

# **Sledování vlivu přídatku síťovadel na vlastnosti kolagenních filmů**

Bc. Jarošová Radmila

---

Diplomová práce  
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Radmila Jarošová**  
Osobní číslo: **T13375**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Sledování vlivu přídavku sířovadel na vlastnosti kolagenních filmů**

Zásady pro vypracování:

1. Způsoby sířování (živočišných) bílkovin.
2. Prostudujte podmínky a mechanismy sířování bílkovin (kolagenu) kyselinou alginovou a dalšími sířovadly akceptovatelnými pro potravinářské aplikace.
3. V praktické části se zaměřte na sířování kolagenní hmoty kombinací vybraných sířovadel, studujte vliv technologických podmínek při sířování na vlastnosti filmů.
4. Stupeň zesířování vyhodnoťte vhodnými metodami (teplota smrštění, bobtnací testy, infračervená spektroskopie).
5. Zpracujte výsledky s využitím statistických technik, proveďte diskuzi a zhodnoťte přínos práce.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Vědecké články a monografie z databází Web of Science, ScienceDirect a další;  
databáze elektronických knih (např. Knovel).

Blažej A. et al. Technologie kůže a kožešin. Praha: SNTL, 1984.

Meißner, B., Zilvar, V. Fyzika polymerů: Struktura a vlastnosti polymerních materiálů.  
Praha: SNTL, 1987.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Pavel Mokrejš, Ph.D.**  
Ústav inženýrství polymerů


Datum zadání diplomové práce: **16. ledna 2015**

Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2015**

Ve Zlíně dne 2. března 2015

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové 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<sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová 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 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<sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> 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<sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou 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 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 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 30. 4. 2015

*Jarošová Radmila*

---

<sup>1)</sup> 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 nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

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

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

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

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

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

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

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

## **ABSTRAKT**

Cílem diplomové práce je sledování vlivu přídatku síťovadel na vlastnosti kolagenních filmů. V teoretické části jsou uvedeny způsoby, jakými lze síťovat kolagenní materiály. Dále je popsána kyselina alginová a tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfát a jejich možné využití jako síťovací činidla. Poslední část teoretické části popisuje nejběžnější metody sloužící k charakterizaci zesíťované kolagenní matrice.

V experimentální části je sledován vliv přídatku kyseliny alginové v kombinaci s glutaraldehydem a vliv přídatku samotného tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfátu na vlastnosti kolagenních filmů. Ze stanovených teplot smrštění, bobtnacích testů a mechanických parametrů filmů bylo zjištěno, že kolagenní filmy síťované pomocí tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfátem vykazují lepší materiálové vlastnosti než filmy síťované kyselinou alginovou.

Klíčová slova: síťování, kolagen, glutaraldehyd, kyselina alginová, tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfát, teplota smrštění, bobtnání, mechanické parametry, FTIR

## **ABSTRACT**

The target of the master thesis is studying the effect of adding cross-linkers on the properties of collagen films. In the theoretical part methods of cross-linking of collagen materials are introduced. Further, alginic acid and tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulphate and their possible utilizations as cross-linked agents are described. The last part of the theoretical part presents the most common methods used to characterizing degree of cross-linking of collagen matrix. In the practical part of the thesis the influence of addition of alginic acid in combination with glutaraldehyde and the influence of addition of tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate on properties of collagen films are studied. Based on the results of shrinkage temperature, swelling tests and mechanical parameters of the films it can be concluded that collagen films cross-linked with tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulphate shows better material properties than films cross-linked with alginic acid.

Keywords: cross-linking, collagen, glutaraldehyde, alginic acid, tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulphate, shrinkage temperature, swelling, mechanical parameters, FTIR

*“Nechtěj být člověkem, který je úspěšný, ale člověkem, který za něco stojí.”*

Albert Einstein

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Pavlu Mokrejšovi, PhD. za jeho pomoc, vstřícnost, připomínky a cenné rady při jejím vypracování. Dále mu děkuji za odborné vedení, veškerý čas, který mi byl obětován při konzultacích a při práci v laboratořích, kterou věnoval přípravě a realizaci mé diplomové práce. Děkuji také laborantce paní Miroslavě Žaludkové za pomoc a asistenci v laboratoři a svým rodičům a nejbližším, kteří mě po dobu mých studií podporovali.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>1. BÍLKOVINY.....</b>	<b>12</b>
1.1 SÍŤOVÁNÍ BÍLKOVIN.....	12
1.2 SÍŤOVADLA .....	13
<b>2. SÍŤOVÁNÍ KOLAGENU .....</b>	<b>15</b>
2.1 CHEMICKÉ SÍŤOVÁNÍ KOLAGENU .....	17
2.1.1 Tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfát .....	17
2.1.2 Kyselina alginová .....	20
2.1.3 Formaldehyd.....	22
2.1.4 Glutaraldehyd .....	22
2.1.5 Jiné chemické síťující látky.....	24
2.2 ENZYMOMÉ SÍŤOVÁNÍ KOLAGENU.....	27
2.3 FYZIKÁLNÍ SÍŤOVÁNÍ KOLAGENU .....	29
2.3.1 Dehydrotermální síťování .....	29
2.3.2 Síťování pomocí UV záření .....	29
2.3.3 Síťování svazkem elektronů.....	30
<b>3. CHARAKTERIZACE STUPNĚ ZESÍŤOVÁNÍ BÍLKOVINNÉHO SUBSTRÁTU .....</b>	<b>32</b>
3.1 BOBTNACÍ TESTY.....	32
3.2 HYDROTERMÁLNÍ STABILITA .....	32
3.3 DIFERENČNÍ SNÍMACÍ KALORIMETRIE .....	32
3.4 MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL .....	33
3.5 INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE.....	33
3.6 STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN .....	34
<b>4. ZHODNOCENÍ LITERÁRNÍ STUDIE A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>35</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>36</b>
<b>5. SÍŤOVÁNÍ FILMŮ.....</b>	<b>37</b>
5.1 POUŽITÉ MATERIÁLY, CHEMIKÁLIE A ZAŘÍZENÍ .....	37
5.2 ORGANIZOVÁNÍ EXPERIMENTŮ .....	37
5.3 POSTUP PRÁCE SÍŤOVÁNÍ KOLAGENU.....	38
5.3.1 Síťování kombinací kyseliny alginové a glutaraldehydu .....	38
5.3.2 Síťování tetrakis hydromethyl fosfonium sulfátem.....	40
5.4 METODY K HODNOCENÍ ÚČINKU SÍŤOVÁNÍ .....	42
<b>6. VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>44</b>



6.1	FILMY SÍŤOVANÉ KOMBINACÍ KYSELINY ALGINOVÉ A GLUTARALDEHYDU.....	44
6.1.1	Teplota smrštění .....	47
6.1.2	Mechanické parametry .....	51
6.1.3	Bobtnací zkoušky .....	56
6.1.4	FTIR .....	63
6.1.5	Zhodnocení síťujícího účinku kombinací kyseliny alginové a glutaraldehydu .....	67
6.2	FILMY SÍŤOVANÉ TETRAKIS HYDROXYMETHYL FOSFONIUM SULFÁTEM.....	69
6.2.1	Teplota smrštění .....	72
6.2.2	Mechanické parametry .....	76
6.2.3	Bobtnací zkoušky .....	82
6.2.4	FTIR .....	89
6.2.5	Zhodnocení síťujícího účinku tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfátem .....	93
6.3	SROVNÁNÍ SÍŤUJÍCÍHO ÚČINKU OBOU POUŽITÝCH SÍŤOVADEL.....	95
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>96</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>97</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>104</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>106</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>110</b>

## ÚVOD

Kolagen je látka rozšířená v celé říši živých organismů a patří mezi technicky nejdůležitější vláknité bílkoviny. Jelikož se jedná o obnovitelnou surovinu, a jeho zdroje jsou téměř neomezené, je snaha neustále zdokonalovat preparáty z něj vyráběné. Kolagen je nejen hlavní surovinou kožedělného průmyslu pro výrobu usní, ale využívá se i v řadě dalších oborů. Hlavní předností tohoto biopolymeru je jeho podobnost s kolagenem tělesným, a tudíž je často využíván v oblasti biomedicínských aplikací. Jeho dalšími přednostmi, oproti běžně používaným syntetickým polymerům, je jeho resorbovatelnost, kterou lze řídit síťujícími reakcemi; dále pak schopnost zadržovat vodu, díky své vynikající absorpční schopnosti. Navíc nevyvolává tvorbu protilátek organismu a vykazuje velmi nízkou antigenitu, kterou lze ještě více potlačit odstraněním telopeptidů z konců řetězců. V biomedicínských aplikacích může být kolagen využit jako systém pro dodávání léčiv, v tkáňovém inženýrství je pak využíván pro transplantace tkání, používá se pro výrobu resorbovatelných chirurgických nití, nebo se z něj zhotovují tzv. kolagenové podušky aplikované na popáleniny nebo otevřené rány. Kolagen je také významnou surovinou v potravinářském průmyslu, kde se využívá především v podobě jedlých obalů a filmů. Vyrobené kolagenní filmy slouží především k ochraně masných výrobků před vnějším prostředím, před působením mikroorganismů, navíc zadržují masovou šťávu a omazují únik aromatických látek.

Jelikož mechanické vlastnosti nativního kolagenu nejsou pro mnoho aplikací dostačující, je nutné kolagen síťovat. V současné době je nečastěji používaným síťovadlem reaktivní glutaraldehyd, který při svém odbourávání uvolňuje formaldehyd, čímž vykazuje cytotoxický účinek. Navíc v případě výroby bioprotéz síťovaných glutaraldehydem dochází po implantaci k jejich vápenatění, což je hlavní příčinou jejich poruch.

Právě díky těmto nedostatkům existuje v současné době celá řada studií zabývajících se hledáním jiného vhodného síťujícího činidla, které poskytne kolagen se srovnatelnými nebo dokonce s lepšími materiálovými vlastnostmi. Mezi taková síťovadla patří např. modifikované polysacharidy (celulózový dialdehyd, dialdehyd kyseliny alginové nebo dialdehyd škrobu), genipin, kyselina alginová nebo tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfát.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1. BÍLKOVINY

Bílkoviny se řadí mezi nejsložitější organické přírodní makromolekulární sloučeniny, tzv. biopolymery. Jsou složeny ze základních strukturních jednotek monomerů, aminokyselin, kterých je celkem 20. Vlastnosti bílkovin jsou dány především chemickým složením, sekvencí aminokyselin, velikostí makromolekul, prostorovou strukturou a komplexní povahou. Vzájemné spojování aminokyselin do polypeptidického řetězce dává velkou variabilitu, druhovou specifickou a rozmanitost. Bílkoviny v organismu plní řadu funkcí, jako je funkce biologická, výživová, energetická a mnohé další [1].

Bílkoviny se často dělí podle tvaru makromolekul a to na bílkoviny globulární (korpuskulární) a bílkoviny vláknité (fibrilové). Mezi bílkoviny globulární řadíme albuminy, globuliny, řadu enzymů, bílkoviny krevní plazmy, vaječné, mléčné a rostlinné bílkoviny. Pro globulární bílkoviny je typické, že jejich rozměry jsou ve všech třech směrech stejné. Globulární bílkoviny lze po degradaci buněk rozpustit ve vodě nebo ve vodných roztocích zředěných solí [1].

Vláknité bílkoviny mají velmi typické prostorové uspořádání. Sousední molekuly působí navzájem na sebe a tím se vytvářejí větší agregáty, v nichž jsou vláknité molekuly uspořádány rovnoběžně. Zdáli dojde k vzájemné reakci, začnou vznikat příčné vazby orientované kolmo na směr osy molekuly, což má za následek nerozpustnost ve vodě i v roztocích solí [1, 2].

Vláknité bílkoviny slouží jako základní stavební materiál v živočišné říši. Řadíme zde kolagen, keratin, elastin, myosin, aktin aj. [3].

### 1.1 Sítování bílkovin

Sítování je chemický proces, který umožňuje spojení dvou nebo více molekul pomocí kovalentní vazby [12]. Chemická modifikace, která vede ke zvýšení stupně zesítování, závisí na reaktivitě proteinových složek, specifické činnosti činidel, složení a reaktivitě aminokyselin a trojrozměrné struktury proteinu [6].

Chemická reaktivita proteinů je dána aminokyselinovým složením jejich postraních řetězců a volnými aminovými a karboxylovými skupinami. Mezi nejvíce reaktivní proteinové skupiny řadíme serin, hydroxyprolin, treonin, tyrosin, kyselinu aspartovou a glutamovou, lysin a arginin [6].

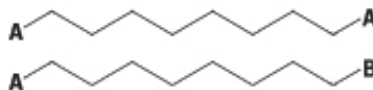
K chemickému síťování proteinů dochází pomocí čtyř základních funkčních skupin:

- Primární aminy ( $-\text{NH}_2$ ) – tato skupina se vyskytuje na N– konci každého polypeptidového řetězce a v postranním řetězci lysinového zbytku
- Karboxyly ( $-\text{COOH}$ ) – tato skupina se vyskytuje na C– konci každého polypeptidového řetězce a v postranním řetězci kyseliny asparagové a glutamové
- Sulfhydryly ( $-\text{SH}$ ) – tato skupina se nachází v postranním řetězci cysteinu. Často je součástí sekundární a terciární struktury bílkovin, kde jsou cysteiny spojeny svými postranními řetězci prostřednictvím disulfidových vazeb ( $-\text{S}-\text{S}-$ )
- Karbonyly ( $-\text{CHO}$ ) – tyto aldehydové skupiny mohou být vytvořeny oxidací sacharidových skupin glykoproteinů.

Pro každou z těchto cílových funkčních skupin existuje celá řada reaktivních skupin, které jsou součástí síťovacích činidel, pomocí nichž dochází k tvorbě příčných vazeb [12].

## 1.2 Síťovadla

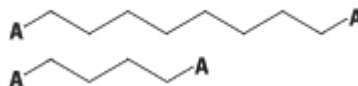
Síťovací činidla jsou molekuly, které obsahují dva nebo více reaktivní konce, které jsou schopny se chemicky připojit na proteiny a jiné molekuly. Mezi molekulami vznikají mezimolekulární příčné vazby. Rozeznáváme řadu komerčně dostupných síťovacích činidel, které mohou obsahovat specifické funkční skupiny zaměřující se na aminy, sulfhydryly, karboxyly, karbonyly nebo hydroxylové skupiny. Dále rozeznáváme činidla homobifunkční a heterobifunkční, přičemž homobifunkční síťovadla mají stejné reaktivní skupiny na obou koncích (obrázek 1 – A/A) a lze je použít pouze při jednostupňových reakcích. Naopak činidla heterobifunkční obsahují na obou koncích různě reaktivní skupiny (obrázek 1 – A/B). Tato činidla umožňují jak jednostupňové reakce, tak i reakce dvoustupňové, které minimalizují nežádoucí polymerace a samokonjugace.



Obrázek 1 – Jednoduché schéma porovnávající homobifunkční a heterobifunkční síťovadla

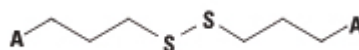
[12]

Síťovací činidla se mohou také od sebe lišit délkou ramene, kdy reaktivní skupiny jsou od sebe prostorově odděleny strukturou síťující molekuly. Vzdálenost mezi reaktivními skupinami může být různě velká, jak znázorňuje obrázek 2 níže. Existují i síťovadla s nulovou délkou ramene, u kterých po dokončení reakce nezůstává žádná zbylá část síťovadla.



Obrázek 2 – Jednoduché schéma znázorňující variabilitu v délkách ramene síťovacích činidel [12]

Síťovadla mohou také obsahovat štěpitelné prvky, jako jsou estery nebo disulfidové vazby, pomocí nichž může dojít k rozbití vazby přidáním hydroxylaminu nebo redukčního činidla. V takovém případě pak rozeznáváme činidla štěpitelná a neštěpitelná. Schéma štěpitelného činidla znázorňuje obrázek 3 [12].



Obrázek 3 – Jednoduchá schéma štěpitelného síťovadla s disulfidovou vazbou [12]

## 2. SÍŤOVÁNÍ KOLAGENU

Kolagen představuje nejrozšířenější živočišnou bílkovinu, která je hlavní vláknitou složkou kůže, kostí, šlach, chrupavek, cévních stěn a zubů. Mimo jiné také tvoří kontinuum spojující buňky do tkání a slouží jako stavební materiál membrán [1, 3].

Jako všechny ostatní bílkoviny je i kolagen složený z 20 druhů základních aminokyselin. Pro kolagen je typický vysoký obsah glycinu a cyklických aminokyselin, mezi které řadíme prolin a hydroxyprolin. Charakteristické aminokyseliny, které obsahuje pouze kolagen je hydroxyprolin a hydroxylysin. Neobsahuje cystin, cystein a tryptofan [1, 2].

Vytvářet nerozpustná vlákna s velmi vysokou pevností v tahu je dáno specifickou strukturou, charakteristickou vysokým stupněm vnitřní organizace molekul. Základní strukturální jednotkou kolagenu je tzv. tropokolagen, který se skládá ze tří vláken stejné délky ( $\alpha$  – řetězce) společně se stáčejí do pravidelné pravotočivé trojitě spirály [3, 4].

Kolagen má charakter amfoterního polyelektrolytu, proto jeho iontové reakce silně závisí na pH prostředí. To znamená, že část skupin jeho postranního řetězce se ionizuje v alkalickém prostředí a část v prostředí kyselém. Kolagen vykazuje v alkalické oblasti záporný náboj, přičemž v prostředí kyselém má náboj kladný. Izoelektrický bod nativního kolagenu je při pH 7. Mírnými účinky chemikálií je možné jej měnit v rozsahu pH 4,5 až 8. Právě v této oblasti kolagen vykazuje extrémní hodnoty fyzikálně -mechanických vlastností [4].

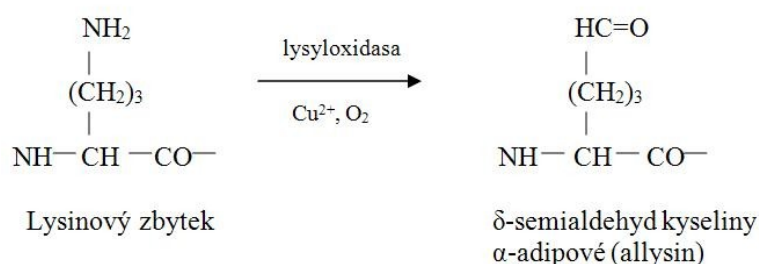
Zesíťovaný kolagen vykazuje vyšší modul pružnosti, je odolnější vůči působení proteáz a nedochází k tak výraznému nabobtnání v porovnání s kolagenem nezesíťovaným. Je žádoucí, aby kolagenové preparáty měly co nejlepší jak chemické, tak i fyzikální a materiálové vlastnosti. Kolagen využívaný v biomedicínských aplikacích např. na bioprotézy se po implantaci do těla velmi rychle rozkládá, proto je nutné jej stabilizovat [4, 5].

Síťování se může provádět jednak chemickou úpravou, pomocí např. aldehydů (glutaraldehyd, formaldehyd), kyselin nebo oxidačními činidly, a jednak fyzikálními vlivy, jako je např.  $\gamma$  a UV záření [4].

### Zesíťování kolagenu po agregaci na fibrily

Postupným stárnutím kolagenu dochází u kolagenových fibril k vrůstající nerozpustnosti, což může v konečném stádiu představovat rozpustnost pouze v silně hydrolytických prostředích. Tato skutečnost je dána vznikem intermolekulárních a intramolekulárních příčných vazeb, které spojují tropokolagenové molekuly do polymerní sítě [1].

Největší význam v těchto příčně vazebných reakcích představují aminokyselinové zbytky lysinu a hydroxylysínu. Tyto zbytky se částečně oxidují specifickým enzymem lisyloxidasou za vzniku aldehydové skupiny, jak znázorňuje následující schéma:



Obrázek 4 – Oxidace lysinového zbytku na allysin [1]

Vzniklé aldehydové skupiny reagují s vedlejšími řetězci aminokyselin za vzniku příčných vazeb mezi sousedními polypeptidickými řetězci. V případě kolagenových roztoků k síťování nedochází z důvodu velké vzdálenosti mezi molekulami. Kolagenové molekuly, které obsahují aldehydové skupiny, se skládají do fibril. Poté nastává reakce karbonylu s vedlejšími řetězci a mezi jednotlivými řetězci se začnou vytvářet příčné vazby. Může také docházet i ke vzájemným reakcím dvou aldehydových skupin. Síťování u kolagenu probíhá nejprve pouze do stádia tzv. redukovatelných příčných vazeb, které jsou štěpitelné redukčními činidly, a teprve v dalším procesu dozrávání se mění na neredukovatelné příčné vazby adicí jedné nebo dvou dalších reaktivních skupin vedlejších řetězců [1].

### Aldehydová kondenzace

Mezi aldehydy mající schopnost stabilizovat a síťovat aminokyseliny a proteiny, patří především mono- a bifunkční aldehydy. Dialdehydové škroby a alifatické dialdehydy, jako je např. glutaraldehyd síťují kolagen pomocí můstků za současného vzniku dvojité Schiffovy báze, které se obvykle zúčastňuje síťujících reakcí s  $\epsilon$ -aminoskupinou lysinu. Stabilita Schiffovy báze udává, že takto zesíťovaný kolagen je více odolný vůči kyselé nebo vysokoteplotní hydrolyze než kolagen síťovaný za stejných podmínek pomocí formaldehydu.



V případě nízké koncentrace glutaraldehydu vznikají intramolekulární síťování, při vyšší koncentraci se vytvářejí dlouhé polymerní řetězce způsobující intermolekulární fixaci [4].

### Oxidace jodistanem

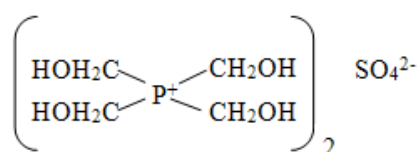
Pomocí této metody se získá kolagen s požadovanou mechanickou pevností, bistabilitou s antiimunogenicitou bez použití glutaraldehydu. V polypeptidickém řetězci kolagenu může dojít k oxidaci hydroxylové skupiny 5-hydroxylysinu pomocí jodistanu za současného vzniku aldehydové skupiny, která reaguje se sousedními aminoskupinami lysinových zbytků. Tím dochází ke vzniku sítě [4].

## 2.1 Chemické síťování kolagenu

Před zahájením síťování je velmi důležitá vhodná volba síťovadla pro optimální reakci s proteiny. V potaz se bere rozpustnost síťovadla, membránová permeabilita, délka distančního ramene a vratnost příčných vazeb. Síťování by mělo probíhat za mírných podmínek pH a teploty aby se zachovala nativní struktura proteinů. Homobifunkční činidla jako jsou například formaldehyd a glutaraldehyd patří mezi nejpoužívanější síťovadla [12].

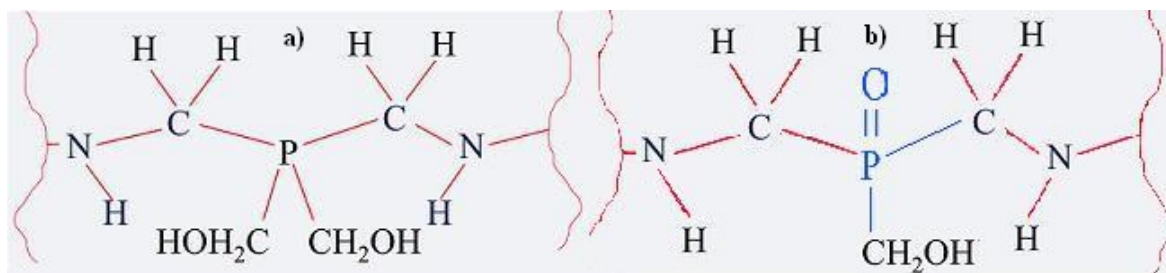
### 2.1.1 Tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfát

Tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfát (THPS), jehož molekulární vzorec znázorňuje obrázek 5, je látka, která se vyznačuje celou řadou výhod, jako je nízká toxicita, malé dávkovatelné množství, rychlý rozklad v životním prostředí, nulová akumulace v organismech a nízký stupeň rizika jak pro lidské zdraví, tak pro životní prostředí. Je užitečné v celé řadě průmyslových odvětví. Jeho široký rozsah použití je založen na jeho multifunkčních vlastnostech, které z něj činí účinný prostředek pro zpomalování hoření, pro síťování bílkovin, prostředek k regulaci růstu bakterií a další. THPS se využívá také k zachycování sulfidu železa ve vodách ropných ložisek. Přídavek malého množství zajistí snížení obsahu sulfidu železa ve vodě a tím dojde k odstranění usazenin z povrchu potrubí, filtračních médií a v dalších zařízeních [17].



Obrázek 5 – Vzorec THPS [18]

V případě síťování kolagenu pomocí THPS dochází k reakci mezi hydroxymethylovými skupinami THPS s  $-NH_2$  skupinami kolagenu. Princip vzniku příčných můstků je podobný aldehydovému síťování, kdy vznikají krátké a silné příčné vazby. Kolagen síťovaný THPS je bílé barvy, oproti kolagenu síťovanému například glutaraldehydem (viz. Příloha). Takto zesíťovaný kolagen neobsahuje žádné ionty a je elektronegativní. Kolagen zesíťovaný pomocí THPS je patrný na obrázku 6 níže [17].



Obrázek 6 – Schéma zesíťovaného kolagenu pomocí THPS – a) aktivní forma zesíťovaného kolagenu, b) stabilizovaná forma zesíťovaného kolagenu [19]

Díky antimikrobiálním vlastnostem THPS, objevenými Albrightem a Wilsonem, byl vyvinut bezpečnější biocid, který může být použit k regulaci růstu bakterií a řas v průmyslových vodních systémech. THPS nabízí mnoho výhod oproti jiným, tradičně používaným biocidům a to z toho důvodu, že je podstatně méně toxický pro necílové organismy, je účinný při mnoho nižších koncentracích a je biologicky odbouratelný [8].

Běžně biocidy používané k potlačení růstu bakterií, řas a hub v průmyslových systémech a ropných polí jsou vysoce toxické pro člověka a vodní organismy a často přetrvávají v životním prostředí. THPS biocidy představují zcela novou třídu antimikrobiální chemie, která kombinuje vynikající antimikrobiální aktivitu při relativně neškodném toxikologickém účinku. Mezi hlavní výhody THPS je nízká toxicita, rychlý rozklad v životním prostředí a nebioakumulace. THPS biocidy poskytují snížení rizik pro lidské zdraví a životní prostředí. THPS se rozkládá hydrolyzou, oxidací, fotodegradací a biologickým rozkladem. Bylo prokázáno, že degradační produkty mají neškodnou toxicitu. THPS biocidy jsou vodné roztoky a neobsahují organické těkavé sloučeniny. Vzhledem k tomu, že THPS neobsahuje halogeny, nepřispívá k tvorbě dioxinů nebo vstřebatelných organických halogenů. Na základě netoxického účinku na životní prostředí byl schválen pro použití v ekologii [8].

Díky svému netoxickému účinku na životní prostředí byl THPS studován jako náhražka chromu při činění usně. Usně vyčiněné pomocí chromu vykazují modro – šedou barvu s vysokými teplotami smrštění (~105°C). Kvůli dopadu na životní prostředí byla snaha chrom nahradit syntetickými tríslovinami, které ale poskytovaly pouze usně nažloutlé barvy. Žádný s dosavadních činících procesů nemohl poskytnout kvalitní, čistě bílé usně vhodné pro přímé použití nebo pro barvení s použitím ekologicky přijatelných a ekonomicky dostupných složek. Cílem studie bylo poskytnout pro životní prostředí přijatelný činící proces, který poskytuje bílé usně s vysokými teplotami smrštění v rozmezích od 80°C do 85°C. Bylo zjištěno, že neoptimálnější koncentrace THPS se pohybuje v rozmezí od 0,01 do 20 hm. %, vztaženo na celkovou hmotnost suché kůže. Obecně platí, že hodnota pH při které useň dosahuje nejlepšího stupně činění je v blízkosti jejího izoelektrického bodu. Z toho důvodu byla u holiny provedena úprava pH, která by se měla nejlépe pohybovat od 4,5 do 7. Fathima ve své studii provedl úpravu pH pomocí 1% hydrogenuhličitanu sodného na konečnou hodnotu pH 5. Takto vyčiněné usně jsou světlé barvy s vysokými teplotami smrštění. V jiné studii byl k činění usní použit tetrakis hydroxymethyl fosfonium chlorid (THPC). V tomto případě se hodnota pH upravovala na hodnoty od 3 do 9. Obvykle se však dosahuje uspokojivých výsledku při pH od 2 do 12 [50–52].

Bylo také studováno síťování kolagenu pomocí THPS a účinek tohoto síťování na tepelnou a enzymatickou stabilitu. Kolagenní vlákna byla smíchána s 1% roztokem THPS po dobu 24 hodin při teplotě 25°C, přičemž hodnota pH byla 4. Teplota smrštění i teplota denaturace byla naměřena vyšší než v případě kolagenu nativního. Pomocí DSC bylo zjištěno, že v průběhu denaturace dochází k fázovému přechodu u nativního kolagenu již při teplotě 65°C, přičemž u kolagenních síťovaných vláken dochází k fázovému přechodu až při teplotě 95°C. Stanovení enzymatické stability se provádělo na základě stanovení uvolněného hydroxyprolinu. Síťovaný a nativní kolagen byly inkubovány společně s kolagenózou. Výsledky ukazují, že i po 96 hodinách inkubace je uvolněno pouze 15% hydroxyprolinu v případě síťovaného kolagenu, přičemž u nezesíťovaného kolagenu je obsah hydroxyprolinu 96% [53].

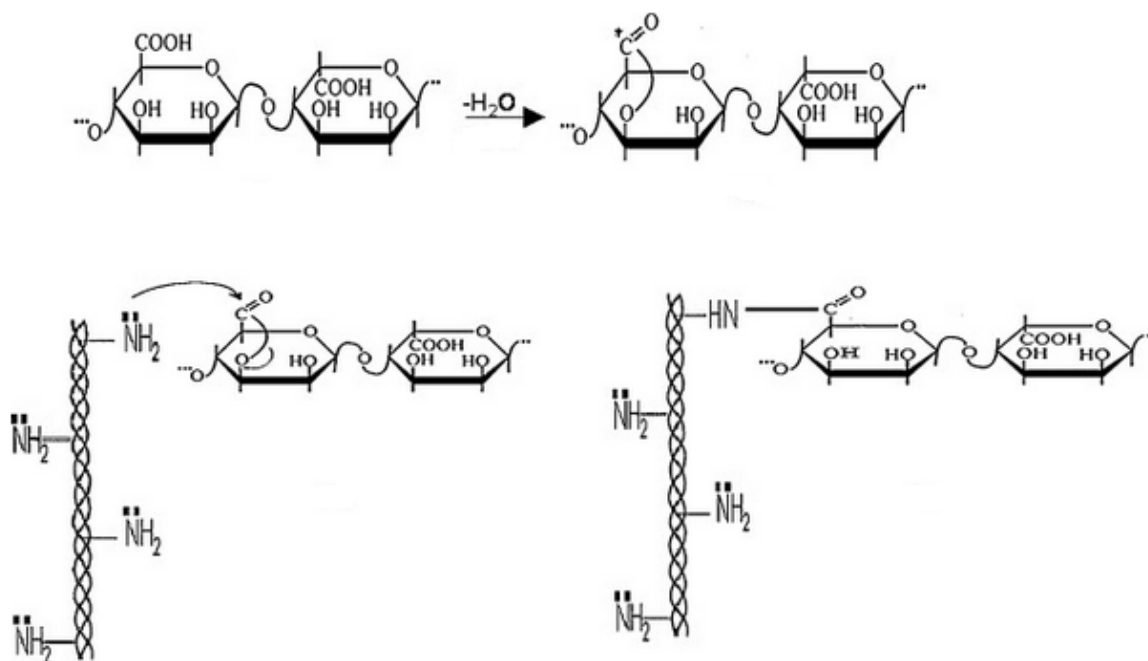
Byla taktéž provedena studie, zda se nejedná o látku mutagenní nebo zda nejsou mutagenní její metabolické produkty. Výchozím materiálem pro experiment byly textilie obsahující 75% THPS, které byly začleněny zvířatům do krmiva. Výsledky studie ukazují, že THPS neprodukoval žádné mutagenní reakce [54].

### 2.1.2 Kyselina alginová

Kyselin alginová (KALG) je lineární aniontový kopolymer složený z jednotek kyseliny  $\beta$ -D-manuronové a  $\alpha$ -L-guluronové vázaných pomocí glykosidické vazby uspořádaných do homopolymerních nebo heteropolymerních bloků. Jedná se o jediný polysacharid, který přirozeně obsahuje karboxylové skupiny. Vyskytuje se jako bílá až žlutavě hnědá látka, vláknitě, zrnitě, granulované či práškové formě nerozpustná ve vodě a organických rozpouštědlech. K rozpouštění dochází pouze v roztocích uhličitanu, hydroxidu a fosforečnanu sodného [10, 11].

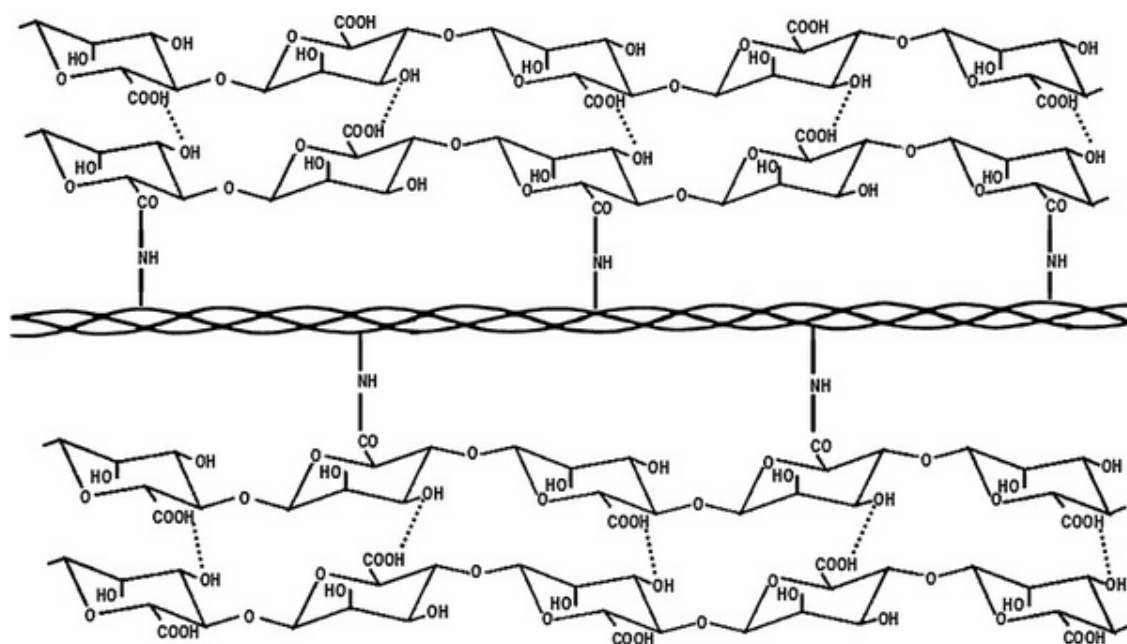
Kyselina alginová představuje hlavní polysacharid z hnědých mořských řas rodu *Phaeopyta*, je látkou netoxickou, nekarcinogenní, biokompatibilní a sterilizovatelnou. Kyselina alginová a její sodné a vápenaté soli se již poměrně dlouho využívají v potravinářském, kosmetickém, farmaceutickém a v mnoha dalších průmyslech [10].

K síťování mezi kolagenem a kyselinou alginovou dochází pomocí kovalentní vazby. Nejprve dochází ke smíchání požadované koncentrace kolagenu s kyselinou alginovou. Reakce se spustí za tvorby esteru a ztráty vody. Vzhledem k tomu, že výsledné laktony jsou biologicky aktivní, jsou schopny interagovat s volnými  $-\text{NH}_2$  skupinami zbytku lysinu v řetězci kolagenu. Reakční schéma je znázorněno na následujícím obrázku 7 [10].



Obrázek 7 – Schéma reakce kolagenu s kyselinou alginovou [10]

Stanovením obsahu volných  $-NH_2$  skupin (spektrofotometricky za použití trinitrobenzen-sulfonové kyseliny – TNBSA) byl zjišťován procentuální stupeň zesítnění. Při použití 1,5% kyseliny alginové byl zjištěn 75% stupeň zesítnění. Dále bylo zjištěno, že dalším zvýšením obsahu kyseliny alginové již nedochází ke zvyšování stupně zesítnění, ale pouze k tvorbě H-vazeb. Tento fakt je zobrazen níže na obrázku 8 [10].

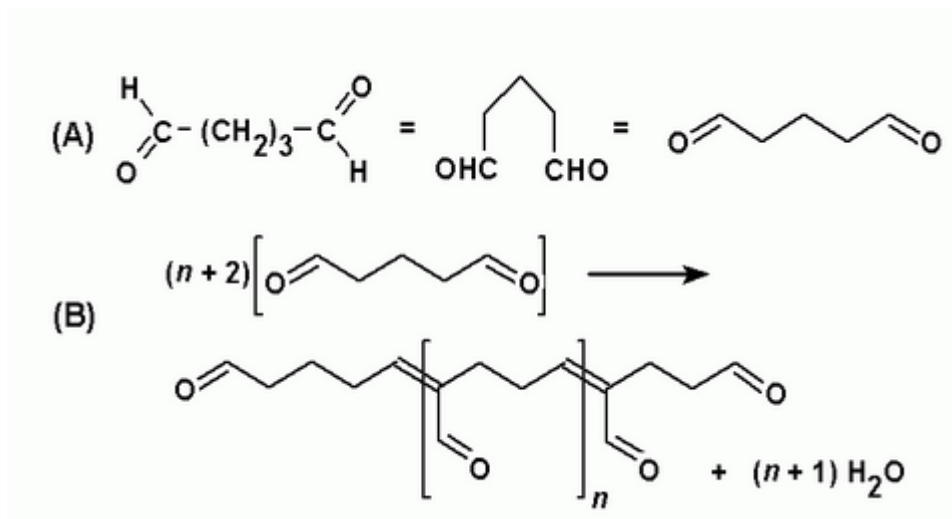


Obrázek 8 – Schéma kolagenu zesíťovaného kyselinou alginovou [10]

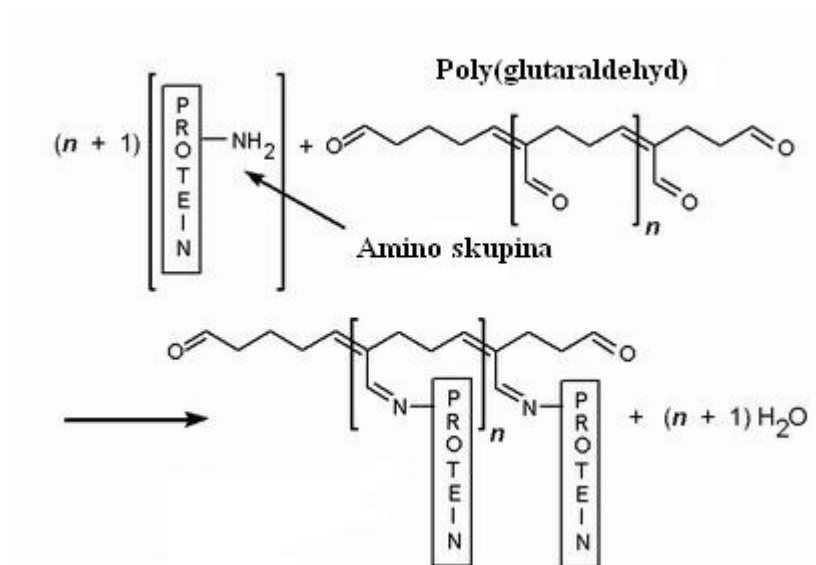
V praxi se využívá i například dialdehyd kyseliny alginové jako náhražka chromu při činění usní. Kožedělný průmysl stále hledá vhodné alternativy pro náhradu chromu při činěním procesu z důvodu možné tvorby šestimocného chromu, který je karcinogenní a poškozuje kůži, sliznici, dýchací cesty a ledviny. Při výrobě usní vzniká velké množství jak pevného, tak i vodného odpadu s obsahem chromu, který narušuje rovnováhu v životním prostředí. V případě dialdehydu kyseliny alginové bylo prokázáno, že je biologicky odbouratelný, toxikologicky neškodný a jde o produkt z obnovitelných přírodních zdrojů. Jedná se o modifikovaný biopolymer kyseliny alginové, který je poměrně levnou surovinou s velkým počtem aldehydových skupin v jedné molekule. Náhrada chromu při činění touto alternativou nám poskytuje usně s dobrými funkčními vlastnostmi bez zbytečného znečištění životního prostředí [11].



skupin na obou stranách molekuly. Mechanismus polymerační reakce GA je znázorněn na obrázku 10. Na obrázku 11 je pak znázorněn mechanismus síťování GA spolu s molekulou proteinu za vzniku Schiffovy báze ( $-\text{N}=\text{CH}-$ ) [7, 9].



Obrázek 10 – A) tři typy molekul monomerního GA, B) polymerační reakce GA [9]



Obrázek 11 – síťovací reakce GA s molekulou proteinu [9]

Jedná se o velmi reaktivní látku, která podléhá heterocyklickým a homocyklickým reakcím za vzniku směsi hydrátů, pyranů a různých polymerů. Komerčně dostupné přípravky GA jsou často zředěné roztoky (přibližně 2,0%). Jedná se o extrémně reaktivní síťovací činidlo proteinů. Je také široce používán v průmyslových, vědeckých a biomedicínských oborech. Používá se také při speciálních aplikacích jako je fixace pro elektronovou mikroskopii a pro přípravu chirurgických štěpů, bioprotéz a dentálních materiálů [9].

Existuje celá řada nevýhod spojených s jeho použitím. Jednou z nevýhod je např. depolymerace příčných vazeb, které byly pozorovány *in vivo*. Tato depolymerace je spojená s uvolňováním toxických látek. V případě výroby bioprotéz bylo zjištěno, že protézy síťované GA mají nežádoucí sklon vápenatět po implantaci do těla. Právě tato kalcifikace je hlavní příčinou poruch implantovaných protéz [5]. K vápenatění dochází v důsledku reakce mezi vápníkem nacházejícím se v lidském těle a aldehydovou skupinou přítomné v molekule glutaraldehydu. Z toho důvodu byla provedena řada studií, které se snažily aldehydové skupiny přednostně obsadit jinými látkami a tím blokovat navázání vápníku [22].

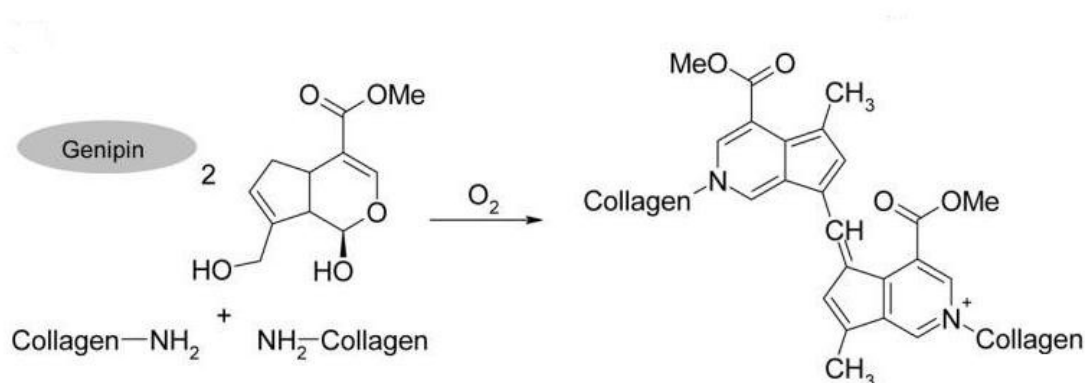
GA je v současné době zařazen jako dermálně dráždivé činidlo při lokální aplikaci na kůži. Při testech na myších způsobil středně těžké až těžké podráždění a/nebo alergickou reakci. Závažné lokální záněty byly pozorovány při použití náplastí s 25% GA na králičí kůži. Podkožní podání 25 nebo 125 mg/kg GA denně potkanům po dobu 35 dnů způsobilo zvýšený počet bílých krvinek, snížení hladiny hemoglobinu a lymfocytů. Přípustný expoziční limit pro glutaraldehyd je 0,8 mg/m<sup>3</sup> (0,2 ppm). Tato koncentrace byla stanovena na základě dráždivých účinků na oči, nos a hrdlo. Tyto účinky jsou spojovány s krátkodobým působením glutaraldehydu [7].

### 2.1.5 Jiné chemické síťující látky

#### Genipin

Genipin s molekulární strukturou C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>, je látka získávána z plodů ovoce gardénie (*Gardenia jasminoides Ellis*). Jedná se o látku bezbarvou, která má tendenci ke spontánním reakcím s aminokyselinami za vzniku modrých pigmentů, které se využívají jako potravinářská barviva. Jedná se o bílý prášek rozpustný v ethanolu, methanolu, acetonu a slabě rozpustný ve vodě. Struktura této látky společně s mechanismem síťující reakce je znázorněna na obrázku 12 níže [21, 23].





Obrázek 12 – Síťovací reakce genipinu s molekulou kolagenu [14]

Používá se jak pro farmaceutické účely, tak jako síťující činidlo. Genipin je látka s daleko nižší toxicitou než běžně používaný glutaraldehyd. Bylo prokázáno, že genipin je schopen dimerizovat v přítomnosti nukleofilů, jako jsou primární aminy a že dvojně vazby mezi uhlíky a přítomné alkoholy jsou nezbytné pro proces síťování. Genipin může být připraven oxidací a následnou redukcí a hydrolýzou nebo enzymatickou hydrolýzou z mateřské sloučeniny. Alternativně lze genipin připravit i syntetickými postupy [23].

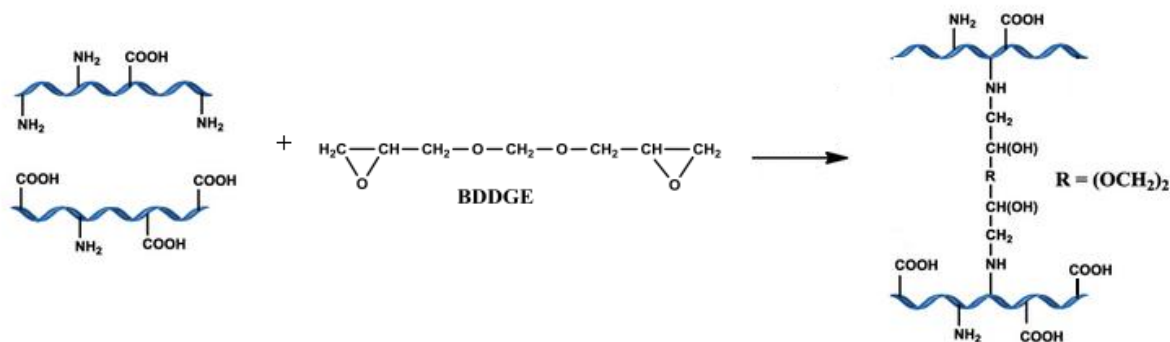
Želatinu lze využít jako biomateriál pro medicínské aplikace, např. jako obvazové materiály nebo jako kostní náhrady. Jelikož se želatina rychle rozpouští ve vodném prostředí a degraduje při tělesné teplotě, je nutné ji síťovat. Jak již bylo zmíněno, nejčastějším používaným síťovacím činidlem je glutaraldehyd. Kvůli jeho cytotoxicitě v důsledku uvolňování formaldehydu při jeho odbourávání byl proveden výzkum za použití přirozeně se vyskytujícího genipinu s nízkou toxicitou. Reakční mechanismus síťování mezi genipinem a želatinou je v současné době stále předmětem výzkumu [24].

Díky své nízké cytotoxicitě a biokompatibilitě byl genipin použit také k síťování kolagenu v odvětví bioprotéz. Bioprotézy síťované glutaraldehydem navíc mají v těle tendenci vápenatět, což značně ovlivňuje životnost implantované bioprotézy. Díky studii bylo zjištěno, že cytotoxicita a zánětlivá reakce kolagenu síťovaného genipinem je výrazně nižší než v případě bioprotéz fixovaných glutaraldehydem a epoxidovými sloučeninami. Dále bylo zjištěno, že obsah vápníku v genipinem fixované tkáni měřený v celém průběhu studie byl minimální. Navíc mechanická pevnost a odolnost vůči enzymatické degradaci je srovnatelná. Výsledky této studie *in vitro* ukazují, že genipin je efektivní síťovací činidlo pro fixaci kolagenních tkání [25, 26].

## Epoxidy

Jako síťovací činidla je možné použít i epoxidové sloučeniny, jako jsou glycerol diglycidyl étery, glycerol triglycidyl étery a ethylenglykol glycidyl étery. Epoxidové sloučeniny mohou díky navázanému kyslíku vytvářet flexibilní spoje reakcí s  $\text{-NH}_2$  skupinami kolagenu, ale taktéž i s jeho  $\text{-COOH}$  a  $\text{-OH}$  skupinami. Reakce s epoxidy probíhá jak v kyselém, tak i v zásaditém prostředí. Síťování je především ovlivněno pH prostředím, koncentrací síťovacího činidla a počtem jeho funkčních skupin. Bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací fixačního činidla a s rostoucím pH prostředí stupeň síťování roste. Je velmi důležité zda se síťování provádí monofunkčními nebo vícefunkčními epoxidy. V případě, že se k síťování použije monofunkční epoxid, tvoří se vazba pouze mezi jednou amino skupinou a jednou epoxydovou skupinou. Za těchto podmínek nedochází k tvorbě můstků a tudíž ani k propojení řetězců bílkovin. Dochází pouze k obsazení  $\text{-NH}_2$  skupin použitým síťovadlem. V takovém případě se hovoří o tzv. maskování. Jestliže reagují alespoň dvě skupiny epoxidu, mohou kromě maskování vznikat můstky, které spojují např. dva řetězce bílkovin, což představuje tzv. pravé síťování [27, 55]. Bylo zjištěno, že kolagen síťovaný epoxidovými sloučeninami vykazuje výbornou pružnost a elasticitu, naproti tomu kolagen fixovaný glutaraldehydem po zesíťování tyto vlastnosti ztrácí. Vysoká pružnost a elasticita jsou žádané především v oblasti bioprotéz. Díky studii bylo jisté, že kolagen síťovaný epoxidovými sloučeninami má vynikající biokompatibilitu a pružnost srovnatelnou s biologickou tkání [27].

Byla provedena studie, kde bylo použito bifunkční epoxidové síťovadlo konkrétně 1,4-butandiol diglycidyl éter (BDDGE). Byl použit k fixaci kolagenu pro náhradu oční rohovky. Síťování tímto síťovadlem probíhalo za bazických podmínek při pH 11. Mechanismus síťování mezi BDDGE a molekulou kolagenu znázorňuje obrázek 13 [28].

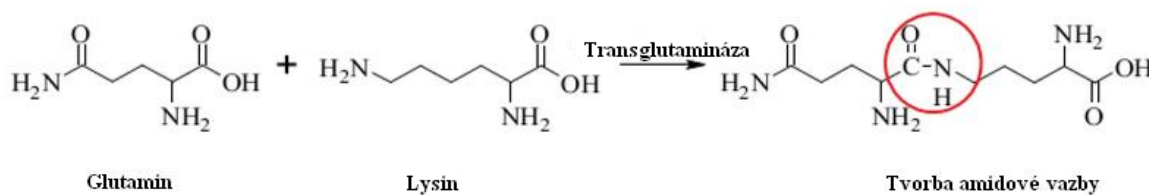


Obrázek 13 – Síťovací reakce mezi BDDGE a molekulou kolagenu [28]

## 2.2 Enzymové síťování kolagenu

K enzymovému síťování se používají enzymy zvané transglutaminázy, které způsobují vznik síťové struktury mezi volnými  $-NH_2$  skupinami v proteinech. Vazby vytvořené pomocí transglutaminázy vykazují vysokou odolnost vůči proteolytické degradaci. Až do konce roku 1980, bylo možné získávat transglutaminázu pouze z živočišných tkání, nejčastěji z jater morčat. Tyto živočišné enzymy jsou široce distribuovány v mnoha tkáních a tělních tekutinách a jsou zapojeny do různých biologických jevů, jako je srážení krve, hojení ran a epidermální keratinizace. Dále jsou údajně zodpovědné za regulaci buněčného růstu, diferenciaci a proliferaci. Tento způsob získávání transglutaminázy byl ale velice složitý a měl za následek velmi vysoké ceny izolovaného enzymu, což bránilo jeho širokému uplatnění. Z toho důvodu se začala používat transglutamináza produkovaná mikroorganismy. První mikrobiální transglutaminázy vyprodukovala bakterie *Streptoverticillium morbaraense*. Potraviny upravené tímto enzymem mají lepší chuť, vzhled a strukturu. Kromě toho, může použitý enzym zvýšit trvanlivost některých potravin a snížit jejich alergicitu. Enzymové síťování je vhodnou volbou v potravinářských aplikacích, kde odpadá nutnost použití chemických síťujících činidel, jak je tomu při síťování chemickém [13, 35, 36].

K síťující reakci dochází přes lysin a glutamin, které se nacházejí v kolagenní struktuře. Síťující schéma popisuje obrázek 14 [42].



Obrázek 14 – Síťování kolagenu transglutaminázou [42]

Byla provedena studie, kde byly sledovány rozdíly mezi chemickým a enzymovým síťováním kolagenu. Ze studie bylo zjištěno, že teplota tání, u folií enzymaticky modifikovaných, nebyla významně ovlivněna v porovnání s nemodifikovaným filmem, ale v případě chemického síťování byla tato teplota výrazně odlišná. Zlepšení mechanických vlastností bylo taktéž pozorováno u chemicky zesíťovaných filmů projevující se zvýšením pevnosti v tahu. U filmů síťovaných transglutaminázou byly zjištěny nižší hodnoty rozpustnosti a protažení v porovnání s filmem nativním [13].

V potravinářství se enzym transglutamináza používá například pro restrukturalizaci syrového masa. Kousky masa jsou smíchány společně s transglutaminázou a kaseinátém. Pomocí tohoto systému lze zhotovit z malých kousků masa velké hovězí či vepřové kusy ale také i rybí filé. Kusy masa, včetně masa mletého, tak mohou být vázány dohromady bez zbytečného přidávání solí (chlorid sodný) a fosfátů, což umožňuje výrobu relativně zdravých masných výrobků. Přídavek transglutaminázy má synergický účinek jako přidání solí a fosfátů. Transglutamináza řeší i řadu problémů v mléčných výrobcích, jako je například separace vody v případě jogurtů při změně teploty a to díky schopnosti zadržovat vodu. Pšeničné těstoviny s obsahem tohoto enzymu mají po procesu vaření zvýšenou pevnost a nedochází k poškození jejich textury [35].

Sítování pomocí enzymů bylo využito i v oblasti výroby jedlých, biologicky rozložitelných filmů. Tyto filmy musejí mít výborné bariérové a mechanické vlastnosti, které poskytují jak fyzickou ochranu potravin, tak snižují ztráty vlhkosti, omezují absorpci kyslíku a migraci lipidů. Díky biologické rozložitelnosti a šetrnosti vůči životnímu prostředí jsou nejvíce používány přírodní polymery, jako jsou sacharidy a proteiny. Právě kvůli jejich špatným bariérovým vlastnostem pro vodní páry a nadměrné rozpustnosti ve vodě je vhodné tyto filmy enzymaticky sítovat [38].

I přes to, že hlavní využití mikrobiální transglutaminázy je v potravinářském odvětví, je možné ji použít i v oblasti biomedicínského inženýrství, materiálových věd, v textilním a kožedělném průmyslu [36].

Tzv. scaffold hraje významnou roli v tkáňovém inženýrství, kde poskytuje strukturu, která je schopná podporovat vznik trojrozměrné tkáně. Výsledný scaffold musí být biokompatibilní, mechanicky odolný a biologicky rozložitelný s řízenou rychlostí odbourávání. Scaffold zhotovený z kolagenu nebo z želatiny je nejčastěji používán pro růst savčích buněk. Jejich hlavní nevýhodou je nízká mechanická pevnost a tudíž je nutné tyto materiály sítovat. Byl použit kolagenní gel, který byl sítován pomocí mikrobiální transglutaminázy. V průběhu sítování došlo k chemické reakci mezi glutaminem a lysinem za tvorby kovalentní amidové vazby, která posílila trojrozměrnou strukturu kolagenního materiálu. Bylo zjištěno, že takto zesíťovaný kolagenní scaffold není toxický pro přítomné buňky a vykazuje podstatně vyšší pevnost v tlaku než scaffold nezesíťovaný. Bylo také zjištěno, že přítomnost transglutaminázy nijak výrazně nepřispívá k růstu tkáně [36, 37].

## 2.3 Fyzikální síťování kolagenu

Řada chemických síťovadel mohou způsobovat vápenatění implantovaných biprotéz nebo působit cytotoxicky v důsledku neúplného odstranění toxických zbytků, aldehydů a dalších metabolitů, což ovlivňuje jejich biokompatibilitu. Dalším možným způsobem síťování je síťování fyzikálními metodami. Mezi fyzikální metody patří např. dehydrotermální síťování, síťování pomocí UV záření a elektronovým paprskem [29].

### 2.3.1 Dehydrotermální síťování

Dehydrotermální síťovací metoda (DHT) je technika ke stabilizaci kolagenu a kolagenních materiálů. Jedná se o fyzikální metodu zahrnující zvýšení teploty kolagenu na teplotu vyšší jak 90°C v prostředí vakua. Zvýšením teploty dojde k odstranění vody z molekul kolagenu, což vede k vytvoření mezimolekulárního zesíťování prostřednictvím kondenzačních reakcí a to buď esterifikací, nebo tvorbou amidů. Dehydrotermální metoda je v porovnání s jinými metodami velmi příznivá, protože nevyžaduje použití cytotoxických činidel. Další výhodou této metody je sterilizace díky použité vysoké teplotě a době expozice [15].

Fyzikální síťování pomocí DHT zvyšuje mechanickou pevnost a biostabilitu ve srovnání s materiály nezesíťovanými. Nicméně, kolagen zesíťovaný DHT metodou vykazuje nižší hustotu zesíťování v porovnání s kolagenem síťovaným chemicky, což má za následek rychlejší degradační procesy a snížení pevnosti [16].

### 2.3.2 Síťování pomocí UV záření

Studie vlivu UV záření na kolagen má široké uplatnění pro aplikace v medicíně, v biomateriálech a podobně. Jelikož UV záření nemůže pronikat do materiálu, je UV záření účinně pouze pro tenké nebo průhledné vrstvy. Bylo zjištěno, že tento typ záření způsobuje zesíťování kolagenních vláken, nicméně způsobuje jak síťovací, tak i degradační účinek. Síťování je iniciováno prostřednictvím tvorby volných radikálů, které se vytváří v reziduálních aromatických aminokyselinách, jako jsou tyrosin a fenylalanin. Omezený počet zmiňovaných aminokyselin v kolagenu určuje maximální míru zesíťování [30, 31].

Je tedy nezbytné dodržovat nízký čas expozice, protože zesíťování proběhne poměrně rychle a poté již nastává degradace kolagenu. V průběhu degradace dochází ke vzniku reaktivních kyslíkatých částic v molekulách vody okolo kolagenu, což následně vede k rozštěpení

peptidové vazby. Tyto degradační procesy lze inhibovat přidávkem lapačů volných radikálů a antioxidantů. Oba vlivy lze ovlivnit změnami podmínek ozařování, jako je způsob přípravy vzorků a dávka ozáření [30].

Byla provedena studie, kde byly testovány mechanické vlastnosti, propustnost pro vodní páry, rozměrová stabilita a povrchová morfologie kolagenních materiálů ozářených UV zářením. Jako materiál byla použita kozí kůže ozářená UV zářením o vlnové délce 312 nm s různou dobou ozáření (0–64 hodin). Bylo zjištěno, že pevnost v tahu vzorků se mírně zvyšuje po dobu ozařování 2–4 hodiny. Při delších časech ozařování (8–64 hodin) pevnost v tahu klesá. V případě propustnosti pro vodní páry, propustnost klesá v případě doby expozice 2–4 hodiny, poté již propustnost roste s dobou expozice. Pomocí SEM bylo zjištěno, že UV záření způsobuje trhliny a ztrátu tonusu kůže. Také dochází ke zmenšování vzorku v důsledku smršťování slabých částí kolagenových fibril [30].

Bylo prokázáno, že síťování pomocí UV záření je mnohdy efektivnějším způsobem než DHT síťování, protože trvá daleko kratší dobu než je tomu u DHT způsobu, který trvá 3–5 dnů. Navíc kolagen síťovaný UV zářením má vyšší enzymatickou rezistenci [31].

### 2.3.3 Síťování svazkem elektronů

Membrány z kolagenu získané ze surové telecí kůže byly ozařovány svazkem elektronů za teplot vyšších, než je teplota tání testovaného kolagenního materiálu v atmosféře dusíku. Vzorky byly ozařovány urychlenými elektrony s energií 1,7 MeV přičemž dávky ozařování byly od 0 do 100 kGy. Účinky záření byly zhodnoceny pomocí IČ a DSC metod, které dokazují vznik intermolekulárních, kovalentních vazeb mezi molekulami kolagenu. Kolagení řetězce se stávají nad teplotou tání flexibilní, podobné struktuře kaučuku a tudíž je zesíťování snadnější než v případě rigidního řetězce. Jelikož reakce probíhala v atmosféře dusíku je předpokladem, že nedochází k významné oxidační reakci. Výsledky studie ukázaly, že s rostoucí dávkou ozáření roste i hustota zesíťování vypočítaná podle vztahu založeném na Flory – Rehnerově teorii [32].

V jiné studii studovali účinek svazku elektronů na tkáň bovinního perikardia. Na vzorky se působilo elektrony s energií 0,55 MeV v dávkách od 12,5 do 25 kGy. Rychlost ozařování byla zvolena 4,67 a 9,34 kGy/s. Ozařování probíhalo jak v přítomnosti, tak i za absence kyslíku. Ozářené vzorky byly analyzovány pomocí DSC, SEM a mírou zbobtnání. Bylo zjištěno, že vzorky ozařované v přítomnosti kyslíku vykazují vyšší míru zbobtnání než

vzorky neozářené. Naproti tomu, vzorky ozářené bez přítomnosti kyslíku vykazují nižší stupeň zbobtnání než kontrolní neozářené vzorky. Bylo tedy prokázáno, že přítomnost kyslíku v průběhu ozařování podporuje štěpení molekuly kolagenu. Naopak v nepřítomnosti kyslíku, za použití stejných parametrů ozáření, je možné konstatovat, že u kolagenní tkáně přednostně probíhá síťovací proces [33].

Nativní kolagen spolu s kolagenem síťovaným glutaraldehydem byly ozářeny svazkem elektronů o energii 14 MeV přičemž dávky ozařování byly od 20 do 100 kGy. Vzorky kolagenu byly ozařovány v suchém i ve vlhkém stavu. Byl studován účinek enzymů, odolnost proti rozpouštění v horké vodě, struktura vláken a analýza aminokyselin. Pomocí elektronového mikroskopu bylo prokázáno, že vlákna ozářena v suchém stavu vykazují vyšší stupeň poškození než vlákna ozářená ve vlhkém stavu. Ozařování způsobilo jak u nativního kolagenu, tak i u kolagenu fixovaného glutaraldehydem vyšší odolnost vůči enzymu kolagenáze. Oby typy vzorků ozářených jak za mokra, tak za sucha štěpil enzym elastáza. Po ozáření vzorků nebyly zaznamenány žádné významné změny ve složení aminokyselin. Rozpustnost vzorků ve zředěných alkáliích, kyselině octové a teplé vodě se po procesu ozáření snížila v případě vzorků ozářených v mokřém stavu, naopak u vzorků ozářených v suchém stavu došlo ke zvýšení rozpustnosti v uvedených roztocích. Ze studie vychází, že ozařování způsobilo síťování pouze u vzorků ve vlhkém stavu. Ozařování vzorků elektronovým svazkem v suchém stavu má za následek štěpení polypeptidových řetězců, naproti tomu v přítomnosti vody dochází k tvorbě mezimolekulárních vazeb. Dále bylo taktéž zjištěno, že ozařování nemá vliv na vazby vznikající během síťování s glutaraldehydem. Vzorky síťované glutaraldehydem však nevykazovaly po ozáření svazkem elektronu výrazně vyšší stupeň zesíťování, než tomu bylo u vzorků z nativního kolagenu [34].

### 3. CHARAKTERIZACE STUPNĚ ZESÍŤOVÁNÍ BÍLKOVINNÉHO SUBSTRÁTU

#### 3.1 Bobtnací testy

Kolagen řadíme z fyzikálně-chemického pohledu ke koloidním soustavám. Základní vlastností takových systémů je schopnost bobtnat. Po ponoření kolagenu do vody dochází k omezenému bobtnání kolagenního vlákna. Během tohoto procesu dochází ke změně objemu, délky a pružnosti vlákna. Část vody vyskytující se v kolagenním vlákne představuje tzv. bobtnací vodu, kterou je možné odstranit pomocí mechanického účinku. Zbylá část vody tvoří složku hydratační, která je koloidně vázaná a odstranitelná pouze sušením. Bobtnání lze z hlediska mechanismu dělit na bobtnání osmotické a lyotropní [4].

#### 3.2 Hydrotermální stabilita

V případě, že dochází k zahřívání kolagenu ve vodě, dochází ke zkrácení kolenních vláken asi o 1/3 ve směru osy. Tato termická reakce je charakterizována teplotou smrštění ( $T_s$ ). Tato teplota je o 5 až 15°C nižší než teplota fázové přeměny. Příčinou tohoto smrštění je štěpení intermolekulárních příčných vazeb a taktéž vazeb intramolekulárních v případě denaturace kolagenu. Tyto vazby drží trojitě spirály v nativním kolagenovém vlákne v nataženém stavu. Teplota smrštění je považována za tání kolagenu v krystalických oblastech. Pomocí síťování kolagenu dochází k výraznému zvýšení teploty smrštění [1, 4].

Jednou z metod pro stanovení teploty smrštění je mikroskopická metoda, pro kterou stačí minimální množství materiálu. Smrštění vzorku se pozoruje pod mikroskopem, který je umístěn na vyhřívaném stolku, jehož teplotu lze postupně zvyšovat. Sledována vlákna jsou zahřívána až do teploty, při které alespoň dvě vlákna souběžně začnou vykazovat smršťování [56]. Teplota smrštění do teploty 100°C v případě usní se stanovuje dle technické normy ČSN EN ISO 3380 (793841) [57].

#### 3.3 Diferenční snímací kalorimetrie

Diferenční snímací kalorimetrie (DSC) je termická analýza, při které se zkoumaný vzorek lineárně ohřívá nebo chladí a současně se plynule mění rychlost tepelného toku uvnitř vzorku. Rychlost tepelného toku je úměrná okamžitému měrnému teplu. Tato metoda slou-



ží ke stanovení charakteristických teplot, jako jsou teplota skelného přechodu, teplota tání atd. Sleduje se tepelný tok mezi měřeným a referenčním vzorkem podle předem naprogramovaného teplotního režimu. Zkoumaný a referenční vzorek je vyhříván stejnou rychlostí a to takovým způsobem, aby mezi nimi nebyl žádný teplotní rozdíl. Zda-li dojde ke zvýšení nebo ke snížení tepelné kapacity analyzovaného vzorku, dojde ke zvýšení nebo ke snížení množství dodávaného tepla do zkoumaného vzorku. Každému fázovému přechodu, ke kterému u vzorku dojde, odpovídají charakteristické změny v záznamu DSC analýzy [48]. Pomocí DSC můžeme stanovit teplotu rozkladu čistého kolagenu a zjistit, jak se tato teplota změní, v případě kolagenu síťovaného. Dále můžeme detekovat i hmotnostní úbytky, ke kterým dochází v průběhu ohřívání. Sinkowski pomocí DSC zjistil, že teplota rozkladu síťovaného kolagenu se výrazně zvýšila v porovnání s kolagenem nesíťovaným. Taktéž byla zaznamenána i změna v úbytku hmotnosti, která v případě síťovaného kolagenu byla výrazně nižší než v případě nativního kolagenu [43].

### 3.4 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil (AFM) je technika sloužící k pozorování povrchů různých objektů. Základem této metody je ostrý hrot upevněný na ohebném nosníku. Režimy snímání povrchu jsou dvojího typu. V případě kontaktního snímání je hrot vtlačován do vzorku a následkem působících sil je nosník ohýbán. Jeli povrch zkoumaného vzorku nerovný, má nosník v různých místech vzorku různou velikost ohnutí. Sledováním závislosti ohnutí na poloze vzorku můžeme sestavit zvětšený obraz povrchu. Při nekontaktním režimu se hrot pohybuje v určité vzdálenosti nad vzorkem, kde působí přitažlivé síly. V případě tohoto režimu se sledují změny amplitudy oscilací při interakci hrot – povrch. Hrot a vzorek na sebe působí prostřednictvím Van der Waalsových a elektrostatických sil. Jelikož jsou tyto síly velmi malé, je nosník rozkmitán a místo jeho ohnutí se měří velikost amplitudy [49].

Pomocí mikroskopie atomárních sil můžeme detekovat rozdíly v morfologii povrchu síťovaných a nesíťovaných kolagenních materiálů. Bylo zjištěno, že nesíťované filmy vykazují daleko vyšší drsnost povrchu než filmy chemicky síťované [43].

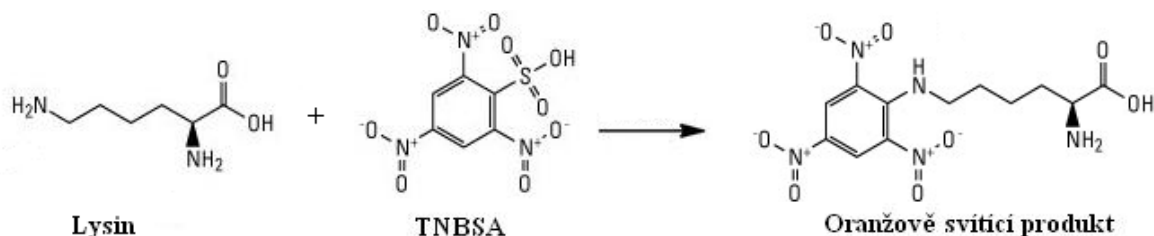
### 3.5 Infračervená spektroskopie

Infračervená (IČ) spektroskopie je analytická metoda, která nám poskytuje informace o složení vzorku, který není analýzou žádným způsobem poškozen. IČ záření je elektromag-

netické záření v rozsahu vlnočtů  $12500\text{--}20\text{ cm}^{-1}$ , což značí, že IČ záření se nachází mezi zářeními mikrovlnným a viditelným. Pro identifikaci a určování chemické struktury má největší význam oblast od  $4000\text{ do }200\text{ cm}^{-1}$ . Podstatou IČ spektroskopie je absorpce IČ záření při průchodu vzorkem, přičemž dochází ke změně rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Výsledkem měření je infračervené spektrum, které je grafickým zobrazením funkční závislosti energie, zpravidla vyjádřené v procentech transmitance na vlnové délce dopadajícího záření. Transmitance neboli propustnost je dána poměrem intenzity záření, které prošlo vzorkem, k intenzitě záření, které vychází ze zdroje [44]. Pomocí infračervené spektroskopie můžeme zjistit změny v chemickém složení u zesíťovaného kolagenu v porovnání s kolagenem nativním. Ve spektru síťovaného kolagenu může být například zaznamenána vyšší intenzita píků znázorňující amidovou vazbu v porovnání se spektrem nezesíťovaného kolagenu [43].

### 3.6 Stanovení volných aminokyselin

Tato metoda nám umožňuje stanovit  $\varepsilon$ -aminoskupiny pomocí spektrofotometrických metod. Dochází k chemické modifikaci aminokyselinových zbytků pomocí kyseliny trinitrobenzensulfonové (TNBSA), přičemž reakce silně závisí na pH a vyžaduje poměrně dlouhý reakční čas. Výstupem jsou informace například o počtu některých aminokyselin v polypeptidickém řetězci, o stabilizaci proteinů a také o vazebných a aktivních místech v řetězci. Absorbance vzniklého produktu se pak měří při vlnové délce 345 nm. Díky možnosti stanovení počtu volných primárních aminoskupin, můžeme stanovit stupeň zesíťování daných materiálů. Schéma znázorňující vazbu mezi TNBSA a aminokyselinovým zbytkem znázorňuje obrázek 15 [45, 46].



Obrázek 15 – Schéma vazby mezi lysinovým zbytkem s TNBSA [47]

## 4. ZHODNOCENÍ LITERÁRNÍ STUDIE A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Na základě literární studie bylo zjištěno, že existuje celá řada způsobů, jimiž lze síťovat kolagenní materiály. V současné době, však stále převládá chemické síťování pomocí glutaraldehydu, které poskytuje velmi kvalitně zesíťované kolagenní matrice. Díky jeho toxicitě existuje celá řada studií zabývajících se hledáním jiného vhodného síťující činidla, které poskytne kolagen s lepšími nebo alespoň se srovnatelnými materiálovými vlastnostmi. Pro potřeby diplomové práce byla zvolena a) kyselina alginová, která byla dávkovaná společně s nižší dávkou glutaraldehydu; b) tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfát. Tato síťovadla jsou biologicky rozložitelná a toxikologicky neškodná.

Cílem diplomové práce je otestovat účinek kyseliny alginové v kombinaci s glutaraldehydem a síťující účinek samotného THPS k síťování kolagenního gelu.

Díličí cíle praktické části diplomové práce:

1. Síťování kolagenu (ve formě kolagenního gelu) kombinací kyseliny alginové a glutaraldehydu. Sledovat vliv vybraných technologických proměnných při síťování (množství kyseliny alginové, množství glutaraldehydu a doba zrání gelu) na vlastnosti připravených filmů. Studovat síťující reakce, provést bobtnací a mechanické testy a stanovit teplotu smrštění.
2. Síťování kolagenu (ve formě kolagenního gelu) tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfátem. Sledovat vliv vybraných technologických proměnných při síťování (pH kolagenního gelu, množství THPS a doba zrání gelu) na vlastnosti připravených filmů. Studovat síťující reakce, provést bobtnací a mechanické testy a stanovit teplotu smrštění.
3. Vyhodnotit síťující účinky kyseliny alginové v kombinaci s glutaraldehydem a samotného THPS a stanovit optimální podmínky síťování kolagenního gelu.

## II. PRAKTICKÁ ČÁST

## 5. SÍŤOVÁNÍ FILMŮ

### 5.1 Použité materiály, chemikálie a zařízení

K experimentům byl použit silně **viskózní kolagenní gel** připravený ze škály hovězího dobytka (dodavatel: VUP Medical, Brno). Bílkovinný gel byl skladován v ledničce při teplotě  $6\pm 1^\circ\text{C}$ . Charakteristika: 7,0% obsah sušiny, obsah kolagenních bílkovin 82,0%, obsah popelovin 1,0%.

Použitá zařízení byly předvážky KERN 440–47 (Německo), analytické váhy KERN 770–60 (Německo), sušárna Memmert ULP 400 (Německo), sušárna Binder E28–TB1 (Německo), Sattelite FTIR (Mattson, USA), magnetické míchadlo s ohřevem IKA–RCT (Německo), kontaktní teploměr IKA–ETS–D4 (Německo), hřídelové míchadlo UNIMED, topná deska s magnetickým míchadlem (Německo), teplotní čidlo OE 14619, pH metr WTW pH 526 (Německo), mikrometr SOMET (ČR), lednička Samsung Calex, laboratorní sklo a pomůcky, PE folie, PE sáčky, PMMA desky a ocelový válec.

Mezi chemikálie, které byly použity, patří kyselina alginová (KALG) od firmy Carl ROTH (CAS: 9005-38-3); 25% roztok tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfátu (THPS) dodaný firmou Sigma-Aldrich (CAS:55566-30-8,  $M_r = 406,28$  g/mol); 25% roztok glutaraldehydu (GA) od firmy Sigma-Aldrich (CAS: 111-30-8,  $M_r = 100,12$  g/mol); 3% roztok dodekahydrátu fosforečnanu sodného ( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ); 0,5% roztok hydroxidu sodného (NaOH) a destilovaná voda.

### 5.2 Organizování experimentů

Řada výzkumných prací je založena na experimentech, jejichž úkolem je zpravidla stanovit, který z vlivů významně působí na výsledek a jakým způsobem tyto vlivy výsledek experimentu ovlivňují. Zpravidla se při provádění experimentu postupuje tak, že se na základě určitých teoretických předpokladů nebo na základě předcházejících zkušeností určí z velkého množství vlivů pouze ty vlivy, které daný výsledek ovlivňují nejpodstatněji. V praxi je často takových vlivů více a při jejich výzkumu se většinou postupuje tak, že se mění pouze jeden vliv, přičemž ostatní vlivy zůstávají konstantní. Takovým způsobem lze zjistit, jak působí první vliv na výsledek pokusu. Dalším krokem je, že se mění další vlivy, přičemž ostatní zůstávají opět nezměněné. A tak se pokračuje až do chvíle, kdy jsou pro-

zkoumány všechny námi vybrané vlivy. Hlavní nevýhodou tohoto způsobu je, že při stejných podmínkách budou výsledky experimentů při jejich opakování kolísat v určitých mezích a zda bude tato variabilita značná, bude se tím spolehlivost našich závěrů snižovat. Pro zvýšení spolehlivosti našich výsledků je tedy nutné, pokusy několikrát opakovat při naprosto stejných podmínkách, čímž ale vzrostou náklady, které na experimenty vynaložíme a čas, který na ně spotřebujeme. Takto uspořádané experimenty se označují jako klasické uspořádání pokusu [39].

Z toho důvodu byla pro potřeby diplomové práce vybrána metoda faktorových experimentů. Podstata této metody spočívá v tom, že se současně sleduje více vlivů, působících na výsledek experimentu a provádějí se pokusy pro všechny kombinace vybraných vlivů. Tato metoda nám umožňuje hodnotit nejen jednotlivé vlivy, které na výsledek experimentu působí, ale také jak rozdílně ovlivní výsledek pokusu různé kombinace zkoumaných vlivů, což u klasického uspořádání pokusu není možné. Počet pokusů se odvíjí od počtu vstupních proměnných a hodnotách bodů těchto proměnných. Vliv, o kterém víme nebo předpokládáme, že má na výsledek experimentu určitý účinek, se nazývá faktor. Nejčastěji používanými plány experimentu jsou typu  $N^P$ , kde N je počet úrovní faktorů a P je počet faktorů. Pro náš experiment byl zvolen experiment typu  $2^3$  (2 úrovně, 3 studované faktory) [39, 40].

### 5.3 Postup práce síťování kolagenu

Z kolagenního gelu byly připraveny dvě série filmů, z nichž jedna série byla síťovaná kombinací kyseliny alginové a glutaraldehydu a druhé série pomocí THPS. Experimenty síťování kolagenu v obou dvou případech byly typu  $2^3$ , s centrálním experimentem. U připravených filmů byl následně hodnocen stupeň zesíťování pomocí uvedených metod.

#### 5.3.1 Síťování kombinací kyseliny alginové a glutaraldehydu

Jednotlivé kolagenní filmy byly síťovány na základě těchto proměnných:

- Faktor A: množství síťovadla KALG (dolní limit: 1,0%; střední limit: 3,0%; horní limit: 5,0 %; vztaženo na kolagenní sušinu ve hmotě)
- Faktor B: množství síťovadla GA (dolní limit: 0,4%; střední limit: 1,0%; horní limit: 1,6 %; vztaženo na kolagenní sušinu ve hmotě)

- Faktor C: doba zrání kolagenního gelu (dolní limit: bez zrání; střední limit: 4 hodiny; horní limit: 8 hodin)

Bylo odebráno  $50 \pm 0,1$  g kolagenního gelu z lednice. Navážená hmota byla vyválena do 3 mm tenké vrstvy, na kterou se rovnoměrně rozlilo odvážené množství roztoku KALG podle faktoru A (tj. 1,0; 3,0 nebo 5,0%). Roztok KALG byl připraven smícháním odpovídajícího množství KALG s 2,5 ml 3% roztoku  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Po přidání roztoku KALG na kolagenní hmotu, se okamžitě začalo ručně míchat, aby se roztok síťovadla rovnoměrně vetřel do kolagenní hmoty. Míchání probíhalo cca 7–10 minut. Kolagenní gel byl po zamíchání vytvarován do kuličky, hermeticky uzavřena do PE sáčku a uložen do lednice (při  $6 \pm 1^\circ\text{C}$ ) po dobu 24 hodin. Během této doby docházelo k prvnímu stupni zrání. Po prvním zrání byla hmota vyjmuta z lednice a opět vytvarována do tenké vrstvy. Byl přidán roztok GA v množství podle faktoru B (tj. 0,4; 1,0 nebo 1,6%) a opět bylo ručně míchalo po dobu 7–10 minut tak, aby se roztok síťovadla dokonale vetřel do kolagenní hmoty. Roztok GA byl připraven smícháním odpovídajícího množství GA s 2,5 ml destilované vody. Gel po promíchání se opět vytvaroval do kuličky, hermeticky uzavřel do PE sáčku a uložil do lednice (při  $6 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Druhý stupeň zrání byl dán podle faktoru C (tj. bez zrání; 4 nebo 8 hodin). Po druhém stupni zrání následovala samotná příprava filmu. Na připravených destičkách byl rozprostřen připravený kolagenní gel, který se následně přikryl z horní strany PE sáčkem. Poté pomocí ocelového válečku došlo k vyválení filmu na požadovanou tloušťku. Takto připravený film byl následně sušen v regulovatelné sušárně při zapnutém ventilátoru (na 100%) ve třech stupních. V prvním stupni byla destička s filmem vložena do předem vyhřáté sušárny na teplotu  $40^\circ\text{C}$  a při této teplotě byl film sušen po dobu 12 minut. Po uplynutí stanovené doby následoval druhý stupeň sušení. V sušárně byla zvýšena teplota na  $60^\circ\text{C}$  a po dosažení této teploty ( $d_t/d\tau = 5'40''$ ) bylo sušeno 12 minut. Ve třetím stupni se teplota v sušárně zvýšila na teplotu  $80^\circ\text{C}$  a po dosažení této teploty ( $d_t/d\tau = 5'55''$ ) se sušilo opět 12 minut.

Vysušený film se sejmul z destičky, byl vyfocen a byla změřena jeho tloušťka. Nakonec byl film uzavřen do PE sáčku a uchováván při pokojové teplotě k hodnocení stupně zesíťování filmu.

*Poznámka:*

Filmy s maximálním a se středním přídatkem KALG byly hůře zpracovatelné v porovnání s ostatními filmy, kde byl přídatek KALG minimální. Jednalo se o filmy č. 5, 6, 7 a 8, které obsahovaly 5,0% KALG a film č. 9 s obsahem 3,0% KALG. Po rozliti roztoku na hmotu a následném promíchávání roztoku do kolagenní hmoty se ve zpracovávané hmotě tvořily bílé shluky. Hmota nebyla kompaktní a celistvá jak v ostatních případech s menším množstvím KALG. Hmota obsahovala hrudky, které ovlivňovaly následující válcování hmoty na destičky. Hmota se trhala a bylo zapotřebí více síly a času, aby hmota pojmula připravený roztok KALG. Hmota po zamíchání byla na omak kluzká a zhrudkovatělá.

**5.3.2 Sít'ování tetrakis hydromethyl fosfonium sulfátem**

Jednotlivé kolagenní filmy byly sít'ovány na základě těchto proměnných:

- Faktor A: pH kolagenní hmoty (dolní limit: 2,5; střední limit: 2,9; horní limit: 3,3)
- Faktor B: množství THPS (dolní limit: 0,4%; střední limit: 1,0%; horní limit: 1,6%; vztaženo na kolagenní sušinu ve hmotě)
- Faktor C: doba zrání kolagenního gelu (dolní limit: bez zrání; střední limit: 4 dny; horní limit: 8 dnů)

Bylo odebráno  $50 \pm 0,1$  g kolagenního gelu z lednice. Navážená hmota byla vyválena do 3 mm tenké vrstvy, na kterou se rovnoměrně rozlilo dané množství 0,5% roztoku NaOH pro úpravu pH podle faktoru A, přičemž při pH 2,5 byl ponechán gel bez úpravy, při pH 2,9 byly přidány 3,0 ml 0,5% NaOH a při pH 3,3 bylo přidáno 5,0 ml NaOH. Po přidání roztoku NaOH na kolagenní hmotu, se okamžitě začalo ručně míchat, aby se alkalický roztok rovnoměrně vetřel do kolagenní hmoty. Míchání probíhalo cca 7–10 minut. Kolagenní gel byl po zamíchání vytvarován do kuličky, hermeticky uzavřen do PE sáčku a uložen do lednice (při  $6 \pm 1^\circ\text{C}$ ) po dobu 24 hodin. Po uplynutí stanovené doby byl gel vyjmut z lednice a opět vytvarován do tenké vrstvy. Byl přidán roztok THPS v množství podle faktoru B (tj. 0,4; 1,0 nebo 1,6%) a opět se ručně míchalo po dobu 7–10 minut tak, aby se roztok sít'oval dokonale vetřel do kolagenní hmoty. Roztok THPS byl připraven smícháním odpovídajícího množství THPS s 2 ml destilované vody. Gel po promíchání byl opět vytvarován do kuličky, hermeticky uzavřen do PE sáčku a uložen do lednice (při  $6 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Stupeň zrání byl dán podle faktoru C (tj. bez zrání; 4 nebo 8 dnů). Po zrání následovala samotná příprava



filmu. Na připravených destičkách byl rozprostřen připravený kolagenní gel, který se následně přikryl z horní strany PE sáčkem. Poté pomocí ocelového válečku došlo k vyválnění filmu na požadovanou tloušťku. Takto připravený film byl následně sušen v regulovatelné sušárně při zapnutém ventilátoru (na 100%) ve třech stupních. V prvním stupni byla destička s filmem vložena do předem vyhřáté sušárny na teplotu 40°C a při této teplotě byl film sušen po dobu 12 minut. Po uplynutí stanovené doby následoval druhý stupeň sušení. V sušárně byla zvýšena teplota na 60°C a po dosažení této teploty ( $dt/d\tau = 5'40''$ ) bylo sušeno 12 minut. Ve třetím stupni se teplota v sušárně zvýšila na teplotu 80°C a po dosažení této teploty ( $dt/d\tau = 5'55''$ ) se sušilo opět 12 minut.

Vysušený film se sejmul z destičky, byl vyfocen a byla změřena jeho tloušťka. Nakonec byl film uzavřen do PE sáčku a uchováván při pokojové teplotě k hodnocení stupně zesíťování filmu.

*Poznámka:*

V případě filmů č. 6 a 8 byla hmota po 3 denním zrání, po vyjmutí z lednice velmi ztuhlá a obtížně zpracovatelná. Při manipulaci se hmota trhala a nebyla stejné konzistence jako v ostatních případech. Kolagenní hmota připravená pro film č. 8 se velmi obtížně válcovala na připravené destičky. Během válcování se tvořily trhliny, které následně ovlivnily kvalitu zhotoveného filmu. V případě hmot pro film č. 6 a 9 byly hmoty opět velice ztuhlé, ale v průběhu válcování se již trhliny neobjevovaly. V případě hmot pro film č. 2 a 4 byly hmoty po 3 denním zrání méně ztuhlé v porovnání s předešlými případy. Po důkladném míchání a hnětení se po krátké době hmoty vrátily zpět do své původní lepkavé konzistence a staly se opět dobře zpracovatelné. Na základě zjištěných informací lze soudit, že na strukturu a zpracovatelnost hmoty má vliv jak množství THPS, tak i přídavek NaOH pro úpravu pH a doba zrání. Naproti tomu hmota připravená pro film č. 7, kde bylo pH kolagenní gelu a množství THPS totožné jako u filmu č. 8, které se lišily pouze dobou zrání, byla zpracovatelnost hmoty v pořádku. V průběhu válcování nedocházelo k tvorbě trhlín.

Aby bylo možné připravené filmy pro experiment hodnotit, byl pro srovnání zhotoven i film bez síťovadla a film síťovaný 2,0% GA, což je koncentrace literaturou nejčastěji používaná.

## 5.4 Metody k hodnocení účinku síťování

### Stanovení teploty smršťení

Stanovení teploty smršťení bylo provedeno principiálně podle normy ČSN EN ISO 3380 (793841) s určitými modifikacemi. Ke sledování  $T_s$  byla sestavena jednoduchá aparatura skládající se z topné desky, kádinky a kalibrované zkumavky naplněné destilovanou vodou a závěsu pro vzorek. Míchání kapaliny v kádince bylo zajišťováno malým hřidelovým máchadlem. Z filmu bylo vystřiženo tělísko a rozměrech 50x6mm a na obou stranách 5mm od konců byly vytvořeny otvory pro zavěšení tělíska na háček a uchycení závažíčka. Tělíska bylo uchyceno na háček s celkovým přepětím 1,2 g. Sestava byla uchycena do aparatury na vodní lázni při pokojové teplotě tak, aby tělísko bylo zcela ponořené v kapalině zkumavky a ponecháno 4 minuty bez zahřívání. Poté byla zapnuta vodní lázeň a zahříváno se od pokojové teploty rychlostí 3,3–4,2 °C/min. Sledovalo se, zda dochází k protažení tělíska a měřilo se o kolik. Poté byla sledována teplota, při které se začal vzorek smršťovat. Jako teplota smršťení byla zaznamenána teplota, při níž se tělísko smršťilo o 0,5–1 mm své délky. Každé stanovení teploty smršťení jak v podélném, tak i v příčném směru bylo provedeno 2x. Výsledky jsou prezentovány jako aritmetický průměr.

### Bobtnací zkoušky

Vzorek filmu o rozměrech 20x20 mm byl zvážen na analytických vahách, vložen do vytemperované vodní lázně při dvou vybraných teplotách (26°C a 80°C) a inkubován po dobu 1 hodiny. V průběhu inkubace se vzorek 5x vytáhl, položil na malé sítko a nechal 1 minutu okapat. Po osušení byla zvážena hmotnost vzorku a přeměřeny jeho rozměry. Bobtnací zkouškou byl u vzorku zjišťován jeho stupeň zbobtnání a změna plochy.

Stupeň zbobtnání (SZ) byl vyjádřen jako násobek přírůstku hmotnosti vzorku podle následujícího vzorce:

$$SZ = \frac{m_n}{m_s} \text{ (násobek)} \quad (1)$$

kde:  $m_n$  je hmotnost nabobtnalého vzorku (g) a  $m_s$  je hmotnost suchého vzorku (g)

Změny plochy vzorku ( $\Delta S$ ) byla vypočítána dle vzorce:

$$\Delta S = \left( \frac{P_N}{P_S} \cdot 100 \right) - 100 (\%) \quad (2)$$

kde:  $P_N$  je plocha nabobtnalého vzorku ( $\text{mm}^2$ ) a  $P_S$  plocha suchého vzorku ( $\text{mm}^2$ )

### FTIR

IČ spektra jednotlivých filmů byla měřena pomocí spektrometru Satellite řady Genesis dodaný firmou ATI Mattson. Detektor byl použit standardní pyroelektrický s tantaličnanem lithným pracující při pokojové teplotě. Laser byl helium–neonový. Pro měření spekter filmů byl použit horizontální ATR nástavec s držákem instalovaný do prostoru pro vzorek. V případě měření kapalin byla použita prizmatická cela pro kapaliny. Rozlišení přístroje bylo zvoleno 4.0. Frekvenční rozsah byl v rozmezí od 600 do 4000  $\text{cm}^{-1}$  a počet scanů 64. Pro vyhodnocení naměřených hodnot byl použit software WinFirst. Před každým měřením bylo změřeno tzv. pozadí, jehož naměřené hodnoty se pomocí softwaru odečítaly od hodnot naměřených u vzorků filmů, aby vzdušná vlhkost nezkreslovala IČ spektra měřených filmů.

### Mechanické testy

Z mechanických vlastností se u filmů stanovovala tahová síla při přetržení a poměrné prodloužení při přetržení. Používal se zkušební stroj Instron Mini 55. Metodika testování byla převzata ze zkušebních předpisů podnikových laboratoří koželužen TOMA Otrokovice (dr. Vaculík, 1993). Z filmů se vystřihly zkušební tělesa 140x15 mm, která se upnula do čelistí stroje (vzdálenost čelistí 50 mm). Rychlost posunu čelistí 50 mm/min. Každé stanovení bylo provedeno 3x. Výsledky jsou prezentovány jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou.

### Stanovení obsahu sušiny

Pro stanovení obsahu sušiny byla použita tzv. gravimetrická metoda. Princip této metody spočívá v tom, že se do předem vysušených a zvážených misek naváží cca 0,2 g filmu. Následně je miska spolu se vzorkem vložena do sušárny při teplotě  $103 \pm 1^\circ\text{C}$  po dobu 24 hodin do konstantní hmotnosti. Obsah sušiny  $S^*$  je pak vypočítán dle vzorce:

$$S^* = \frac{m_1 - m_2}{m_3} \cdot 100 (\%) \quad (3)$$

kde:  $m_1$  je hmotnost misky se vzorkem po vysušení (g),  $m_2$  představuje hmotnost prázdné misky (g) a  $m_3$  značí hmotnost vzorku (g)

## 6. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Filmy síťované kombinací kyseliny alginové a glutaraldehydu

Tabulka 1 – Naměřené výsledky u filmů síťovaných kombinací KALG+GA

Film č.	Faktor A množství KALG (%)	Faktor B množství GA (%)	Faktor C doba zrání kolagenního gelu (hodiny)	Obsah sušiny (%)	Tloušťka filmu (mm) ±0,005	Ts (°C)		Mechanické zkoušky		
						Podélný směr	Příčný směr	F (N)	$\sigma$ (-)	$\varepsilon$ (%)
1	1,0	0,4	0	89,3	0,064	47,5	47,8	1,9	16	107,2
2	1,0	0,4	8	87,2	0,056	47,9	48,2	2,4	10,7	115,3
3	1,0	1,6	0	89,1	0,052	48,4	48,6	4,6	19,4	122,8
4	1,0	1,6	8	87,4	0,052	50,0	50,3	3,6	19,8	138,7
5	5,0	0,4	0	87,7	0,055	47,9	48,2	1,3	14,0	101,4
6	5,0	0,4	8	88,5	0,054	49,9	50,5	1,4	6,8	99,3
7	5,0	1,6	0	89,6	0,064	49,6	50,1	5,1	19,7	103,4
8	5,0	1,6	8	88,1	0,065	50,6	50,8	2,6	17,0	111,6
9	3,0	1,0	4	87,2	0,054	48,8	49,0	2,1	25,7	126,4
<b>Údaje ke srovnání</b>										
Film bez síťovadla				86,2	0,065	47,1	48,0	0,5	21,3	98,5
Film s 2,0 % GA				90,1	0,050	52,1	52,2	5,3	13,3	146,0
F – tahová síla při přetržení; $\sigma$ – směrodatná odchylka tahové síly při přetržení; $\varepsilon$ – poměrné prodloužení při přetržení										

Z tabulky 1 je zřejmé, že obsah sušiny se u filmů síťovaných pomocí kyseliny alginové a glutaraldehydu pohybuje v rozmezí od 87,2 do 89,6%. Tloušťka filmů se pohybovala v úzkém rozsahu od 0,052 do 0,064 mm.

V tabulce jsou taktéž zaznamenány i naměřené hodnoty tahové síly potřebné pro přetržení daných vzorků společně se směrodatnou odchylkou a jejich poměrné prodloužení při přetržení. Je patrné, že u všech zesíťovaných filmů byla naměřena vyšší tahová síla a vyšší poměrné prodloužení než u filmu bez síťovadla. V porovnání s filmem síťovaným 2,0% GA nebyla naměřena vyšší tahová síla a poměrné prodloužení u žádného ze zhotovených filmů.

Z tabulky je patrné, že všechny zhotovené filmy mají vyšší teplotu smršťení než film bez síťovadla. Nejlepší hodnoty teploty smršťení byly naměřeny v případě filmu č. 8, kde byla naměřena teplota smršťení 50,6 °C ve směru podélném a 50,8°C ve směru příčném. Velmi dobré výsledky byly zjištěny i u filmů č. 4, 6 a 7. Vyšší hodnoty teploty smršťení v porovnání s filmem s 2,0% GA nebyly naměřeny u žádného ze zhotovených filmů.

V průběhu měření teplot smršťení docházelo u daných vzorků k určitým změnám, jako je prodloužení nebo smršťování vzorků. Zjištěné změny jsou uvedeny v tabulce 2 níže. Je zjevné, že u všech zhotovených filmů během prvních 4 minut měření při pokojové teplotě docházelo k prodloužení a to jak ve směru podélném tak i ve směru příčném. Od počátku zahřívání do teploty smršťení již k prodlužování vzorků nedocházelo s výjimkou filmu č. 5, u kterého bylo zaznamenáno mírné prodloužení. Z tabulky je taktéž patrné, že v podélném směru se filmy smršťovaly výrazněji než ve směru příčném. Smršťování probíhalo v příčném směru pomaleji než smršťování ve směru podélném. Teplota, při které bylo ukončeno smršťování, byla zpravidla kolem 75°C, poté již u vzorků nedocházelo k žádným změnám.

Naměřené hodnoty teplot smršťení jak v podélném, tak i v příčném směru byly vyhodnoceny ve statistickém programu. Stejným způsobem byly vyhodnoceny i hodnoty tahové síly a poměrného prodloužení při přetržení. Výpočty probíhaly ve statistickém programu Minitab 17 s 95% úrovní spolehlivosti.

Tabulka 2 – Změny filmů síťovaných KALG+GA v příčném a podélném směru při stanovení teploty smrštění

Film	Prodloužení (-)/smrštění (+) filmu v podélném směru				Prodloužení (-)/smrštění (+) filmu v příčném směru			
	T <sub>0</sub> (mm)	T <sub>z</sub> – T <sub>s</sub> (mm)	T <sub>s</sub> – T (mm)	T – 80°C (mm)	T <sub>0</sub> (mm)	T <sub>z</sub> – T <sub>s</sub> (mm)	T <sub>s</sub> – T (mm)	T – 80°C (mm)
bez síťovadla	-1,8	0	+15,5 (T=77,4°C)	0	-4,0	0	+2,0 (T=72°C)	0
1	-0,7	0	+7,4 (T=75°C)	0	-0,7	0	+4,7 (T=72,6°C)	0
2	-0,7	0	+10,0 (T=75°C)	0	-0,3	0	+4,0 (T=70°C)	0
3	-1,3	0	+5,0 (T=75°C)	0	-1,3	0	+5,0 (T=75°C)	0
4	-0,7	0	+4,0 (T=75°C)	0	-0,7	0	+6,7 (T=75°C)	0
5	-1,0	-0,3	+9,4 (T=70°C)	0	-1,0	0	+3,4 (T=70°C)	0
6	-0,3	0	+8,4 (T=75°C)	0	-0,7	0	+4,4 (T=75°C)	0
7	-0,7	0	+8,7 (T=75°C)	0	-0,3	0	+6,7 (T=75°C)	0
8	-0,3	0	+9,0 (T=75°C)	0	-0,7	0	+6,4 (T=75°C)	0
9	-0,7	0	+8,4 (T=75°C)	0	-0,7	0	+5,4 (T=70°C)	0
s 2,0%GA	0	0	+14,0 (T=80°C)	0	0	0	+7,0 (T=70°C)	0

T<sub>0</sub> – 4 minuty bez záhřevu při pokojové teplotě; T<sub>z</sub> – teplota, při které bylo započato zahřívání; T<sub>s</sub> – teplota, při které se film začal smršťovat;  
T – teplota ukončení smršťování filmu

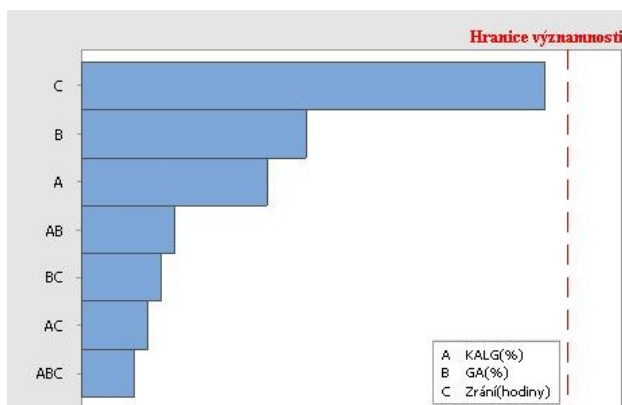
### 6.1.1 Teplota smrštění

- Teplota smrštění v podélném směru

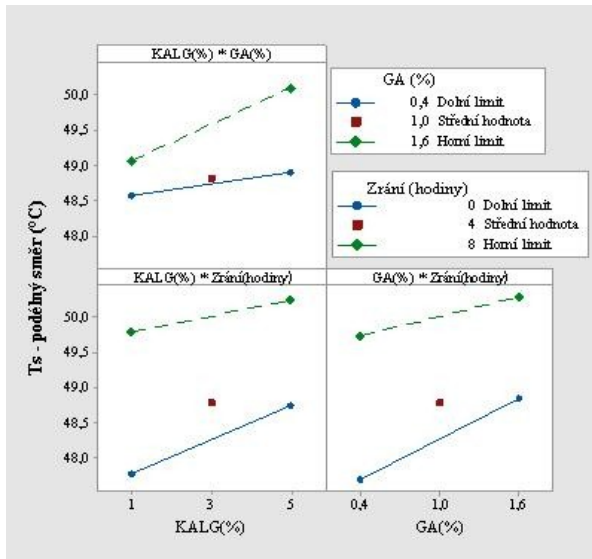
Rovnice pro  $T_s$  v podélném směru má tvar:

$$y = 47,29 + 0,00833333A + 0,2708B + 0,2656C + 0,2292AB + 0,005208AC - 0BC - 0,0208333ABC; \text{ korelační koeficient: } R^2 = 0,9205$$

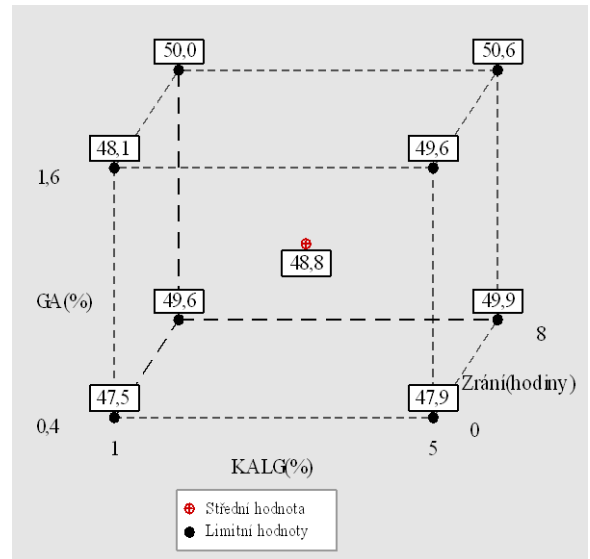
Z následujícího obrázku 16 je patrné, že největší vliv na teplotu smrštění v podélném směru měla doba zrání, která byla taktéž ovlivněna i přidavkem glutaraldehydu. Naopak nejmenší vliv je zřejmý v přidavku kyseliny alginové. Obrázek 17 vykresluje vliv interakcí sledovaných faktorů na teplotu smrštění. Je zřejmé, že s rostoucími hodnotami sledovaných faktorů roste i teplota smrštění jednotlivých filmů. Žádný ze sledovaných faktorů teplotu smrštění nesnižoval. Z obrázku 18 lze vyčíst, že nejvyšší teplota smrštění byla naměřena u filmu obsahujícího maximální dávku jak GA tak i KALG přičemž jeho doba zrání činila 8 hodin. Naopak nejnižší teplota smrštění byla zaznamenána u filmu s nejnižším množstvím použitých síťovadel s žádnou dobou zrání. Jelikož měla na teplotu smrštění největší vliv doba zrání a množství GA, byly tyto sledované faktory vyneseny do vzájemné závislosti pomocí vrstevnicového grafu, který představuje obrázek 19. Z obrázku je zřejmé, že nejvyšších teplot smrštění v podélném směru se dosahuje v případě nejdelší doby zrání a největšího množství síťovadla, přičemž pro dosažení teplot smrštění od 50 do 50,5°C je dostačující použít množství GA kolem 1% s dobou zrání alespoň 7 hodin. Přídavek kyseliny alginové nijak výrazně teplotu smrštění v podélném směru neovlivnil, tudíž nebyl tento faktor vynesen do grafu.



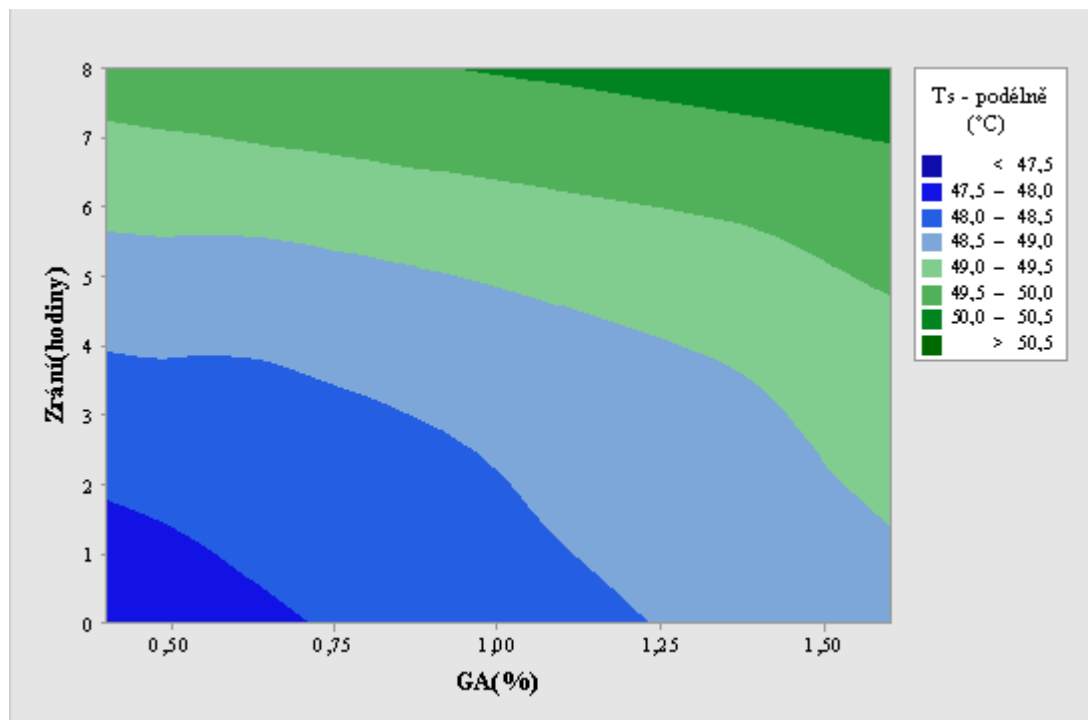
Obrázek 16 – Významnost sledovaných faktorů na  $T_s$  v podélném směru u filmů síťovaných KALG+GA



Obrázek 17 – Vliv interakcí sledovaných faktorů na Ts v podélném směru u filmů síťovaných KALG+GA



Obrázek 18 – Vliv sledovaných faktorů na Ts v podélném směru v kubickém zobrazení u filmů síťovaných KALG+GA



Obrázek 19 – Vrstevnicový graf vlivu GA a doby zrání na Ts v podélném směru

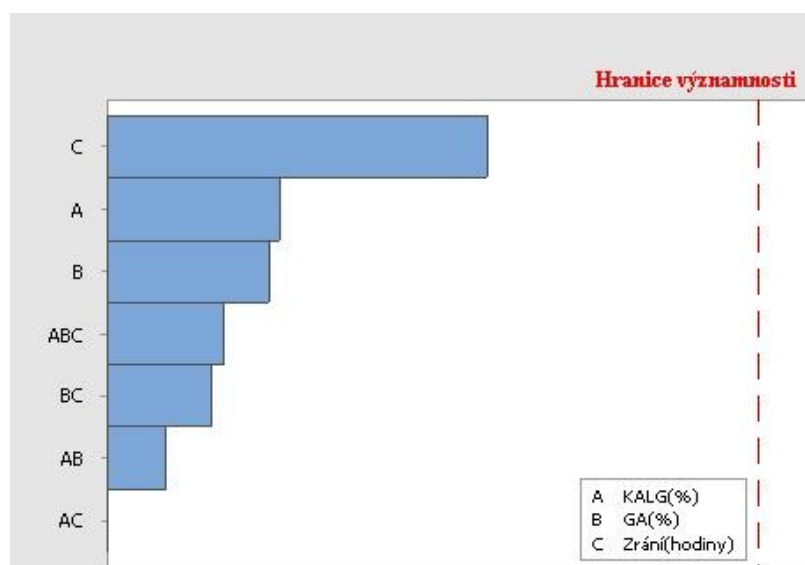


- Teplota smrštnění v příčném směru

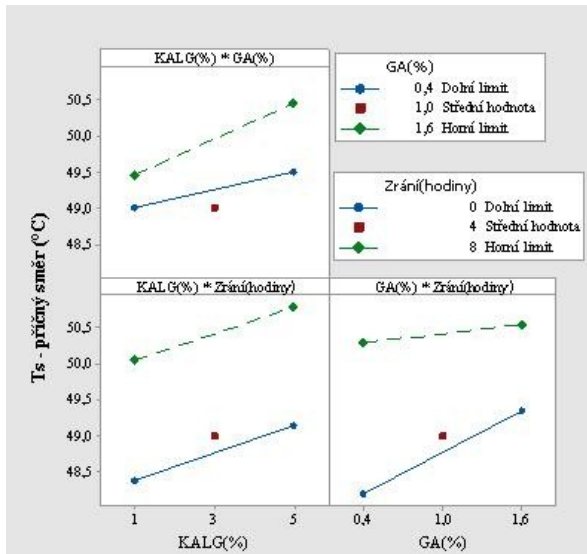
Rovnice pro  $T_s$  v příčném směru má tvar:

$$y = 48,19 - 0,1250A + 0,02083B + 0,1437C + 0,3125AB + 0,05208AC + 0,0625BC - 0,05208ABC; \text{ korelační koeficient: } R^2 = 0,8483$$

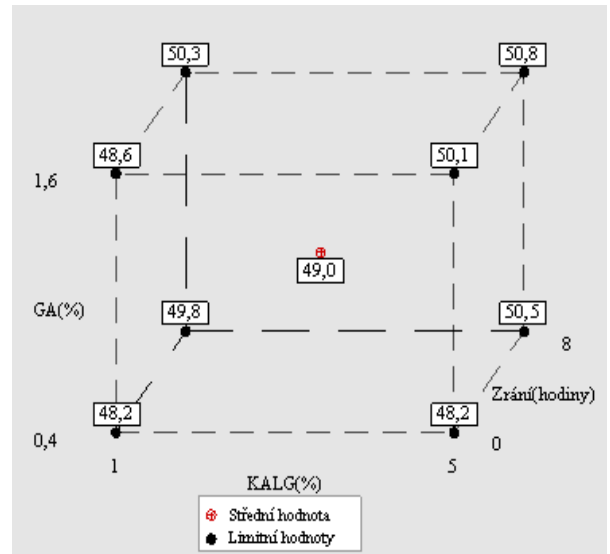
Na obrázku 20 níže je patrné, že největší vliv na teplotu smrštnění v příčném směru má opět doba zrání, přičemž vliv přídavku KALG a GA je v tomto případě srovnatelný. Z obrázku 21, který zobrazuje vliv interakcí sledovaných faktorů na teplotu smrštnění, lze vyčíst, že s rostoucími hodnotami sledovaných faktorů roste i teplota smrštnění jednotlivých filmů. Žádný ze sledovaných faktorů teplotu smrštnění v příčném směru nesnižoval. Na obrázku 22 je zřetelné, že nejvyšší teplota smrštnění byla naměřena u filmu obsahujícího maximální dávku jak GA tak i KALG přičemž jeho doba zrání činila 8 hodin. Naopak nejnižší teplota smrštnění byla zaznamenána u filmu s nejnižším množstvím použitých síťovadel s žádnou dobou zrání. Byl zhotoven vrstevnicový graf znázorněný na obrázku 23, kde je vynesena závislost doby zrání kolagenního gelu na množství glutaraldehydu. Na základě grafu je možné konstatovat, že pro dosažení teplot smrštnění v příčném směru v rozmezí od 50 do 50,5°C je dostačující použít množství GA již okolo 0,5% přičemž doba zrání je alespoň 7 hodin. Pro dosažení vyšších teplot smrštnění je zapotřebí použít GA v množství alespoň okolo 1,5% s dobou zrání minimálně 8 hodin.



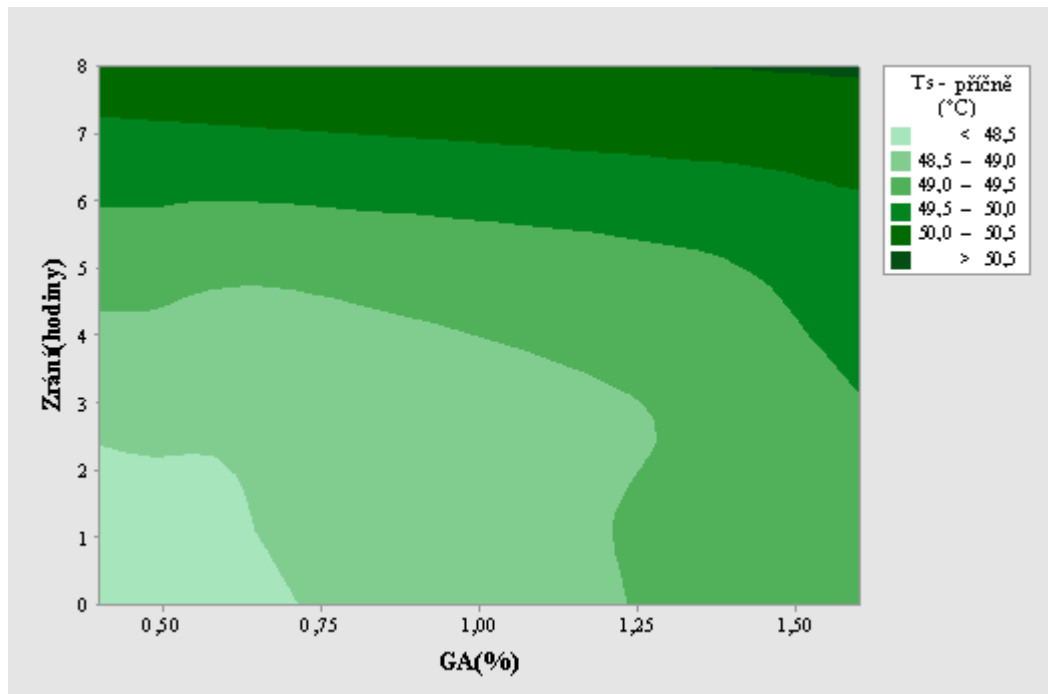
Obrázek 20 – Významnost sledovaných faktorů na  $T_s$  v příčném směru u filmů síťovaných KALG+GA



Obrázek 21 – Vliv interakcí sledovaných faktorů na Ts v příčném směru u filmů síťovaných KALG+GA



Obrázek 22 – Vliv sledovaných faktorů na Ts v příčném směru v kubickém zobrazení u filmů síťovaných KALG+GA



Obrázek 23 – Vrstevníkový graf vlivu GA a doby zrání na Ts v příčném směru

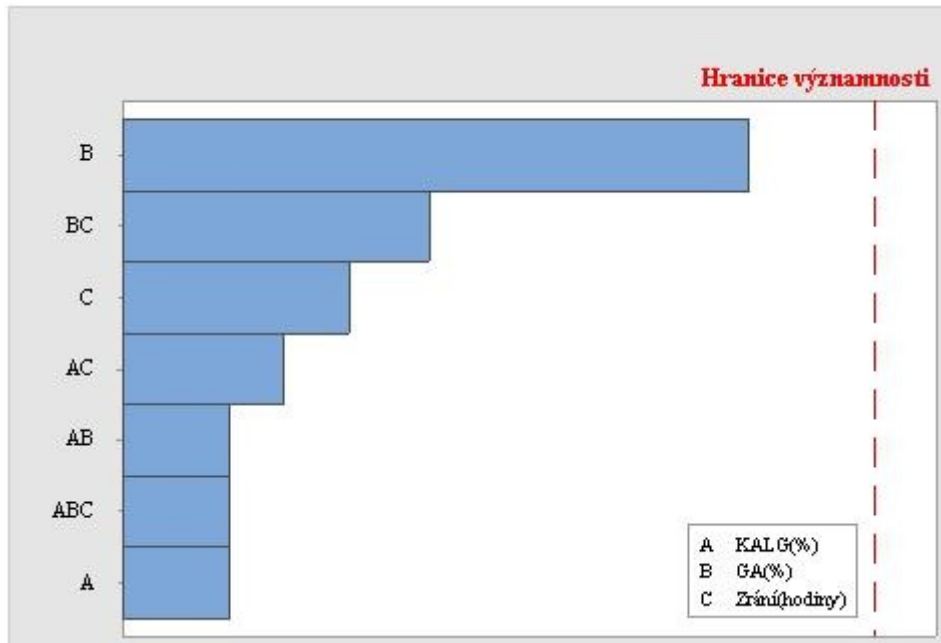
### 6.1.2 Mechanické parametry

- Tahová síla při přetržení

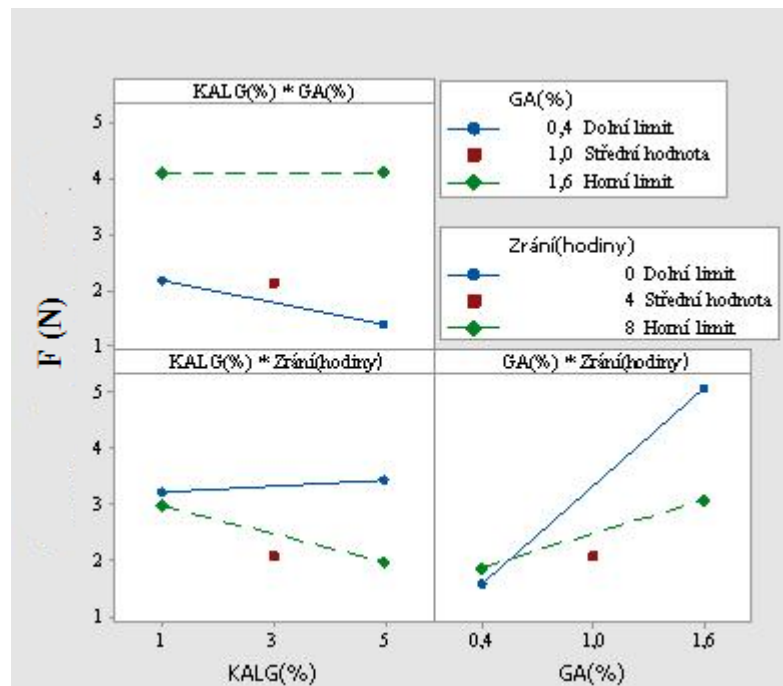
Rovnice pro tahovou sílu při přetržení má tvar:

$$y = 1,283 - 0,2833A + 1,917B + 0,1208 C + 0,3333AB + 0,004167AC - 0,1146BC - 0,04167ABC; \text{ korelační koeficient: } R^2 = 0,7354$$

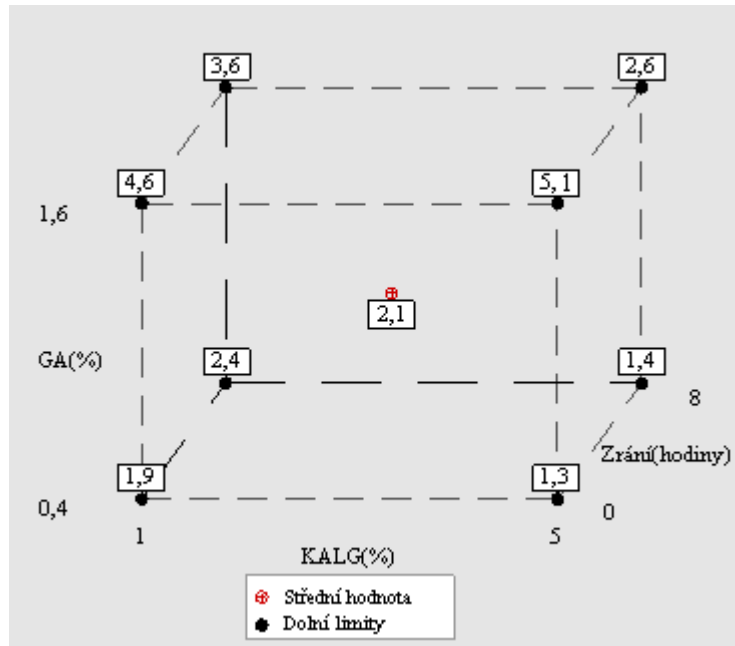
Bylo zjištěno, že největší vliv na tahovou sílu při přetržení má přídavek glutaraldehydu, zatímco vliv přídavku kyseliny alginové je zanedbatelný, jak znázorňuje obrázek 24. Z obrázku 25, který vykresluje vliv interakcí sledovaných faktorů na tahovou sílu, je zjevné, že se tahová síla v případě maximálního přídavku GA nemění s rostoucím přídavkem kyseliny alginové, jeví se jako konstantní. Dokonce v případě obsahu minimálního přídavku GA tahová síla s rostoucím množstvím KALG klesá. Podobný jev je patrný i v případě interakce KALG a doby zrání. V případě doby zrání 0 hodin se tahová síla nijak výrazně nemění s přídavkem KALG, přičemž se dosahuje tahové síly vyšší než v případě doby zrání 8 hodin, kde tahová síla s rostoucím přídavkem KALG klesá. V případě interakce GA a doby zrání je zjevné, že s rostoucím množstvím GA s minimální dobou zrání tahová síla roste až k hodnotě 5N. V případě maximální doby zrání tahová síla s rostoucím množstvím glutaraldehydu roste, ale nedosahuje tak výrazných tahových sil. Bylo tedy zjištěno, že delší doba zrání způsobuje snížení tahových sil potřebných pro přetržení a že přidáním KALG tahovou sílu nezvýšíme. Uvedené poznatky jsou graficky znázorněny na obrázku 26, kde je patrné, že nejvyšší tahová síla byla zaznamenána v případě maximálního obsahu GA a KALG s nulovou dobou zrání. Byl zhotoven vrstevnicový graf znázorněný na obrázku 27, kde je vynesena závislost doby zrání kolagenního gelu na množství glutaraldehydu. Z obrázku lze vyčíst, že nejvyšších tahových sil při přetržení se dosahuje v případě nejkratší doby zrání a nejvyššího množství GA. Pomocí grafu je možné soudit, že pro dosažení tahových sil v rozmezí od 4 do 5 N je potřeba použít GA v množství alespoň 1,25% s nulovou dobou zrání.



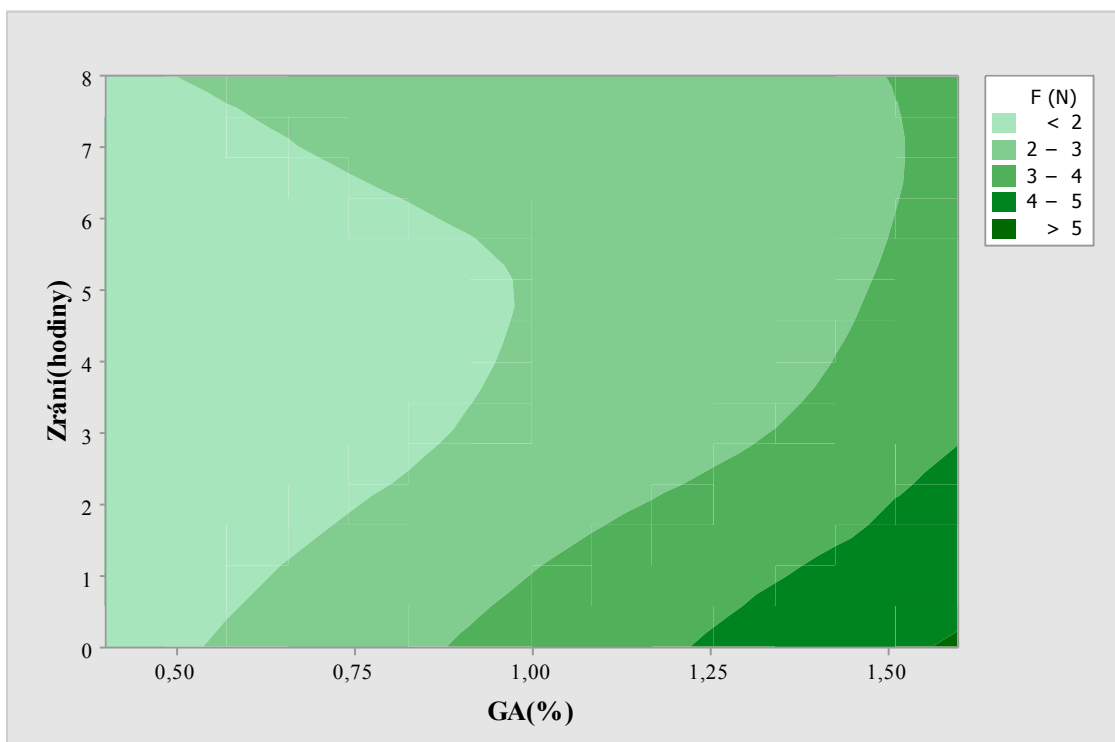
Obrázek 24 – Významnost sledovaných faktorů na tahovou sílu při přetržení u filmů síťovaných KALG+GA



Obrázek 25 – Vliv interakcí sledovaných faktorů na tahovou sílu při přetržení u filmů síťovaných KALG+GA



Obrázek 26 – Vliv sledovaných faktorů na tahovou sílu při přetržení v kubickém zobrazení u filmů síťovaných KALG+GA



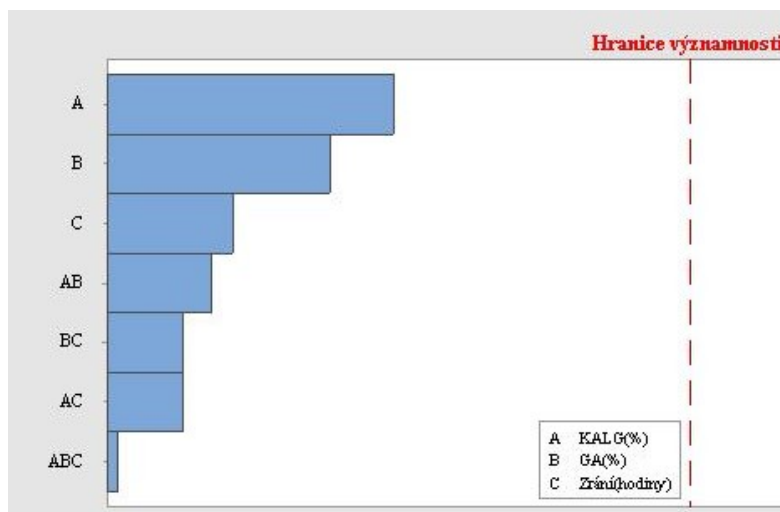
Obrázek 27 – Vrstevnicový graf vlivu GA a doby zrání na tahovou sílu při přetržení

- Poměrné prodloužení při přetržení

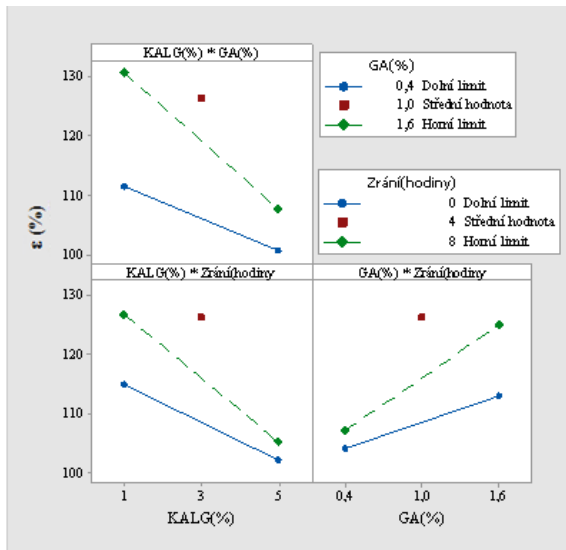
Rovnice pro poměrné prodloužení při přetržení má tvar:

$$y = 102,3 - 0,3167A + 15,83B + 1,032 C - 2,833AB - 0,3448AC + 0,7474BC - 0,0651ABC; \text{ korelační koeficient: } R^2 = 0,7607$$

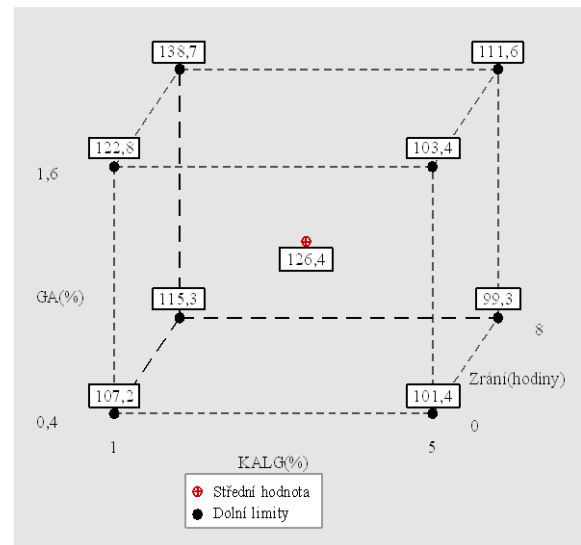
Pomocí obrázku 28 bylo zjištěno, že nejvýraznější vliv na poměrné prodloužení při přetržení má obsah KALG, přičemž nejmenší vliv má doba zrání. Pomocí grafů znázorněných na obrázku 29 je možné konstatovat, že s rostoucím obsahem KALG poměrné prodloužení klesá. Nejvyšší hodnoty prodloužení (přes 130%) byly naměřeny u filmů s maximálním obsahem GA a s minimálním obsahem KALG. V případě interakce doby zrání s obsahem GA je patrné, že s rostoucí dobou zrání a s rostoucím obsahem GA poměrné prodloužení roste. Na obrázku 30 je zjevné, že nejvyšší poměrné prodloužení bylo naměřeno u filmu s maximálním obsahem GA, s maximální dobou zrání, přičemž obsah KALG je minimální. Naopak k nejmenšímu protažení došlo u filmu s minimální koncentrací GA, s maximální dobou zrání a s maximálním obsahem KALG. Obrázek 31 představuje závislost přídavku kyseliny alginové na množství GA. I zde se potvrdilo, že vyšší obsah KALG způsobuje výrazný pokles poměrného prodloužení, zatímco filmy s vyšším obsahem GA vykazují poměrně vysoké hodnoty prodloužení.



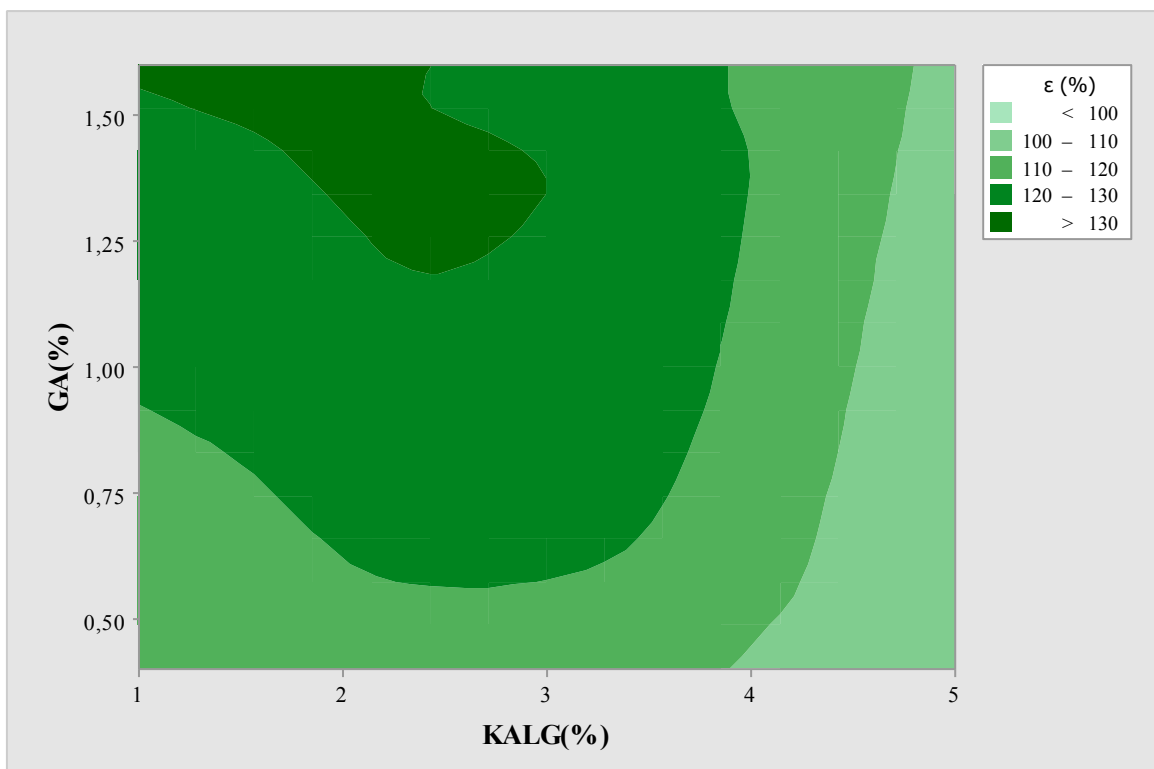
Obrázek 28 – Významnost sledovaných faktorů na poměrné prodloužení při přetržení u filmů síťovaných KALG+GA



Obrázek 29 – Vliv interakcí sledovaných faktorů na Ts v příčném směru u filmů síťovaných THPS



Obrázek 30 – Vliv sledovaných faktorů na Ts v příčném směru v kubickém zobrazení u filmů síťovaných THPS



Obrázek 31 – Vrstevnicový graf vlivu KALG a GA na poměrné prodloužení při přetržení

### 6.1.3 Bobtnací zkoušky

U všech připravených filmů byly provedeny bobtnací zkoušky a to jak při teplotě 26°C, tak i při teplotě 80°C. V tabulkách 3 a 4 jsou znázorněny zjištěné hodnoty stupně zbobtnání a změny plochy u všech zhotovených filmů síťovaných kombinací KALG a GA v porovnání s filmem bez síťovadla a filmem síťovaným 2,0% GA. V průběhu inkubace při teplotě 26°C se vzorky pouze mírně kroutily a pluly po hladině vody. V průběhu inkubace při teplotě 80°C se vzorky ihned po vložení do lázně zkroutily a smrštily, po 6 minutách inkubace se vzorky mírně vyrovnaly. V průběhu měření se vzorky občas ponořily pod hladinu vody. Vzorky z filmů č. 3, 4, 7 a 8 měly nažloutlou barvu, což je dáno přítomností vyššího obsahu glutaraldehydu.

Naměřené hodnoty stupně zbobtnání jsou znázorněny na obrázcích 32–35. V porovnání s filmem bez síťovadla bylo zjištěno, že všechny zesíťované filmy bobtnají při obou teplotách výrazně méně. V případě filmu síťovaného 2,0% GA bylo zjištěno, že při obou teplotách dochází u filmů č. 4, 6, 7 a 8 k menšími zbobtnání. U ostatních filmů byly hodnoty stupně zbobtnání větší.

Obrázky 36–39 znázorňují závislost změny plochy na době inkubace u všech filmů při obou teplotách měření. Bylo zjištěno, že u všech zesíťovaných filmů byla změna plochy naměřena menší v porovnání s filmem bez síťovadla a to jak při teplotě 26°C, tak i při teplotě 80°C. U filmu síťovaného 2,0% GA nedocházelo při teplotě 26°C k žádné změně plochy. Stejný výsledek při totožné teplotě byl zjištěn i u filmů č. 8. V případě filmů č. 4 a 6 byla změna plochy při 26°C zanedbatelná. Při teplotě 80°C došlo k menší změně plochy pouze u filmu č. 8. U ostatních filmů byla změna plochy zaznamenána vyšší.

Pomocí provedených zkoušek bylo zjištěno, že film č. 8 (obsah KALG: 5,0%; obsah GA: 1,6%; doba zrání: 8 hodin) vykazuje nejlepší výsledky bobtnacích zkoušek.



Tabulka 3 – Naměřené hodnoty stupně zbobtnání a změny plochy při 26°C a 80°C u filmů č. 1–4 síťovaných KALG+GA a filmu bez síťovadla

Film	Doba inkubace (min)	Test při 26°C		Test při 80°C	
		SZ (násobek)	$\Delta S$ (%)	SZ (násobek)	$\Delta S$ (%)
Bez síťovadla	1	5,4	5,0	6,2	-66,3
	6	11,5	20,8	11,9	-62,5
	16	11,9	20,8	11,3	-62,5
	36	10,8	20,8	8,2	-68,5
	60	9,6	20,8	10,8	-68,5
1	1	2,7	5,0	2,8	-56,0
	6	2,8	7,5	3,9	-58,0
	16	3,0	10,0	4,3	-62,5
	36	3,7	10,0	4,5	-62,5
	60	4,0	15,0	4,9	-64,6
2	1	1,9	2,5	2,5	-62,5
	6	2,3	5,0	3,4	-60,0
	16	2,1	7,5	3,6	-58,0
	36	2,5	10,0	3,9	-58,8
	60	3,3	10,0	4,0	-58,8
3	1	2,7	0,0	2,2	-62,3
	6	2,8	2,5	2,9	-60,0
	16	3,0	2,5	3,2	-60,0
	36	3,7	5,0	3,6	-60,4
	60	3,9	5,0	4,4	-60,4
4	1	2,3	0,0	1,9	-64,3
	6	2,5	0,0	2,3	-64,3
	16	2,9	0,0	2,5	-56,5
	36	2,5	0,5	2,7	-58,3
	60	2,3	0,5	3,3	-58,3

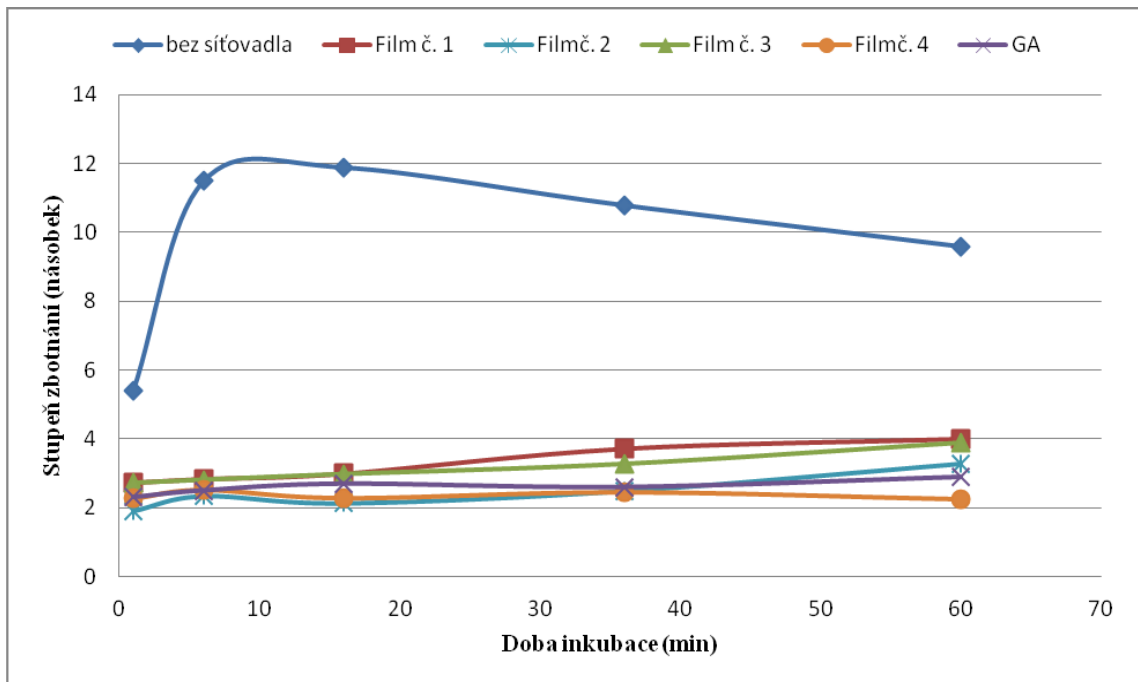
SZ – stupeň zbobtnání;  $\Delta S$  – změna plochy

Tabulka 4 – Naměřené hodnoty stupně zbobtnání a změny plochy při 26°C a 80°C u filmů č. 5–6 síťovaných KALG+GA a filmu s 2,0% GA

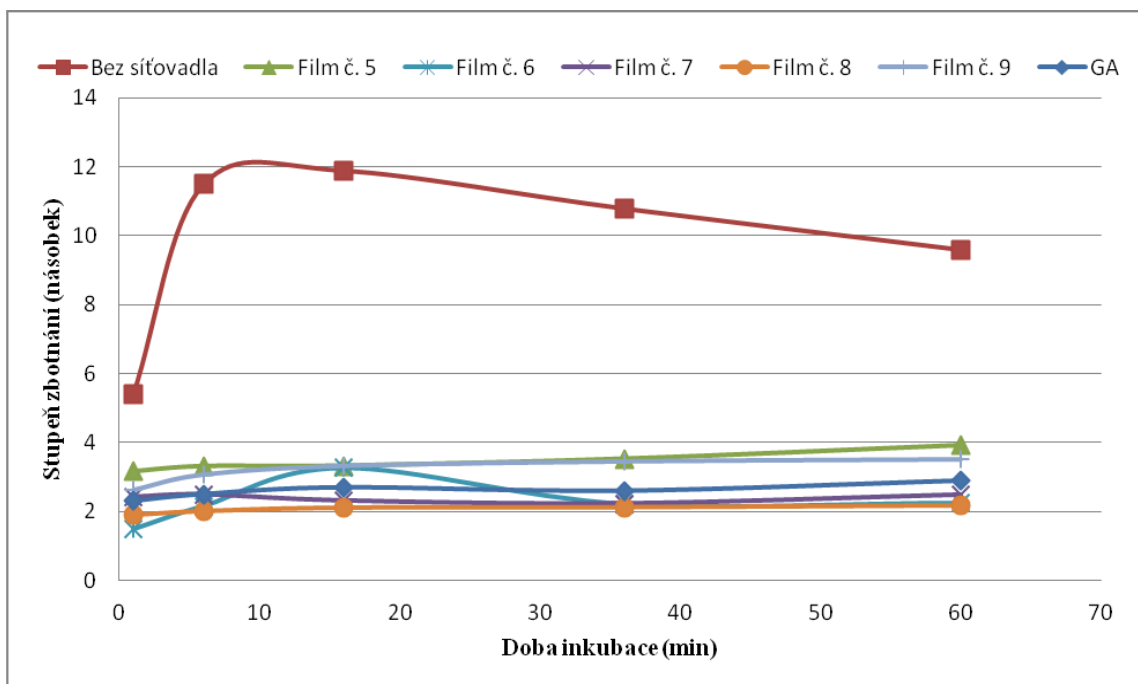
Film	Doba inkubace (min)	Test při 26°C		Test při 80°C	
		SZ (násobek)	$\Delta S$ (%)	SZ (násobek)	$\Delta S$ (%)
5	1	3,2	0,0	3,8	-58,0
	6	3,3	0,0	4,1	-59,0
	16	3,3	5,0	4,1	-59,0
	36	3,5	5,0	4,2	-60,0
	60	3,9	7,6	4,2	-60,2
6	1	1,5	0,0	2,7	-63,2
	6	2,2	0,0	2,7	-58,0
	16	3,3	0,0	2,8	-58,0
	36	2,2	0,5	3,0	-59,5
	60	2,4	0,5	3,5	-59,5
7	1	2,3	0,0	2,3	-52,4
	6	2,5	0,0	2,8	-50,3
	16	2,5	2,5	3,3	-53,3
	36	2,4	2,5	3,5	-55,3
	60	2,6	5,0	3,7	-58,8
8	1	1,9	0,0	2,3	-50,4
	6	2,0	0,0	2,6	-49,4
	16	2,1	0,0	2,7	-51,3
	36	2,1	0,0	2,9	-51,3
	60	2,2	0,0	3,3	-54,5
9	1	2,6	0,0	2,6	-63,5
	6	3,1	2,6	2,9	-58,5
	16	3,3	5,3	3,0	-55,0
	36	3,5	10,8	3,7	-55,0
	60	3,5	10,8	4,2	-61,5
s 2,0% GA	1	2,3	0,0	2,4	-61,5
	6	2,5	0,0	2,7	-61,5
	16	2,7	0,0	2,9	-61,5
	36	2,6	0,0	3,3	-58,8
	60	2,9	0,0	3,5	-58,8

SZ – stupeň zbobtnání;  $\Delta S$  – změna plochy

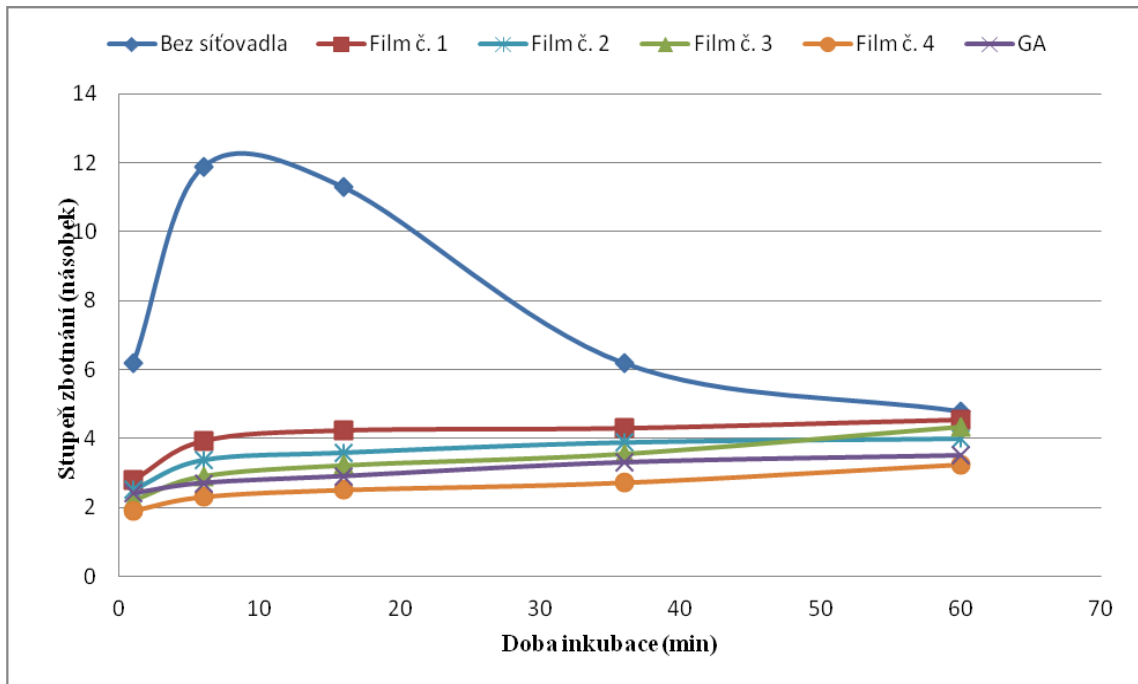
Stupeň zbobtnání filmů č. 1–4 a filmů č. 5–9 při obou teplotách měření znázorňují obrázky 32–35 níže ve srovnání s filmem bez síťovadla a s filmem s 2,0% GA.



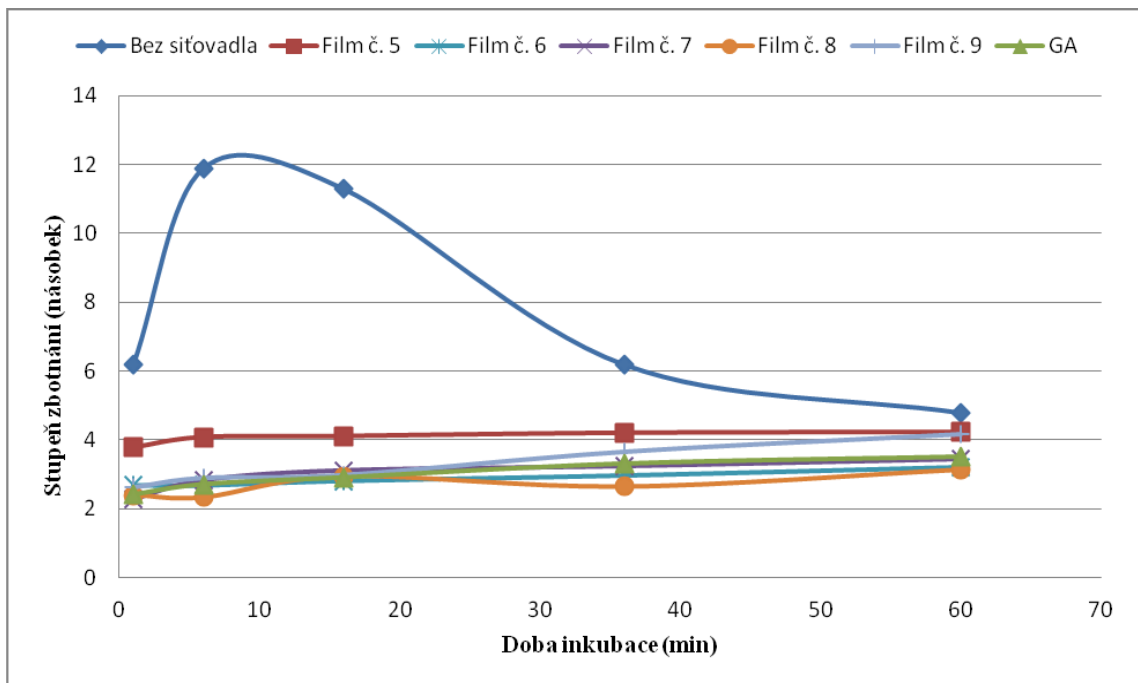
Obrázek 32 – Závislost stupně zbobtnání na době inkubace u filmů č. 1–4 síťovaných KALG+GA při teplotě 26°C



Obrázek 33 – Závislost stupně zbobtnání na době inkubace u filmů č. 5–9 síťovaných KALG+GA při teplotě 26°C

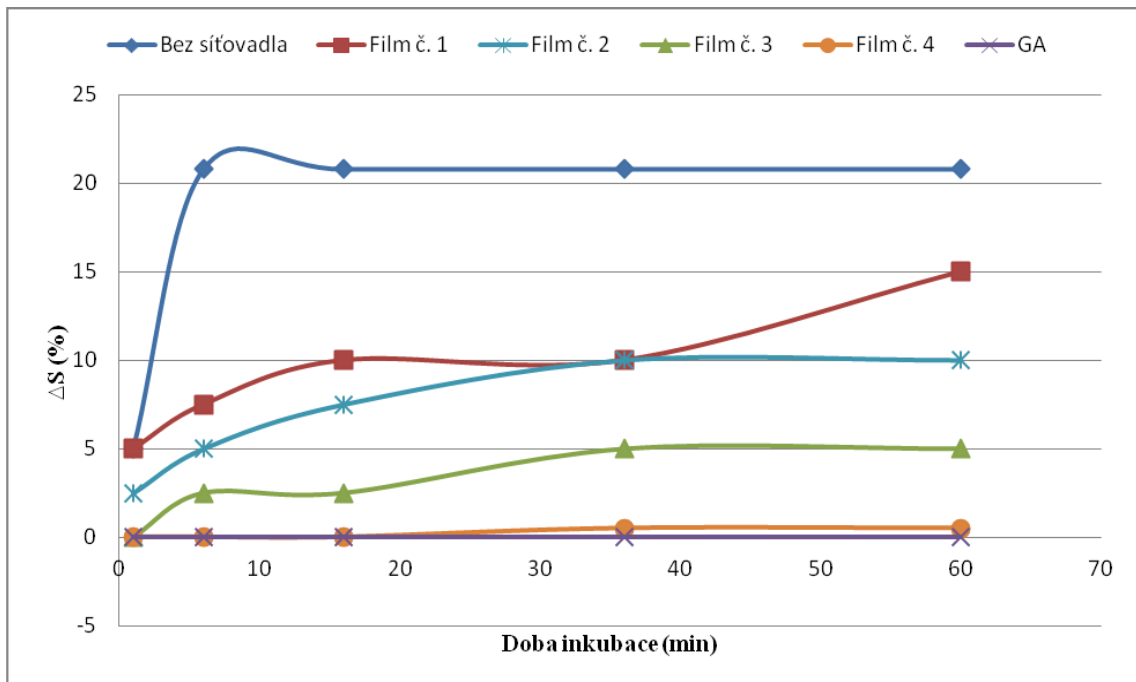


Obrázek 34 – Závislost stupně zbotnění na době inkubace u filmů č. 1–4 síťovaných KALG+GA při teplotě 80°C

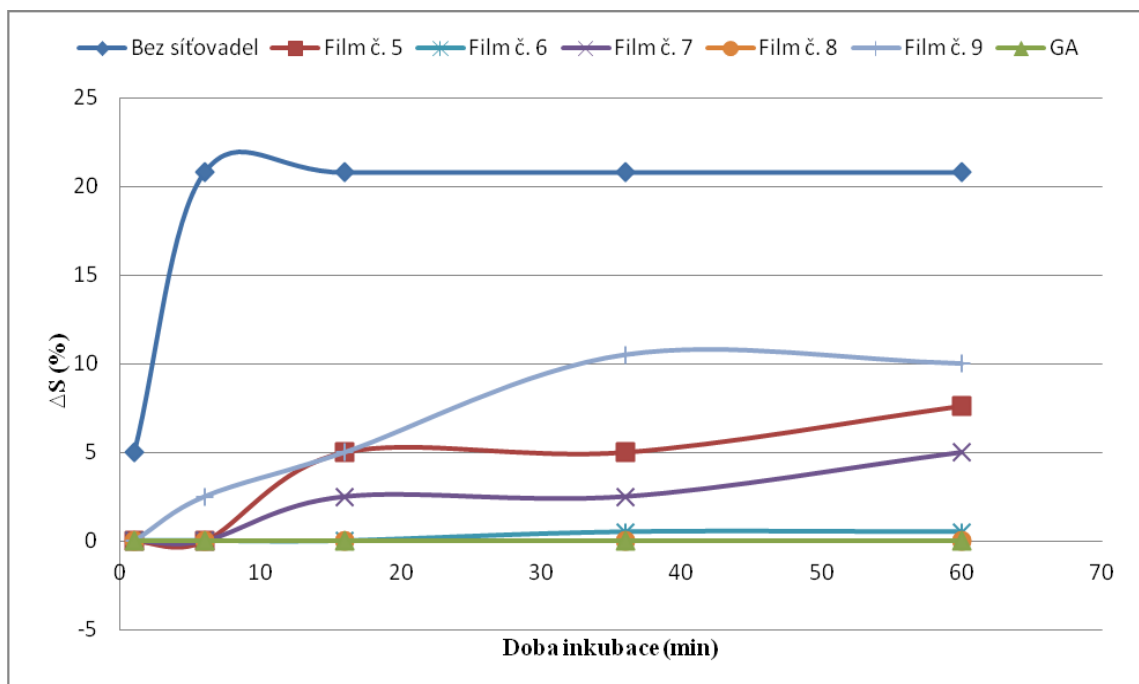


Obrázek 35 – Závislost stupně zbotnění na době inkubace u filmů č. 5–9 síťovaných KALG+GA při teplotě 80°C

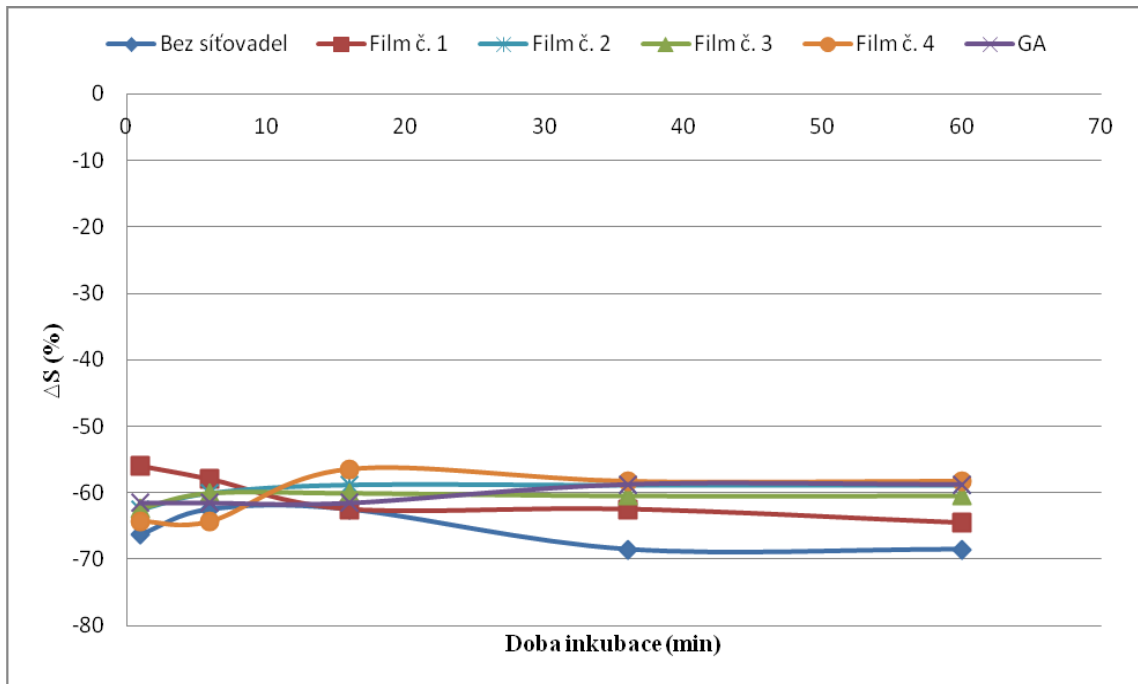
Změny plochy filmů č. 1–4 a filmů č. 5–9 při obou teplotách měření znázorňují obrázky 36– 39 níže ve srovnání s filmem bez síťovadla a s filmem s 2,0% GA.



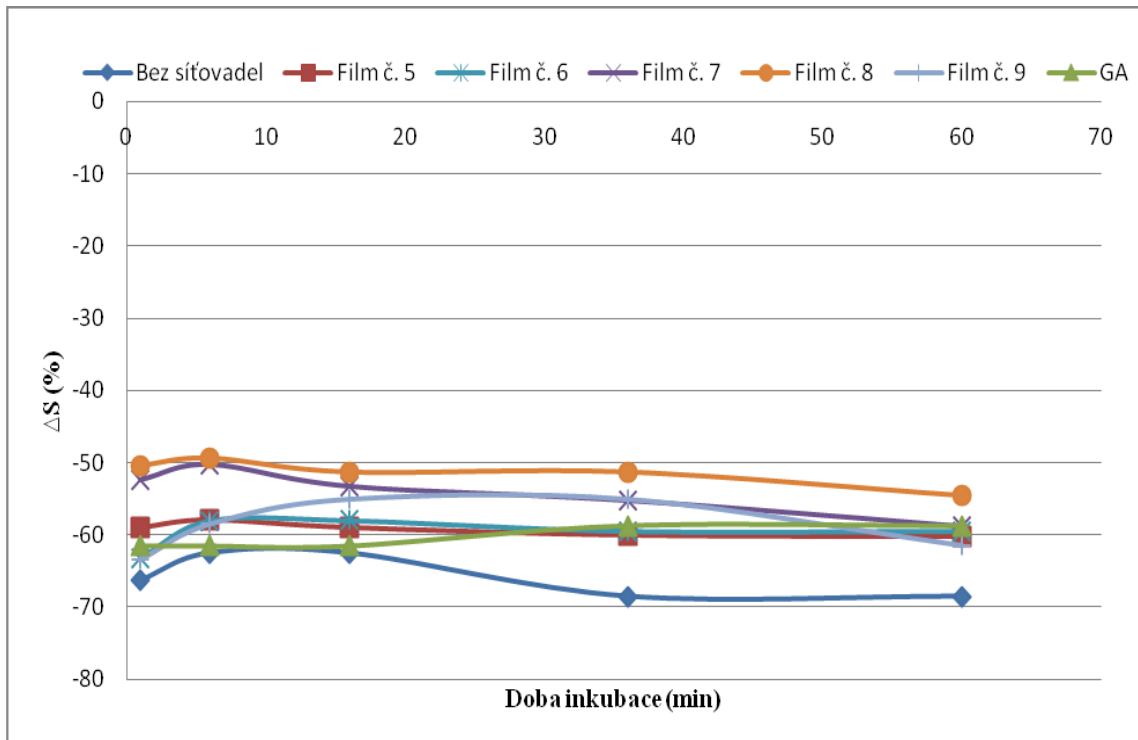
Obrázek 36 – Závislost změny plochy na době inkubace u filmů č. 1–4 sít'ovaných KALG+GA při teplotě 26°C



Obrázek 37 – Závislost změny plochy na době inkubace u filmů č. 5–9 sít'ovaných KALG+GA při teplotě 26°C



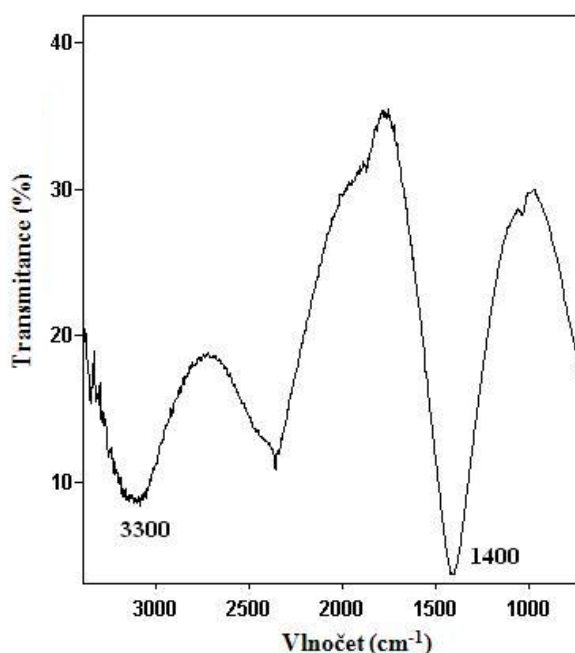
Obrázek 38 – Závislost změny plochy na době inkubace u filmů č. 1–4 síťovaných KALG+GA při teplotě 80°C



Obrázek 39 – Závislost změny plochy na době inkubace u filmů č. 5–9 síťovaných KALG+GA při teplotě 80°C

#### 6.1.4 FTIR

Ke srovnání bylo naměřeno spektrum samotné kyseliny alginové. Naměřené spektrum je zobrazené níže na obrázku 40. Ve spektru je patrný intenzivní absorpční pás při vlnočtu  $3300\text{ cm}^{-1}$ , který značí  $\text{-OH}$  funkční skupiny. Další charakteristický pás je zjevný při vlnové délce  $1400\text{ cm}^{-1}$ , což představuje výskyt  $\text{-COOH}$  skupin nacházejících se v molekule kyseliny alginové.



Obrázek 40 – IČ spektrum kyseliny alginové

V tabulce 5 jsou zaznamenány rozdíly v charakteristických pásech u filmů síťovaných kombinací KALG a GA v porovnání s filmem bez síťovadla. Naměřená IČ spektra všech zhotovených filmů jsou podobná s výskytem všech charakteristických absorpčních pásů nativního kolagenu, což značí, že nedošlo k porušení sekundární struktury kolagenu; totéž uvádí i Sionkowski [43].

Byly zaznamenány následující odlišnosti:

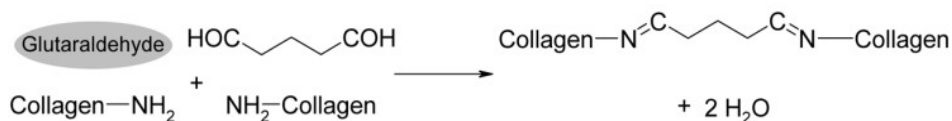
- Slabší intenzita píku oproti filmu bez síťovadla byla zjištěna při vlnové délce  $2930\text{ cm}^{-1}$  – přiřazení  $\text{-CH}_2\text{-}$
- Vyšší intenzita píku oproti filmu bez síťovadla byla zjištěna při vlnové délce  $1400\text{ cm}^{-1}$  – přiřazení  $\text{-COOH}$  funkční skupina
- Vyšší intenzita píku při vlnočtu  $1241\text{ cm}^{-1}$  – přiřazení  $\text{-CO-NH-}$  funkční skupina

- V oblasti  $1040\text{ cm}^{-1}$  byla zjištěna u všech filmů vyšší intenzita píku v porovnání s filmem bez síťovadla – přiřazení R–OH

Pomocí IČ spekter byly zjištěny určité změny v intenzitě píků u filmů síťovaných kombinací KALG a GA v porovnání s filmem bez síťovadla. V případě zesíťovaných filmů byla zaznamenána vyšší intenzita píků při vlnové délce  $1400$  a  $1241\text{ cm}^{-1}$  v porovnání s nativním kolagenem. Tato skutečnost je přisuzována tomu, že při síťování kolagenu dochází k tvorbě amidové vazby –CO–NH–. Dále byla zaznamenána vyšší intenzita píků při vlnové délce  $1040\text{ cm}^{-1}$ , což značí vyšší obsah –OH skupin v systému, což je pravděpodobně způsobeno přítomností kyseliny alginové, která tyto skupiny obsahuje. Porovnání spektra nativního kolagenu a kolagenu síťovaného kyselinou alginovou pozoroval i Mitra Tapas [10]. Tyto vzniklé změny značí, že mezi kolagenem a použitým síťovadlem došlo k určitým interakcím.

Reakce mezi KALG a kolagenem je s největší pravděpodobností uskutečněna prostřednictvím –NH<sub>2</sub> funkční skupiny kolagenu a –COOH skupiny KALG za vzniku –CO–NH– kovalentní vazby. Další možnou interakcí je vznik H–můsteků mezi molekulami kyseliny alginové a kolagenu.

Síťování kolagenu bylo navíc podpořeno i přidávkem GA, kde docházelo ke vzniku tzv. Schiffovy báze prostřednictvím –CHO skupiny GA a –NH<sub>2</sub> skupiny kolagenu jak znázorňuje obrázek 41 níže.

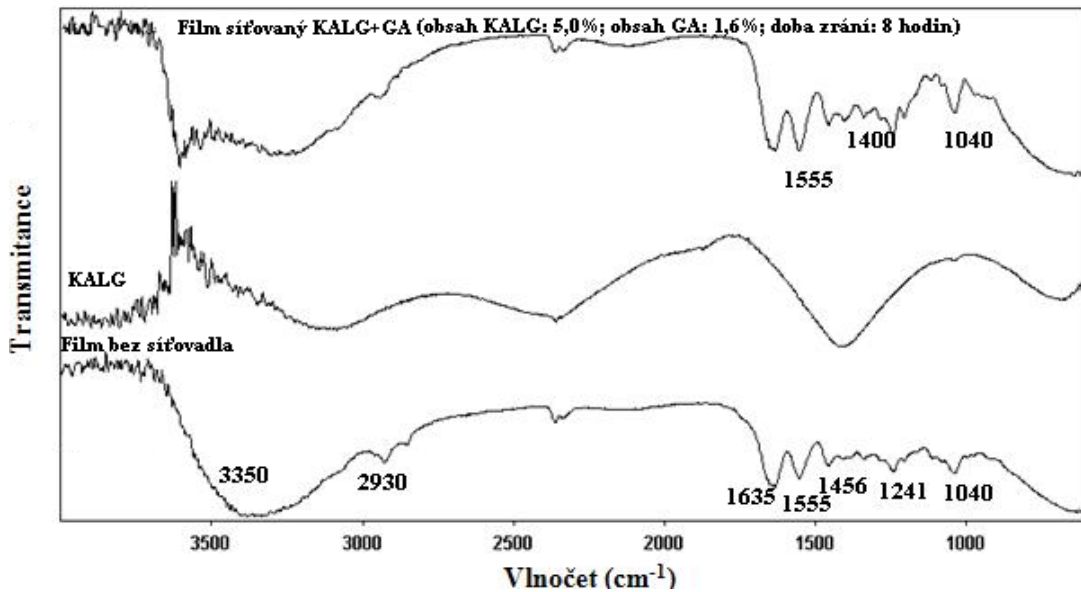


Obrázek 41 – Síťování kolagenu glutaraldehydem [14]

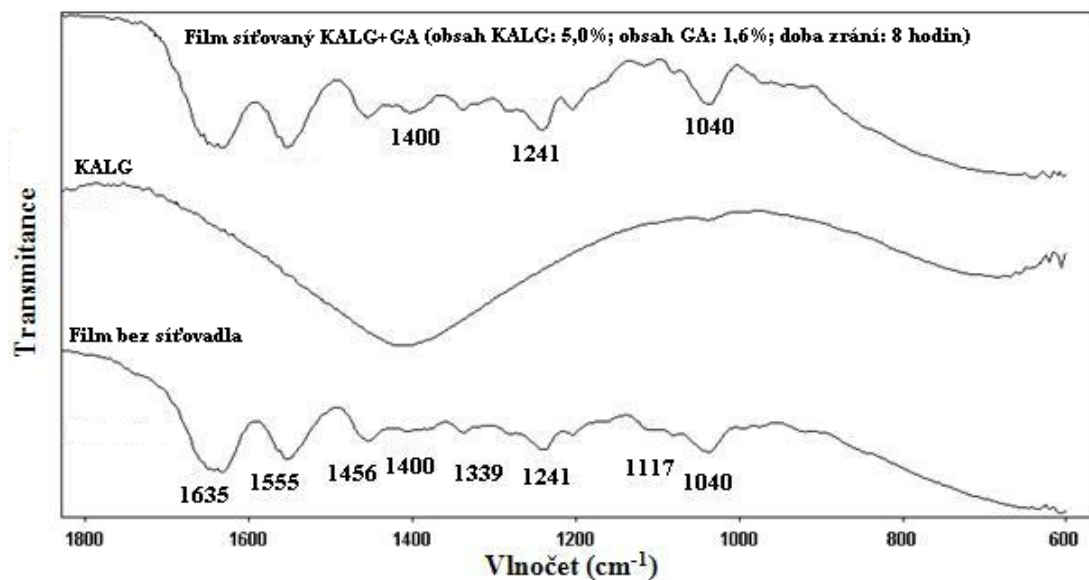




Modelový příklad srovnání spekter je uveden na příkladu č. 8, která můžeme pozorovat na obrázku 42. Detail charakteristických pásů při vlnočtu 2000–600  $\text{cm}^{-1}$  pak znázorňuje obrázek 43.



Obrázek 42 – IČ spektrum filmu síťovaného KALG+GA, filmu bez síťovadla a KALG



Obrázek 43 – Detail IČ charakteristických pásů při vlnočtech 2000–600  $\text{cm}^{-1}$  při síťování KALG+GA

### 6.1.5 Zhodnocení síťujícího účinku kombinací kyseliny alginové a glutaraldehydu

Všechny zhotovené filmy měly teplotu smrštění v obou směrech vyšší než film bez síťovadla, přičemž žádný z filmů nepřesáhl teplotu smrštění filmu síťovaného 2,0% GA. Nejvyšší teplota smrštění byla naměřena u filmu č. 8 (podélný směr: 50,6°C, příčný směr: 50,8°C). Poměrné vysoké hodnoty byly naměřeny i u filmů č. 4 (podélný směr: 50,0°C, příčný směr: 50,3°C), 6 (podélný směr: 49,9°C, příčný směr: 50,5°C) a 7 (podélný směr: 49,6°C, příčný směr: 50,1°C). Zpracováním výsledků ve statistickém programu bylo zjištěno, že největší vliv na teplotu smrštění má doba zrání, přičemž žádný ze sledovaných faktorů teplotu smrštění nesnižoval. Ve statistickém programu byly taktéž zpracovány i výsledky tahové síly při přetržení a poměrného prodloužení při přetržení. Bylo zjištěno, že delší doba zrání tahovou sílu snižuje a přídavek KALG tahovou sílu nijak výrazně neovlivňuje. Zvýšení tahové síly se docílí pouze přídavkem GA. Nejvyšší tahová síla byla naměřena u filmu č. 7 (5,1N). V případě poměrného prodloužení bylo opět zjištěno, že pro docílení vyššího prodloužení, je zapotřebí vyšší obsah GA, přičemž obsah KALG musí být minimální. Nejvyšší prodloužení vykazoval film č. 4 (138,7%). Je tedy možné konstatovat, že přídavek kyseliny alginové nijak výrazně měřené veličiny neovlivňoval. Zásadní vliv na dané veličiny měl přídavek glutaraldehydu a doba zrání.

Pomocí bobtnacích zkoušek bylo zjištěno, že všechny zhotovené filmy bobtnají jak při teplotě 26°C tak i při teplotě 80°C výrazně méně než film bez síťovadla. V případě filmu síťovaného 2,0% GA bylo zjištěno, že při obou teplotách dochází u filmů č. 4, 6, 7 a 8 k menšími zbobtnání. U ostatních filmů byly hodnoty stupně zbobtnání větší.

Díky FTIR byly zjištěny určité změny v intenzitě píků u filmů síťovaných kombinací KALG a GA v porovnání s filmem bez síťovadla. V případě zesíťovaných filmů byla zaznamenána vyšší intenzita píků v oblasti amidových vazeb v porovnání s nativním kolagenem. Tato skutečnost je přisuzována tomu, že při síťování kolagenu dochází k tvorbě amidové vazby  $-\text{CO}-\text{NH}-$ . Pravděpodobně tedy došlo k interakci  $-\text{NH}_2$  skupiny kolagenu a  $-\text{COOH}$  skupiny kyseliny alginové za vzniku peptidové vazby. Ostatní změny zaznamenané v jiných oblastech pak pravděpodobně představují H-můstky tvořené mezi molekulou kolagenu a kyselinou alginovou. Současně docházelo taktéž k reakci mezi přítomným glutaraldehydem a kolagenem prostřednictvím  $-\text{CHO}$  skupiny glutaraldehydu a  $-\text{NH}_2$  funkční skupiny kolagenu za tvorby Schiffovy báze.

Na základě veškerých provedených metod a zjištěných výsledků je možné konstatovat, že všechny filmy síťované kombinací KALG a GA vykazují poměrně dobré vlastnosti. Nejvyšší teploty smrštění a nejnižší stupeň zbobtnání byly naměřeny u filmu č. 8. Poměrně vysoké hodnoty teploty smrštění s nízkým stupněm zbobtnání vykazovaly i filmy č. 4, 6 a 7. Nejvyšší hodnoty tahové síly byly naměřeny u filmu č. 7, který vykazoval ihned po filmu č. 8 nejvyšší teploty smrštění a nejmenší stupeň zbobtnání. K nejvyššímu prodloužení naopak docházelo u filmu č. 4.

Pro stanovení optimálních podmínek je nutné zohlednit, pro jaké aplikace bude daný film určen a jaké požadavky budou na něj kladené. V případě, že budou žádané vysoké teploty smrštění s minimální tendencí k bobtnání bez nutnosti vysokých tahových sil a poměrného prodloužení je nejlepší volbou film č. 8, který obsahuje maximální množství obou použitých síťovadel s dobou zrání 8 hodin. Naopak pro aplikace, kde jsou žádané dobré mechanické vlastnosti se zachováním poměrně vysokých teplot smrštění s nízkým stupněm zbobtnání, by byl vhodnou volbou film č. 7, který obsahuje maximální přídavky použitých síťovadel s nulovou dobou zrání. Nulová doba zrání navíc zkracuje dobu potřebnou pro zhotovení daného filmu, čímž se snižují i zpracovatelské náklady. Film č. 4 by byl vhodný v oblastech, kde je žádané poměrně vysoké prodloužení. Ze zdravotnického hlediska je pak nejvhodnější film č. 6, který obsahoval nejnižší množství toxického glutaraldehydu vykazující poměrně vysoké teploty smrštění s nízkým stupněm zbobtnání.

## 6.2 Filmy síťované tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfátem

Tabulka 6 – Naměřené výsledky u filmů síťovaných THPS

Film č.	Faktor A pH kolagenního gelu	Faktor B množství THPS (%)	Faktor C doba zrání kolagenního gelu (dny)	Obsah sušiny (%)	Tloušťka filmu (mm) ±0,005	Ts (°C)		Mechanické zkoušky		
						Podélný směr	Příčný směr	F (N)	$\sigma$ (-)	$\varepsilon$ (%)
1	2,5	0,4	0	89,5	0,056	48,1	48,3	2,6	16,7	95,9
2	2,5	0,4	8	87,6	0,049	49,8	50,0	2,5	30,4	117,3
3	2,5	1,6	0	88,9	0,051	51,3	51,6	4,2	17,8	126,7
4	2,5	1,6	8	87,3	0,054	52,8	52,4	3,1	40,3	112,3
5	3,3	0,4	0	87,7	0,053	50,3	50,7	2,4	23,6	90,5
6	3,3	0,4	8	88,4	0,048	51,7	52,0	1,5	33,2	77,7
7	3,3	1,6	0	89,5	0,055	56,0	55,8	3,0	28,4	89,9
8	3,3	1,6	8	88,3	0,052	55,1	54,8	1,4	26,4	72,5
9	2,9	1,0	4	87,4	0,051	52,3	51,8	2,2	37,5	117,2
<b>Údaje ke srovnání</b>										
Film bez síťovadla				86,2	0,065	47,1	48,0	0,5	21,3	98,5
Film s 2,0 % GA				90,1	0,050	52,1	52,2	5,3	13,3	146,0
F – tahová síla při přetržení; $\sigma$ – směrodatná odchylka tahové síly při přetržení; $\varepsilon$ – poměrné prodloužení při přetržení										

Z tabulky 6 je zřejmé, že obsah sušiny se u filmů síťovaných pomocí THPS pohybuje v rozmezí od 87,3 do 89,5%. Tloušťka filmů se pohybovala od 0,049 do 0,056 mm.

V tabulce jsou taktéž zaznamenány i naměřené hodnoty tahové síly potřebné pro přetržení daných vzorků společně se směrodatnou odchylkou a jejich poměrné prodloužení při přetržení. Je patrné, že u všech zesíťovaných filmů byla naměřena vyšší tahová síla než u filmu bez síťovadla. Pouze u filmů č. 2, 3, 4 a 9 bylo zaznamenáno vyšší poměrné prodloužení. V porovnání s filmem síťovaným 2,0% GA nebyla naměřena vyšší tahová síla a poměrné prodloužení u žádného ze zhotovených filmů.

Z tabulky 6 je patrné, že všechny filmy síťované pomocí THPS mají vyšší teplotu smršťení než film bez síťovadla. Nejlepší hodnoty teploty smršťení byly naměřeny v případě filmu č. 7, kde byla naměřena teplota smršťení 56,0°C v podélném směru a 55,8°C ve směru příčném. Velmi dobré výsledky byly zjištěny i u filmu č. 8, kde byly zjištěny hodnoty 54,2°C v podélném směru a 54,8°C v příčném směru. Poměrně srovnatelné výsledky teplot smršťení v porovnání s filmem síťovaným 2,0% GA byly zjištěny u filmu č. 4. U ostatních zhotovených filmů byla naměřena teplota smršťení nižší.

V průběhu měření teplot smršťení docházelo u daných vzorků k určitým změnám, jako je prodloužení nebo smršťování vzorků. Zjištěné změny jsou uvedeny v tabulce 7 níže. Je patrné, že u všech zhotovených filmů, kromě filmů č. 4, 7 a 8, během prvních 4 minut měření při pokojové teplotě docházelo k prodloužení a to jak ve směru podélném tak i ve směru příčném. Od počátku zahřívání do teploty smršťení již k prodlužování vzorků nedocházelo. Z tabulky je taktéž patrné, že v podélném směru se filmy smršťovaly výrazněji než ve směru příčném. Smršťování probíhalo v příčném směru pomaleji než smršťování ve směru podélném. Teplota, při které bylo ukončeno smršťování, byla zpravidla mezi 75 a 80 °C, poté již u vzorků nedocházelo k žádným změnám.

Naměřené hodnoty teplot smršťení jak v podélném, tak i v příčném směru byly vyhodnoceny ve statistickém programu. Stejným způsobem byly vyhodnoceny i hodnoty tahové síly a poměrného prodloužení při přetržení. Pracovalo se ve statistickém programu Minitab 17 s 95% úrovní spolehlivosti.

Tabulka 7 – Změny filmů síťovaných THPS v příčném a podélném směru při stanovení teploty smrštění

Film	Prodloužení (-)/smrštění (+) filmu v podélném směru				Prodloužení (-)/smrštění (+) filmu v příčném směru			
	$T_0$ (mm)	$T_z - T_s$ (mm)	$T_s - T$ (mm)	$T - 80^\circ\text{C}$ (mm)	$T_0$ (mm)	$T_z - T_s$ (mm)	$T_s - T$ (mm)	$T - 80^\circ\text{C}$ (mm)
bez síťovadla	-1,8	0	+15,5 (T=77,4°C)	0	-4,0	-0,7	+2,0 (T=72°C)	0
1	-0,7	0	+8,0 (T=75°C)	0	-0,7	0	+5,0 (T=75°C)	0
2	-1,3	0	+8,7 (T=80°C)	0	-1,3	0	+6,0 (T=75°C)	0
3	-0,7	0	+10,0 (T=80°C)	0	-0,7	0	+8,0 (T=75°C)	0
4	0	0	+6,0 (T=80°C)	0	0	0	+7,7 (T=75°C)	0
5	-0,3	0	+8,7 (T=80°C)	0	-1,0	0	+5,0 (T=80°C)	0
6	-0,3	0	+9,4 (T=75°C)	0	-0,7	0	+6,0 (T=75°C)	0
7	0	0	+13,0 (T=80°C)	0	0	0	+7,4 (T=75°C)	0
8	0	0	+12,7 (T=80°C)	0	0	0	+6,7 (T=75°C)	0
9	-0,3	0	+8,4 (T=75°C)	0	-0,3	0	+6,5 (T=75°C)	0
s 2,0%GA	0	0	+14,0 (T=80°C)	0	0	0	+7,0 (T=70°C)	0

$T_0$  – 4 minuty bez záhřevu při pokojové teplotě;  $T_z$  – teplota, při které bylo započato zahřívání;  $T_s$  – teplota, při které se film začal smršťovat;  
 $T$  – teplota ukončení smršťování filmu

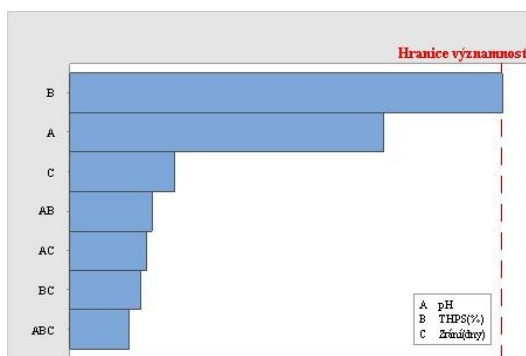
### 6.2.1 Teplota smrštění

- Teplota smrštění v podélném směru

Rovnice pro  $T_s$  v podélném směru má tvar:

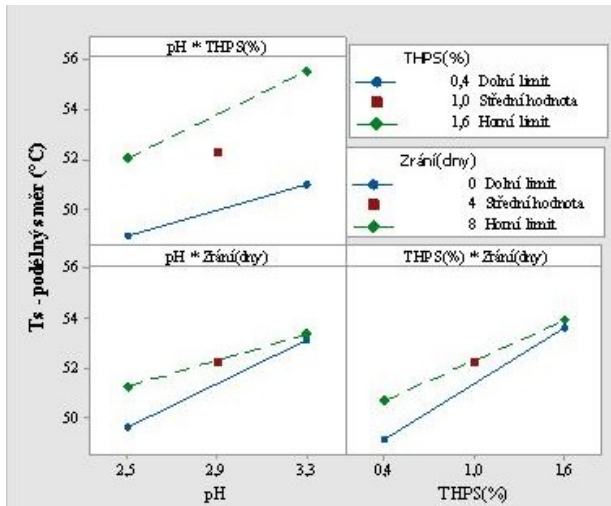
$$y = 42,76 + 1,708A - 3,844B + 0,06458C + 2,604AB + 0,0625AC + 0,6628BC - 0,2734ABC; \text{ korelační koeficient: } R^2 = 0,9308$$

Z následujícího obrázku 44 je patrné, že největší vliv na teplotu smrštění v podélném směru mělo množství THPS. Teplota smrštění byla taktéž ovlivněna hodnotou pH kolagenního gelu, přičemž doba zrání měla vliv nejmenší. Obrázku 45 zobrazuje vliv interakcí sledovaných faktorů na teplotu smrštění. Je zřejmé, že s rostoucími hodnotami sledovaných faktorů roste i teplota smrštění jednotlivých filmů. Žádný ze sledovaných faktorů teplotu smrštění nesnižoval. Z obrázku 46 je zjevné, že nejvyšší teplota smrštění byla naměřena u filmu obsahujícího maximální dávku THPS, vykazující nejvyšší hodnotou pH přičemž jeho doba zrání činila 0 dnů. Naopak nejnižší teplota smrštění byla zaznamenána u filmu s nejnižším množstvím použitého síťovadla, s minimální hodnotou pH a s nulovou dobou zrání. Jak již bylo zmíněno, tak teplota smrštění v podélném směru byla nejvíce ovlivněna množstvím THPS a hodnotou pH kolagenního gelu. Z toho důvodu jsou právě tyto dva sledované faktory vykresleny ve vzájemné závislosti na obrázku 47 pomocí vrstevnicového grafu. Je patrné, že nejvyšších teplot smrštění se dosahuje v oblasti maximálního pH s nejvyšším množstvím THPS. Je možné konstatovat, že pro dosažení teplot smrštění v podélném směru v rozmezí od 54 do 56°C je zapotřebí upravit pH kolagenního gelu alespoň na hodnotu 3, přičemž obsah použitého síťovadla bude okolo 1,25%. Doba zrání nebude nijak významně teplotu smrštění ovlivňovat.

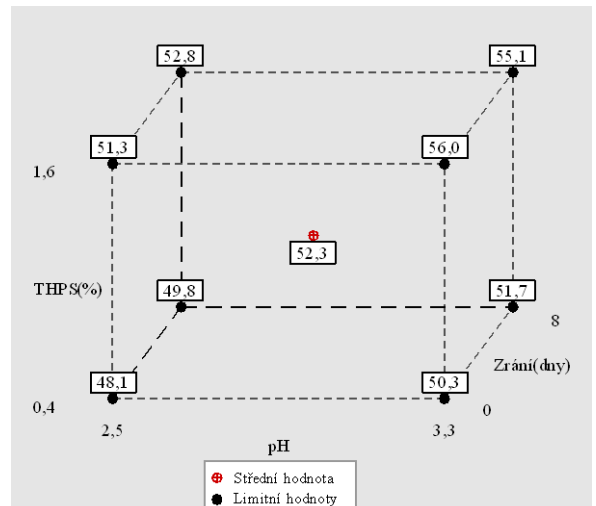


Obrázek 44 – Významnost sledovaných faktorů na  $T_s$  v podélném směru u filmů síťovaných THPS

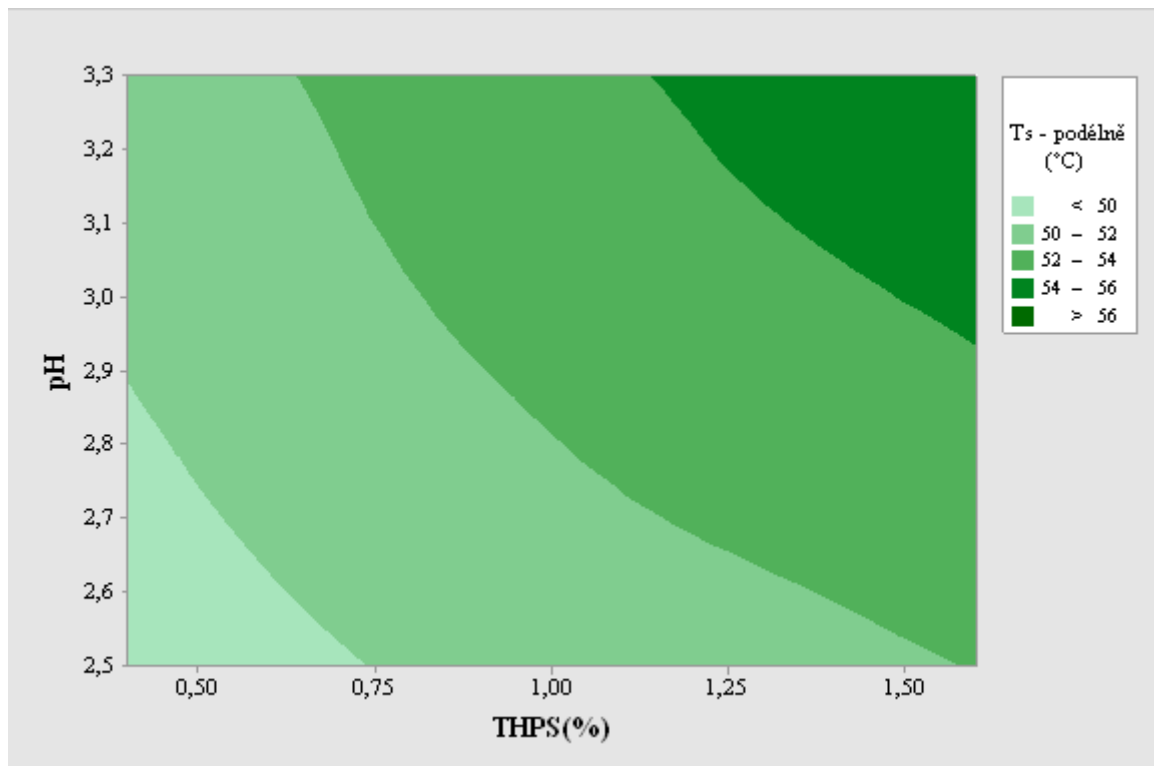




Obrázek 45 – Vliv interakcí sledovaných faktorů na Ts v podélném směru u filmů síťovaných THPS



Obrázek 46 – Vliv sledovaných faktorů na Ts v podélném směru v kubickém zobrazení u filmů síťovaných THPS



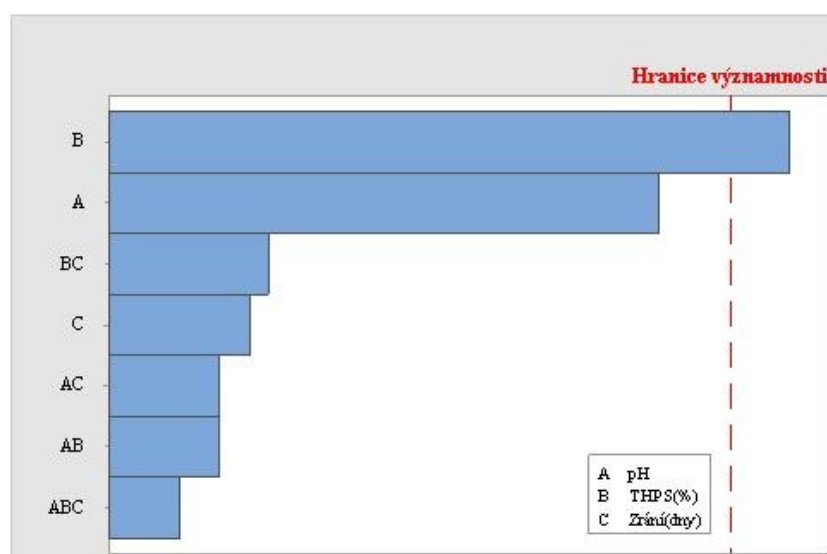
Obrázek 47 – Vrstevnicový graf vlivu pH a THPS na Ts v podélném směru

- Teplota smrštění v příčném směru

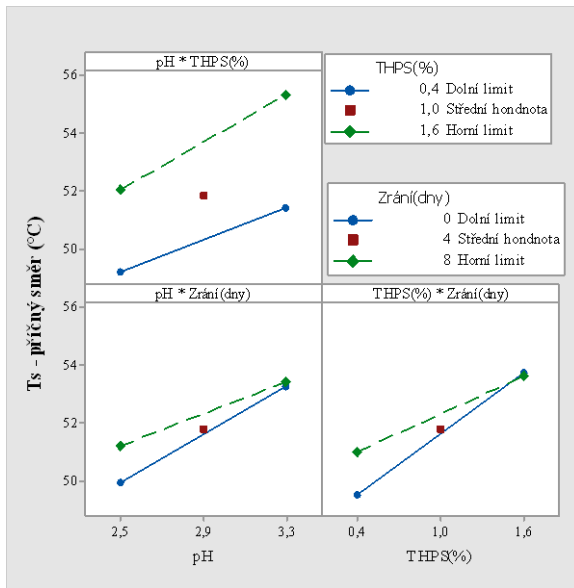
Rovnice pro  $T_s$  v příčném směru má tvar:

$$y = 41,57 + 2,25A - 1,937B + 0,774C + 1,875 AB - 0,1563 AC + 0,01823BC - 0,07812 ABC; \text{ korelační koeficient: } R^2 = 0,9344$$

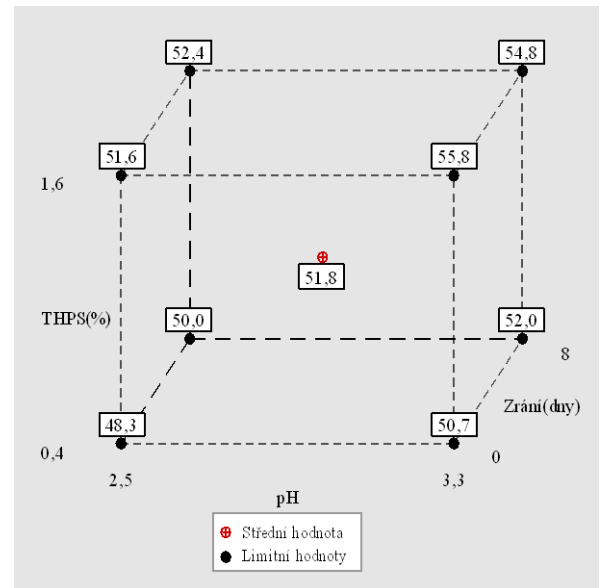
Na obrázku 48 níže je zřejmé, že největší vliv na teplotu smrštění v příčném směru má opět množství THPS, přičemž danou teplotu ovlivňuje i pH kolagenního gelu. Vliv doby zrání je opět zanedbatelný. Z obrázku 49, který zobrazuje vliv interakcí sledovaných faktorů na teplotu smrštění, lze vyčíst, že s rostoucími hodnotami sledovaných faktorů roste i teplota smrštění jednotlivých filmů. Žádný ze sledovaných faktorů teplotu smrštění v příčném směru nesnižoval. Na obrázku 50 je zjevné, že nejvyšší teplota smrštění byla naměřena u filmu, u něhož bylo upraveno pH na maximální hodnotu, obsahujícího maximální dávku THPS s nulovou dobou zrání. Naopak nejnižší teplota smrštění byla zaznamenána u filmu s nejnižším množstvím THPS s minimální hodnotou pH a s žádnou dobou zrání. Byl zhotoven vrstevnicový graf znázorněný na obrázku 51, kde je vynesena závislost pH kolagenního gelu na množství THPS. Na základě grafu je možné konstatovat, že pro dosažení teplot smrštění v příčném směru v rozmezí od 54 do 55°C je dostačující použít množství THPS již okolo 1,25% přičemž pH kolagenního gelu bude alespoň 3. Pro dosažení vyšších teplot smrštění je zapotřebí použít THPS v množství alespoň okolo 1,5% s hodnotou pH okolo 3,3.



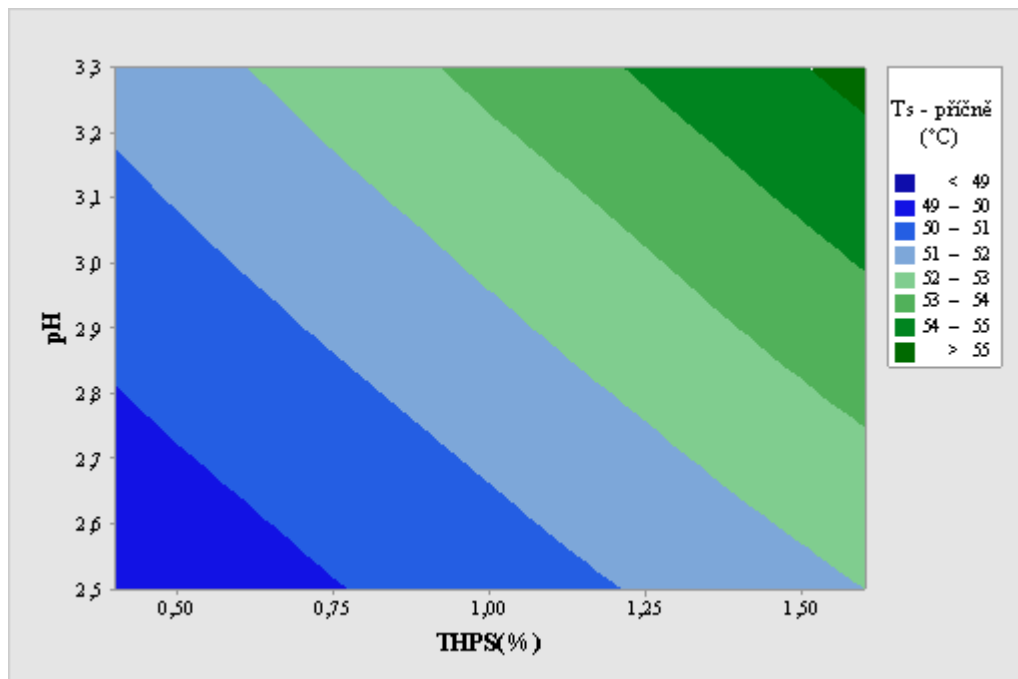
Obrázek 48 – Významnost sledovaných faktorů na  $T_s$  v příčném směru u filmů síťovaných THPS



Obrázek 49 – Vliv interakcí sledovaných faktorů na Ts v příčném směru u filmů síťovaných THPS



Obrázek 50 – Vliv sledovaných faktorů na Ts v příčném směru v kubickém zobrazení u filmů síťovaných THPS



Obrázek 51 – Vrstevníkový graf vlivu pH a THPS na Ts v příčném směru

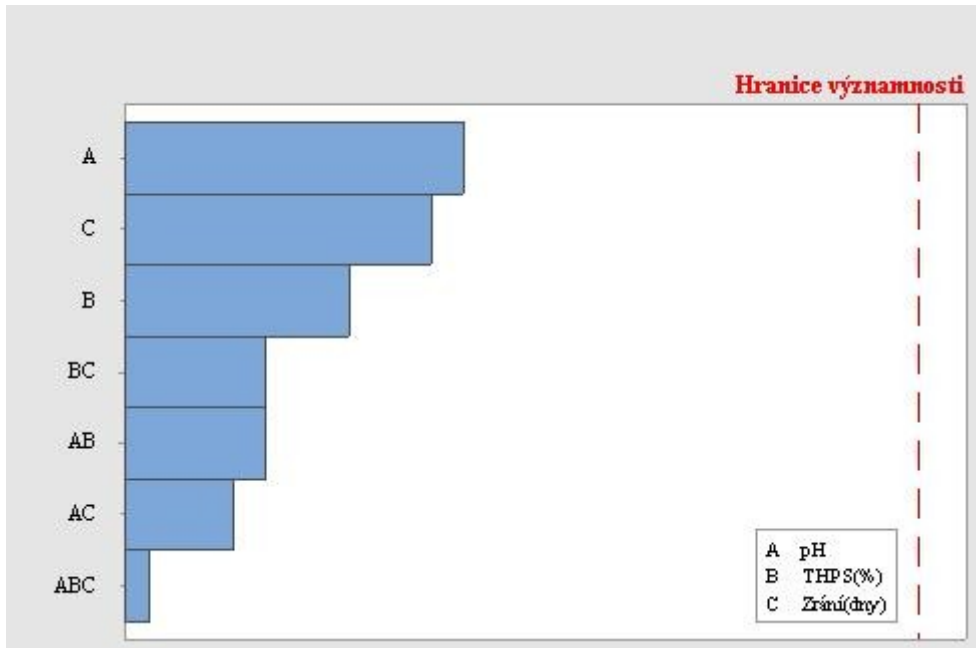
### 6.2.2 Mechanické parametry

- Tahová síla při přetržení

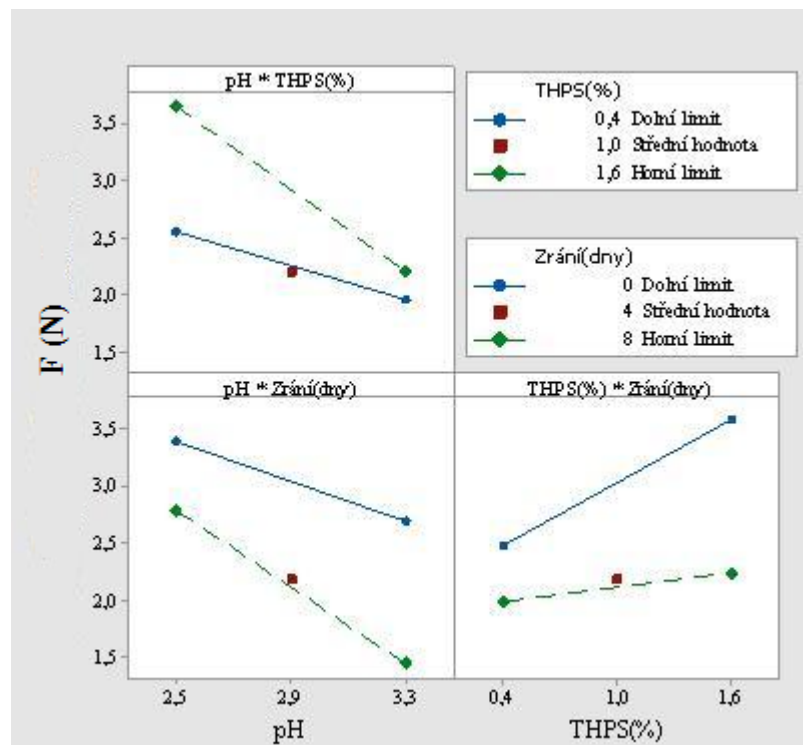
Rovnice pro tahovou sílu při přetržení má tvar:

$$y = 1,65 + 0,1667A + 3,937B + 0,3807 C - 1,402AB - 0,1406AC - 0,20186BC + 0,03906ABC; \text{ korelační koeficient: } R^2 = 0,8141$$

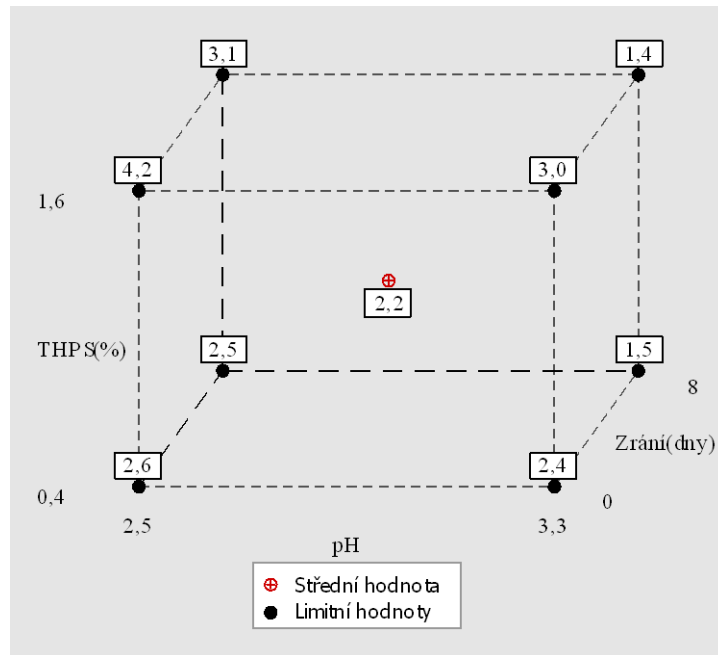
Bylo zjištěno, že největší vliv na tahovou sílu při přetržení má pH kolagenního gelu, zatímco vliv přídavku THPS je zanedbatelný, jak znázorňuje obrázek 52. Na obrázku 53, který značí vliv interakcí sledovaných faktorů na tahovou sílu, je zjevné, že tahová síla v případě maximálního a minimálního přídavku THPS klesá s rostoucí hodnotou pH. Podobný jev je patrný i v případě interakce pH kolagenního gelu a doby zrání. V případě doby zrání 0 i 8 dnů tahová síla s rostoucím pH klesá, přičemž se v případě doby zrání 0 dnů dosahuje vyšší tahové síly než v případě doby zrání 8 dnů. V případě interakce THPS a doby zrání bylo zjištěno, že s rostoucím množstvím THPS s minimální dobou zrání tahová síla roste až přes hodnoty 3,5 N. V případě maximální doby zrání tahová síla s rostoucím množstvím THPS mírně roste, ale nedosahuje tak výrazných tahových sil. Je tedy zřejmé, že delší doba zrání způsobuje snížení tahových sil potřebných pro přetržení a že zvýšením hodnoty pH tahovou sílu nezvýšíme. Uvedené poznatky jsou graficky znázorněny na obrázku 54, kde je zjevné, že nejvyšší tahová síla byla zaznamenána v případě filmu s minimální hodnotou pH, s maximálním obsahem THPS a dobou zrání 0 dnů. Naopak nejnižší tahová síla byla naměřena u filmu s nejvyšším pH, s nejvyšším obsahem THPS a s dobou zrání 8 dnů. Byl zhotoven vrstevnicový graf znázorněný na obrázku 55, kde je vynesena závislost doby zrání kolagenního gelu na jeho hodnotě pH. Z obrázku lze vyčíst, že nejvyšších tahových sil při přetržení se dosahuje v případě, že kolagenní gel má minimální hodnotu pH a žádnou dobu zrání.



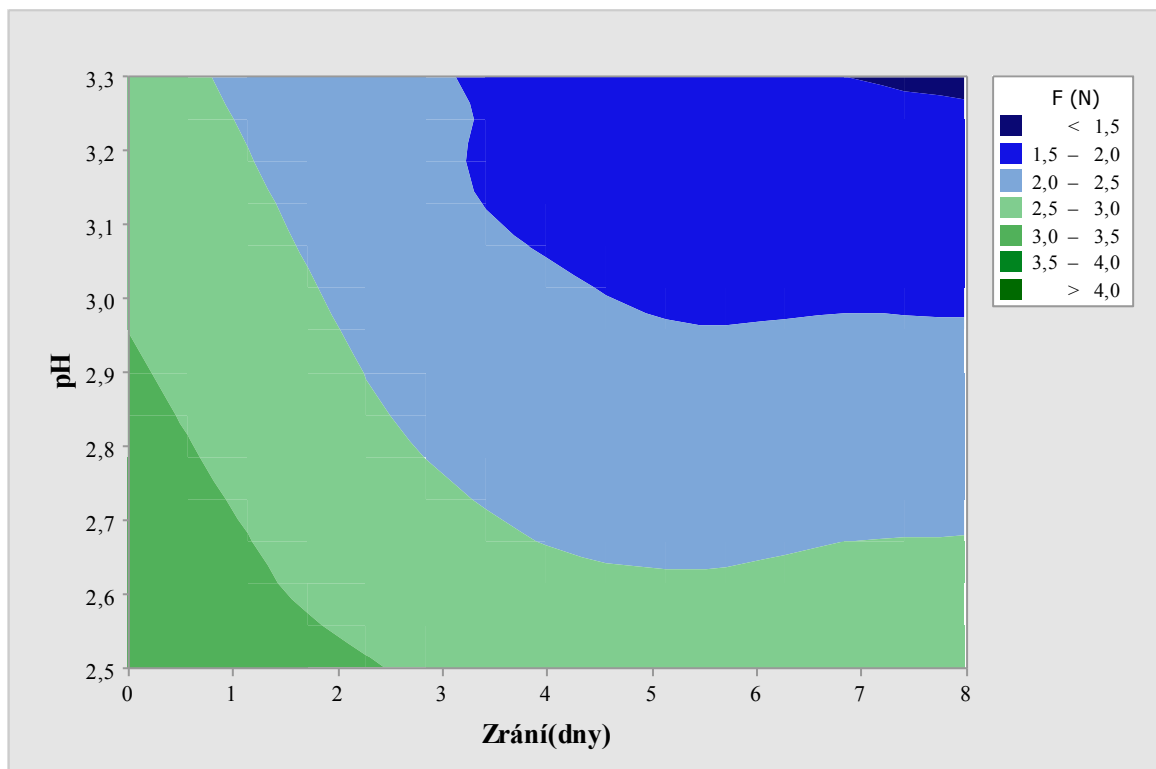
Obrázek 52 – Významnost sledovaných faktorů na tahovou sílu při přetržení u filmů síťovaných THPS



Obrázek 53 – Vliv interakcí sledovaných faktorů na tahovou sílu při přetržení u filmů síťovaných THPS



Obrázek 54 – Vliv sledovaných faktorů na tahovou sílu při přetržení v kubickém zobrazení u filmů síťovaných THPS



Obrázek 55 – Vrstevnicový graf vlivu pH a doby zrání na tahovou sílu při přetržení

- Poměrné prodloužení při přetržení

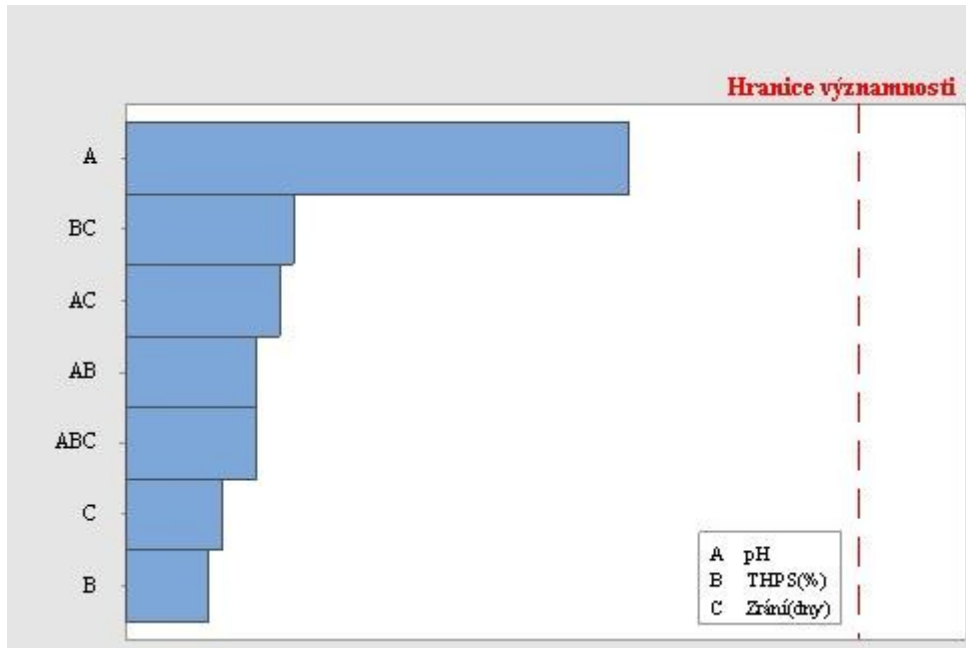
Rovnice pro poměrné prodloužení při přetržení má tvar:

$$y = 69,8 + 6,333A + 107,4B + 21,59 C - 32,71AB - 6,969AC - 13,89BC + 4,063ABC$$

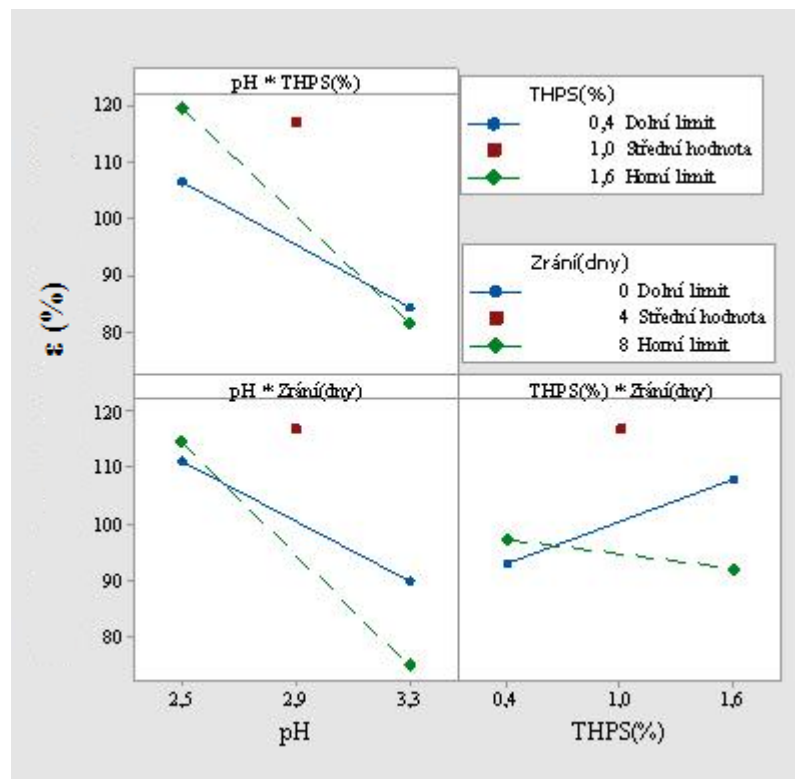
Korelační koeficient:  $R^2 = 0,6727$

Díky obrázku 56 bylo zjištěno, že nejvýraznější vliv na poměrné prodloužení při přetržení má hodnota pH kolagenního gelu, přičemž vliv přídavku THPS a doby zrání je v tomto případě srovnatelný. Pomocí grafů znázorněných na obrázku 57 je možné konstatovat, že s rostoucí hodnotou pH poměrné prodloužení klesá. Nejvyšší hodnoty prodloužení (okolo 120%) byly naměřeny u filmů s maximálním obsahem THPS a s minimální hodnotou pH. V případě interakce doby zrání s obsahem THPS je patrné, že při minimální době zrání poměrné prodloužení roste s rostoucím obsahem THPS. Naopak v případě, že je doba zrání maximální, poměrné prodloužení s rostoucím obsahem THPS klesá. Je tedy možné konstatovat, že delší doba zrání způsobuje snížení poměrného prodloužení při přetržení a že zvýšením hodnoty pH poměrné prodloužení nezvýšíme. Na obrázku 58 je zřejmé, že nejvyšší poměrné prodloužení bylo naměřeno u filmu s maximálním obsahem THPS, s minimální dobou zrání, přičemž hodnota pH kolagenního gelu je taktéž minimální. Naopak k nejmenšímu protažení došlo u filmu s minimálním množstvím THPS, s maximální dobou zrání a s maximální hodnotou pH. Obrázek 59 představuje závislost přídavku THPS na pH kolagenního gelu. I zde se potvrdilo, že vyšší hodnoty pH způsobují výrazný pokles poměrného prodloužení, zatímco u filmů s vyšším obsahem THPS dochází k poměrně vysokým hodnotám prodloužení.

Zpracováním výsledků ve statistickém programu bylo zjištěno, že film, u kterého byla zaznamenána nejvyšší tahová síla potřebná pro přetržení, zároveň vykazuje i nejvyšší poměrné prodloužení při přetržení. Naopak u filmu, u kterého docházelo k nejmenšímu prodloužení, byla zapotřebí nejmenší tahová síla potřebná pro přetržení.

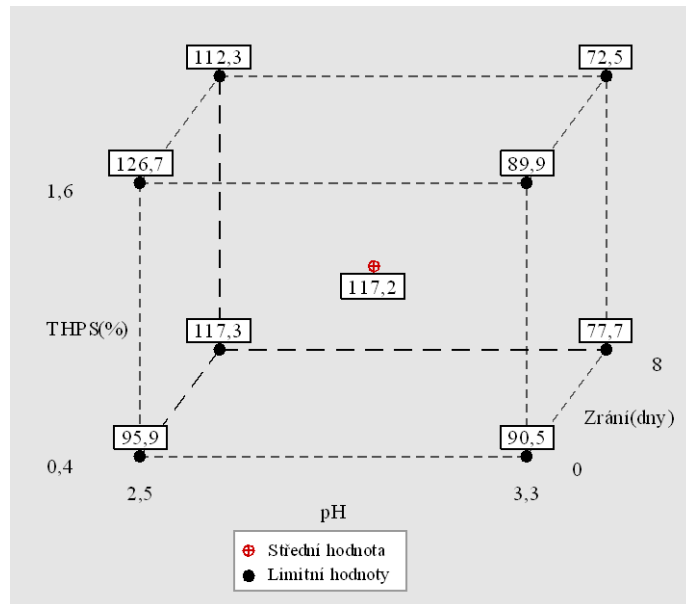


Obrázek 56 – Významnost sledovaných faktorů na poměrné prodloužení při přetržení u filmů síťovaných THPS

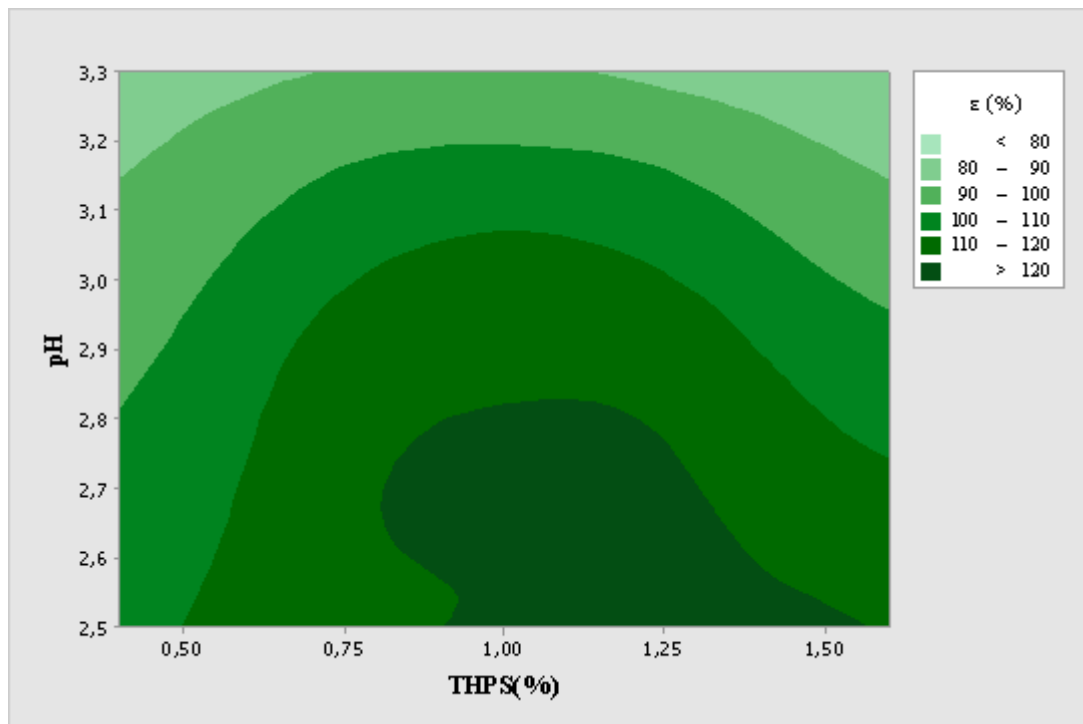


Obrázek 57 – Vliv interakcí sledovaných faktorů na poměrné prodloužení při přetržení u filmů síťovaných THPS





Obrázek 58 – Vliv sledovaných faktorů na poměrné prodloužení při přetržení v kubickém zobrazení u filmů síťovaných THPS



Obrázek 59 – Vrstevnicový graf vlivu pH a množství THPS na poměrné prodloužení při přetržení

### 6.2.3 Bobtnací zkoušky

U všech připravených filmů byly provedeny bobtnací zkoušky a to jak při teplotě 26°C, tak i při teplotě 80°C. V tabulkách 8 a 9 můžeme pozorovat zjištěné hodnoty stupně zbobtnání a změny plochy u všech zhotovených filmů síťovaných pomocí THPS v porovnání s filmem bez síťovadla a filmem síťovaným 2,0% GA.

V průběhu inkubace při teplotě 26°C se vzorky pouze mírně kroutily a pluly po hladině vody. V průběhu inkubace při teplotě 80°C se vzorky ihned po vložení do lázně zkroutily a smrštily do ruličky, pouze vzorky z filmů č. 4, 7 a 9 se po 6 minutách inkubace mírně vyrovnaly. Vzorky z ostatních filmů (tj. film č. 1, 2, 3, 5, 6, 8) si držely srulovaný tvar v průběhu celé zkoušky. Po provedení zkoušky se jevily jako nejvíce kvalitní právě vzorky filmů č. 4, 7 a 9. Jak již bylo zmíněno výše (str. 41), kolagenní hmota přípravná pro film č. 8 byla velmi obtížně zpracovatelná. Během válcování hmoty na destičky se tvořily trhliny, které po následném vysušení filmu ovlivnily kvalitu zhotoveného filmu. V průběhu bobtnací zkoušky při 80°C byla struktura vzorka velmi špatná. Vzorek měl po 6 min inkubace tendenci se trhat a po 10 min inkubace se objevily ve vzorku patrné trhliny. Po provedení zkoušky nebylo možné vzorek zhodnotit jelikož došlo k jeho rozpadu.

Naměřené hodnoty stupně zbobtnání jsou znázorněny na obrázcích 60–63. V porovnání s filmem bez síťovadla bylo zjištěno, že všechny zesíťované filmy bobtnají při obou teplotách méně. V případě filmu síťovaného 2,0% GA bylo zjištěno, že při obou teplotách dochází u filmů č. 4, 7 a 8 k menšími zbobtnání. U ostatních filmů byly hodnoty stupně zbobtnání větší.

Obrázky 64–67 znázorňují závislost změny plochy na době inkubace u všech filmů při obou teplotách měření. Bylo zjištěno, že u všech zesíťovaných filmů byla změna plochy naměřena menší v porovnání s filmem bez síťovadla a to jak při teplotě 26°C, tak i při teplotě 80°C. U filmu síťovaného 2,0% GA nedocházelo při teplotě 26°C k žádné změně plochy. Stejně výsledky při totožné teplotě byly zjištěny i u filmů č. 4, 7 a 8. V porovnání s filmem s GA došlo k menší změně plochy opět pouze u filmů č. 4, 7 a 8. U ostatních filmů byla změna plochy zaznamenána vyšší.

Pomocí provedených zkoušek bylo zjištěno, že film č. 7 (pH: 3,3; obsah THPS: 1,6%; doba zrání: 0 dnů) vykazuje nejlepší výsledky bobtnacích zkoušek.

Tabulka 8 – Naměřené hodnoty stupně zbobtnání a změny plochy při 26°C a 80°C u filmů č. 1–4 síťovaných THPS a filmu bez síťovadla

Film	Doba inkubace (min)	Test při 26°C		Test při 80°C	
		SZ (násobek)	$\Delta S$ (%)	SZ (násobek)	$\Delta S$ (%)
Bez síťovadla	1	5,4	5,0	6,2	-66,3
	6	11,5	20,8	11,9	-62,5
	16	11,9	20,8	11,3	-62,5
	36	10,8	20,8	8,2	-68,5
	60	9,6	20,8	10,8	-68,5
1	1	2,7	2,5	3,8	-67,5
	6	2,9	5,0	4,0	-67,0
	16	3,3	7,6	4,3	-64,3
	36	3,5	10,3	4,6	-61,5
	60	3,8	10,3	4,7	-64,3
2	1	2,2	2,5	4,0	-67,5
	6	2,6	2,5	4,5	-64,3
	16	3,0	5,0	4,1	-64,3
	36	3,2	5,0	4,2	-62,9
	60	3,6	7,6	4,5	-62,9
3	1	2,2	0	4,0	-64,3
	6	2,5	2,5	3,8	-62,9
	16	2,9	2,5	3,9	-62,9
	36	3,2	5,0	4,1	-61,5
	60	3,5	5,0	4,4	-61,5
4	1	2,2	0,0	2,6	-61,5
	6	2,2	0,0	2,9	-53,1
	16	2,3	0,0	3,1	-53,1
	36	2,5	0,0	3,2	-51,3
	60	2,5	0,0	3,3	-49,0

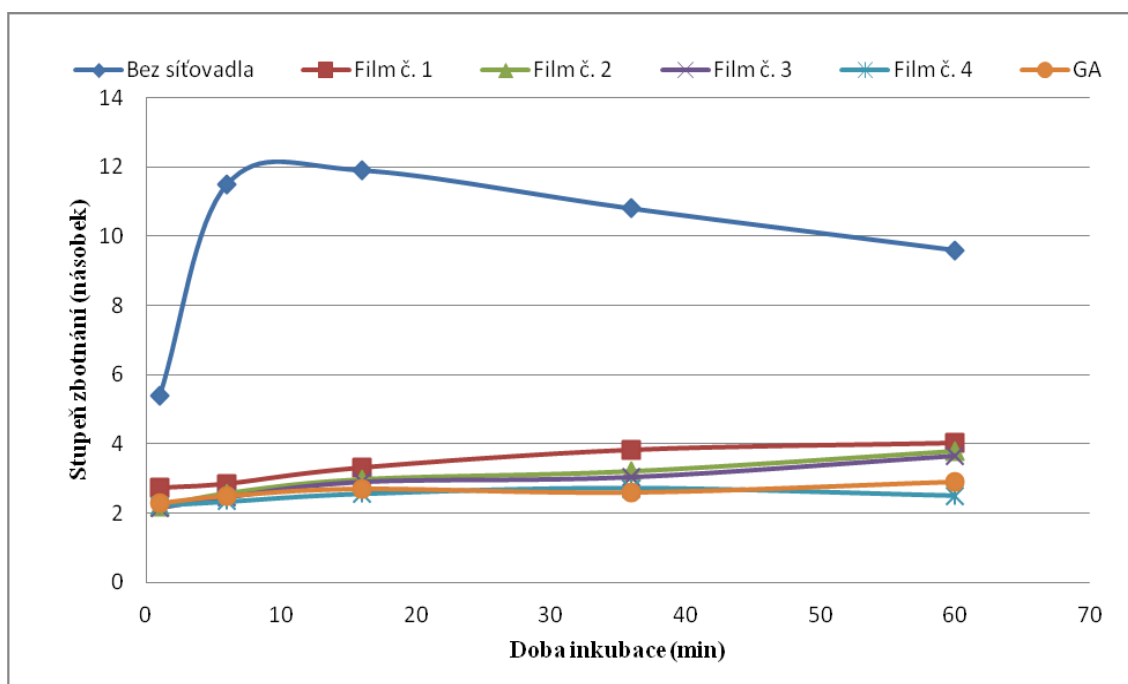
SZ – stupeň zbobtnání;  $\Delta S$  – změna plochy

Tabulka 9 – Naměřené hodnoty stupně zbobtnání a změny plochy při 26°C a 80°C u filmů č. 5–9 síťovaných THPS a filmu s 2,0% GA

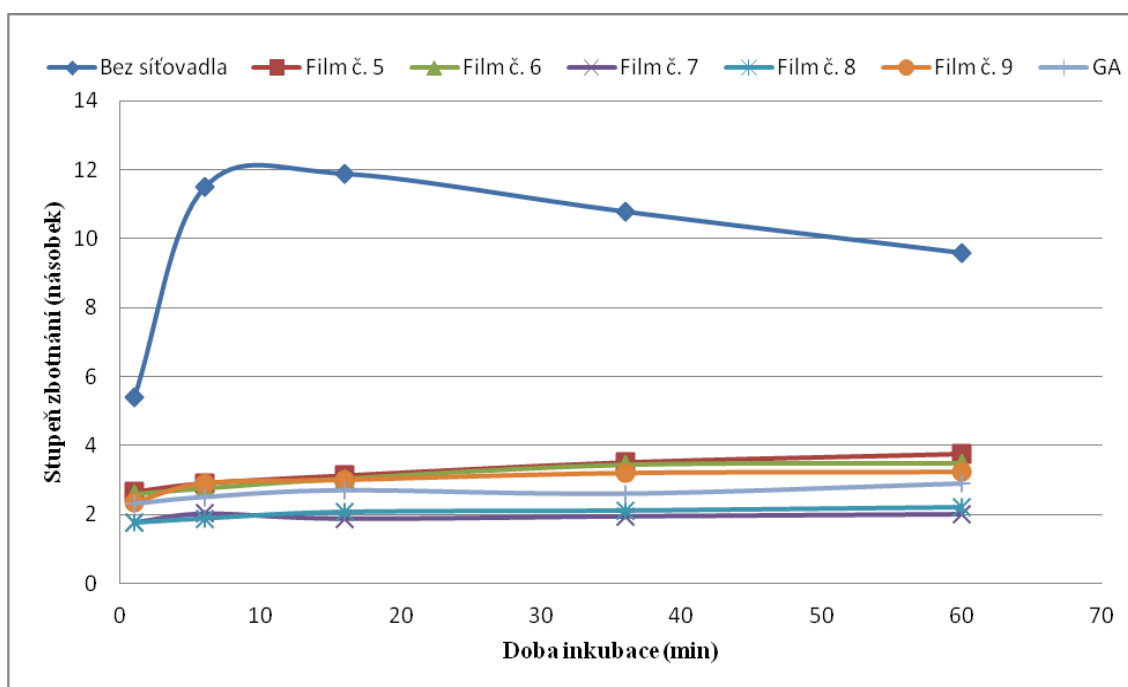
Film	Doba inkubace (min)	Test při 26°C		Test při 80°C	
		SZ (násobek)	$\Delta S$ (%)	SZ (násobek)	$\Delta S$ (%)
5	1	2,7	0,0	3,7	-67,0
	6	2,9	0,0	4,0	-64,3
	16	3,1	2,5	4,1	-64,3
	36	3,5	5,0	4,4	-62,9
	60	3,8	7,6	4,5	-62,9
6	1	2,6	0,0	3,6	-67,0
	6	2,8	2,5	3,8	-67,5
	16	3,0	2,5	4,0	-62,9
	36	3,4	5,0	4,2	-61,5
	60	3,5	5,0	4,3	-61,5
7	1	1,8	0,0	2,3	-53,1
	6	2,0	0,0	2,5	-49,0
	16	1,9	0,0	2,8	-49,0
	36	2,0	0,0	2,9	-47,5
	60	2,0	0,0	3,1	-46,0
8	1	1,8	0,0	2,9	-61,0
	6	1,9	0,0	3,1	-58,0
	16	2,1	0,0	3,3	-53,1
	36	2,1	0,0	3,2	-51,3
	60	2,2	0,0	3,2	-48,0
9	1	2,3	0,0	3,2	-67,0
	6	2,9	0,0	3,5	-64,3
	16	3,0	0,0	4,0	-62,9
	36	3,2	2,5	4,1	-61,5
	60	3,2	2,5	4,2	-58,8
s 2,0% GA	1	2,3	0,0	2,4	-61,5
	6	2,5	0,0	2,7	-61,5
	16	2,7	0,0	2,9	-61,5
	36	2,6	0,0	3,3	-58,8
	60	2,9	0,0	3,5	-58,8

SZ – stupeň zbobtnání;  $\Delta S$  – změna plochy

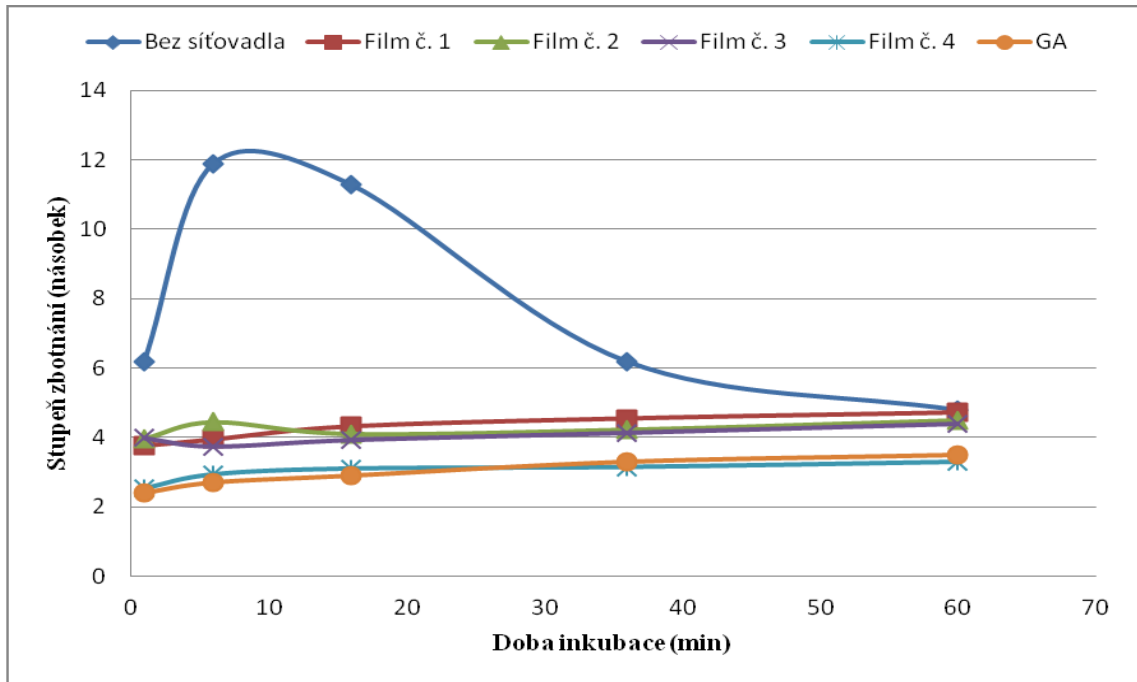
Stupeň zbobtnání filmů č. 1–4 a filmů č. 5–9 při obou teplotách měření znázorňují obrázky 60–63 níže ve srovnání s filmem bez síťovadla a s filmem s 2,0% GA.



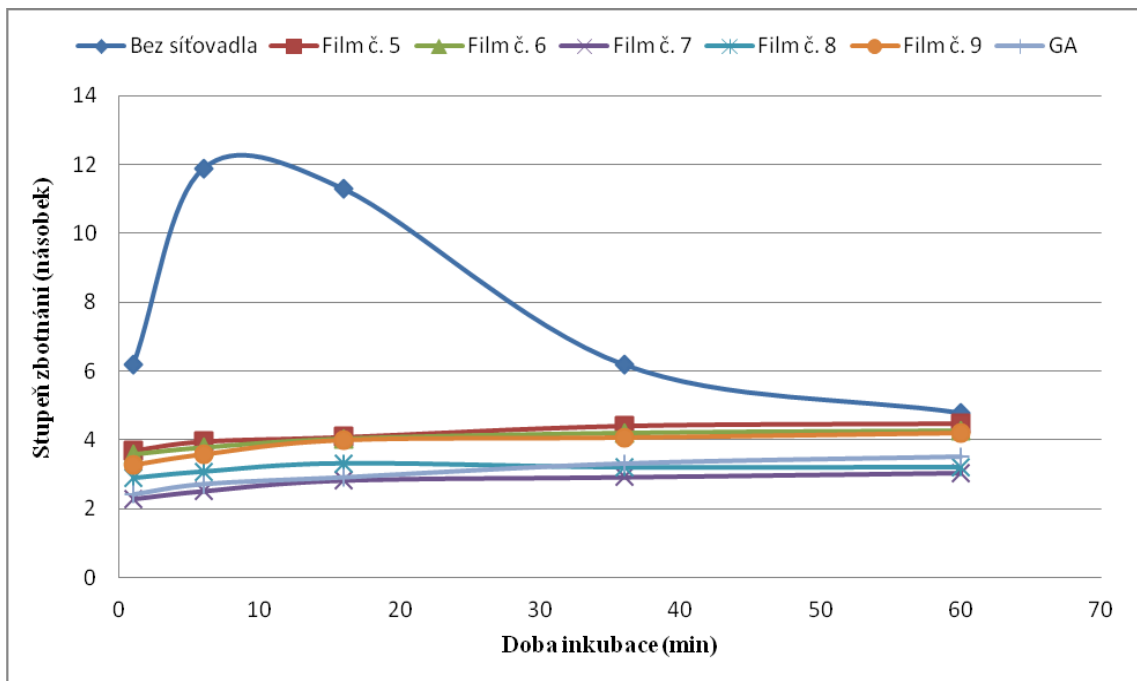
Obrázek 60 – Závislost stupně zbobtnání na době inkubace u filmů č. 1–4 síťovaných THPS při teplotě 26°C



Obrázek 61 – Závislost stupně zbobtnání na době inkubace u filmů č. 5–9 síťovaných THPS při teplotě 26°C

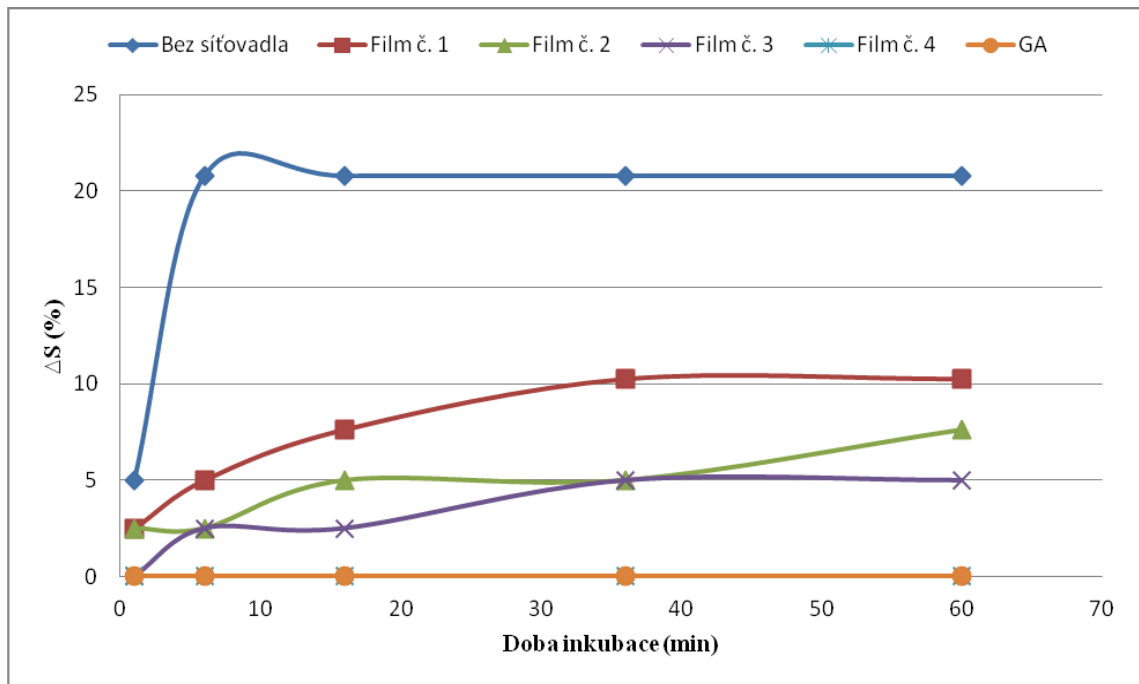


Obrázek 62 – Závislost stupně zbotnění na době inkubace u filmů č. 1–4 síťovaných THPS při teplotě 80°C

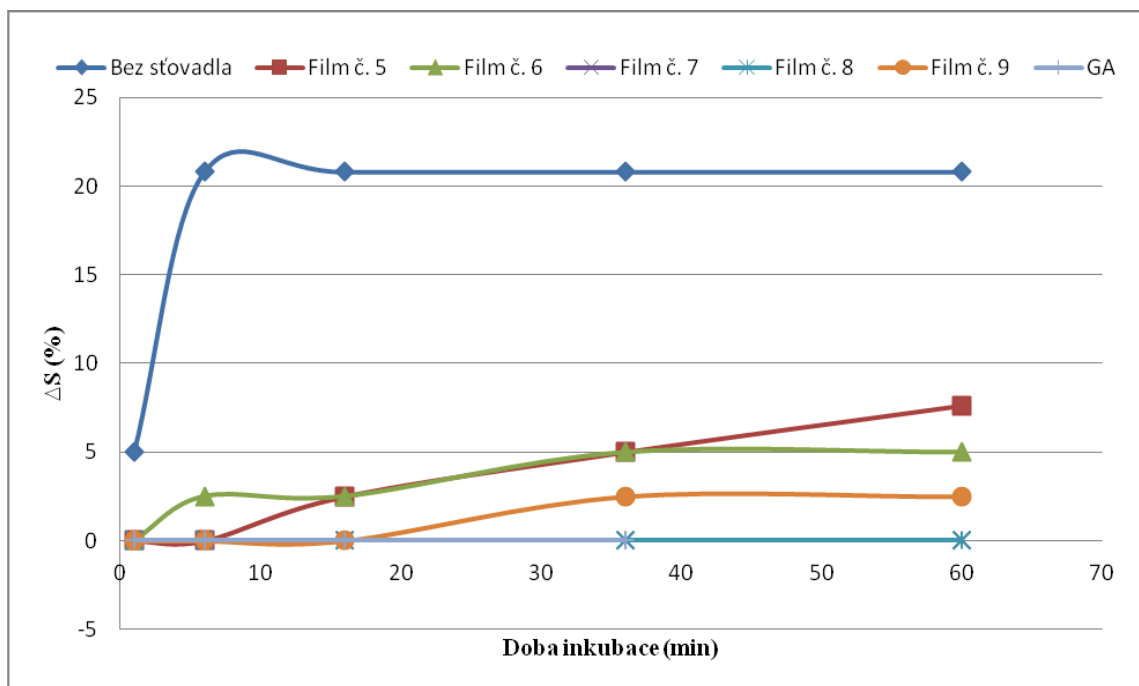


Obrázek 63 – Závislost stupně zbotnění na době inkubace u filmů č. 5–9 síťovaných THPS při teplotě 80°C

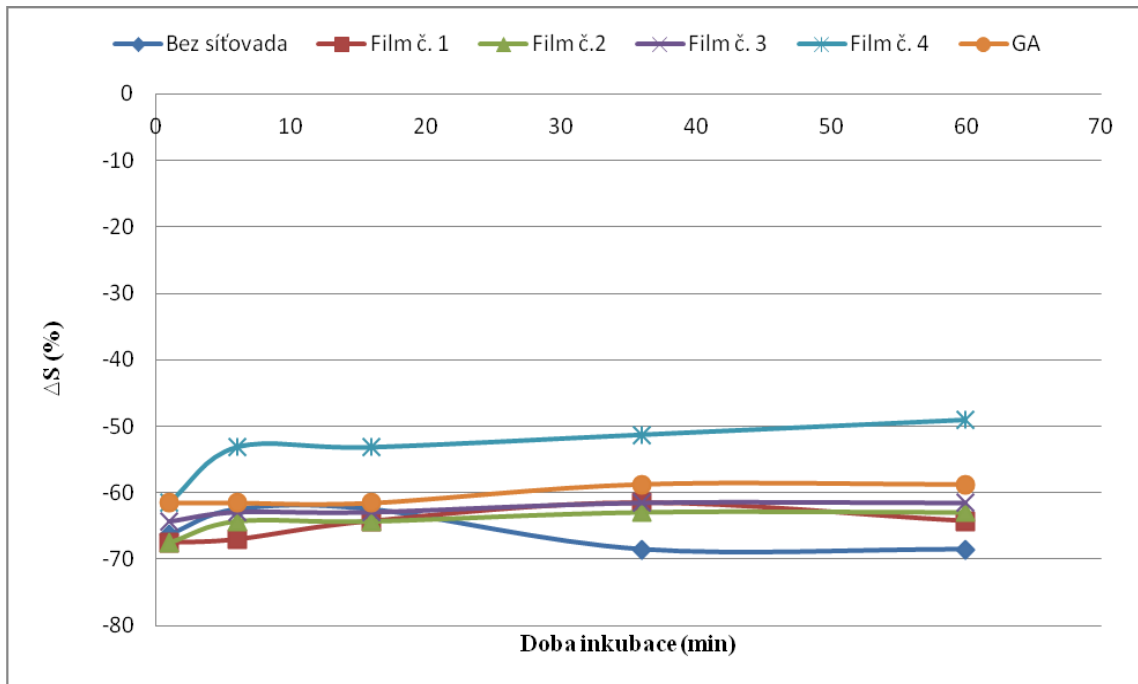
Změna plochy filmů č. 1–4 a filmů č. 5–9 při obou teplotách měření znázorňují obrázky 64–67 níže ve srovnání s filmem bez síťovadla a s filmem s 2,0% GA.



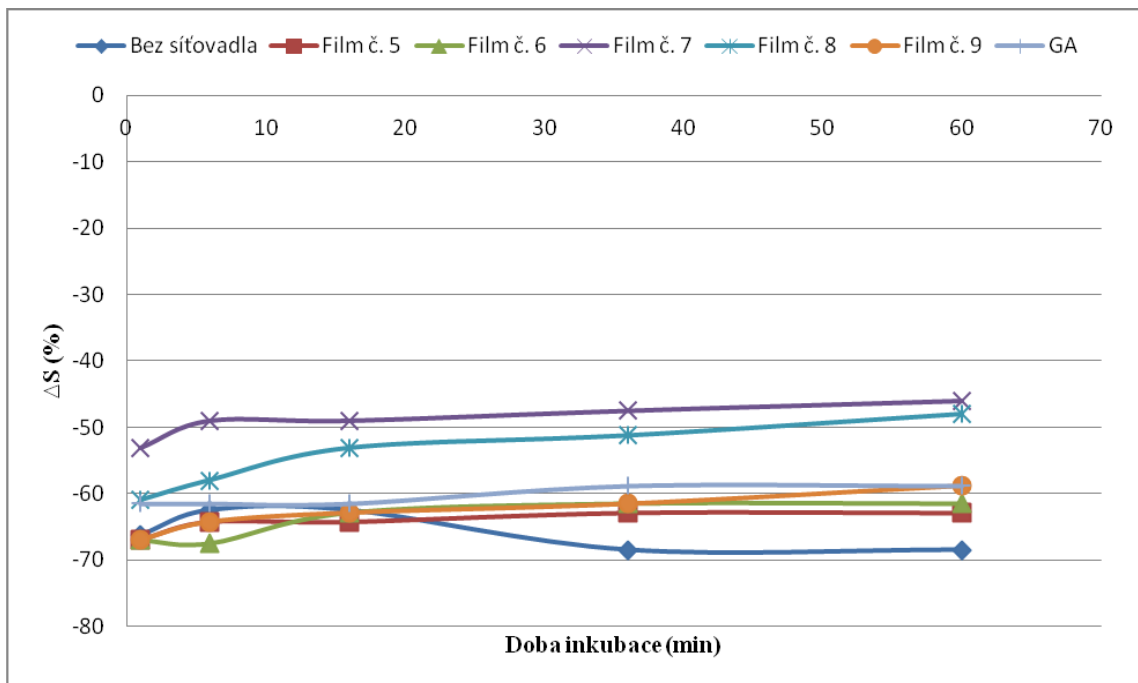
Obrázek 64 – Závislost změny plochy na době inkubace u filmů č. 1–4 síťovaných THPS při teplotě 26°C



Obrázek 65 – Závislost změny plochy na době inkubace u filmů č. 5–9 síťovaných THPS při teplotě 26°C



Obrázek 66 – Závislost změny plochy na době inkubace u filmů č. 1–4 síťovaných THPS při teplotě 80°C

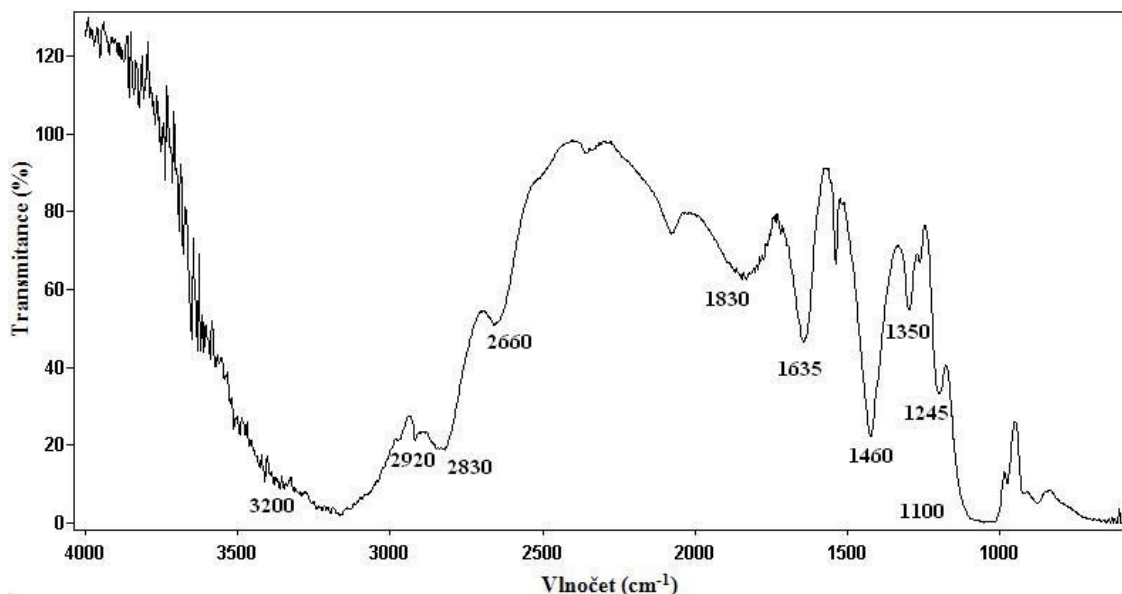


Obrázek 67 – Závislost změny plochy na době inkubace u filmů č. 5–9 síťovaných THPS při teplotě 80°C



### 6.2.4 FTIR

Ke srovnání bylo naměřeno spektrum samotného síťovadla THPS. Naměřené spektrum je patrné níže na obrázku 68. Ve spektru jsou zřejmé, následující absorpční pásy:  $3200\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{OH}$ );  $2920\text{ cm}^{-1}$  a  $2830\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2-$ );  $1830\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ );  $1635\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{H}_2\text{O}$ );  $1460$ ,  $1350$  a  $1245\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}-\text{P}$ );  $1100\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Stejné absorpční pásy zaznamenal také Ismail a Mieneni [20, 41].



Obrázek 68 – IČ spektrum THPS

V tabulce 10 jsou zaznamenány rozdíly v charakteristických pásích u filmů síťovaných pomocí THPS v porovnání s filmem bez síťovadla. Naměřená IČ spektra všech zhotovených filmů jsou podobná s výskytem všech charakteristických absorpčních pásů nativního kolagenu, což značí, že nedošlo k porušení sekundární struktury kolagenu; totéž uvádí i Sionkowski [43].

Byly zaznamenány následující odlišnosti:

- Slabší intenzita píku oproti filmu bez síťovadla byla zjištěna při vlnové délce  $2930\text{ cm}^{-1}$  – přiřazení  $-\text{CH}_2-$
- Slabší intenzita píku oproti filmu bez síťovadla byla zaznamenána při vlnové délce  $1635\text{ cm}^{-1}$  – přiřazení  $-\text{CO}-\text{NH}-$
- Při vlnočtu  $1555\text{ cm}^{-1}$  byla pozorována nižší intenzita píku ve spektrech všech zhotovených filmů

- Slabší intenzita píku oproti filmu bez síťovadla byla zjištěna při vlnové délce  $1456\text{ cm}^{-1}$  – přiřazení  $-\text{CH}_2-$  a  $-\text{CH}_3$
- Výrazné zvětšení píku oproti filmu bez síťovadla bylo zaznamenanáno při vlnové délce  $1400\text{ cm}^{-1}$
- V oblasti  $1040\text{ cm}^{-1}$  byla zjištěna u všech filmů vyšší intenzita píku v porovnání s filmem bez síťovadla – přiřazení  $\text{R}-\text{OH}$
- U všech zhotovených filmů se objevil nový pík při vlnočtu  $848\text{ cm}^{-1}$  – vibrace  $\text{CN}$

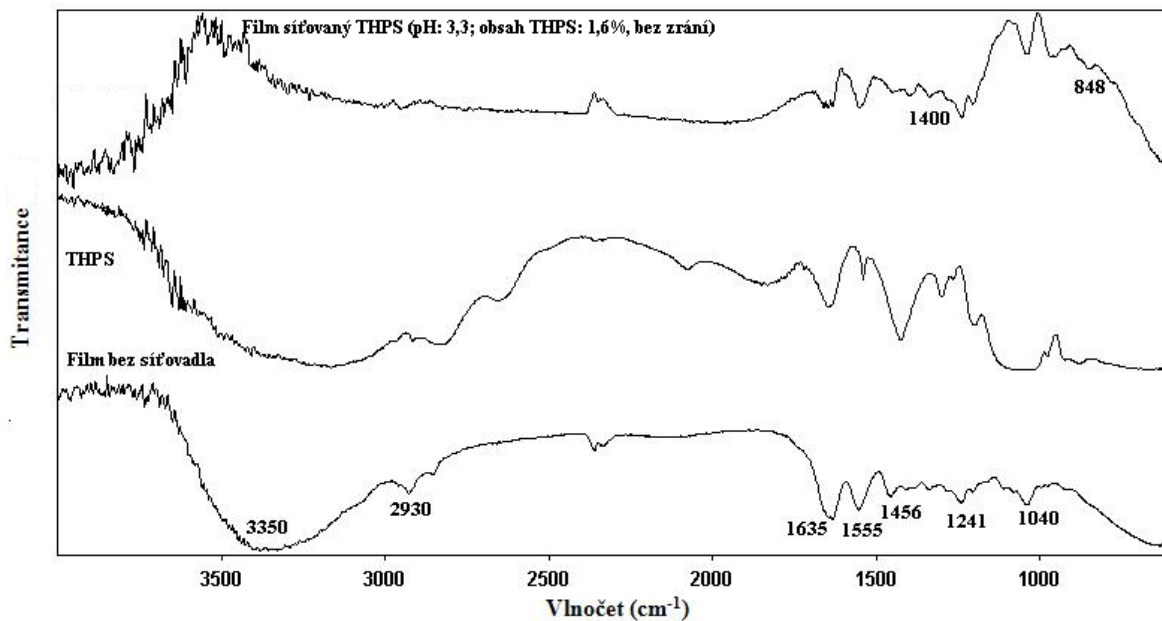
Pomocí IČ spekter byly zjištěny určité změny v intenzitě nebo objevu píků u filmů s THPS v porovnání s filmem bez síťovadla. Bylo zjištěno, že u všech filmů se objevil nový pík při vlnočtu  $848\text{ cm}^{-1}$ , který značí vibrace  $\text{CN}$ . Nejsilnější intenzita píku byla zaznamenána v případě filmů č. 3, 4, 7, 8 a 9, kde byl nejvyšší obsah použitého síťovadla. Naopak v případě ostatních filmů byla intenzita nově vzniklého píku výrazně nižší. Dále byla zaznamenána vyšší intenzita píků při vlnočtu  $1040\text{ cm}^{-1}$ . Tato skutečnost je přisuzována tomu, že při síťování kolagenu s THPS zůstávají některé  $-\text{OH}$  skupiny v THPS nezreagované a tudíž je obsah těchto skupin v zesíťovaném kolagenu vyšší. Při vlnočtu  $1555\text{ cm}^{-1}$  byla pozorována nižší intenzita píků u zesíťovaných filmů a to proto, že došlo ke snížení obsahu  $-\text{NH}_2$  skupin v kolagenu, které reagovaly s použitým síťovadlem. Dále byla zaznamenána vyšší intenzita píků při vlnové délce  $1400\text{ cm}^{-1}$ . Vymizení nebo slabší intenzita píku v oblasti  $3350\text{ cm}^{-1}$  značí, že v průběhu síťující reakce kolagen ztratil vodu, která na něj byla vázaná. Tuto skutečnost pozoroval i Sionkowski [43]. Tyto vzniklé změny značí, že mezi kolagenními filmy a použitým síťovadlem došlo k určitým interakcím.

Reakce mezi THPS a kolagenem je s největší pravděpodobností uskutečněna prostřednictvím  $-\text{NH}_2$  skupiny kolagenu a  $-\text{OH}$  skupiny THPS za vzniku  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$  vazby. Další možnou interakcí je vznik  $\text{H}$ -můstků mezi  $-\text{OH}$  skupinou THPS a  $-\text{COOH}$  skupinou kolagenu.

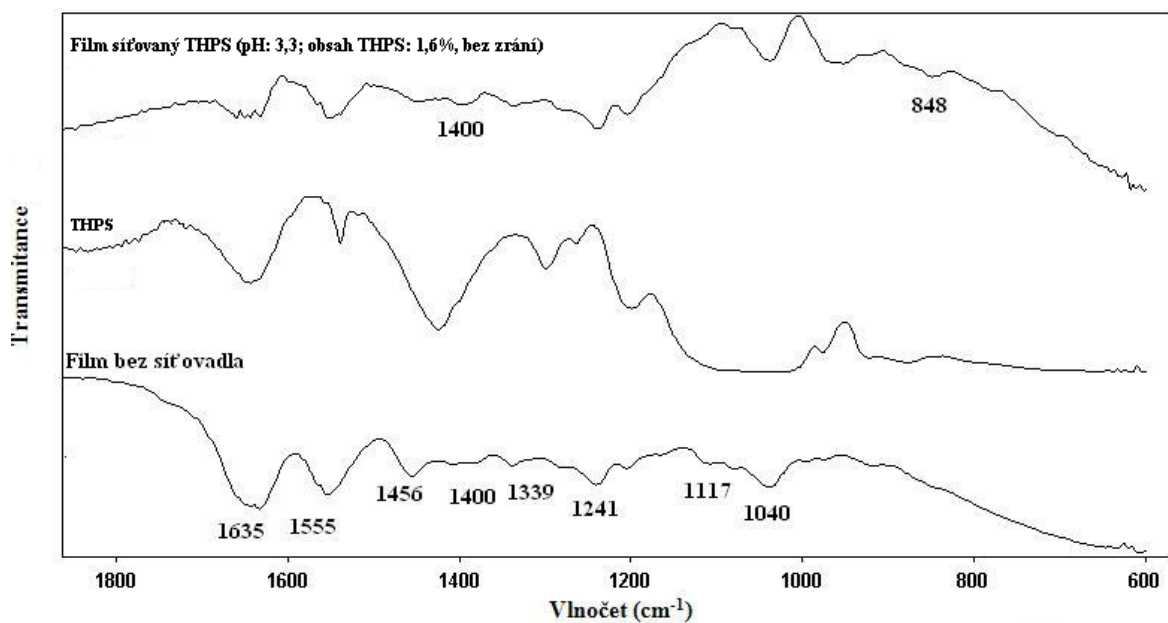
Tabulka 10 – Odlišnosti charakteristických píků filmů č. 1–9 síťovaných THPS v porovnání s filmem bez síťovadla

Funkční skupina	Vlnočet (cm <sup>-1</sup> )	Film č.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Srovnání píků filmů síťovaných THPS s píky filmu bez síťovadla											
vibrace –OH– skupiny	3350	vymizení	vymizení	vymizení	vymizení	vymizení	vymizení	vymizení	vymizení	vymizení	vymizení
–(C)–CH <sub>2</sub> , –(O)–CH <sub>2</sub>	2930	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita
–CO–NH– funkční skupina (amidová I vazba)	1635	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita
–CO–NH– funkční skupina (amidová II vazba)	1555	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita
Vibrace –CH <sub>2</sub> – a –CH <sub>3</sub> skupin	1456	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita	Slabší intenzita
Vibrace –COOH skupiny	1400	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita
Vibrace skupiny C–N cyklického prolinu	1339	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita
–CO–NH– funkční skupina (amidová III vazba)	1281, 1241 1204	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita
Vibrace skupiny R–NH <sub>2</sub>	1117, 1081	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita	Stejná intenzita
Primární funkční skupina R–OH	1040	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita	Vyšší intenzita
<b>Nově vzniklé píky filmů síťovaných THPS</b>											
Vibrace CN	848	U filmů č. 3, 4, 7, 8 a 9 byla zaznamenána vyšší intenzita píku oproti filmům č. 1, 2, 4 a 6									

Modelový příklad srovnání spekter je uveden na příkladu č. 7, která můžeme pozorovat na obrázku 69. Detail charakteristických pásů při vlnočtu 2000–600  $\text{cm}^{-1}$  pak znázorňuje obrázek 70.



Obrázek 69 – IČ spektrum filmu síťovaného THPS, filmu bez síťovadla a síťovadla THPS



Obrázek 70 – Detail IČ charakteristických pásů při vlnočtech 2000–600  $\text{cm}^{-1}$  při síťování THPS

### 6.2.5 Zhodnocení síťujícího účinku tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfátem

Všechny zhotovené filmy měly teplotu smrštění v obou směrech vyšší než film bez síťovačů, přičemž filmy č. 4, 7 a 8 přesáhly teplotu smrštění i filmu síťovaného 2,0% glutaraldehydem. Nejvyšší teplota smrštění byla naměřena u filmu č. 7 (podélný směr: 56,0°C, příčný směr: 55,8°C). Poměrné vysoké hodnoty byly naměřeny i u filmů č. 4 (podélný směr: 52,8°C, příčný směr: 52,4°C) a 8 (podélný směr: 55,1°C, příčný směr: 54,8°C).

Zpracováním výsledků ve statistickém programu bylo zjištěno, že největší vliv na teplotu smrštění má doba zrání, přičemž žádný ze sledovaných faktorů teplotu smrštění nesnižoval. Ve statistickém programu byly také zpracovány i výsledky tahové síly při přetržení a poměrného prodloužení při přetržení. Bylo zjištěno, že delší doba zrání a vysoké hodnoty pH kolagenního gelu tahovou sílu a poměrné prodloužení při přetržení snižují. Zvýšení těchto veličin se docílí pouze přidávkem THPS. Nejvyšší tahová síla (4,2N) a poměrné prodloužení (126,7%) byly tudíž naměřeny u filmu č. 3, který měl minimální hodnotu pH, maximální obsah THPS a žádnou dobu zrání.

Pomocí bobtnacích zkoušek bylo zjištěno, že všechny zhotovené filmy bobtnají jak při teplotě 26°C tak i při teplotě 80°C výrazně méně než film bez síťovačů. V případě filmu síťovaného 2,0% GA bylo zjištěno, že při obou teplotách dochází u filmů č. 4, 7 a 8 k menšími stupni zbobtnání. U ostatních filmů byly hodnoty stupně zbobtnání větší.

Díky FTIR byly zjištěny určité změny v intenzitě píků a objevu nových píků u filmů síťovaných pomocí THPS v porovnání s filmem bez síťovačů. U všech zesíťovaných filmů byl objeven nový pík při vlnové délce 848  $\text{cm}^{-1}$ , který značí přítomnost  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$  vazby. Pravděpodobně tedy došlo k interakci mezi  $-\text{NH}_2$  skupinou kolagenu a  $-\text{OH}$  skupinou THPS. Nejnižší intenzita tohoto píku byla zaznamenána u spekter filmů s nízkým obsahem THPS, naopak u filmů s maximálním obsahem THPS byla intenzita píku vyšší. Ostatní změny zaznamenané v jiných oblastech pak pravděpodobně představují H-můstky tvořené mezi  $-\text{OH}$  skupinou THPS a  $-\text{COOH}$  skupinou kolagenu.

Na základě veškerých provedených metod a zjištěných výsledků je možné konstatovat, že všechny filmy síťované pomocí THPS vykazují poměrně dobré vlastnosti. Nejvyšší teploty smrštění a nejnižší stupeň zbobtnání byly naměřeny u filmu č. 7. Poměrné vysoké hodnoty teploty smrštění s nízkým stupněm zbobtnání vykazovaly i filmy č. 4 a 8. Nejvyšší hodnoty tahové síly a poměrného prodloužení při přetržení byly naměřeny u filmu č. 3.

Pro stanovení optimálních podmínek je nutné zohlednit, pro jaké aplikace bude daný film určen a jaké požadavky budou na něj kladené. V případě, že budou žádané vysoké teploty smrštění s minimální tendencí k bobtnání bez nutnosti vysokých tahových sil a poměrného prodloužení je nejlepší volbou film č. 7, který obsahuje maximální množství THPS, má maximální hodnotu pH a nulovou dobu zrání. Nulová doba zrání navíc snižuje zpracovatelské náklady, tudíž je film č. 7 výhodný i z ekonomického hlediska. Bylo taktéž zjištěno, že delší doba zrání zhoršuje zpracovatelské podmínky, kdy dochází k tvorbě trhlin, které ovlivňují kvalitu výsledného filmu, což se potvrdilo v případě filmu č. 8. Naopak pro aplikace, kde jsou žádané dobré mechanické vlastnosti s poměrně vysokým prodloužením bez nutnosti vysokých teplot smrštění a nízkého stupně zbobtnání, je vhodný film č. 3, který obsahuje maximální dávku THPS, minimální hodnotu pH kolagenního gelu a nulovou dobu zrání.

### 6.3 Srovnání síťujícího účinku obou použitých síťovadel

Tabulka 11 – srovnání naměřených výsledků

SZ při 26°C (násobek)	SZ při 80°C (násobek)	Ts (°C)		F (N)	ε (%)
		Podélný směr	Příčný směr		
<b>Film bez síťovadla</b>					
9,6	10,8	47,1	48,0	0,5	98,5
<b>Filmy síťované KALG+GA</b>					
2,2 – 4,0	3,3 – 4,9	47,5 – 50,6	48,2 – 50,8	1,3 – 5,1	99,3 – 126,4
<b>Filmy síťované THPS</b>					
2,0 – 3,8	3,0 – 4,7	48,1 – 56	48,3 – 55,8	1,4 – 4,2	72,5 – 126,7
<b>Film s 2,0% GA</b>					
2,9	3,5	52,2	52,1	5,3	146
SZ – stupeň zbobtnání po 60 min inkubace; Ts – teplota smrštění; F – tahová síla při přetržení; ε – poměrné prodloužení při přetržení					

V tabulce 11 jsou zaznamenány hodnoty naměřené u filmů síťovaných kombinací KALG+GA a filmů síťovaných pomocí THPS. Pro porovnání, jsou taktéž uvedeny i hodnoty naměřené u filmu bez síťovadla a filmu síťovaného 2,0% GA. Z tabulky je patrné, že v průběhu bobtnacích zkoušek při obou teplotách docházelo u filmů síťovaných pomocí THPS k mírně menšímu stupni zbobtnání než u filmů síťovaných kombinací KALG a GA. Teploty smrštění v obou směrech byly taktéž zaznamenány vyšší u filmů síťovaných THPS než u filmů síťovaných kombinací síťovadel. Vyšších tahových sil potřebných pro přetržení bylo zapotřebí v případě filmů síťovaných kombinací KALG a GA, což je dáno vyšším obsahem GA. Maximální hodnota poměrného prodloužení byla zaznamenána u filmů síťovaných oběma způsoby přibližně stejná. Na základě zjištěných výsledků je možné konstatovat, že pro dosažení vysokých teplot smrštění a nízkého stupně zbobtnání, přesahující dokonce hodnoty naměřené u filmu síťovaného 2,0% GA, je nejlepší volbou použít jako síťující činidlo THPS. Jak již bylo zmíněno, tak výsledky naměřené u filmů síťovaných kombinací síťovadel jsou ovlivněny převážně přídavkem GA. Obsah kyseliny alginové nijak výrazně hodnoty sledovaných veličin neovlivnil a tudíž není z ekonomického hlediska výhodné kombinovat glutaraldehyd s kyselinou alginovou. Naopak u filmů síťovaných pomocí THPS byl prokázán pozitivní vliv použitého síťovadla na sledované veličiny. Z toho důvodu je možné konstatovat, že THPS může být pro mnoho aplikací vhodnou alternativou za běžně požívaný toxický glutaraldehyd.

## ZÁVĚR

V teoretické části jsou popsány způsoby, jakými lze síťovat bílkoviny, konkrétně kolagen, a to jak chemickým, fyzikálním tak i enzymovým způsobem. Jsou popsána nejčastěji používaná chemická síťovadla; včetně kyseliny alginové a tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfátu, které byly použity k síťování kolagenního gelu v experimentální části diplomové práce. Kolagenní gel se síťoval: a) kombinací kyseliny alginové a glutaraldehydu (KALG+GA); b) tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfátem (THPS). Byl posuzován vliv sledovaných parametrů (KALG+GA: množství KALG a GA, doba zrání; THPS: pH kolagenního gelu, množství THPS, doba zrání) na vlastnosti zhotovených filmů.

Všechny kolagenní filmy síťované kombinací KALG a GA měly teplotu smrštění ( $T_s$ ) v obou směrech vyšší než film bez síťovadla, přičemž ani jeden z filmů nepřesáhl teplotu smrštění naměřenou u filmu s 2,0% GA. Nejvyšší  $T_s$  v obou směrech s nejnižším stupněm zbobtnání byla naměřena u filmu obsahujícího 5,0% KALG; 1,6% GA s dobou zrání 8 hodin. Vysoké  $T_s$  s nízkým stupněm zbobtnání byly naměřeny i u filmu s 5,0% KALG; s 1,6% GA s nulovou dobou zrání, který navíc vykazoval i výborné mechanické vlastnosti. Poměrně dobré výsledky byly naměřeny i u filmu s 5,0% KALG s dobou zrání 8 hodin, který obsahoval nejnižší dávku (0,4%) toxického glutaraldehydu v porovnání s výše uvedenými filmy a tudíž by byl vhodnou volbou ve zdravotnických aplikacích. U všech filmů síťovaných pomocí THPS byly naměřeny vyšší teploty smrštění v obou směrech v porovnání s filmem bez síťovadla. U filmů zhotovených podle následujících proměnných (pH: 2,5 THPS: 1,6%, doba zrání: 8 dnů), (pH: 3,3; THPS: 1,6%, doba zrání: 8 dnů) a (pH 3,3; THPS: 1,6%, bez zrání) byla naměřena vyšší  $T_s$  a nižší stupeň zbobtnání než u filmu s 2,0% GA. Nejvyšší  $T_s$  s nejnižším stupněm zbobtnání byla naměřena u filmu, který byl připraven z hmoty o pH 3,3 s obsahem 1,6% THPS s nulovou dobou zrání.

Srovnáním naměřených výsledků v případě obou použitých síťovadel je zjevné, že filmy síťované pomocí THPS vykazují lepší materiálové vlastnosti než filmy síťované kombinací KALG a GA. Vlastnosti filmů síťovaných kombinací KALG a GA jsou ovlivněny především přidavkem GA, přičemž přítomnost KALG nijak výrazně sledované veličiny neovlivňovala. Naopak, u filmů síťovaných pomocí THPS byl prokázán pozitivní vliv použitého síťovadla na sledované veličiny. Z toho důvodu je možné konstatovat, že THPS je vhodnou alternativou náhrady glutaraldehydu v mnoha průmyslových aplikacích.



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BLAŽEJ, A. *Technologie kůže a kožešin*. Bratislava: Nakladatelství technické literatury, 1984. ISBN 04–817–84.
- [2] MLÁDEK, M. *Zpracování odpadů kožedělného průmyslu*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1971.
- [3] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. Praha: Academia, 2002, ISBN 80-200-0600-1.
- [4] PETERKOVÁ, P., LAPČÍK, L. Kolagen – vlastnosti, modifikace a aplikace. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2001. roč. 94, č. 6, s. 371-379. ISSN 0009-2770
- [5] PATHAK, C. P. et.al. Cross-linking tissue with a compound having a C8 to C40 aliphatic chain [patent]. United States Patent, US 6156531. Uděleno 5. 12. 2000. Dostupné z:  
<http://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US6156531.pdf>
- [6] CARVALHO, R. et al. Properties of chemically modified gelatin films. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2006, roč. 23, č. 1. DOI: 10.1590/S0104-66322006000100006.
- [7] FRANK, W. *NTP technical report on the toxicity studies of Glutaraldehyde*. Report number 111-30-8. Dostupné z:  
[http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/st\\_rpts/tox025.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/st_rpts/tox025.pdf)
- [8] THPS Biocides: A New Class of Antimicrobial Chemistry. Dostupné z: <http://www2.epa.gov/green-chemistry/1997-designing-greener-chemicals-award>
- [9] KIERNAN, J, Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do.: Practical aspects of glutaraldehyde fixation. *Microscopy Today*, 2000. Dostupné z:  
<http://publish.uwo.ca/~jkiernan/formglut.htm>
- [10] MITRA, T., et al. Preparation and characterization of a thermostable and biodegradable biopolymers using natural cross-linker. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2011, roč. 48, č. 2, s. 276-285. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.11.011.

- [11] NIRANJANA, M. et al. Stabilization of collagen using dialdehyde alginic acid. Dostupné z:  
<http://www.aaqtc.org.ar/congresos/istanbul2006/Visual%20Displays/V%2034%20-%20Stabilization%20of%20collagen%20using%20dialdehyde%20alginic%20acid%20-%20an%20ecofriendly%20tanning%20system.pdf>
- [12] Crosslinking technical handbook. *Thermo scientific*. Dostupné z:  
<https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/1602163-Crosslinking-Reagents-Handbook.pdf>
- [13] CARVALHO, R. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloids*. 2004, roč. 18, č. 5, s. 717-726. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2003.10.005
- [14] ENGLERT, C., et al. Bonding of articular cartilage using a combination of biochemical degradation and surface cross-linking. *Arthritis Research*. 2007, roč. 9, č. 3, s. 717-726. DOI: 10.3990/1.9789036535274.
- [15] HAUGH, M., et al. The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen-GAG scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009, roč. 89, č. 2, s. 363-369. DOI: 10.1002/jbm.a.31955.
- [16] DREXLER, J., et al. Dehydrothermal crosslinking of electrospun collagen. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2011, roč. 17, č. 1, s. 9-17. DOI: 10.1089/ten.tec.2009.0754.
- [17] LONG-FANG, R., et al. Phosponium-aluminum combination tanning for goat garant leader. *Leather of American Leather Chemists Association*, 2009, roč. 104, č. 6, s. 218-226.
- [18] THE DOW CHEMICAL COMPANY. *AQUCAR™ THPS 75 Water Treatment Microbiocide Antimicrobial for Industrial Water Treatment Applications*.  
Dostupné z:  
[http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh\\_030b/0901b8038030b48f.pdf?filepath=biocides/pdfs/noreg/253-01944.pdf&fromPage=GetDoc](http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_030b/0901b8038030b48f.pdf?filepath=biocides/pdfs/noreg/253-01944.pdf&fromPage=GetDoc)

- [19] BLC-LEATHER TECHNOLOGY CENTER. *Crosslinking of collagen with THPS*. Dostupné z:  
[http://www.erepak.com/userfiles/files/5%20Cleaner%20Technologies%20for%20%20Pickling\\_Tanning.pdf](http://www.erepak.com/userfiles/files/5%20Cleaner%20Technologies%20for%20%20Pickling_Tanning.pdf).
- [20] AIAD, I., et al Enhancing of Corrosion Inhibition and the Biocidal Effect of Phosphonium Surfactant Compounds for Oil Field Equipment. *Journal of Surfactants and Detergents*. 2013, roč. 17, č. 3, s. 391-401 . DOI: 10.1007/s11743-013-1512-y.
- [21] DJERASSI, C. et al. Terpenoids. XLVII. The Structure of Genipin . *The Journal of Organic Chemistry*. 1961, roč. 26, č. 4, s. 1192-1206. DOI: 10.1021/jo01063a052.
- [22] YOO, J., et al. Study on genipin: A new alternative natural crosslinking agent for fixing heterograft tissue. *The Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2011, roč. 44, č. 3, s. 197-207. DOI: 10.5090/kjtcs.2011.44.3.197.
- [23] SHEK, R. et al. Genipin cross-linked fibrin gels [patent]. United States Patent, US 20120189584 A1. Uděleno 26. 7. 2012. Dostupné z:  
<http://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US20120189584.pdf>
- [24] CHANG, W., et al. A genipin-crosslinked gelatin membrane as wound-dressing material: in vitro and in vivo studies. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2003, roč. 14, č. 5, s. 481-49. DOI: 10.1163/156856203766652084.
- [25] SUNG, H., et al. Feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998, roč. 42, č. 560 – 567. ISSN:0021-9304
- [26] HUANG, L., et al. Biocompatibility study of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking reagent. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998, roč. 42, č. 4, s. 568-576.
- [27] IMAMURA, E. et al. Collagen crosslinked with epoxy [patent]. United States Patent, US 5080670. Uděleno 14. 1 1992. Dostupné z:

- <http://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US5080670.pdf>
- [28] KOH, L., et al. Epoxy cross-linked collagen and collagen-laminin peptide hydrogels as corneal substitutes. *Journal of Functional Biomaterials*. 2013, roč. 4, č. 3, s. 162-177. DOI: 10.3390/jfb4030162.
- [29] CHAN, B., et al. Photochemical crosslinking improves the physicochemical properties of collagen scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2005, roč. 75A, č. 3, s. 689-701. DOI: 10.1002/jbm.a.30469.
- [30] WANG, K., et al. Influence of UV irradiation on the properties of goatskin collagen matrices. Dostupné z:  
<http://www.aaqtc.org.ar/congresos/china2009/download/2-1/2-21.pdf>
- [31] PARENTEAU-BAREIL, R., et al. Collagen-based biomaterials for tissue engineering Applications. *Materials*. 2010, roč. 3, č. 3, s. 1863-1887. DOI: 10.3390/ma3031863
- [32] JIANG, B., et al. Electron beam irradiation modification of collagen membrane. *Biomaterials*. 2006, roč. 27, č. 1, s. 385-408. DOI: 10.1201/b12160-13.
- [33] POLAK, R., et al. Effects of electron beam irradiation on bovine pericardium tissue. *International nuclear atlantic conference 2009*. ISBN: 978-85-99141-03-8
- [34] GRANT, R., et al. The effects of irradiation with high energy electrons on the structure and reactivity of native and cross-linked collagen fibres, *J. Cell. Sci.* 1970, roč. 7, s. 387-405. Dostupné z:  
<http://jcs.biologists.org/content/7/2/387.full.pdf>
- [35] MOTOKI, M., SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science*. 1998, roč. 9, č. 5, s. 204-210. DOI: 10.1016/S0924-2244(98)00038-7.
- [36] ZHU, Y. Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. *Trends in Biotechnology*. 2008, roč. 26, č. 10, s. 559-565. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.06.006.

- [37] ORBAN, M., et al. Crosslinking of collagen gels by transglutaminase. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2004, roč. 68A, č. 4, s. 756-762. DOI: 10.1002/jbm.a.20110.
- [38] PORTA, R., et al. Transglutaminase crosslinked pectin- and chitosan-based edible Films: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011, roč. 51, č. 3, s. 1-37. DOI: 10.1007/978-3-319-03751-6\_7-1.
- [39] BENEŠ, M., LIKEŠ, J. Faktorové experimenty v průmyslovém výzkumu. *Pokroky matematiky, fyziky z astronomie*. Dostupné z: [http://dml.cz/bitstream/handle/10338.dmlcz/137166/PokrokyMFA\\_02-1957-1\\_3.pdf](http://dml.cz/bitstream/handle/10338.dmlcz/137166/PokrokyMFA_02-1957-1_3.pdf)
- [40] ŠTRAUSOVÁ, K., DOLEJŠ, P. Faktorové plánování a hodnocení experimentů při úpravě vody. *Sborník konference Pitná voda 2010*. České Budějovice: W&ET Team, 2010, s. 95-100. ISBN 978-80-254-6854-8.
- [41] MYNENI, S., et al. Vibrational spectroscopy of functional group chemistry and arsenate coordination in ettringite: Vibrational Spectroscopy with Neutrons. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1998, roč. 62, č. 21-22, s. 267-304. DOI: 10.1039/9781847550934.
- [42] BABCZYK, P., et al. Stem cells on biomaterials for synthetic grafts to promote vascular healing. *Journal of Clinical Medicine*. 2014, roč. 3, č. 1, s. 39-87. DOI: 10.3390/jcm3010039.
- [43] SIONKOWSKA, A., et al. Chemical and thermal cross-linking of collagen and elastin hydrolysates. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010, roč. 47, č. 4, s. 570-577. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.08.004.
- [44] KANIA, P. *Infračervená spektrometrie: Laboratoř analytické chemie*. Praha: VŠCHT, Praha, 2007. Dostupné z: [www.vscht.cz/anl/lach1/7\\_IC.pdf](http://www.vscht.cz/anl/lach1/7_IC.pdf)
- [45] BUBNIS W., et al. The determination of  $\epsilon$ -amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry* 207, s. 129–133.

- [46] KALE, R., et al. Ultraviolet spectrophotometric method for determination of gelatin crosslinking in the presence of amino groups. *Journal of Young Pharmacists*. 2010, roč. 2, č. 1, s. 90-94. DOI: 10.4103/0975-1483.62223.
- [47] TNBSA solution. Dostupné z:  
<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/28997>.
- [48] PAVLÍNEK, V. Termické analýzy: *Kontrolní a zkušební metody*.  
Dostupné z: [http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM\\_06.pdf](http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_06.pdf)
- [49] AFM mikroskop. Dostupné  
z: [http://fyzika.fce.vutbr.cz/file/kusak/AFM\\_mikroskopie.pdf](http://fyzika.fce.vutbr.cz/file/kusak/AFM_mikroskopie.pdf)
- [50] COLLINS, R. et al. Tanning leather [patent]. United States Patent. US6540790B2. Uděleno 1. 4. 2003. Dostupné z:  
<http://drive.google.com/viewerng/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US6540790.pdf>
- [51] FATHIMA, N., et al. Iron-phosphonium combination tanning: Towards a Win-Win Approach. *Journal of the American Leather Chemists Association*. 2005, roč. 100, s. 273-281.
- [52] EDWARD, M. et al. Tanning with tetrakis-(hydroxymethyl) phosphonium chloride [patent]. United States Patent. US2732278. Uděleno 24. 1. 1956. Dostupné z:  
<http://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US2732278.pdf>
- [53] FATHIMA, N., et al. Stabilization of type I collagen against collagenases (type I) and thermal degradation using iron complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2006, roč. 100, č. 11, s. 1774-1780. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2006.06.014.
- [54] CONNOR, T., The mutagenic evaluation of tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium sulfate using a combined testing protocol approach. *Journal of environmental pathology nad toxicology*. 1980, roč. 4, č. 1145. ISSN:0146-4779. Dostupné z:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.k.utb.cz/pubmed/7003047>

- [55] PŠEJA., J. *Anaerobní biologický rozklad epoxidy síťovaného bílkovinného hydrolyzátu a modifikovaného polyvinylalkoholu*. Zlín, 2009. Disertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. ISBN 978-80-7318-821-4
- [56] SOUČKOVÁ, M. Stanovení míry poškození písemných památek a výzkum a vývoj konzervátorských metod vedoucích k jejich záchraně, Praha 2011. Dostupné z: [http://wwwold.nkp.cz/restauratori/2011/Souckova\\_2011\\_cinidla.pdf](http://wwwold.nkp.cz/restauratori/2011/Souckova_2011_cinidla.pdf)
- [57] ČSN EN ISO 3380 Usně – Fyzikální a mechanické zkoušky – Stanovení teploty smrštění do 100°C. Dostupné z: [http://www.technicke-normy-csn.cz/793841-csn-en-iso-3380\\_4\\_66882.html](http://www.technicke-normy-csn.cz/793841-csn-en-iso-3380_4_66882.html)

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

°C	stupeň Celsia
°C/min	stupeň Celsia za minutu
AFM	mikroskopie atomárních sil
BDDGE	1, 4 - butandiol dyglycidyl éter
cm <sup>-1</sup>	vlnočet
DHT	dehydrotermální síťování
DSC	diferenční snímací kalorimetrie
dt/dτ	gradient teploty
EN	evropská norma
F	tahová síla při přetržení
FTIR	Fourierova transformační infračervená spektroskopie
g	gram
GA	glutaraldehyd
ISO	mezinárodní organizace pro normalizaci
KALG	kyselina alginová
kGy	kilogray
kGy/s	kilograyů za sekundu
m <sub>1</sub>	hmotnost misky se vzorkem po vysušení
m <sub>2</sub>	hmotnost prázdné misky
m <sub>3</sub>	hmotnost vzorku
MeV	megaelektronvolt
m <sub>n</sub>	hmotnost nabobtnalého vzorku
m <sub>S</sub>	hmotnost suchého vzorku
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	dodekahydrát fosforečnanu sodného



---

NaOH	hydroxid sodný
$P_N$	plocha nabobtnalého vzorku
$P_S$	plocha suchého vzorku
$S^*$	obsah sušiny
SEM	skenovací elektronový mikroskop
SZ	stupeň zbobtnání
T	teplota ukončení smršťování filmu
$T_0$	4 minuty bez záhřevu při pokojové teplotě
THPC	tetrakis hydroxymethyl fosfonium chlorid
THPS	tetrakis hydroxymethyl fosfonium sulfát
TNBSA	kyselina trinitrobenzensulfonová
$T_s$	teplota smrštění
$T_z$	teplota, při které bylo započato zahřívání
UV	ultrafialové záření
$\Delta S$	změna plochy
$\varepsilon$	poměrné prodloužení při přetržení
$\sigma$	směrodatná odchylka tahové síly při přetržení

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Jednoduché schéma porovnávací homobifunkční a heterobifunkční síťovadla .....	13
Obrázek 2 – Jednoduché schéma znázorňující variabilitu v délkách ramene síťovacích činidel .....	14
Obrázek 3 – Jednoduchá schéma štěpitelného síťovadla s disulfidovou vazbou .....	14
Obrázek 4 – Oxidace lysinového zbytku na allysin .....	16
Obrázek 5 – Vzorec THPS .....	17
Obrázek 6 – Schéma zesíťovaného kolagenu pomocí THPS .....	18
Obrázek 7 – Schéma reakce kolagenu s kyselinou alginovou .....	20
Obrázek 8 – Schéma kolagenu zesíťovaného kyselinou alginovou .....	21
Obrázek 9 – Síťování proteinu formaldehydem .....	22
Obrázek 10 – A) tři typy molekul monomerního GA, B) polymerační reakce GA .....	23
Obrázek 11 – síťovací reakce GA s molekulou proteinu.....	23
Obrázek 12 – Síťovací reakce genipinu s molekulou kolagenu .....	25
Obrázek 13 – Síťovací reakce mezi BDDGE a molekulou kolagenu .....	26
Obrázek 14 – Síťování kolagenu transglutaminázou .....	27
Obrázek 15 – Schéma vazby mezi lysinovým zbytkem s TNBSA .....	34
Obrázek 16 – Významnost sledovaných faktorů na Ts v podélném směru u filmů síťovaných KALG+GA .....	47
Obrázek 17 – Vliv interakcí sledovaných faktorů na Ts v podélném směru u filmů síťovaných KALG+GA .....	48
Obrázek 18 – Vliv sledovaných faktorů na Ts v podélném směru v kubickém zobrazení u filmů síťovaných KALG+GA.....	48
Obrázek 19 – Vrstevnicový graf vlivu GA a doby zrání na Ts v podélném směru .....	48
Obrázek 20 – Významnost sledovaných faktorů na Ts v příčném směru u filmů síťovaných KALG+GA .....	49
Obrázek 21 – Vliv interakcí sledovaných faktorů na Ts v příčném směru u filmů síťovaných KALG+GA .....	50
Obrázek 22 – Vliv sledovaných faktorů na Ts v příčném směru v kubickém zobrazení u filmů síťovaných KALG+GA.....	50
Obrázek 23 – Vrstevnicový graf vlivu GA a doby zrání na Ts v příčném směru.....	50

Obrázek 24 – Významnost sledovaných faktorů na tahovou sílu při přetržení u filmů síťovaných KALG+GA .....	52
Obrázek 25 – Vliv interakcí sledovaných faktorů na tahovou sílu při přetržení u filmů síťovaných KALG+GA .....	52
Obrázek 26 – Vliv sledovaných faktorů na tahovou sílu při přetržení v kubickém zobrazení u filmů síťovaných KALG+GA .....	53
Obrázek 27 – Vrstevnicový graf vlivu GA a doby zrání na tahovou sílu při přetržení .....	53
Obrázek 28 – Významnost sledovaných faktorů na poměrné prodloužení při přetržení u filmů síťovaných KALG+GA.....	54
Obrázek 29 – Významnost sledovaných faktorů na $T_s$ v příčném směru u filmů síťovaných THPS .....	55
Obrázek 30 – Vliv sledovaných faktorů na $T_s$ v příčném směru v kubickém zobrazení u filmů síťovaných THPS.....	55
Obrázek 31 – Vrstevnicový graf vlivu KALG a GA na poměrné prodloužení při přetržení.....	55
Obrázek 32 – Závislost stupně zbobtnání na době inkubace u filmů č. 1–4 síťovaných KALG+GA při teplotě 26°C .....	59
Obrázek 33 – Závislost stupně zbobtnání na době inkubace u filmů č. 5–9 síťovaných KALG+GA při teplotě 26°C .....	59
Obrázek 34 – Závislost stupně zbobtnání na době inkubace u filmů č. 1–4 síťovaných KALG+GA při teplotě 80°C .....	60
Obrázek 35 – Závislost stupně zbobtnání na době inkubace u filmů č. 5–9 síťovaných KALG+GA při teplotě 80°C .....	60
Obrázek 36 – Závislost změny plochy na době inkubace u filmů č. 1–4 síťovaných KALG+GA při teplotě 26°C .....	61
Obrázek 37 – Závislost změny plochy na době inkubace u filmů č. 5–9 síťovaných KALG+GA při teplotě 26°C .....	61
Obrázek 38 – Závislost změny plochy na době inkubace u filmů č. 1–4 síťovaných KALG+GA při teplotě 80°C .....	62
Obrázek 39 – Závislost změny plochy na době inkubace u filmů č. 5–9 síťovaných KALG+GA při teplotě 80°C .....	62
Obrázek 40 – IČ spektrum kyseliny alginové .....	63
Obrázek 41 – Síťování kolagenu glutaraldehydem.....	64

Obrázek 42 – IČ spektrum filmu síťovaného KALG+GA, filmu bez síťovadla a KALG .....	66
Obrázek 43 – Detail IČ charakteristických pásů při vlnočtech 2000–600 cm <sup>-1</sup> při síťování KALG+GA .....	66
Obrázek 44 – Významnost sledovaných faktorů na Ts v podélném směru u filmů síťovaných THPS .....	72
Obrázek 45 – Vliv interakcí sledovaných faktorů na Ts v podélném směru u filmů síťovaných THPS .....	73
Obrázek 46 – Vliv sledovaných faktorů na Ts v podélném směru v kubickém zobrazení u filmů síťovaných THPS .....	73
Obrázek 47 – Vrstevnicový graf vlivu pH a THPS na Ts v podélném směru .....	73
Obrázek 48 – Významnost sledovaných faktorů na Ts v příčném směru u filmů síťovaných THPS .....	74
Obrázek 49 – Vliv interakcí sledovaných faktorů na Ts v příčném směru u filmů síťovaných THPS .....	75
Obrázek 50 – Vliv sledovaných faktorů na Ts v příčném směru v kubickém zobrazení u filmů síťovaných THPS .....	75
Obrázek 51 – Vrstevnicový graf vlivu pH a THPS na Ts v příčném směru .....	75
Obrázek 52 – Významnost sledovaných faktorů na tahovou sílu při přetržení u filmů síťovaných THPS .....	77
Obrázek 53 – Vliv interakcí sledovaných faktorů na tahovou sílu při přetržení u filmů síťovaných THPS .....	77
Obrázek 54 – Vliv sledovaných faktorů na tahovou sílu při přetržení v kubickém zobrazení u filmů síťovaných THPS .....	78
Obrázek 55 – Vrstevnicový graf vlivu pH a doby zrání na tahovou sílu při přetržení .....	78
Obrázek 56 – Významnost sledovaných faktorů na poměrné prodloužení při přetržení u filmů síťovaných THPS .....	80
Obrázek 57 – Vliv interakcí sledovaných faktorů na poměrné prodloužení při přetržení u filmů síťovaných THPS .....	80
Obrázek 58 – Vliv sledovaných faktorů na poměrné prodloužení při přetržení v kubickém zobrazení u filmů síťovaných THPS .....	81
Obrázek 59 – Vrstevnicový graf vlivu pH a množství THPS na poměrné prodloužení při přetržení .....	81

Obrázek 60 – Závislost stupně zbobtnání na době inkubace u filmů č. 1–4 síťovaných THPS při teplotě 26°C.....	85
Obrázek 61 – Závislost stupně zbobtnání na době inkubace u filmů č. 5–9 síťovaných THPS při teplotě 26°C.....	85
Obrázek 62 – Závislost stupně zbobtnání na době inkubace u filmů č. 1–4 síťovaných THPS při teplotě 80°C.....	86
Obrázek 63 – Závislost stupně zbobtnání na době inkubace u filmů č. 5–9 síťovaných THPS při teplotě 80°C.....	86
Obrázek 64 – Závislost změny plochy na době inkubace u filmů č. 1–4 síťovaných THPS při teplotě 26°C.....	87
Obrázek 65 – Závislost změny plochy na době inkubace u filmů č. 5–9 síťovaných THPS při teplotě 26°C.....	87
Obrázek 66 – Závislost změny plochy na době inkubace u filmů č. 1–4 síťovaných THPS při teplotě 80°C.....	88
Obrázek 67 – Závislost změny plochy na době inkubace u filmů č. 5–9 síťovaných THPS při teplotě 80°C.....	88
Obrázek 68 – IČ spektrum THPS .....	89
Obrázek 69 – IČ spektrum filmu síťovaného THPS, filmu bez síťovadla a síťovadla THPS .....	92
Obrázek 70 – Detail IČ charakteristických pásů při vlnočtech 2000–600 cm <sup>-1</sup> při síťování THPS.....	92

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 – Naměřené výsledky u filmů síťovaných kombinací KALG+GA .....	44
Tabulka 2 – Změny filmů síťovaných KALG+GA v příčném a podélném směru při stanovení teploty smrštění .....	46
Tabulka 3 – Naměřené hodnoty stupně zbobtnání a změny plochy při 26°C a 80°C u filmů č. 1–4 síťovaných KALG+GA a filmu bez síťovadla.....	57
Tabulka 4 – Naměřené hodnoty stupně zbobtnání a změny plochy při 26°C a 80°C u filmů č. 5–6 síťovaných KALG+GA a filmu s 2,0% GA.....	58
Tabulka 5 – Odlišnosti charakteristických píků filmů č. 1–9 síťovaných KALG+GA v porovnání s filmem bez síťovadla .....	65
Tabulka 6 – Naměřené výsledky u filmů síťovaných THPS.....	69
Tabulka 7 – Změny filmů síťovaných THPS v příčném a podélném směru při stanovení teploty smrštění .....	71
Tabulka 8 – Naměřené hodnoty stupně zbobtnání a změny plochy při 26°C a 80°C u filmů č. 1–4 síťovaných THPS a filmu bez síťovadla.....	83
Tabulka 9 – Naměřené hodnoty stupně zbobtnání a změny plochy při 26°C a 80°C u filmů č. 5–9 síťovaných THPS a filmu s 2,0% GA.....	84
Tabulka 10 – Odlišnosti charakteristických píků filmů č. 1–9 síťovaných THPS v porovnání s filmem bez síťovadla .....	91
Tabulka 11 – srovnání naměřených výsledků.....	95

**PŘÍLOHA P I: BAREVNÝ ROZDÍL MEZI FILMEM SÍŤOVANÝM  
2,0% GA A FILMEM SÍŤOVANÝM THPS**

