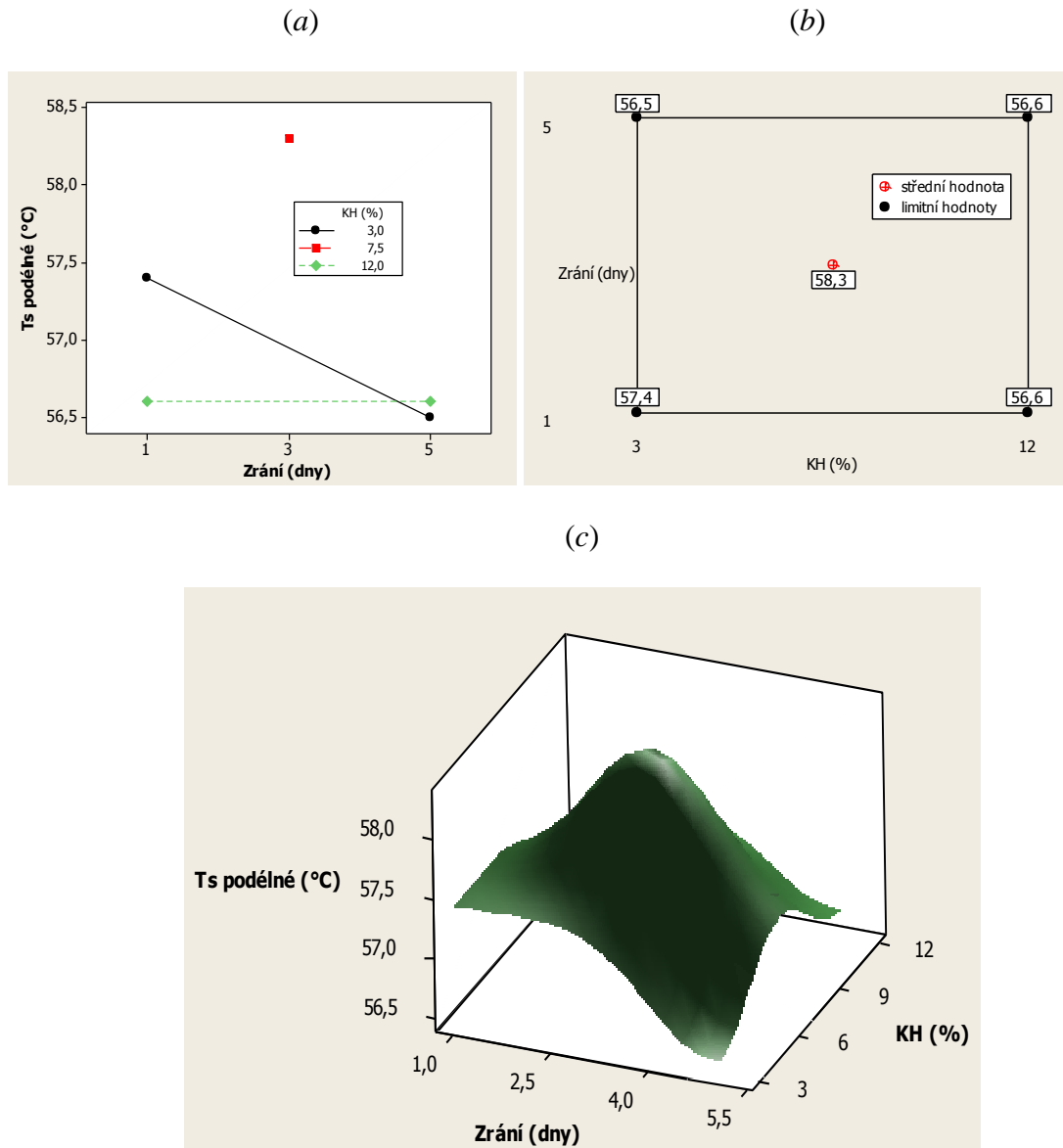
Tabulka č.9 – Prodloužení/smrštění filmů síťovaných KH v podélném a příčném směru.

Experiment č.	Prodloužení (-)/smrštění (+) filmu v podélném směru				Prodloužení (-)/smrštění (+) filmu v příčném směru			
	4 min bez záhřevu při pokojové teplotě (mm)	Tz – Ts (mm)	Ts – T (mm)	T – 90 °C (mm)	4 min bez záhřevu při pokojové teplotě (mm)	Tz – Ts (mm)	Ts – T (mm)	T – 90 °C (mm)
Bez síťovadla	-1,8	0	+15,5(T=77,4 °C)	0	-4,0	0	+2,0(T=72,0 °C)	0
2 % GA	0	0	+14,0	0	0	0	+7,0(T=70,0 °C)	0
1	-2,6	0	+20,2(T=80,2 °C)	0	-1,3	-5,2	+2,6(T=69,4 °C)	0
2	-2,0	-0,7	+17,6(T=80,6 °C)	0	-1,3	-3,9	0(T=62,9 °C**)	0
3	-2,0	-0,7	+18,9(T=77,4 °C)	0	-2,6	-5,2	+1,3(T=65,2 °C**)	0
4	-1,3	-0,7	+18,9(T=69,4 °C)	+0,7	-2,6	-3,9	+1,3(T=62,3 °C**)	0
5	-1,3	0	+20,8(T=81,1 °C)	0	-2,6	-6,5	0(T=56,8 °C**)	0

Tz – teplota, při které se systém začal zahřívat; Ts – teplota, při které se film začal smršťovat; T – teplota ukončení smršťování filmu, ** film se při zkoušce utrhl;

Teplota smrštění (T_s) v podélném směru je popsána regresní rovnicí:

$$T_s \text{ podélné } (^\circ\text{C}) = 57,7 - 0,039 \text{ KH } (\%) - 0,113 \text{ Zrání (dny)}$$

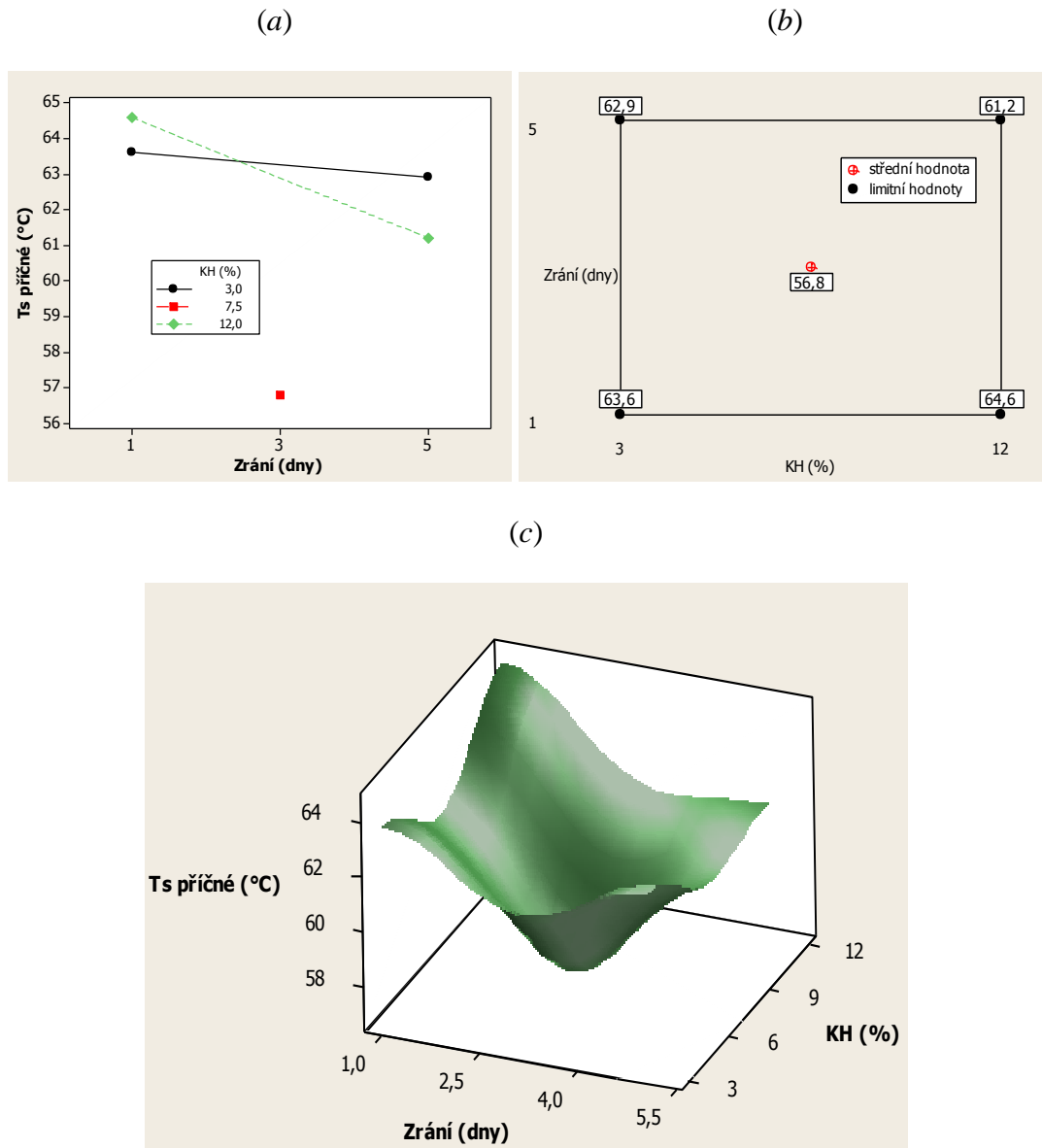


Obrázek č.49 – Vliv přídavku KH a doby zrání na T_s v podélném směru při síťování KH.

Grafické znázornění teploty smrštění v podélném směru (a) ukazuje snížení teploty při minimálním přídavku. Doba zrání u nejvyššího přídavku (12 % KH) teplotu smrštění nezměnila. Nejvyšší teplotou smrštění (b) byla 58,3 °C (7,5 % KH po 3 dnech zrání), nejnižší byla 56,5 °C (3 % KH po 5 dnech zrání). Ve 3D grafu (c) můžeme vidět prudký pokles teploty v závislosti na čase při přídavku 3 % KH. Nejvyšších hodnot teplot smrštění se dosáhlo po 3 dnech zrání (7,5 % KH) a při 1 dni zrání (3 % KH).

Teplota smrštění v příčném směru je popsána regresní rovnicí:

$$T_s \text{ příčné } (^{\circ}\text{C}) = 63,6 - 0,039 \text{ KH } (\%) - 0,51 \text{ Zrání } (\text{dny})$$



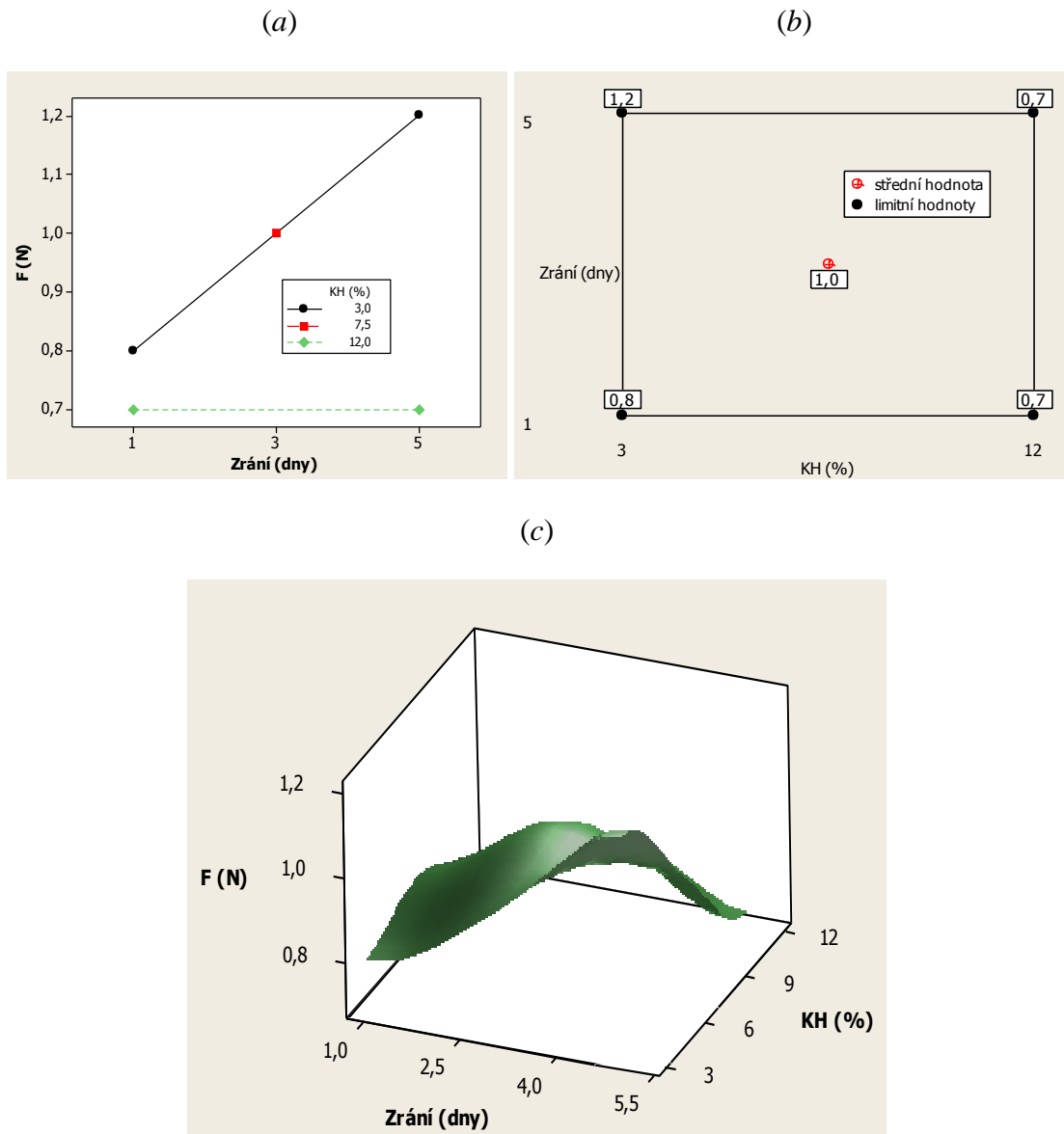
Obrázek č.50 – Vliv přídavku KH a doby zrání na T_s v příčném směru při síťování KH.

Na obrázku (a) je zobrazeno snížení teploty smrštění v příčném směru u všech přídavcích. Nejnižší přídavek (3 % KH) má mírný pokles teploty, výrazný pokles teploty byl u nejvyššího přídavku (12 % KH). Kubický graf (b) ukazuje maximální teplotu (64,6 °C) při 12 % KH po 1 dni zrání a minimální (56,8 °C) při 7,5 % KH po 3 dnech zrání. Na 3D grafu (c) je zobrazeno, že nejvyšší teploty smrštění pro všechny přídavky KH je dosaženo po 1 dni zrání. Poté teplota smrštění v příčném směru klesala.

7.3.2 Mechanické vlastnosti

Tahová síla při přetržení (F) je popsána regresní rovnicí:

$$F \text{ (N)} = 0,980 - 0,0333 \text{ KH (\%)} + 0,0500 \text{ Zrání (dny)}$$

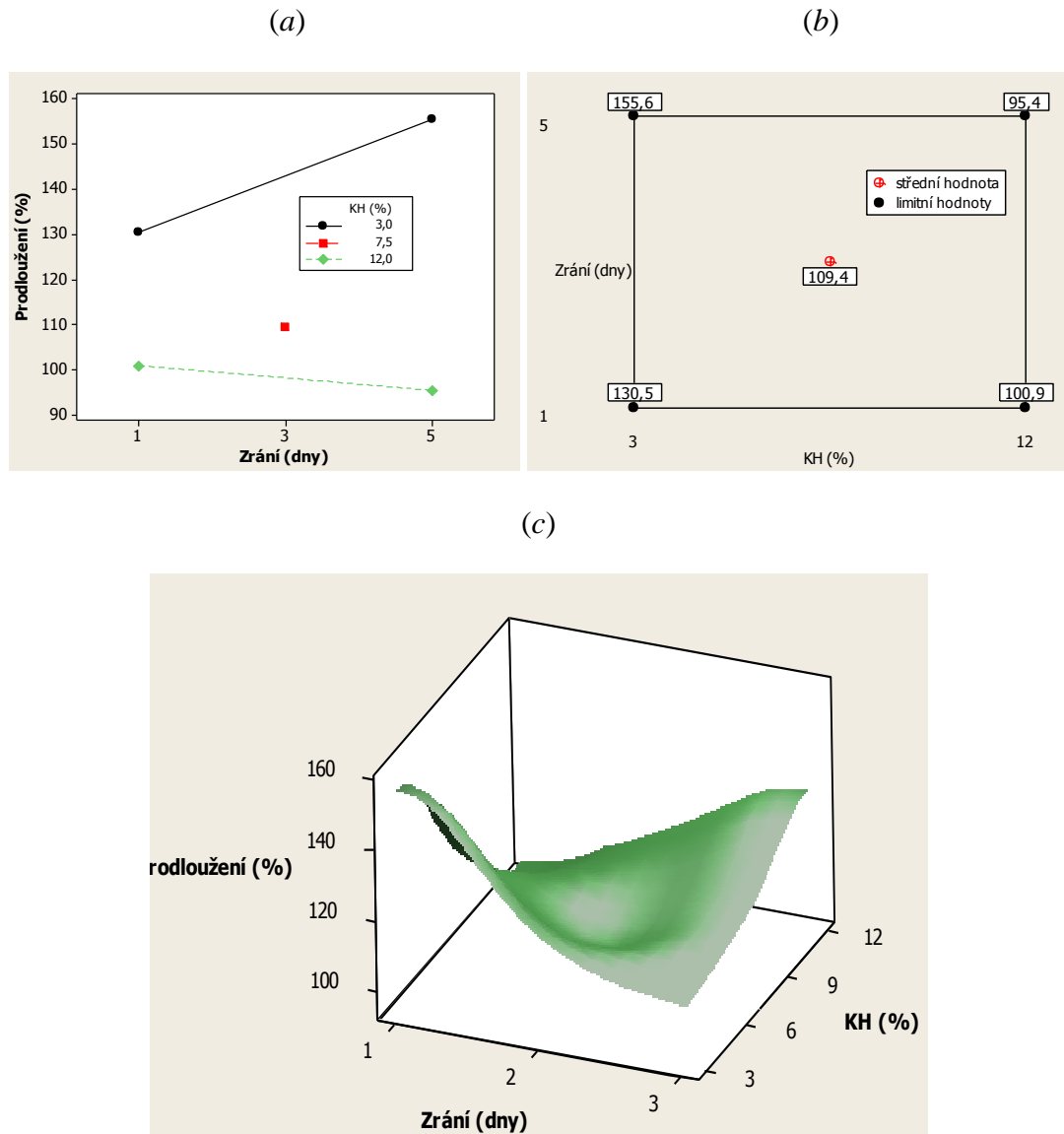


Obrázek č.51 – Vliv přídavku KH a doby zrání na tahovou sílu při síťování KH.

Na grafu (a) je ukázáno výrazné zvýšení tahové síly při přetržení při nejnižším přídavku KH (3 %). Tahová síla se při přídavku 12 % KH nezměnila. Tahová síla (b) dosahuje maxima (1,2 N) při 3 % KH po 5 dnech zrání a minima (0,7 N) při 12 % po 1 a 3 dnech zrání. Ve 3D grafu (c) je zobrazení zvýšení tahové síly při přetržení po delším čase zrání při 3 % KH. Krátký čas zrání (1 den) tahovou sílu nezvyšoval.

Poměrné prodloužení při přetržení (ϵ) je popsána regresní rovnicí:

$$\epsilon (\%) = 148 - 4,99 \text{ KH} (\%) + 2,45 \text{ Zrání (dny)}$$



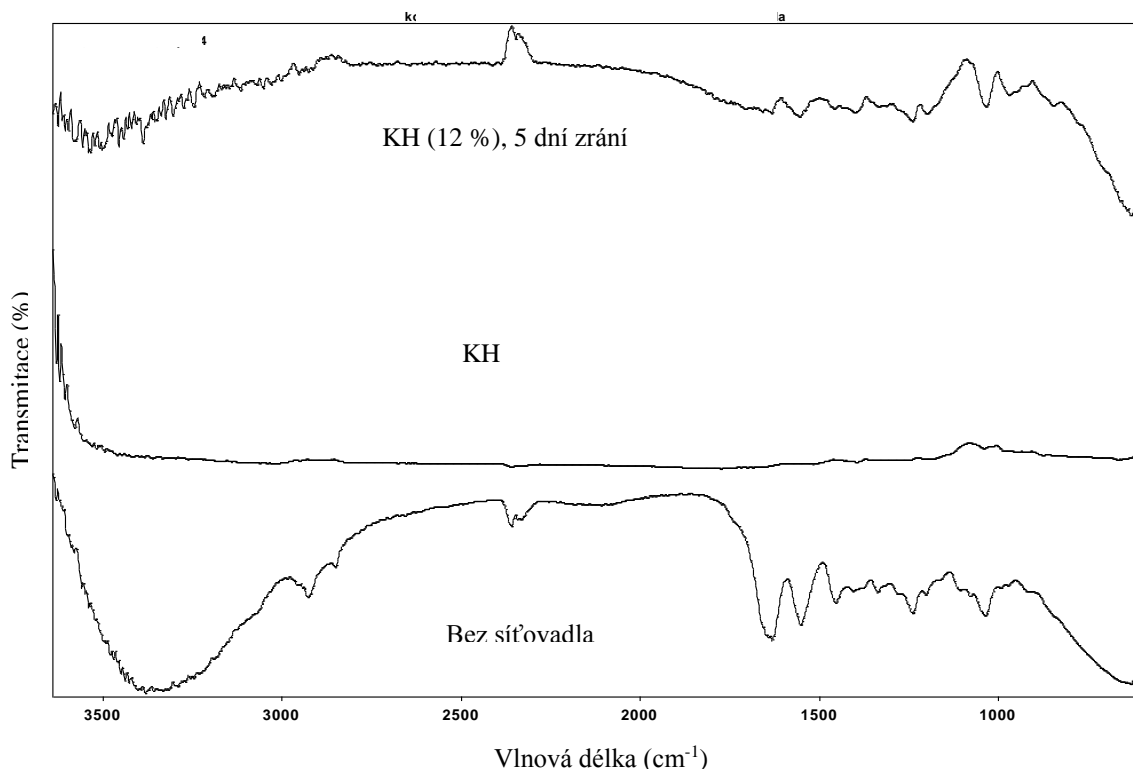
Obrázek č.52 – Vliv přídavku KH a doby zrání na poměrné prodloužení při síťování KH.

Poměrné prodloužení při přetržení v grafu (a) s dobou zrání při nejnižším přídavku KH (3 %) stoupá, při nejvyšším přídavku KH (12 %) mírně klesá. Kubické zobrazení (b) ukazuje jako maximální prodloužení 155,6 % (3 % KH po 5 dnech zrání) a jako minimální 95,4 % (12 % po 5 dnech zrání). Ve 3D grafu (c) je ukázáno, že doba zrání pro 3 % KH zhoršuje poměrné prodloužení při přetržení, ale při přídavku 12 % KH dochází ke zlepšování hodnot poměrného prodloužení.

7.3.3 FTIR

Tabulka č.10 – Odlišnosti charakteristických píků filmů č. 1–5 síťovaných KH s píkы filmu bez síťovadla.

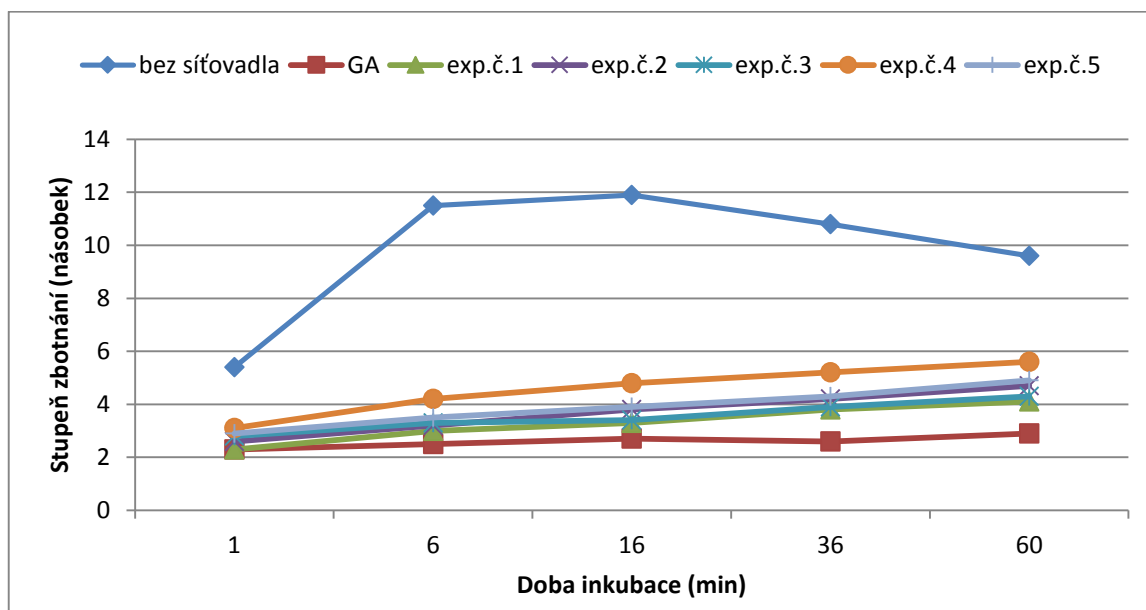
Funkční skupina	Vlnočet (cm ⁻¹)	Filmy				
		1	2	3	4	5
Srovnání píků síťovaných KH s píkы filmu bez síťovadla						
vibrace –OH skupiny	3650–3200	Vymizení	Vymizení	Slabší intenzita	Vymizení	Vymizení
vibrace –(C)–CH ₂ , –(O)–CH ₂	2925	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Slabší intenzita	Slabší intenzita
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová I vazba)	1635	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Výrazně slabší intenzita
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová II vazba)	1550	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita
vibrace –CH ₂ a –CH ₃ skupin	1455	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Vymizení	Slabší intenzita
vibrace –COOH skupiny	1400	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Stejná intenzita	Stejná intenzita
vibrace skupiny C–N cyklického prolinu	1340	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Slabší intenzita	Slabší intenzita
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová III vazba)	1240	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Stejná intenzita
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová III vazba)	1204	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Posunutí, vyšší intenzita	Stejná intenzita
vibrace skupiny R–NH ₂	1115	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení
vibrace skupiny R–NH ₂	1080	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení
vibrace primární funkční skupina R–OH	1038	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Stejná intenzita	Vyšší intenzita
vibrace –OH skupiny	920	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Stejná intenzita	Stejná intenzita
Nově vzniklé píkы						
vibrace –(C)–CH ₂ , –(O)–CH ₂	2953	Střední pík	Slabý pík	Slabý pík	Střední pík	Střední pík
vibrace –CH	980–780	2× Střední pík	1× Vysoký pík, 2× Slabý pík		1× Vysoký pík, 4× Slabý pík	1× Vysoký pík, 4× Slabý pík
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová III vazba)	720				Střední pík	Slabý pík



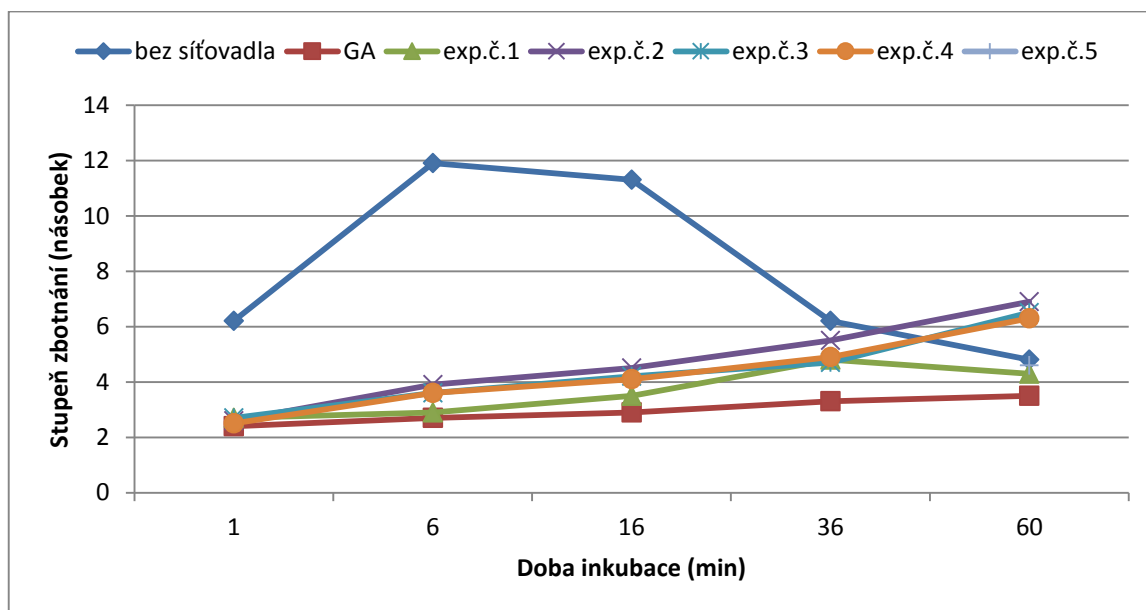
Obrázek č.53 – FTIR spektrum kolagenního filmu bez síťovadla, KH a kolagenního filmu síťovaného KH.

V tabulce č.10 je ukázáno, že charakteristické vibrace pro –OH skupiny (3650–3200 a 1038 cm⁻¹), amidovou I vazbu (1635 cm⁻¹), amidovou II vazbu (1550 cm⁻¹) a alifatické skupiny –CH₂ a –CH₃ (1455 cm⁻¹) zmizely, nebo byly slabé, což indikuje, že KH reagoval s kolagenem. Snížení nebo vymizení vazeb mezi CN a NH (1340, 1115 a 1080 cm⁻¹) ukazuje na reakci kolagenu s KH.

7.3.4 Botnací test

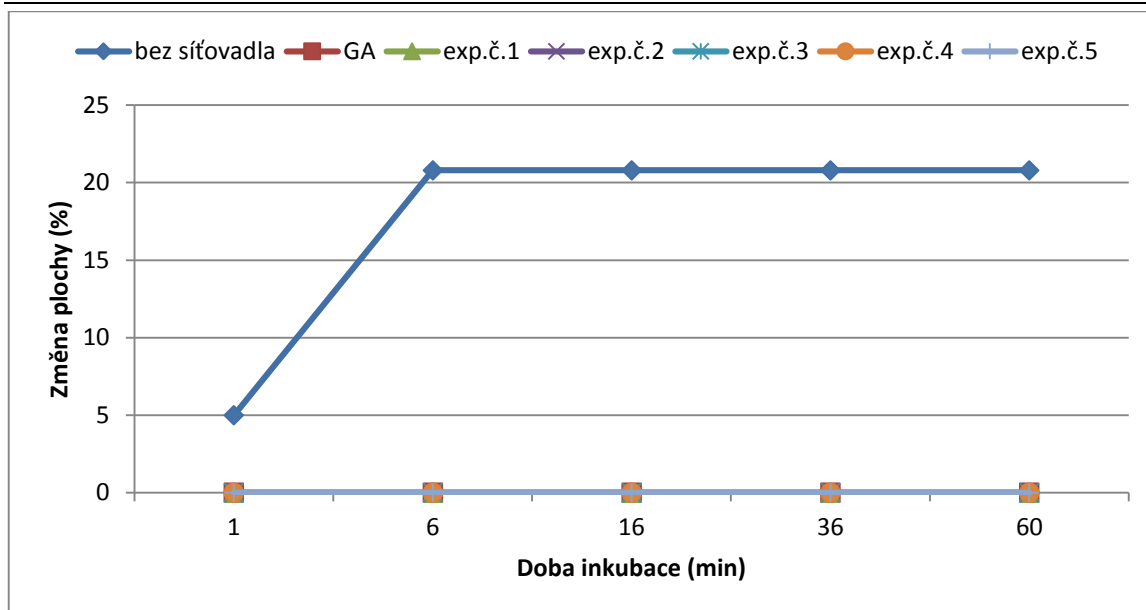


Obrázek č.54 – Stupeň zbotnění filmů při 26 °C.

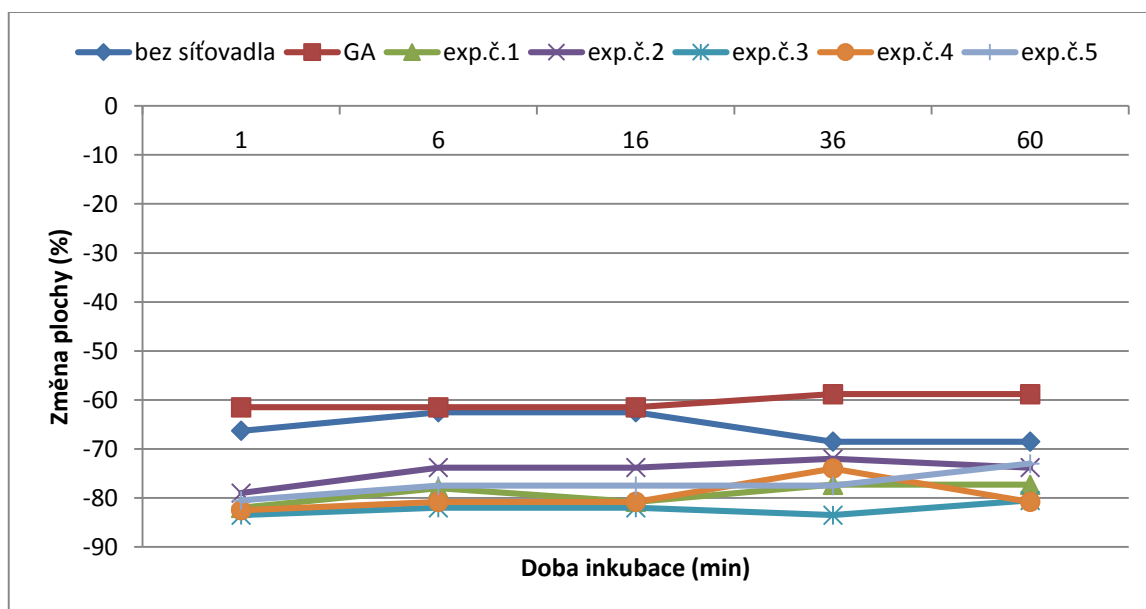


Obrázek č.55 – Stupeň zbotnění filmů při 80 °C.

Při 26 °C nejvíce zbotnal kolagenní gel bez síťovadla. Jako nejvhodnější síťovadlo se ukázal GA. Vhodným síťovadlem je i experiment č.1 (3 % KH po 1 dni zrání) a experiment č.3 (12 % KH po 1 dni zrání). Test při 80 °C ukázal největší stupeň zbotnění u kolagenního gelu bez síťovadla. GA měl nejmenší stupeň zbotnění. Na začátku testu byly stupně zbotnění u všech koncentrací KH téměř totožné. Nejvíce GA přiblížil experiment č.1.



Obrázek č.56 – Změna plochy filmů při 26 °C.



Obrázek č.57 – Změna plochy filmů při 80 °C.

Při 26 °C se plocha změnila jen u kolagenního filmu bez síťovadla. U žádného z experimentů a kolagenního filmu síťovaného GA, nedošlo ke změně plochy. Nejmenší změna plochy při 80 °C byla u kolagenního gelu síťovaného GA a kolagenního film bez síťovadla. Experiment č.3 (12 % KEH po 1 dni zrání) se ukázal jako nejméně vhodný. Už od začátku testu byly mezi experimenty rozdíly. Plocha se během experimentu příliš neměnila.

7.4 Síťování vláknitého kolagenu keratinovým hydrolyzátem a glutaraldehydem

Tabulka č.11 – Souhrnné výsledky ukazatelů zesílení kolagenního gelu síťovaného

KH a GA.

Experiment č.	Faktor A, Množství KH (%)	Faktor B, Doba zrání kolagenní hmoty (dny)	Obsah sušiny filmu (%)	Tloušťka filmu (mm)	T _s podélné (°C)	T _s příčné (°C)	F (N)	σ	ε (%)
Bez síťovadla			88,0	0,065±0,005	49,5	48,0	0,5	21,3	98,5
2 % GA			94,8	0,050±0,005	52,2	52,1	5,3	13,3	146,0
1	2	1	91,5	0,070±0,002	53,4	61,4	2,7	12,4	159,5
2	2	3	92,0	0,083±0,002	54,4	53,4	2,7	20,8	145,2
3	8	1	91,7	0,058±0,003	54,8	57,9	2,4	5,4	144,8
4	8	3	91,8	0,070±0,004	56,0	61,4	1,9	21,3	123,6
5	5	2	90,6	0,069±0,001	52,1	59,2	2,1	20,6	133,8

F – tahová síla při přetržení; σ – směrodatná odchylka pro tahovou sílu při přetržení;
ε – poměrné prodloužení při přetržení

7.4.1 Teplota smrštění

V tabulce č.12 jsou zobrazené prodloužení/smrštění filmů v podélném a příčném směru.

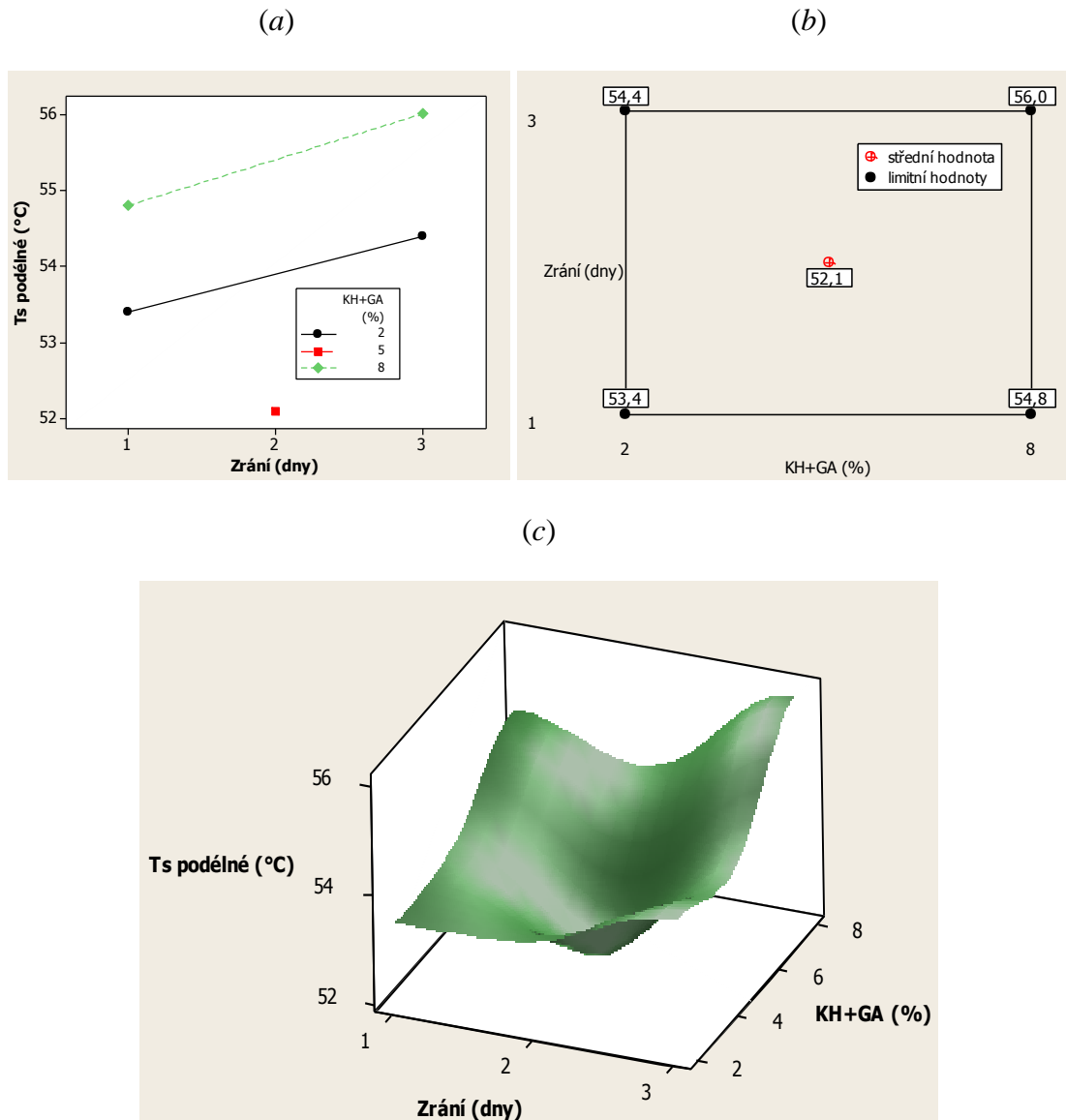
Tabulka č.12 – Prodloužení/smrštění filmů síťovaných KH a GA v podélném a příčném směru.

Experiment č.	Prodloužení (-)/smrštění (+) filmu v podélném směru				Prodloužení (-)/smrštění (+) filmu v příčném směru			
	4 min bez zá- hřevu při pokojové teplotě (mm)	Tz – Ts (mm)	Ts – T (mm)	T – 90 °C (mm)	4 min bez zá- hřevu při pokojové teplotě (mm)	Tz – Ts (mm)	Ts – T (mm)	T – 90 °C (mm)
Bez síťo- vadla	-1,8	0	+15,5(T=77,4 °C)	0	-4,0	0	+2,0 (T=72,0 °C)	0
2 % GA	0	0	+14,0	0	0	0	+7,0 (T=70,0 °C)	0
1	-1,3	0	+19,5(T=76,8 °C)	0	-2,6	0	+3,9(T=70,6 °C)	+0,7
2	-1,3	-0,7	+18,2(T=67,9 °C)	+2,6	-6,5	0	+6,5(T=66,9 °C)	+1,3
3	-1,3	0	+22,8(T=84,2 °C)	0	-2,6	-2,6	+7,8(T=82,0 °C)	0
4	-1,3	0	+20,8(T=73,2 °C)	+0,7	-3,9	-6,5	+3,9(T=66,1 °C)	+0,7
5	-1,3	0	+18,9(T=74,5 °C)	0	-2,6	-1,3	+9,1(T=87,3 °C)	0

Tz – teplota, při které se systém začal zahřívát; Ts – teplota, při které se film začal smršťovat; T – teplota ukončení smršťování filmu, ** film se při zkoušce utrhl;

Teplota smršťení (T_s) v podélném směru je popsána regresní rovnicí:

$$T_s \text{ podélné } (^{\circ}\text{C}) = 51,8 + 0,250 \text{ KH+GA } (\%) + 0,550 \text{ Zrání (dny)}$$

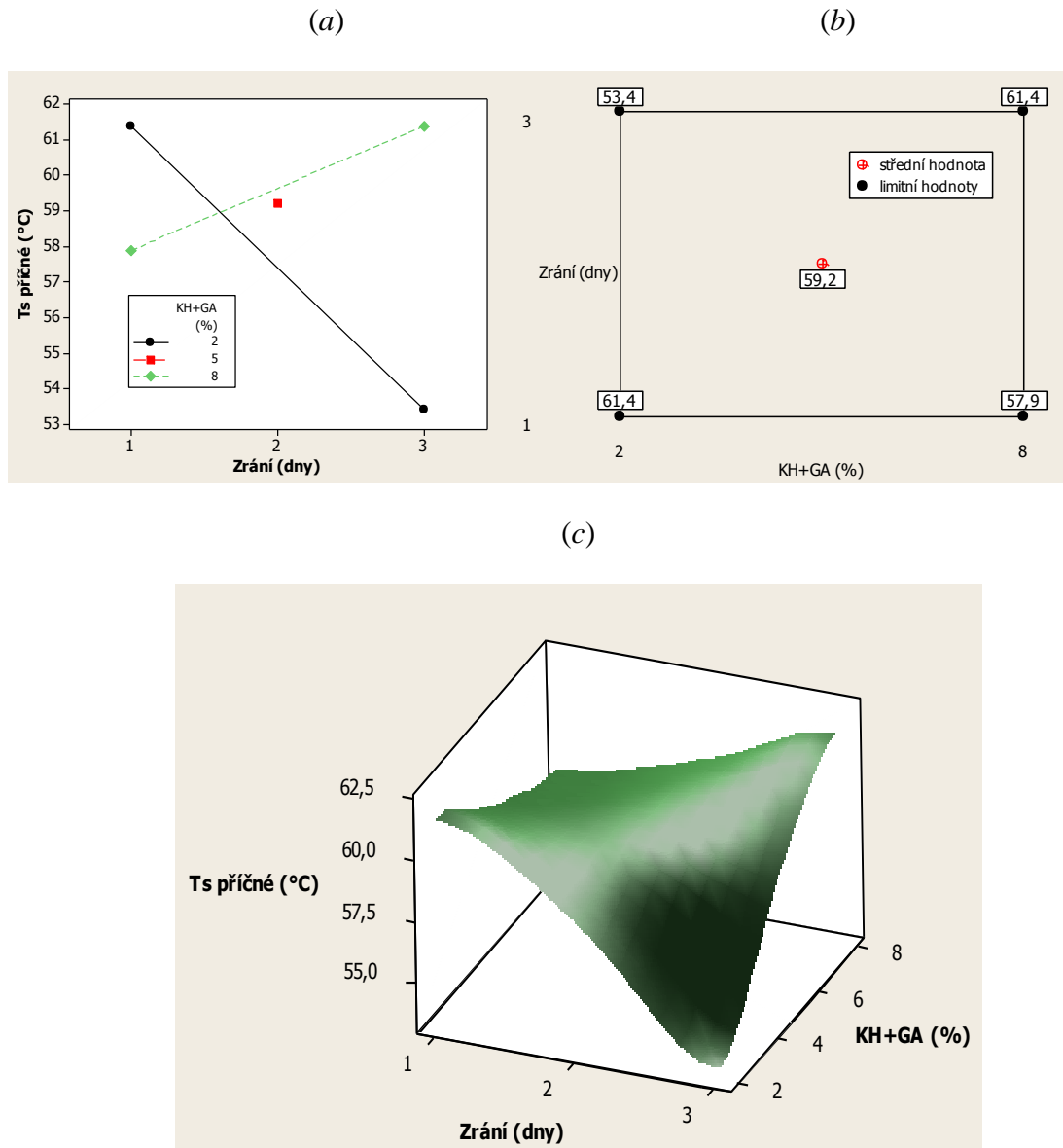


Obrázek č.58 – Vliv přídavku KH a doby zrání na T_s v podélném směru při síťování KH a GA.

Grafické znázornění teploty smršťení v podélném směru (a) ukazuje postupné zvyšování teploty při minimálním i maximálním přídavku. Nejvyšší teplotou smršťení (b) byla $56,0^{\circ}\text{C}$ (8 % po 3 dnech zrání), nejnižší byla $53,4^{\circ}\text{C}$ (2 % po 1 dni zrání). Ve 3D grafu (c) můžeme vidět zvýšení teploty v závislosti na čase. Nejvyšších hodnot teplot smršťení se dosáhlo při 3 dnech zrání. S delší dobou se teplota smršťení v podélném směru zlepšovala.

Teplota smršťení v příčném směru je popsána regresní rovnicí:

$$T_s \text{ příčné (}^\circ\text{C)} = 59,0 + 0,375 \text{ KH+GA (\%)} - 1,12 \text{ Zrání (dny)}$$



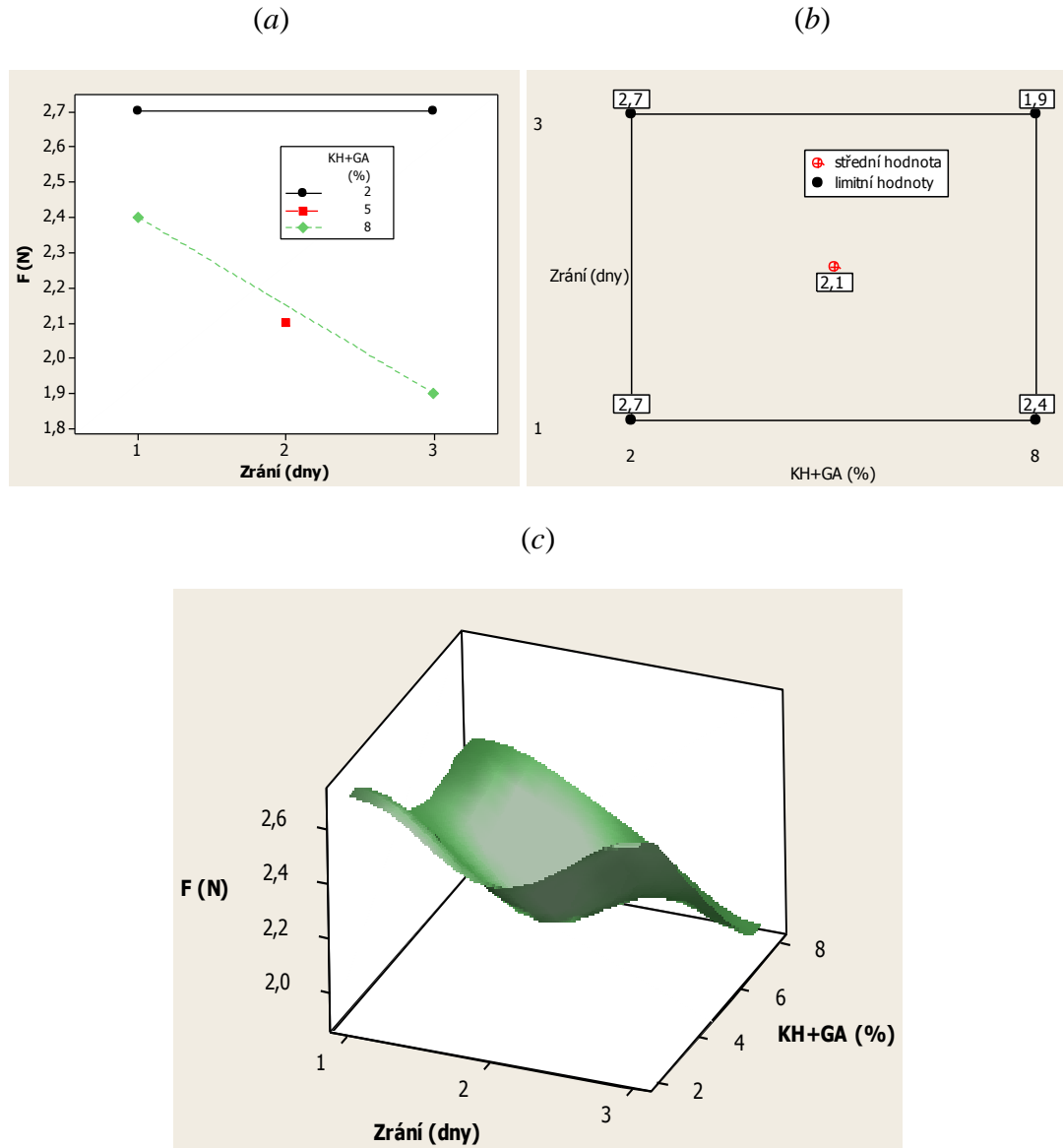
Obrázek č.59 – Vliv přidavku KH a doby zrání na T_s v příčném směru při síťování KH a GA.

Na obrázku (a) je zobrazeno výrazné snížení teploty smršťení v příčném směru u nejnižšího přidavku (2 % KH). Při nejvyšším přidavku (8 % KH) teplota stoupala. Kubický graf (b) ukazuje maximální teplotu (61,4 °C) při 2 % KH po 1 dni zrání, 8 % KH po 3 dnech zrání a minimální teplotu (53,4 °C) při 2 % KH po 3 dnech zrání. Na 3D grafu (c) je zobrazeno, že vysokých teplot je dosaženo při 2 % KH po 1 dni zrání a při 8 % KH po 3 dnech zrání.

7.4.2 Mechanické vlastnosti

Tahová síla při přetržení (F) je popsána regresní rovnicí:

$$F \text{ (N)} = 3,07 - 0,0917 \text{ KH+GA (\%)} - 0,125 \text{ Zrání (dny)}$$

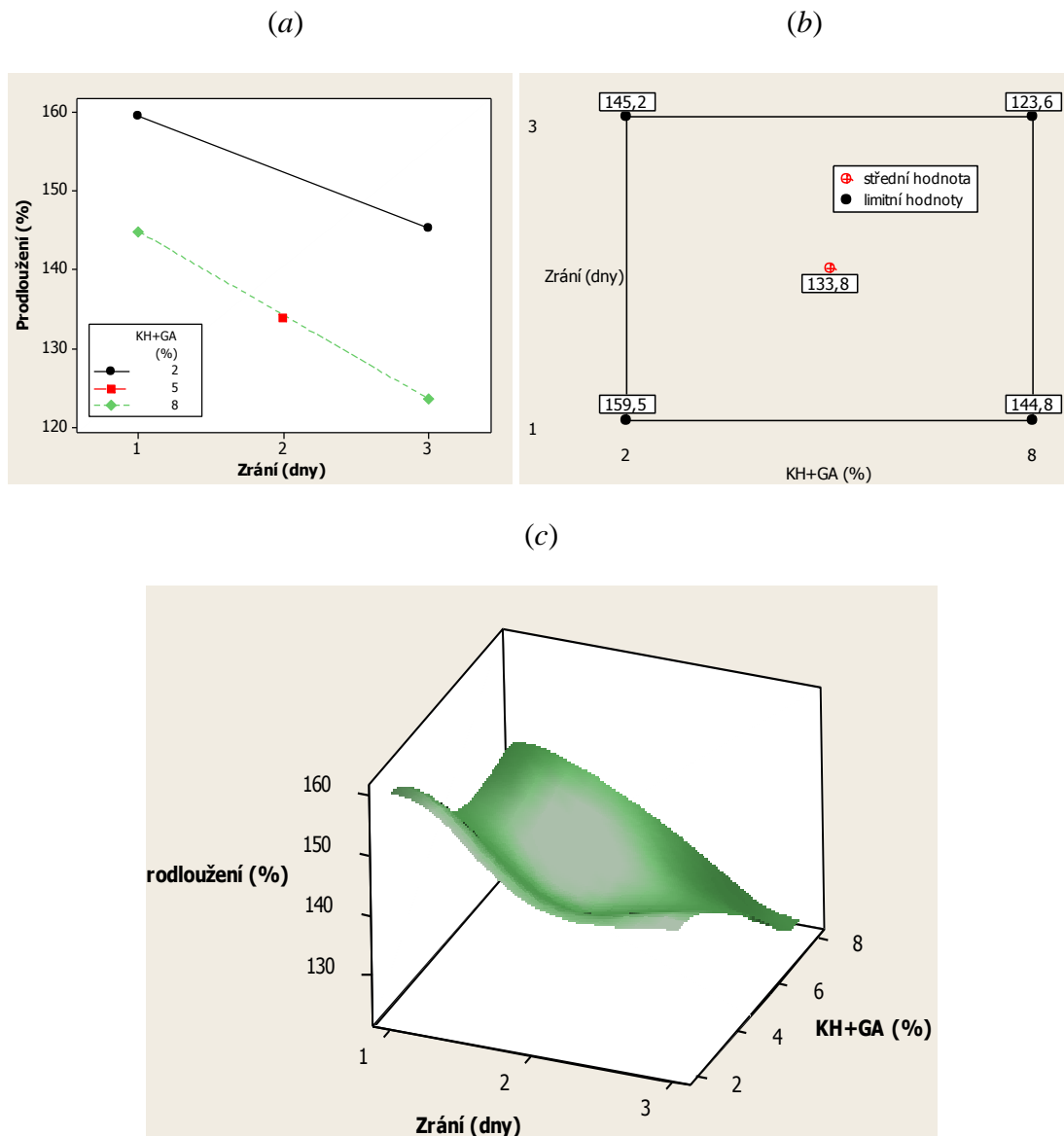


Obrázek č.60 – Vliv přídavku KH a doby zrání na tahovou sílu při síťování KH a GA.

Na grafu (a) je ukázáno snížení tahové síly při přetržení pro nejvyšší přídavek KH (8 %). Delší doba zrání u nejnižšího přídavku (2 % KH) tahovou sílu nezměnila. Tahová síla (b) dosahuje maxima (2,7 N) při 2 % KH po 1 a 3 dnech zrání, a minima (1,9) při 8 % KH po 3 dnech zrání. Ve 3D grafu (c) jsou zobrazena vysoké tahové síly při přetržení při nízkém přídavku KH.

Poměrné prodloužení při přetržení (ϵ) je popsána v regresní rovnici:

$$\epsilon (\%) = 174 - 3,03 \text{ KH+GA} (\%) - 8,88 \text{ Zrání (dny)}$$



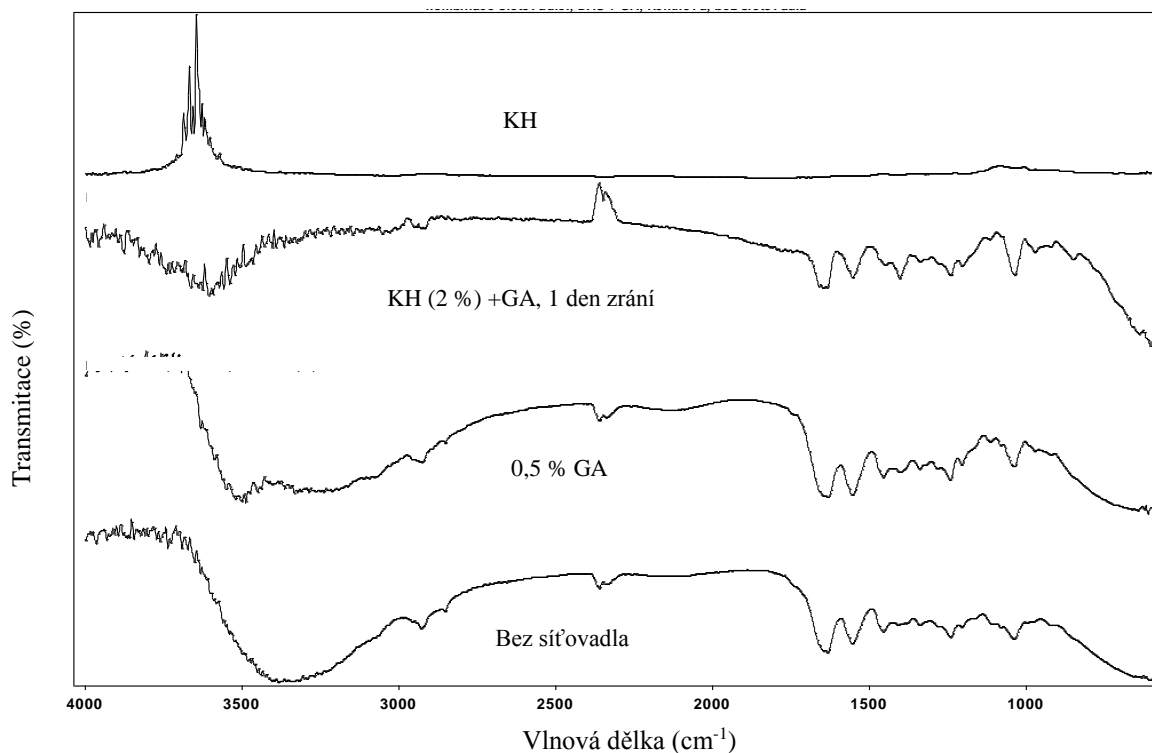
Obrázek č.61 – Vliv přídavku KH a doby zrání na poměrné prodloužení při síťování KH a GA.

Poměrné prodloužení při přetržení v grafu (a) s dobou zrání klesá při všech přídavcích KH. U nejvyššího přídavku (8 % KH) klesá více, než u nejnižšího přídavku (2 % KH). Kubické zobrazení (b) ukazuje jako maximální prodloužení 159,5 % (2 % KH po 1 dni zrání) a jako minimální 123,6 % (8 % KH po 3 dnech zrání). Ve 3D grafu (c) je ukázáno, že doba zrání pro přídavek 2 % KH mírně zhoršuje poměrné prodloužení při přetržení, ale při přídavku 8 % KH dochází ke zhoršení hodnot poměrného prodloužení.

7.4.3 FTIR

Tabulka č.13 – Odlišnosti charakteristických piků filmů č.1–5 síťovaných KH a GA s piky filmu bez síťovadla.

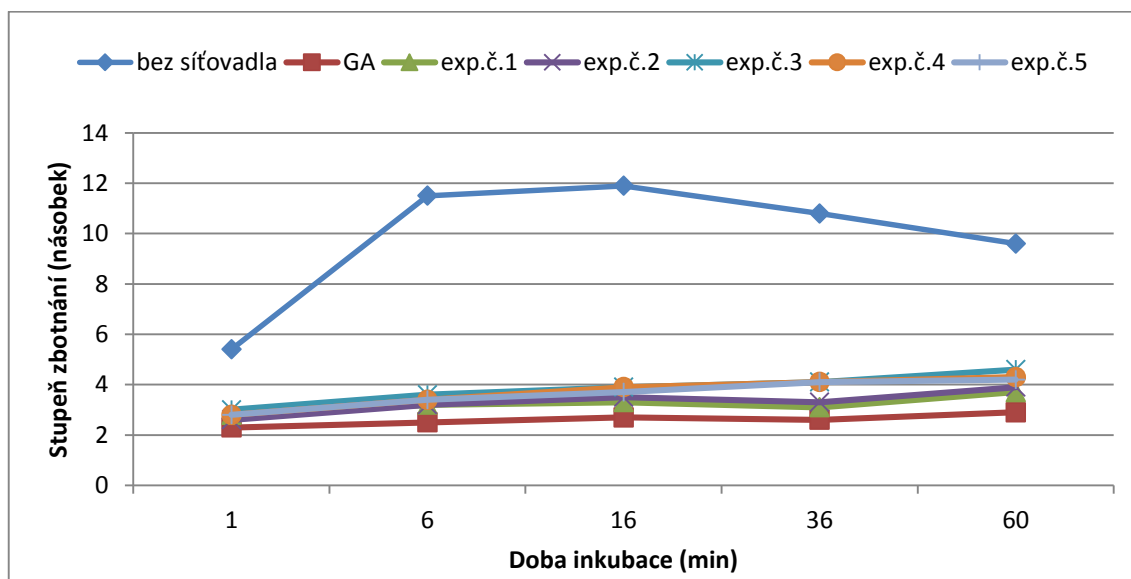
Funkční skupina	Vlnové číslo (cm ⁻¹)	Filmy				
		1	2	3	4	5
Srovnání piků síťovaných KH a GA s piky filmu bez síťovadla						
vibrace –OH skupiny	3650–3200	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení	Vymizení
vibrace –(C)–CH ₂ , –(O)–CH ₂	2925	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová I vazba)	1635	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Těmně vymizení
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová II vazba)	1550	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita
vibrace –CH ₂ a –CH ₃ skupiny	1455	Posun, sl. intenzita	Posun, sl. intenzita	Posun, sl. intenzita	Posun, sl. intenzita	Posun, sl. intenzita
vibrace –COOH skupiny	1400	Vyšší intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita
vibrace skupiny C–N cyklického prolinu	1340	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová III vazba)	1240	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová III vazba)	1204	Stejná intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Stejná intenzita	Vyšší intenzita
vibrace skupiny R–NH ₂	1115	Stejná intenzita	Vymizení	Vymizení	Stejná intenzita	Vymizení
vibrace skupiny R–NH ₂	1080	Slabší intenzita	Vymizení	Vymizení	Slabší intenzita	Vymizení
vibrace primární funkční skupina R–OH	1038	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita
vibrace –OH skupiny	920	Stejná intenzita	Vymizení	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita
Nově vzniklé piky						
vibrace –CH	850–780	2×Slabý pik	2×Slabý pik	2×Slabý pik	2×Slabý pik	2×Slabý pik
vibrace –CO–NH– funkční skupina (amidová III vazba)	715		Slabý pik	Slabý pik		



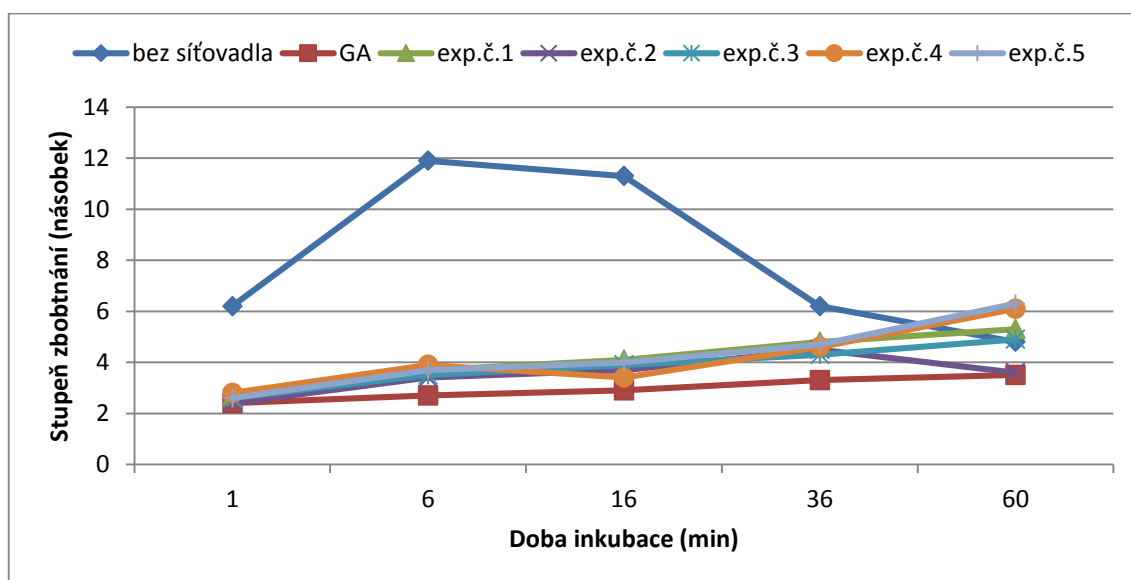
Obrázek č.62 – FTIR spektrum kolagenního filmu bez síťovadla, KH, kolagenního filmu síťovaného 0,5 % GA a kolagenního filmu síťovaného KH a GA.

V tabulce č.13 je ukázáno, že charakteristické vibrace pro –OH skupiny (3650–3200 cm⁻¹) vymizely. Amidová I vazba (1635 cm⁻¹), amidová II vazba (1550 cm⁻¹) a alifatická skupina –CH₂ a –CH₃ (1455 cm⁻¹) byla slabší, což indikuje, že KH reagoval s kolagenem částečně. Aminogrupy kolagenu reagovaly s KH jen u některých experimentů (1115 a 1080 cm⁻¹).

7.4.4 Botnací test

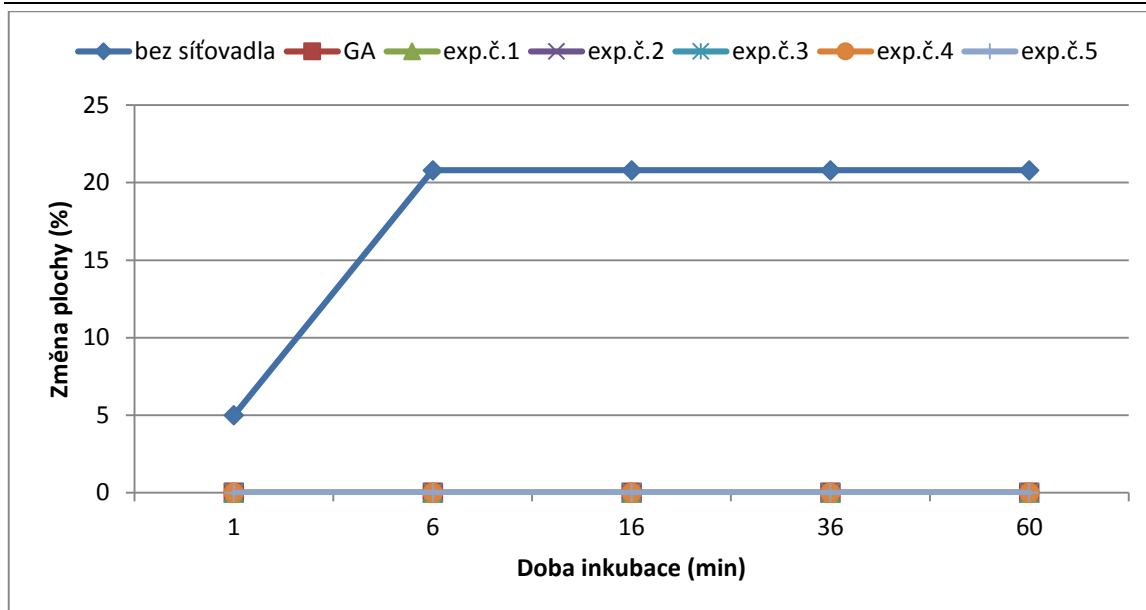


Obrázek č.63 – Stupeň zbotnění filmů při 26 °C.

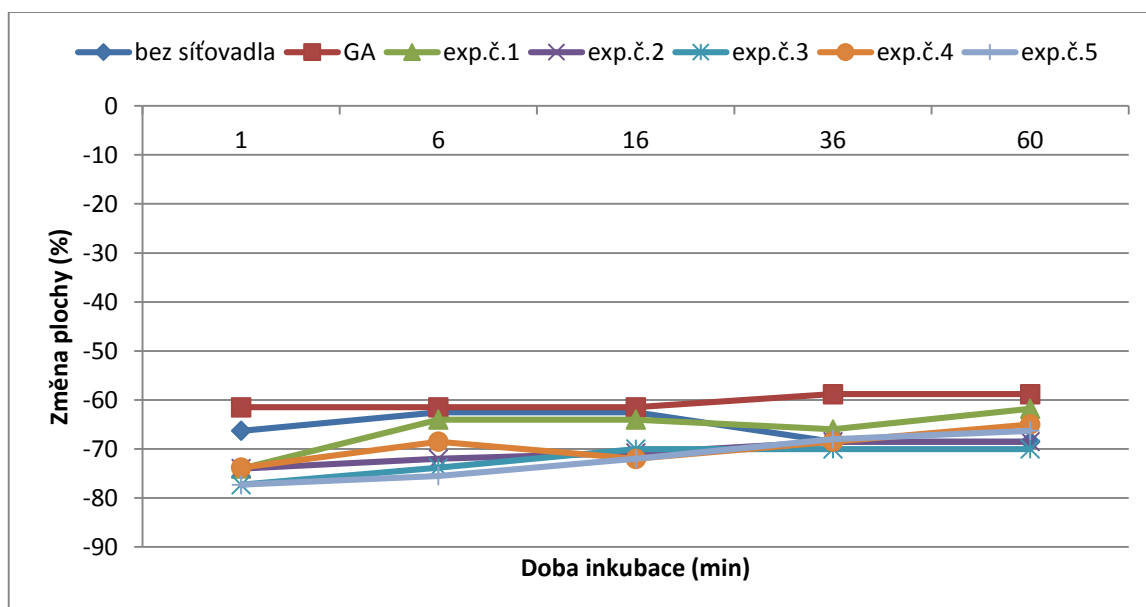


Obrázek č.64 – Stupeň zbotnění filmů při 80 °C.

Při 26 °C nejvíce zbotnal kolagenní gel bez síťovadla. Jako nejvhodnější síťovadlo se ukázal GA. Dalšími vhodnými koncentracemi byl experiment č.1 (2 % KH po 1 dni zrání) a experiment č.2 (2 % KH po 3 dnech zrání). Experimenty se na začátku botnacího testu lišily mezi sebou jen o desetiny stupňů zbotnění. Stupně zbotnění u experimentů začaly být rozdílné po 16 minutě testu. Test při 80 °C ukázal největší stupeň zbotnění u kolagenního gelu bez síťovadla. Na začátku experimentu měly všechny koncentrace téměř stejné stupně zbotnění. Po 16 minutě začaly mezi nimi být větší rozdíly.



Obrázek č.65 – Změna plochy filmů při 26 °C.



Obrázek č.66 – Změna plochy filmů při 80 °C.

Při 26 °C se plocha změnila jen u kolagenního filmu bez síťovadla. U žádného z experimentů a kolagenního filmu síťovaného GA, nedošlo ke změně plochy. Nejmenší změna plochy při 80 °C byla u kolagenního gelu síťovaného GA a do 16 minuty i kolagenního filmu bez síťovadla. Experiment č.3 (8 % KH po 1 dni zrání) a experiment č.5 (5 % KH po 2 dnech zrání) se ukázal jako nejméně vhodný.

8 ZHODNOCENÍ ÚČINKŮ SÍŤOVANÉ SLEDOVANÝMI SÍŤOVADLY

8.1 Účinek síťování vláknitého kolagenu kolagen-elastinovým hydrolyzátem

Teplota smrštění v podélném směru byla nejvyšší (57 °C) u použití 5 % KEH s 1 dnem zrání a nejnižší (54,8 °C) u 10 % KEH po 3 dnech zrání. Teplota smrštění v příčném směru měla nejvyšší (60,5 °C) hodnotu při 15 % KEH po 1 dni zrání. Nejmenší teplota (58,3 °C) byla při 15 % KEH o 5 dnech zrání. Teploty smrštění klesaly v závislosti na čase.

Tahová síla při přetržení se zvyšovala po delší době zrání (3 a 5 dnů). Nejvyšší tahová síla (1,7 N) byla při 10 % KEH po 3 dnech zrání a nejnižší (0,6 N) při 15 % KEH po 1 dni zrání. Krátký čas zrání tahovou sílu nezvyšoval. Poměrné prodloužení při přetržení dosáhlo maxima (135,7 %) při 10 % KEH po 3 dnech zrání, minima (71,2 %) dosáhlo při 15 % KEH po 1 dni zrání. Při nejnižší koncentraci (5 % KEH) s časem prodloužení klesalo a při nejvyšší koncentraci (15 % KEH) stoupalo.

FTIR spektrum ukázalo tvorbu vazeb mezi KEH a kolagenem při všech přídavicích KEH. Také došlo k vytvoření amidové vazby u přídávku 10 % KEH po 3 dnech.

Botnací test při 26 °C ukázal z hlediska stupně zbotnění jako nejvhodnější z experimentů 2 % KEH po 1 dni zrání a jako nejméně vhodný 15 % KEH po 1 dni zrání. Při 80 °C měl nejmenší stupeň zbotnění 15 % KEH po 1 dni zrání. U změny plochy se při 26 °C nic nezměnilo, u 80 °C se nejvíce změnil experiment s 15 % KEH po 1 dni zrání.

8.2 Účinek síťování vláknitého kolagenu kolagen-elastinovým hydrolyzátem a glutaraldehydem

Teplota smrštění v podélném směru byla nejvyšší (59,0 °C) u použití 3 % KEH s 1 dnem zrání a nejnižší (54,0 °C) u 6 % KEH po 2 dnech zrání. Teplota smrštění v příčném směru měla nejvyšší (62,2 °C) hodnotu při 3 % KEH po 3 dnech zrání. Nejmenší teplota (55,1 °C) byla při 3 % KEH po 1 dni zrání. Teploty smrštění v příčném směru stoupaly v závislosti na čase.

Tahová síla při přetržení se zvyšovala po delší době zrání (3 dny) pro 3 % KEH. Nejvyšší tahová síla (2,2 N) byla při 3 % KEH po 3 dnech zrání a nejnižší (1,5 N) při 9 % KEH po 1

a 3 dnech zrání. Poměrné prodloužení při přetržení dosáhlo maxima (138,8 %) při 9 % KEH po 1 dni zrání a minima (129,5 %) při 9 % KEH po 3 dnech zrání. Poměrné prodloužení klesalo v závislosti na čase.

FTIR spektrum ukázalo tvorbu vazeb mezi KEH a kolagenem částečně nebo vůbec. Amidová vazba se vytvořila jen u některých přísadách (3 % KEH).

Botnací test při 26 °C ukázal z hlediska stupně zbotnění jako nejvhodnější z experimentů 3, 9 % KEH po 1 dni zrání a 6 % KEH po 2 dnech zrání. Jako nejméně vhodný se ukázal 9 % KEH po 3 dnech zrání. Při 80 °C měl nejmenší stupeň zbotnění 3 % KEH po 3 dnech zrání. U změny plochy se při 26 °C nic nezměnilo, u 80 °C se nejvíce změnil experiment s 3 % KEH po 1 a 3 dnech zrání.

8.3 Účinek síťování vláknitého kolagenu keratinovým hydrolyzátem

Teplota smrštění v podélném směru byla nejvyšší (58,3 °C) u použití 7,5 % KH se 3 dny zrání a nejnižší (56,5 °C) u 3 % KH po 5 dnech zrání. Teplota smrštění v příčném směru měla nejvyšší (64,6 °C) hodnotu při 12 % KH po 1 dni zrání. Nejmenší teplota (56,8 °C) byla při 7,5 % KH po 3 dnech zrání. Teploty smrštění klesaly v závislosti na čase.

Tahová síla při přetržení se zvyšovala po delší době zrání (3 a 5 dnů). Nejvyšší tahová síla (1,2 N) byla při 3 % KH po 5 dnech zrání a nejnižší (0,7 N) při 12 % KH po 1 a 5 dnech zrání. Krátký čas zrání u 3 % KH tahovou sílu nezvyšoval. Poměrné prodloužení při přetržení dosáhlo maxima (155,6 %) při 3 % KH po 5 dnech zrání, minima (95,4 %) dosáhlo při 12 % KH po 5 dnech zrání. Při nejnižším přísadku (3 % KH) s časem prodloužení stoupalo, a při nejvyšším přísadku (12 % KH) klesalo.

FTIR spektrum ukázalo tvorbu vazeb mezi KH a kolagenem při všech přísadách KH.

Botnací test při 26 °C ukázal z hlediska stupně zbotnění jako nejvhodnější z experimentů 3 % KH a 12 % KH po 1 dni zrání. Jako nejméně vhodný se ukázal 12 % KH po 5 dnech zrání. Při 80 °C měl nejmenší stupeň zbotnění 3 % KH po 1 dni zrání. U změny plochy se při 26 °C nic nezměnilo, u 80 °C se nejvíce změnil experiment s 12 % KH po 1 dni zrání.

8.4 Účinek síťování vláknitého kolagenu keratinovým hydrolyzátem a glutaraldehydem

Teplota smrštění v podélném směru byla nejvyšší (56,0 °C) u použití 2 % KH se 3 dny zrání a nejnižší (52,1 °C) u 5 % KH po 2 dnech zrání. Teplota smrštění v příčném směru měla nejvyšší hodnotu (61,4 °C) při 2 % KH s 1 dnem zrání a 8 % KH po 3 dnech zrání. Nejmenší teplota (53,4 °C) byla při 2 % KH po 3 dnech zrání.

Tahová síla při přetržení se snižovala po delší době zrání pro 8 % KH. Nejvyšší tahová síla (2,7 N) byla při 2 % KH po 1 a 3 dnech zrání, a nejnižší (1,9 N) při 8 % KH po 3 dnech zrání. Poměrné prodloužení při přetržení dosáhlo maxima (159,5 %) při 2 % KH po 1 dni zrání a minima (123,4 %) při 8 % KH po 3 dnech zrání. Poměrné prodloužení klesalo v závislosti na čase.

FTIR spektrum ukázalo tvorbu vazeb mezi KH a kolagenem. Amidová vazba se vytvořila částečně.

Botnací test při 26 °C ukázal z hlediska stupně zbotnění jako nejvhodnější z experimentů 2 % KH po 1 a 3 dnech zrání. Jako nejméně vhodný se ukázal 8 % KH po 1 dni zrání. Při 80 °C měl nejmenší stupeň zbotnění 2 % KH po 3 dnech zrání. U změny plochy se při 26 °C nic nezměnilo, u 80 °C se nejvíce změnil experiment s 8 % KH po 1 dni zrání a s 5 % KH po 2 dnech zrání.

ZÁVĚR

Kolagen sám o sobě nemá vlastnosti, které jsou pro jeho aplikaci v potravinářství a lékařství požadované. Má nízké teploty smrštění, slabé mechanické vlastnosti a vysokou botnavost. Jako nejefektivnější způsob zlepšení těchto vlastností je síťování, které může být fyzikální (dehydrotermální způsob, gama záření, UV záření), enzymové (transglutamináza, laccáza) nebo chemické (glutaraldehyd, trislovina). V každé z uvedených metod se za určitých podmínek daří získat kolagenní substrát, jež je odolný vůči prostředí a má dostatečné vlastnosti k aplikaci. Negativní stránkou bývá určitá míra toxicity, proto se stále stanovují limity, při kterých je kolagen netoxický.

Cílem této práce bylo ověřit účinky kolagenního gelu síťovaného kolagen-elastinovým a keratinovým hydrolyzátem. Obě látky jsou přírodního charakteru, takže výhodou je jejich biokompatibilita s tkáněmi. Za tímto účelem byly připraveny filmy, které obsahovaly zvyšující se přídavky kolagen-elastinového nebo keratinového hydrolyzátu, a také jejich kombinace s glutaraldehydem, který byl konstantní (0,5 %). U těchto jednotlivých filmů se pak stanovovaly charakteristické vlastnosti, jako je např. teplota smrštění, botnání a mechanické vlastnosti. Výsledky těchto měření jsou uvedené v následujícím textu.

Kolagen-elastinový hydrolyzát (KEH) poskytl při přídavku 5 % KEH (1 den zrání) filmy s vyššími teplotami smrštění o 7 °C oproti filmu bez síťovadla. Při použití příliš vysokých koncentrací KEH (15 %) a delší době zrání (5 dnů), došlo ke zvýšení teplot smrštění jen o 5 °C. Pokud požadujeme materiál o lepších mechanických vlastnostech, je lepší přídavek KEH a dobu zrání zvýšit. Film s nejlepšími mechanickými vlastnostmi byl při 10 % KEH se 3 dny zrání (trojnásobné zvýšení tahové síly a prodloužení o 37 %). Při botnacím testu se ukázalo jako nejlepší použití 2 % KEH s 1 dnem zrání (test při 26 °C) a 15 % KEH po 1 dni zrání (test při 80 °C), kdy byly stupně zbotnání filmů v rozmezí 2–4. Co se týče změny plochy, jako nejvíce odolný okolní teplotě (80 °C) byl film s 5 % KEH a 1 dnem zrání.

Kolagen-elastinový hydrolyzát ve spojení s glutaraldehydem měl v závislosti na koncentraci KEH odlišný vliv na vlastnosti kolagenního filmu. Při nejnižším přídavku KEH (3 %) s dobou zrání 1 dne, se teplota smrštění síťovaného filmu oproti filmu bez síťovadla zvýšila o 9 °C. U přídavku 6 % KEH se teplota smrštění filmu zvýšila jen o 4 °C. Nejmenší přídavek KEH (3 %) měl zároveň výsledný film s nejlepší tahovou silou (čtyřnásobné zvýšení). Ale poměrné prodloužení dosáhlo maxima (nárůst o 40 %) při přídavku 9 % KEH a krátké době zrání (1 den). S delší dobou zrání se prodloužení zhoršovalo. Ve vodní lázni (26 °C) nejméně

zbotnaly filmy s přídatkem 3, 9 % KEH po 1 dni zrání a 6 % KEH po 2 dnech zrání (stupně zbotnání byly v rozmezí 2–4 násobku). Při 80 °C nejméně zbotnal 3 % KEH po 3 dnech zrání (2–4,5 násobek). Nejvíce tepelně odolný vůči změně plochy (80 °C) byl film s 9 % KEH a 1 dnem zrání.

Keratinový hydrolyzát (KH) poskytl při použití přídatku 7,5 % KH filmy se zvýšenými teplotami smrštění o 8 °C vůči filmu bez síťovadla. Nižší přídatek KH (3%) zvýšil teplotu smrštění o 7 °C. Po delší době zrání teploty smrštění klesaly, proto byl ideální jen 1 nebo 3 dny zrání. Z hlediska mechanických vlastností byly nejlepší hodnoty (dvojnásobná tahová síla a prodloužení o 57 %) při přídatku 3 % KH. Tahová síla i poměrné prodloužení se u přídatku 3 % KH s dobou zrání zlepšovalo, ale u vyšší koncentrace (12 %) se prodloužení zhoršilo. Při botnacím testu se nejlépe projevil přídatek 3 % KH po 1 dni zrání (test při 26 a 80 °C), jehož stupeň zbotnání byl v rozmezí 2–5 násobku. Plochu nejméně změnil film se 3 % KH po 5 dnech zrání (při 80 °C).

Keratinový hydrolyzát s glutaraldehydem měl na vlastnosti kolagenního filmu dobrý vliv. Teplota smrštění těchto filmů se vůči filmu bez síťovadla zvýšila o 6 °C při přídatku 8 % KH a po delší době zrání (3 dny). O 2 °C se teplota smrštění zvýšila při přídatku 5 % KH a dobou zrání 2 dny. Toto spojení KH a glutaraldehydu poskytlo nejlepší mechanické vlastnosti ze všech použitých kombinací síťovadel. U přídatku 2 % KH se tahová síla zlepšila pětinásobně a poměrné prodloužení o 60 %. Poměrné prodloužení se pak s dobou zrání zhoršovalo. Ve vodní lázni při 26 a 80 °C nejméně zbotnal film se 2 % KH po 3 dnech zrání (zbotnání v rozmezí 2–5 násobku). U změny plochy (při 80 °C) byl nejlepší film s 2 % KH po 1 dni zrání.

Oba hydrolyzáty, kolagen-elastinový i keratinový, prokázaly síťující účinky. Nejlepší teplotu smrštění v podélném a příčném směru měl kolagen-elastinový hydrolyzát v kombinaci s glutaraldehydem a keratinový hydrolyzát. Z mechanických vlastností byla tahová síla při přetržení nejvyšší při kombinaci obou hydrolyzátů s glutaraldehydem. Co se týče poměrného prodloužení při přetržení, nejvyšších hodnot se dosáhlo u přídatku keratinového hydrolyzáta.

Interakce hydrolyzátů a kolagenního gelu si jistě zaslouží další studium, neboť výsledné matrice mohou najít uplatnění např. humánní medicíně.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HEMAPRABHA, E. Chemical crosslinking of proteins: Review. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*. 2012, s. 22–26.
- [2] FRIESS, Wolfgang. Collagen – biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1998 (45), s. 113–136.
- [3] GENNADIOS, A. *Protein-Based Films and Coatings*. Boca Raton: CRC Press, 2002, s. 672. ISBN 978-1-4200-3198-0.
- [4] *The Molecular Probes Handbook: A GUIDE TO FLUORESCENT PROBES AND LABELING TECHNOLOGIES*. 11. vyd., 2010, s. 173–188. Dostupné z: <http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/references/molecular-probes-the-handbook.html>
- [5] TRAKSELIS, A. Michael, Stephen C. ALLEY a Faoud T. ISHMAEL. Identification and mapping of protein-protein interactions by a combination of cross-linking, cleavage, and proteomics. *Bioconjugate Chemistry*. 2005 (16), s. 741–750. DOI: 10.1021/bc050043a.
- [6] [Http://www.bio-world.com/productinfo/4_847_45_293/8572/ANB-NOS-N-azido-nitrobenzoyloxysuccinimide.html](http://www.bio-world.com/productinfo/4_847_45_293/8572/ANB-NOS-N-azido-nitrobenzoyloxysuccinimide.html) [online].
- [7] [Http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/m9775?lang=en®ion=CZ](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/m9775?lang=en®ion=CZ) [online].
- [8] [Http://da.wikipedia.org/wiki/Tris-%282-carboxyethyl%29fosfin](http://da.wikipedia.org/wiki/Tris-%282-carboxyethyl%29fosfin) [online].
- [9] HEEK , Tobias, Greta FACCIO, Michael RICHTER a Linda THÖNY-MEYER. Enzyme-catalyzed protein crosslinking. *Applied Microbial Biotechnology*. 2013 (97), s. 461–475. DOI: 10.1007/s00253-012-4569-z.
- [10] [Http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2009/OB/b908687k/b908687k-f1.gif](http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2009/OB/b908687k/b908687k-f1.gif) [online]
- [11] DUAN, X. a H. SHEARDOWN. Crosslinking of collagen with dendrimers. *Wiley InterScience* [online]. 2005, s. 510–518. DOI: 10.1002/jbm.a.30475.
- [12] SIONKOWSKA, A., J. SKOPINSKA-WISNIEWSKA, M. GAWRON, J. KOZŁOWSKA a A. PLANECKA. Chemical and thermal cross-linking of collagen and elastin hydrolysates. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010 (47), s. 570–577. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.08.004.

- [13] WANG, Kun, Xuejing ZHENG, Jie LIU, Shufa QIN a Keyong TANG. Influence of UV Irradiation on the Properties of Goatskin Collagen Matrices. P. R. China: College of Materials Science and Engineering, Zhengzhou University, Henan. s. 5.
- [14] WEADOCK, Kevin S., Edward J. MILLER, Eric L. KEUFFEL a Michael G. DUNN. Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *Journal of Biomedical Material Research*. 1996 (32), s. 221–226.
- [15] XING, J. Y., B. BAI a Z. H. CHEN. Effect of UV irradiation on stabilization of collagen. China: School of Environmental Science and Engineering, Chang'an University, Xi'an. 2011, s. 2979–2982.
- [16] BRAUER, Delia S., Kuniko SAEKI, Joan F. HILTON, Grayson W. MARSHALL a Sally J. MARSHALL. Effect of sterilization by gamma radiation on nano-mechanical properties of teeth. *Dental Materials*. 2008 (24), s. 1137–1140.
- [17] AARON, Seto MS, Charles J. GATT MD a Michael G. DUNN PhD. Radioprotection of Tendon Tissue via Crosslinking and Free Radical Scavenging. *Clin Orthop Relat Res*. 2008 (466), s. 1788–1795. DOI: 10.1007/s11999-008-0301-9.
- [18] CHAN, B. P., O. C. M. CHAN a K. –F. SO. Effects of photochemical crosslinking on the microstructure of collagen and a feasibility study on controlled protein release. *Acta Biomaterialia*. 2008 (4), s. 1627–1636. DOI: 10.1016/j.actbio.2008.06.007.
- [19] PARK, Joon B. a Joseph D. BRONZINO. *Biomaterials: Principles and Applications*. CRC Press: Boca Raton. 2003, s. 250. ISBN 0-8493-1491-7.
- [20] BURAK, LuJean. Crosslinking technology. *Paint and Coatings Industry*. 2001 (17), s. 52.
- [21] ULUBAYRAM, Kezban, Ebru AKSU, S. Ismet Deliloglu GURHAN, Kemal SERBETCI a Nesrin HASIRCI. Cytotoxicity evaluation of gelatin sponges prepared with different cross-linking agents. *Journal Biomaterial Science Polymer Edn*. 2002 (13), s. 1203–1219. dostupné z www.vsppub.com
- [22] ZHANG, Min, Kun WU a Guoying LI. Interactions of collagen molecules in the presence of N-hydroxysuccinimide activated adipic acid (NHS-AA) as a crosslinking agent. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2011 (49), s. 847–854. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.08.007.
- [23] WANG Chunming, Ting Ting LAU, Wei Li LOH, Kai SU a Dong-An WANG. Cytocompatibility study of a natural biomaterial crosslinker—Genipin with therapeutic model

cells [online]. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2011 (97B), s. 58–65. DOI: 10.1002/jbm.b.31786.

[24] GORGIEVA Selestina a Vanja KOKOL. Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. 2011, s. 17–52. ISBN 978-953-307-661-4.

[25] HAN, Bo, Jason Jaurequi, Bao Wei TANG a Marcel E. NIMNI. Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices [online]. *Wiley*. 2003, s. 118–124.

[26] CAO, Na, Yuhua FU a Junhui HE. Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. *Food Hydrocolloids*. 2007 (21), s. 575–584. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2006.07.001.

[27] NATARAJAN, Venkatachalam, Natarajan KRITHICA, Balaraman MADHAN a Praveen Kumar SEHGAL. Preparation and properties of tannic acid cross-linked collagen scaffold and its application in wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2013 (101B), s. 560–567. DOI: 10.1002/jbm.b.32856.

[28] [Http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2011/AY/c0ay00629g/c0ay00629g-f6.gif](http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2011/AY/c0ay00629g/c0ay00629g-f6.gif) [online].

[29] MOKREJŠ, P., V. HALABALOVÁ, L. SIMEK, P. SVOBODA a R. ČERMÁK. Příprava kolagen-elastinových hydrolyzátů z hovězích šlach. *Research Journal of Chemistry and Environment*. 2013 (17), s. 4–9.

[30] LEE, Chi H., Anuj SINGLA a Yungyung LEE. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001 (221), s. 1–22.

[31] ŠEMRL-KOSMAČ V., A. GANTAR a I. ANŽUR. Modification of collagen hydrolysates. *Resources, Conservation and Recycling*. 1995 (13), s. 97–104.

[32] SCHROOYEN, Peter. *Feather keratins: Modification and film formation*. FEBODRUK BV: Enschede, 1999, s. 161. ISBN 9036513022.

[33] MOKREJŠ, Pavel, Svatopluk SUKOP a Ondřej KREJČÍ. Charakterizace keratinových hydrolyzátů připravených z kuřecího peří. *Chemické listy*. 2014 (108), s. 26–31.

[34] DAMINK, L. H. H. Olde, P. J. DIJKSTRA, M. J. A. VAN LUYN, P. B. VAN WACHEM, P. NIEUWENHUIS a J. FEIJEN. Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1995 (6), s. 460–472.

- [35] MIGNEAULT, Isabelle, Catherine DARTIGUENAVE, Michel J. BERTRAND a Karen C. WALDRON. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*. 2004 (37), s. 790–802.
- [36] CATALINA, M., E. ATTENBURROW, J. COT, A. D. COVINGTON a A. P. M. ANTUNES. Influence of Crosslinkers and Crosslinking Method on the Properties of Gelatin Films Extracted from Leather Solid Waste. *Journal of Applied Polymer Science*. 2011 (119), s. 2105–2111. DOI: 10.1002/app.32932. DOI: 10.1002/app.32932
- [37] PŠEJA, Jiří, Jan KUPEC a Petr HRUZÍK. Síťování bílkovin epoxidy. *Plasty a kaučuk*. 2004 (41), s. 6–7.
- [38] <https://patentimages.storage.googleapis.com/US7291395B2/US07291395-20071106-C00001.png> [online].
- [39] DI, Y. a R. J. HEATH. Collagen stabilization and modification using a polyepoxide, triglycidyl isocyanurate. *Polymer Degradation and Stability*. 2009 (94), s. 1684–1692. DOI: 10.1016/j.polyimdegradstab.2009.06.019.
- [40] KIERNAN, John A. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today*. 2000 (00-1), s. 8–12.
- [41] HAROUN, Mahdi A., Palmina K. KHIRSTOVA, Gurashi A. GASMELSEED a Anthony COVINGTON. Influence of oxazolidines and zirconium oxalate crosslinkers on the hydrothermal, enzymatic, and thermo mechanical stability of type 1 collagen fiber. *Thermochimica Acta*. 2009 (484), s. 4–10. DOI: 10.1016/j.tca.2008.11.008.
- [42] BLAŽEJ, Anton. *Technologie kůže a kožešin*. Státní nakladatelství technické literatury, 1984, s. 451.
- [43] CHARULATHA, V. a A. RAJARAM. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membrane. *Biomaterials*. 2003 (24), s. 759–767.
- [44] PROSR, Pavel a Radek POLANSKÝ. Využití infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací v technické diagnostice. *Elektro*. 2013 (12), s. 8–9.
- [45] ŠTRAUSOVÁ, Klára a Petr DOLEJŠ. Faktorové plánování a hodnocení experimentů při úpravě vody. *Sborník konference Pitná voda*. 2010, s. 95–100.

ISBN 978-80-254-6854-8.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ANB-NOS	N-5-azido-2-nitrobenzoyloxysukcimid
-COOH	Karboxylová skupina
Cs	Kolagen
ČSN	Česká technická norma
DDC	Dicyklohexylkarbodiimid
DDT	Dithiothreitolu
DHT	Dehydrotermální způsob
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
ε	Poměrné prodloužení při přetržení
F	Tahová síla při přetržení
FTIR	Fourierova transformace infračervené spektroskopie
GA, GTA	Glutaraldehyd
Gy	Gray, jednotka absorbované dávky záření
HCl	Kyselina chlorovodíková
HMDIC	Hexamethyldiisokyanát
KEH	Kolagen-elastinový hydrolyzát
KH	Keratinový hydrolyzát
MPB	4-maleimidobenzofenon
m_N	Hmotnost nabotnalého vzorku
m_S	Hmotnost suchého vzorku
NaHCO ₃	Hydrogenuhlíčan sodný
-NH ₂	Aminoskupina
NHS	N-hydroxysukcimid
NHS-AA	N-hydroxysukcimid, karbodiimid a kys. adipová

PAL	Povrchové aktivní látka
PBS	Fosfátový pufr
PC	Fotochemické síťování
PMMA	Polymethylmethakrylát
P _N	Plocha nabotnalého vzorku
P _S	Plocha suchého vzorku
SATA	sukcinimidyl ethylthioacetát
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
-SH	Thiolová skupina
σ	Směrodatná odchylka pro tahovou sílu při přetržení
-SO ₃ H	Sulfonová skupina
SZ	Stupeň zbotnání
T	Teplota ukončení smršťování filmu
TCCs	Kolagen síťovaný tríslovinou
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfinu
T _s	Teplota smrštění
T _z	Teplota, při které se systém začal zahřívat
UNXL	Kolagen bez ošetření
UV	Ultrafialové záření
UV-VIS	Ultrafialové záření ve viditelné oblasti
ZP	Změna plochy

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č.1 – Struktura <i>N</i> -5-azido-2-nitrobenzoyloxysukcimid (a) [6] a 4-maleimidobenzofenonu (b). [7]	14
Obrázek č.2 – Struktura tris(2-karboxyethyl)fosfinu. [8]	14
Obrázek č.3 – Mechanismus reakce transglutaminázy s proteiny. [10].....	15
Obrázek č.4 – Mechanismus reakce laccázy s proteiny. [9]	16
Obrázek č.5 – Mechanismus reakce lysyl-oxidázy s proteiny. [9].....	16
Obrázek č.6 – Spektrum FTIR kolagenu (1) a kolagenu po UV záření (2). [15]	17
Obrázek č.7 – Vliv DHT a UV záření na odolnost kolagenu při zatížení v porovnání s kolagenem bez fyzikálního ošetření (UNXL). [14]	18
Obrázek č.8 – Fotochemicky zesítný kolagen. [18]	19
Obrázek č.9 – Mechanismus reakce EDC s karboxylovou skupinou proteinu. [20] ..	21
Obrázek č.10 – Reakce mezi EDC a želatinou. [21]	21
Obrázek č.11 – Struktura dicyklohexylkarbodiimidu. [20]	22
Obrázek č.12 – Mechanismus reakce NHS esteru s primárním aminem proteinu. [20].....	22
Obrázek č.13 – Mechanismus reakce kolagenu s NHS-AA. [22]	23
Obrázek č.14 – Mechanismus reakce sulfo-NHS, EDC a karboxylové kyseliny. [20].....	24
Obrázek č.15 – Mechanismus reakce imidoesteru s primární aminoskupinou proteinu. [20].....	24
Obrázek č.16 – Mechanismus reakce genipinu s primárními aminy proteinu. [24] ..	25
Obrázek č.17 – Struktura proanthocyanidinu. [25]	26
Obrázek č.18 – Struktura kyseliny ferulové. [26]	26
Obrázek č.19 – Struktura tříslovin. [28]	27
Obrázek č.20 – FTIR spektrum kolagenu (Cs) a kolagenu po zesítnění tříslovinou (TCCs). [27]	27
Obrázek č.21 – Reakce mezi fruktózou a želatinou. [21]	28
Obrázek č.22 – Reakce mezi GA a kolagenem. [35]	30
Obrázek č.23 – Reakce mezi GA a želatinou. [21]	31
Obrázek č.24 – Struktura hexamethyldiisokyanátu. [36]	32
Obrázek č.25 – Mechanismus reakce mezi epoxidem a proteinem. [38]	32
Obrázek č.26 – Reakce formaldehydu s vodou. [40]	33

Obrázek č.27 – Reakce methylenového hydrátu s proteinem. [40]	33
Obrázek č.28 – Reakce mezi formaldehydem a proteinem. [40]	34
Obrázek č.29 – Reakce 4,4-dimethyl-1,3-oxazolidinu s kolagenem. [41]	35
Obrázek č.30 – Kolagen bez ošetření (control), po fotochemickém síťování (PC) a chemickém síťování (GTA). [18]	38
Obrázek č.31 – Vliv přídavku KEH a doby zrání na Ts v podélném směru při síťování KEH.	48
Obrázek č.32 – Vliv přídavku KEH a doby zrání na Ts v příčném směru při síťování KEH.	49
Obrázek č.33 – Vliv přídavku KEH a doby zrání na tahovou sílu při síťování KEH. 50	
Obrázek č.34 – Vliv přídavku KEH a doby zrání na poměrné prodloužení při síťování KEH.	51
Obrázek č.35 – FTIR spektrum kolagenního filmu bez síťovadla, KEH a kolagenního filmu síťovaného KEH.	53
Obrázek č.36– Stupeň zbotnění filmů při 26 °C.	54
Obrázek č.37– Stupeň zbotnění filmů při 80 °C.	54
Obrázek č.38– Změna plochy filmů při 26 °C.	55
Obrázek č.39– Změna plochy filmů při 80 °C.	55
Obrázek č.40 – Vliv přídavku KEH a doby zrání na Ts v podélném směru při síťování KEH a GA.	58
Obrázek č.41 – Vliv přídavku KEH a doby zrání na Ts v příčném směru při síťování KEH a GA.	59
Obrázek č.42 – Vliv přídavku KEH a doby zrání na tahovou sílu při síťování KEH a GA.	60
Obrázek č.43 – Vliv přídavku KEH a doby zrání na poměrné prodloužení při síťování KEH a GA.	61
Obrázek č.44 – FTIR spektrum kolagenního filmu bez síťovadla, KEH, kolagenního filmu síťovaného 0,5 % GA a kolagenního filmu síťovaného KEH a GA.	63
Obrázek č.45 – Stupeň zbotnění filmů při 26 °C.	64
Obrázek č.46 – Stupeň zbotnění filmů při 80 °C.	64
Obrázek č.47 – Změna plochy filmů při 26 °C.	65
Obrázek č.48 – Změna plochy filmů při 80 °C.	65

<i>Obrázek č.49 – Vliv přídavku KH a doby zrání na Ts v podélném směru při síťování KH.</i>	68
<i>Obrázek č.50 – Vliv přídavku KH a doby zrání na Ts v příčném směru při síťování KH.</i>	69
<i>Obrázek č.51 – Vliv přídavku KH a doby zrání na tahovou sílu při síťování KH.</i>	70
<i>Obrázek č.52 – Vliv přídavku KH a doby zrání na poměrné prodloužení při síťování KH.</i>	71
<i>Obrázek č.53 – FTIR spektrum kolagenního filmu bez síťovadla, KH a kolagenního filmu síťovaného KH.</i>	73
<i>Obrázek č.54 – Stupeň zbotnění filmů při 26 °C.</i>	74
<i>Obrázek č.55 – Stupeň zbotnění filmů při 80 °C.</i>	74
<i>Obrázek č.56 – Změna plochy filmů při 26 °C.</i>	75
<i>Obrázek č.57 – Změna plochy filmů při 80 °C.</i>	75
<i>Obrázek č.58 – Vliv přídavku KH a doby zrání na Ts v podélném směru při síťování KH a GA.</i>	78
<i>Obrázek č.59 – Vliv přídavku KH a doby zrání na Ts v příčném směru při síťování KH a GA.</i>	79
<i>Obrázek č.60 – Vliv přídavku KH a doby zrání na tahovou sílu při síťování KH a GA.</i>	80
<i>Obrázek č.61 – Vliv přídavku KH a doby zrání na poměrné prodloužení při síťování KH a GA.</i>	81
<i>Obrázek č.62 – FTIR spektrum kolagenního filmu bez síťovadla, KH, kolagenního filmu síťovaného 0,5 % GA a kolagenního filmu síťovaného KH a GA.</i>	83
<i>Obrázek č.63 – Stupeň zbotnění filmů při 26 °C.</i>	84
<i>Obrázek č.64 – Stupeň zbotnění filmů při 80 °C.</i>	84
<i>Obrázek č.65 – Změna plochy filmů při 26 °C.</i>	85
<i>Obrázek č.66 – Změna plochy filmů při 80 °C.</i>	85
<i>Obrázek č.67 – Připravené filmy kolagenního gelu síťovaného KEH (a), KEH+GA (b), KH (c) a KH+GA (d).</i>	102

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka č.1 – Sítující látky. [1]</i>	12
<i>Tabulka č.2 – Souhrnné výsledky ukazatelů zesítní kolagenního gelu síťovaného KEH.</i>	46
<i>Tabulka č.3– Prodloužení/smrštění filmů síťovaných KEH v podélném a příčném směru.</i>	47
<i>Tabulka č.4 – Odlišnosti charakteristických piků filmů č.1–7 síťovaných KEH s píky filmu bez síťovadla.</i>	52
<i>Tabulka č.5 – Souhrnné výsledky ukazatelů zesítní kolagenního gelu síťovaného KEH a GA.</i>	56
<i>Tabulka č.6 – Prodloužení/smrštění filmů síťovaných KEH a GA v podélném a příčném směru.</i>	57
<i>Tabulka č.7 – Odlišnosti charakteristických piků filmů č.1–5 síťovaných KEH a GA s píky filmu bez síťovadla.</i>	62
<i>Tabulka č.8 – Souhrnné výsledky ukazatelů zesítní kolagenního gelu síťovaného KH.</i>	66
<i>Tabulka č.9 – Prodloužení/smrštění filmů síťovaných KH v podélném a příčném směru.</i>	67
<i>Tabulka č.10 – Odlišnosti charakteristických piků filmů č. 1–5 síťovaných KH s píky filmu bez síťovadla.</i>	72
<i>Tabulka č.11 – Souhrnné výsledky ukazatelů zesítní kolagenního gelu síťovaného KH a GA.</i>	76
<i>Tabulka č.12 – Prodloužení/smrštění filmů síťovaných KH a GA v podélném a příčném směru.</i>	77
<i>Tabulka č.13 – Odlišnosti charakteristických piků filmů č.1–5 síťovaných KH a GA s píky filmu bez síťovadla.</i>	82

SEZNAM PŘÍLOH

**PŘÍLOHA P I: FOTOGRAFIE VÝSLEDNÝCH FILMŮ SÍŤOVANÝCH KEH,
KEH+GA, KH A KH+GA102**

**PŘÍLOHA P I: FOTOGRAFIE VÝSLEDNÝCH FILMŮ SÍŤOVANÝCH
KEH, KEH+GA, KH A KH+GA**



a



b



c



d

*Obrázek č.67 – Připravené filmy kolagenního gelu síťovaného KEH (a),
KEH+GA (b), KH (c) a KH+GA (d)*