



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# VLIV SÍŤOVÁNÍ NA DENATURACI KOLAGENOVÝCH VZORKŮ Z RŮZNÝCH ŽIVOČIŠNÝCH ZDROJŮ

EFFECT OF CROSSLINKING ON THE DENATURATION OF COLLAGEN SAMPLES FROM DIFFERENT  
ANIMAL SOURCES

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Peter Ladický

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2018

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1143/2017  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Student: **Bc. Peter Ladický**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název diplomové práce:

Vliv síťování na denaturaci kolagenových vzorků z různých živočišných zdrojů

### Zadání diplomové práce:

Lit. rešerše na téma síťování kolagenu a jeho denaturace  
Příprava kolagenových vzorků z různých zdrojů a její optimalizace  
Různé parametry síťování připravených vzorků  
Určení teploty smrštění pomocí DSC, optimalizace metody, sledování botnání a degradace  
Vyhodnocení, diskuze a závěr

### Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Peter Ladický  
student(ka)

-----  
Ing. Petr Sedláček, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Diplomová práca sa zaoberá prípravou, sieťovaním a charakterizáciou kolagénových filmov z rôznych živočíšnych zdrojov. Na prípravu kolagénových filmov bol použitý kolagén z prasata, Tilapie, koňa, kravy a krokodýla. Na sieťovanie pripravených filmov boli použité chemické sieťovadlá EDC/NHS a Lyofix. V experimentálnej časti bola optimalizovaná metóda diferenčnej kompenzačnej kalorimetrie (DSC), pomocou ktorej bola následne stanovená teplota denaturácie jednotlivých kolagénových filmov pred a po sieťovaní. Ďalej bola analyzovaná schopnosť filmov botnať a degradovať. Pomocou infračervenej spektroskopie bola overená prítomnosť charakteristických skupín vyskytujúcich sa v štruktúre kolagénu. Morfológia vzoriek bola skúmaná pomocou metódy skenovacej elektrónovej kryomikroskopie (kryo-SEM).

Z výsledkov vyplýva, že EDC/NHS je v porovnaní s Lyofix lepším sieťovadlom kolagénu. Najlepším zdrojom na prípravu termálne stabilných filmov je prasací kolagén, ktorého teplota denaturácie po sieťovaní EDC/NHS bola približne 69 °C a predstavuje viac ako adekvátnu náhradu kravského kolagénu, ktorý je v súčasnosti najviac využívaný či už v oblasti tkanivového inžinierstva alebo potravinárskeho priemyslu.

## **ABSTRACT**

The diploma thesis deals with the preparation, crosslinking and characterization of collagen films from various animal sources. Collagen from pig, Tilapia, horse, cow and crocodile was used to prepare collagen films. Chemical crosslinking agents EDC/NHS and Lyofix were used to crosslink the prepared films. In the experimental part, differential scanning calorimetry (DSC) method was optimized to determine the denaturation temperature of individual collagen films before and after crosslinking. In addition, the ability of films to swell and degrade has been analyzed. The presence of characteristic groups present in the collagen structure was verified using infrared spectroscopy. The sample morphology was analyzed using Scanning Electron Cryomicroscopy (Cryo-SEM).

The results show that EDC/NHS is a better collagen crosslinking agent compared to Lyofix. The best source for the preparation of thermally stable films is piggy collagen, whose denaturation temperature after crosslinking with EDC/NHS was about 69 °C and could represent more than adequate substitution for cow collagen, which is currently most used in the field of tissue engineering and food industry.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

Kolagén, EDC/NHS, Lyofix, tepelná denaturácia, diferenčná kompenzačná kalorimetria (DSC)

## **KEY WORDS**

Collagen, EDC/NHS, Lyofix, thermal denaturation, differential scanning calorimetry (DSC)

LADICKÝ, P. *Vliv síťování na denaturaci kolagenových vzorků z různých živočišných zdrojů.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 73 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

## **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že diplomovú prácu som vypracoval samostatne, a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Táto práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....  
podpis diplomanta

## ***Pod'akovanie***

*Touto cestou by som rád poďakoval Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D. a doc. Ing. Lucy Vojtovej, Ph.D. za odborné rady, trpezlivosť, konzultácie a ústretovosť počas vypracovania mojej diplomovej práce. Ďalej by som rád poďakoval pani Leone Kubikovej a Ing. Josefovi Petrušovi, Ph.D. za pomoc pri osvojovaní si experimentálnych techník a poďakovanie patrí aj všetkým kolegom, ktorý mi akokoľvek pomohli s vypracovaním tejto práce.*

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČASŤ</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1 Kolagén</b> .....	<b>9</b>
1.1.1 Štruktúra .....	9
<b>1.2 Biosyntéza kolagénu</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3 Degradácia kolagénu</b> .....	<b>13</b>
<b>1.4 Fyzikálne a chemické vlastnosti kolagénu</b> .....	<b>13</b>
1.4.1 Botnanie .....	13
1.4.2 Polyelektrolytický charakter .....	14
1.4.3 Denaturácia a renaturácia .....	14
1.4.4 Hydrotermálna stabilita .....	14
1.4.5 Premena na želatínu .....	14
<b>1.5 Antigénnosť kolagénu</b> .....	<b>15</b>
<b>1.6 Diferenčná kompenzačná kalorimetria</b> .....	<b>17</b>
1.6.1 Teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria .....	17
<b>2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 Denaturácia proteínov</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 Siet'ovanie kolagénu</b> .....	<b>19</b>
2.2.1 Chemické siet'ovanie .....	19
2.2.1.1 Glutaraldehyd .....	20
2.2.1.2 Karbodiimidy a acylazidy .....	21
2.2.1.3 Epoxidové zlúčeniny .....	22
2.2.1.4 Deriváty karboxylových kyselín .....	22
2.2.1.5 Prírodné siet'ovadlá .....	22
2.2.2 Fyzikálne siet'ovanie .....	23
2.2.2.1 Dehydrotermálna metóda .....	24
2.2.2.2 Siet'ovanie s využitím žiarenia .....	24
<b>3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1 Použité chemikálie</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2 Použité prístroje</b> .....	<b>25</b>

<b>3.3</b>	<b>Príprava roztokov .....</b>	<b>25</b>
3.3.1	Príprava zásobného roztoku PBS .....	25
3.3.2	Príprava roztoku kolagenázy .....	25
<b>3.4</b>	<b>Príprava vzoriek.....</b>	<b>25</b>
3.4.1	Príprava 1% roztoku kolagénu .....	25
3.4.2	Príprava kolagénových filmov .....	26
3.4.3	Sieťovanie kolagénových filmov .....	26
<b>3.5</b>	<b>Charakterizácia vzoriek .....</b>	<b>26</b>
3.5.1	Stupeň nabotnania a obsah vody .....	26
3.5.2	Enzymatická degradácia.....	26
3.5.3	Diferenčná kompenzačná kalorimetria.....	27
3.5.3.1	Optimalizácia .....	27
3.5.3.2	Stanovenie teploty denaturácie kolagénových filmov .....	28
3.5.4	Infračervená spektroskopia .....	28
3.5.5	Termogravimetrická analýza.....	28
3.5.6	Skenovacia elektrónová kryomikroskopia .....	28
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSIA .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Stupeň nabotnania a obsah vody .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>Enzymatická degradácia.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3</b>	<b>Diferenčná kompenzačná kalorimetria .....</b>	<b>34</b>
4.3.1	Optimalizácia .....	34
4.3.1.1	Vplyv rýchlosti ohrevu.....	36
4.3.2	Teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria .....	38
4.3.2.1	Vplyv amplitúdy a periódy modulácie .....	40
4.3.3	Stanovenie teploty denaturácie kolagénových filmov .....	43
<b>4.4</b>	<b>Infračervená spektroskopia.....</b>	<b>47</b>
<b>4.5</b>	<b>Termogravimetrická analýza .....</b>	<b>51</b>
<b>4.6</b>	<b>Skenovacia elektrónová kryomikroskopia.....</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>ZÁVER.....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV .....</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>ZOZNAM PRÍLOH .....</b>	<b>65</b>

**9 PRÍLOHY ..... 66**

## ÚVOD

Kolagén patrí medzi najrozšírenejšie prírodné biomateriály. Je rozšírený v celej ríši živých organizmov s výnimkou jednobunkových a patrí medzi najdôležitejšie fibrilárne bielkoviny. Predstavuje hlavnú zložku spojivových tkanív, zabezpečuje ich správnu funkciu, hlavne v súvislosti s ich mechanickými vlastnosťami. To je dané jeho špecifickou štruktúrou, charakteristickou vysokým stupňom vnútornej organizácie molekúl. Vo väčšine mäkkých a tvrdých spojivových tkanív predstavuje kolagén a jeho vlákna väčšinu extracelulárnej matrice a tvorí trojrozmerné skafoldy, ktoré obklopujú bunky. Kolagén tiež zohráva dominantnú úlohu pri udržiavaní biologickej a štrukturálnej integrity extracelulárnej matrice a je to dynamický a flexibilný materiál, ktorý prechádza konštantnou remodeláciou pre správnu funkciu tkanív a taktiež je povrchovo aktívny. Biologicky odbúrateľný a netoxický, exogénny kolagén je viac biokompatibilný ako iné známe prírodné polyméry a je len veľmi slabo antigénny. Kolagén je schopný tvoriť vlákna s vysokou pevnosťou v ťahu a stabilitou vďaka zosieťovaniu a samousporiadavaniu. Tieto vlákna môžu tvoriť spomínané skafoldy, ktoré sú veľmi užitočné a vyplynuli z hlbšieho pochopenia štruktúry a funkcie kolagénu.

Aplikácie a využitie kolagénu v oblasti biomateriálov vyplývajú z jeho fyziologickej podobnosti alebo dokonca identity s kolagénom v ľudskom tele, z jeho resorbovateľnosti, schopnosti podporovať rast a diferenciáciu buniek. Hlavnou nevýhodou nezosieťovaného kolagénu sú jeho mechanické vlastnosti, ktoré často bránia jeho samotnému využitiu. Preto sa biomateriály na báze kolagénu musia sieťovať pomocou chemických sieťovadiel ako glutaraldehyd alebo karbodiimid s cieľom splniť požiadavky na dlhodobé klinické využitie.

Cieľom predloženej diplomovej práce je pripraviť filmy z kolagénu získaného z rôznych živočíšnych zdrojov a zosieťovať ich pomocou vybraných chemických činidiel. Sieťovanie výrazne ovplyvňuje mechanické vlastnosti kolagénu a zvyšuje samotnú teplotu denaturácie biomateriálu. Ďalším krokom je stanovenie kinetiky botnania a degradácie samotných nesieťovaných a sieťovaných filmov a následné stanovenie teploty denaturácie pripravených filmov. Vhodnosť použitia termickej analýzy pri charakterizácii kolagénových filmov spočíva najmä v schopnosti zaznamenávať chemické a fyzikálne zmeny materiálu v závislosti na teplote.



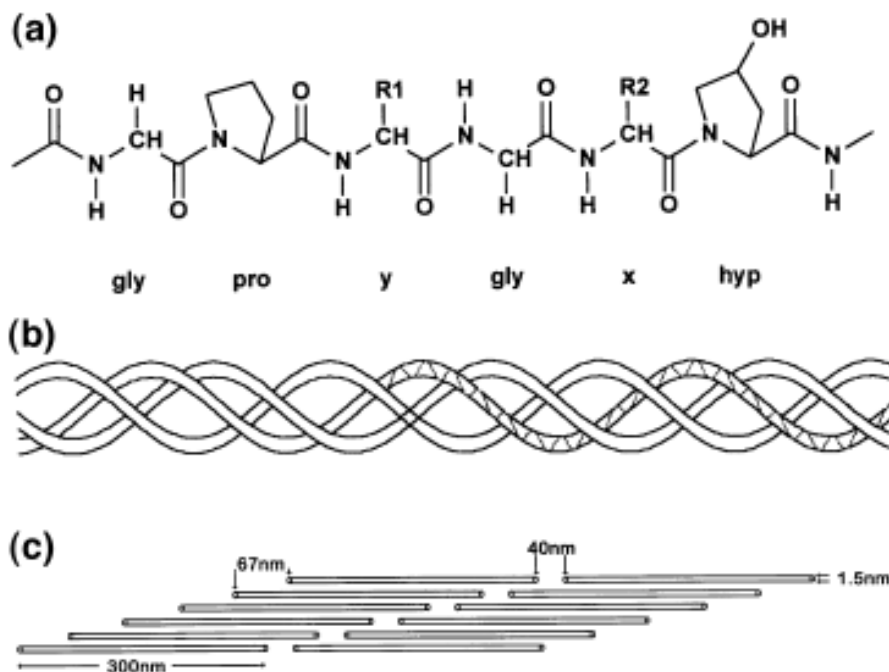
# 1 TEORETICKÁ ČASŤ

## 1.1 Kolagén

Kolagén predstavuje až 30 % zo všetkých bielkovín v ľudskom tele a má hlavne ochrannú a podpornú funkciu. Okrem toho je kľúčovým proteínom v celom množstve životne dôležitých procesov prebiehajúcich v organizme [1]. Kolagény tvoria skupinu proteínov zloženú zo štruktúrne odlišných molekúl usporiadaných do podjednotiek polypeptidov tvoriacich štruktúru trojšroubovice, ktorá je stabilizovaná vodíkovými väzbami medzi susednými skupinami C=O a N-H [2]. Za väčšinu produkcie kolagénu sú zodpovedné fibroblasty. Do dnešného dňa bolo charakterizovaných 29 rôznych typov kolagénu a všetky vykazujú štruktúru trojšroubovice [3]. Vďaka svojej biologickej aktivite, biologickej kompatibilite a biologickej odbúrateľnosti je najviac využívaným kolagén typu I [4]. Biomateriály na báze kolagénu sú v súčasnosti využívané v rôznych klinických aplikáciách ako napríklad obvazy na rany, v systémoch na uvoľňovanie liečiv, ako cievne štepy a kolagén typu I je v súčasnosti zlatým štandardom v oblasti tkanivového inžinierstva [3],[5]. Kolagén ako biomateriál je veľmi sľubný, avšak existujú obavy týkajúce sa jeho stability voči enzymatickej degradácii a nízkej mechanickej pevnosti [5].

### 1.1.1 Štruktúra

Kolagén má špecifickú hierarchickú konformáciu rozdelenú do štyroch štruktúr: primárna štruktúra (poradie aminokyselín), sekundárna štruktúra ( $\alpha$ -helix), terciárna štruktúra (trojšroubovica) a kvartérna štruktúra (fibrily) [6].



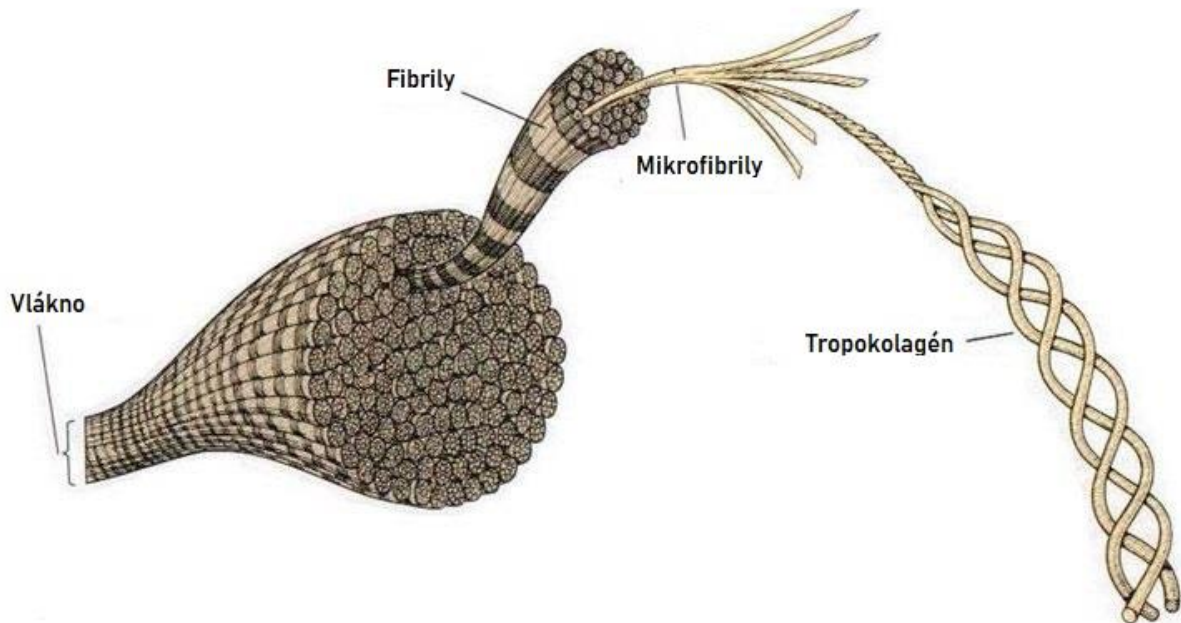
Obr. 1: Štruktúra kolagénu typu I: (a) sekvencia aminokyselín (primárna štruktúra), (b)  $\alpha$ -helix a terciárna štruktúra trojšroubovice, (c) kvartérna štruktúra (fibrily) [7]

Molekuly kolagénu sa skladajú z troch  $\alpha$  reťazcov, ktoré vďaka ich chemickej štruktúre spolu interagujú a vytvárajú trojšroubovicu. Každý  $\alpha$  reťazec sa skladá z viac ako tisíc

aminokyselín, ktoré sú v sekvencii –Gly–X–Y–. Aby došlo k vytvoreniu molekuly *tropokolagénu* je nevyhnutná prítomnosť glycínu v každej tretej pozícii sekvencie aminokyselín a pozície X a Y sú väčšinou predstavované aminokyselinami prolínom respektíve 4-hydroxyprolínom [2]. Pod sekundárnu štruktúru spadajú rôzne torzné uhly v molekule, ktoré sú stabilizované vodíkovými väzbami [8]. V súčasnosti je známych 25 rôznych konformácií  $\alpha$  reťazcov. Kombináciou vždy troch týchto reťazcov dochádza k vzniku rôznych typov kolagénu, ktorých je dnes 29. Najbežnejšie typy sú stručne popísané v Tab. 1 [3]. Trojšroubovica (terciárna štruktúra) predstavuje úplnú trojrozmernú štruktúru, ktorá je stabilizovaná hlavne vodíkovými väzbami, a taktiež Van der Waalsovými silami, iónovými väzbami a kovalentnými väzbami. Vznik kovalentnej väzby je možný v dôsledku reakcie medzi cysteínovými zvyškami, ktoré obsahujú atómy síry. Kvartérnou štruktúrou kolagénu sú *tropokolagénové* molekuly vysoko organizované do fibrilárnych štruktúr v extracelulárnom priestore. Táto štruktúra je stabilizovaná nekovalentnými interakciami [8]. V Tab. 1 je vidieť, že typy I, IV, V, IX a XI sa skladajú buď z dvoch alebo troch rôznych typov  $\alpha$  reťazcov, ktoré sa vzájomne líšia svojim aminokyselinovým zložením, zatiaľ čo typy II, III, VII a XII pozostávajú iba z jedného typu  $\alpha$  reťazca [3].

Tab. 1: Typy, formy a rozdelenie kolagénu. Modifikovaná forma [3]

	Typ	Molekulárny vzorec	Polymerizovaná forma	Výskyt
Fibrilárne	I	$[\alpha 1(\text{I})]_2\alpha 2(\text{I})$	vlákno	kosti, koža, šľachy, väzy, rohovka (predstavuje 90 % celkového kolagénu v tele)
	II	$[\alpha 1(\text{II})]_3$	vlákno	chrupavka, medzistavcový disk, chrptová struna (notochorda), sklovec
	III	$[\alpha 1(\text{III})]_3$	vlákno	koža, cievy
	V	$[\alpha 1(\text{V})]_2\alpha 2(\text{V})$ a $\alpha 1(\text{V})\alpha 2(\text{V})\alpha 3(\text{V})$	vlákno (skladanie s typom I)	rovnako ako typ I
	XI	$\alpha 1(\text{XI}) \alpha 2(\text{XI}) \alpha 3(\text{XI})$	vlákno (skladanie s typom II)	rovnako ako typ II
Fibrilárne - asociované	IX	$\alpha 1(\text{IX}) \alpha 2(\text{IX}) \alpha 3(\text{IX})$	postranné spojenie s vláknom typu II	chrupavka
	XII	$[\alpha 1(\text{XII})]_3$	postranné spojenie s vláknom typu I	šľachy, väzy
Tvoriacie sieť	IV	$[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$	„listová“ sieť	bazálna membrána
	VII	$[\alpha 1(\text{VII})]_3$	„ukotvovacie“ vlákna	pod skvamóznym epitelom

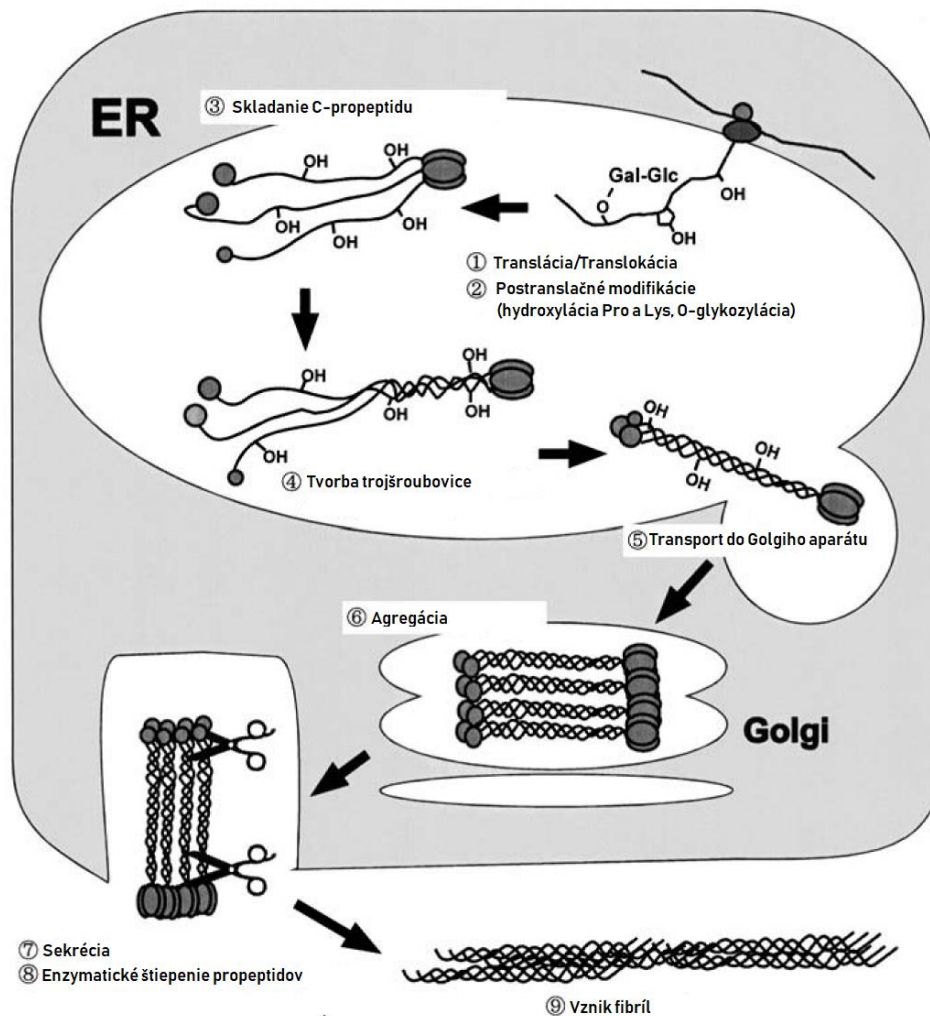


Obr. 2: Hierarchická štruktúra kolagénu. Od trojšroubovice až po vlákno. [9]

## 1.2 Biosyntéza kolagénu

Kolagén sa syntetizuje v endoplazmatickom retikule (ER) vo forme *prokolagénu*. Procesy, pomocou ktorých sa prokolagén syntetizuje v ER, zahŕňajú jedinečné kroky, ktoré neboli zistené pri biosyntéze globulárnych proteínov. Najcharakteristickejším krokom je vytvorenie trojitej šroubovice. Tento krok zahŕňa špecifické posttranslačné modifikácie, ktoré stabilizujú konformáciu trojitého helixu. Tvorba trojšroubovice je oveľa pomalší proces v porovnaní so skladaním globulárnych proteínov. Nedávny výskum ukázal, že tento postup funguje vďaka sáde ER-rezidentných molekulárnych chaperónov, ako je proteín disulfid izomeráza (PDI), peptidyl prolyl cis-trans izomeráza (PPIázy), proteín tepelného šoku (Hsp)47 a prolyl 4-hydroxyláza (P4-H) [10].

Molekuly *prokolagénu*, ktoré boli posttranslačne modifikované a zložené, sú potom prepravované do Golgiho aparátu. V Golgiho aparáte sú molekuly *prokolagénu* pozdĺžne zúžené a vytvárajú agregáty [11],[12]. *Prokolagénové* agregáty sú potom vylúčené do extracelulárneho priestoru, kde sú N- a C-propeptidy enzymaticky rozštiepené, čím sa generujú molekuly kolagénu [10].



Obr. 3: Biosyntéza prokolagénu [10]

Hnacou silou tvorby vlákien je tendencia kolagénu k samsoporiadaniu. Propeptidy majú dve hlavné funkcie, a to že riadia vnútrobunkovú tvorbu molekúl kolagénu s trojitou špirálou a zabraňujú intracelulárnej tvorbe veľkých kolagénových fibríl, ktoré môžu byť pre bunku smrteľné. Samsoporiadanie kolagénu do vlákien zabezpečuje vysokú pevnosť v ťahu [13].

Hneď ako sa kolagénové vlákna vytvoria v extracelulárnom priestore, sú zosieťované vytvorením kovalentných väzieb medzi lyzínovými zvyškami základných molekúl kolagénu. Zosieťovanie prebieha v niekoľkých krokoch. V prvom kroku sú lyzínové a hydroxylyzínové zvyšky deaminované extracelulárnymi enzýmami (lysyloxidázami) a tvorbou aldehydových skupín sa zvyšuje reaktivita. Vytvorené aldehydy potom spontánne reagujú s inými lyzínovými alebo hydroxylyzínovými zvyškami za vzniku kovalentných väzieb. Zosieťovanie prebieha prevažne medzi krátkymi nehelikálnymi koncami molekúl kolagénu [13].

Organizácia kolagénových vlákien v medzibunkovej hmote je prispôbená potrebám tkaniva. Fibrily majú odlišný priemer a sú rozdielne usporiadané v rôznych tkanivách. Napríklad v pokožke cicavcov sú orientované tak, aby odolali napätiu vo všetkých smeroch. V šľachách sú usporiadané do paralelných zväzkov pozdĺž hlavnej osi tlaku pôsobiaceho na šľachu. V kosti a rohovke vytvárajú periodicky vrstvené štruktúry, pričom jednotlivé vrstvy sú navzájom kolmé. Samotné spojivové tkanivá určujú veľkosť a usporiadanie kolagénových

vlákien. Bunky môžu exprimovať jeden alebo viac génov pre rôzne typy fibrilárnych molekúl prokolagénu a môžu tiež regulovať ich distribúciu po sekrécii. Stupeň zosieťovania môže byť vyšší alebo nižší podľa požadovanej pevnosti v ťahu [13].

### 1.3 Degradácia kolagénu

Fibrily a ďalšie podobné formy kolagénu sú vysoko stabilné, ich životnosť je najmenej 6 mesiacov a často aj viac. Napríklad životnosť kolagénu typu I v kosti sa odhaduje na jeden rok, kým premena kolagénu typu II v chrupavke je omnoho pomalšia, ak vôbec k nejakej zmene dôjde. Avšak riadená degradácia kolagénu je potrebná pre túto pomalú premenu, tak ako aj pre hojenie rán, vývoj tkaniva a jeho transformáciu [14].

Kolagén v roztoku podlieha progresívnej hydrolytickej degradácii spolu so stratou mnohých fyzikálnych vlastností. Rýchlosť tohto procesu závisí od teploty, pH systému a druhu iných rozpúšťadiel, ktoré môžu byť prítomné. Teplota zvyšuje rýchlosť hydrolýzy. Pri neutrálnom pH degradácia postupuje pomaly. Rýchlosť degradácie sa zvyšuje s veľkosťou zmeny pH. Okrem hydrolýzy esterových väzieb sa súčasne štiepia aj peptidové väzby v polypeptidovom reťazci. Niektoré štúdie ukázali, že natívny kolagén je rezistentný voči pôsobeniu bežných proteolytických enzýmov, s výnimkou niektorých enzýmov bakteriálneho alebo hmyzieho pôvodu, nazývaných *kolagenázy*, ktoré špecificky štiepia natívne kolagénové peptidové reťazce. Patria sem napríklad enzýmy izolované z *Clostridium histolyticum* a *Clostridium perfringens* [13].

Trojšroubovica je odolná voči degradácii proteázami. Odolnosť voči enzymatickému rozkladu pepsínom, trypsínom a chemotrypsínom sa často používa ako test na overenie konformácie trojitej špirály. Existuje súbor špecifických *matricových metaloproteináz* (MMP), ktoré sa podieľajú na degradácii všetkých zložiek extracelulárnej matrice, vrátane natívneho a denaturovaného kolagénu. *Matricové metaloproteinázy* sú prísne regulované. Táto regulácia zahŕňa aktiváciu proenzýmov a existenciu špecifických inhibítorov. Skupina MMP obsahuje najmenej dvadsať enzýmov, z ktorých všetky vyžadujú na svoju aktivitu  $Zn^{2+}$  a  $Ca^{2+}$  a každý enzým má odlišný, špecifický profil [14].

Oxidačné štiepenie je zložitejšie ako hydrolytická degradácia. Štúdia vplyvu oxidačných činidiel, ako je peroxid vodíka, jodistan sodný, brómnan sodný a železokyanatan sodný, ukázali, že ich reakcie s kolagénom sa navzájom značne líšia. Degradácia je založená na útoku zodpovedajúceho činidla na sacharidy obsiahnuté v kolagéne [13].

### 1.4 Fyzikálne a chemické vlastnosti kolagénu

#### 1.4.1 Botnanie

Kolagén patrí z fyzikálne chemického hľadiska k prechodným koloidným sústavám. Jednou z najdôležitejších vlastností týchto sústav je ich schopnosť botnať. Kolagénové vlákna po ponorení do vody obmedzene botnajú, pričom dochádza k zmene objemu, dĺžky a pružnosti vlákien. Časť vody obsiahnutej v nabotnanom kolagéne je tzv. botnacia voda, ktorú je možno odstrániť mechanickým pôsobením. Druhú časť tvorí voda hydratačná, ktorá je koloidne viazaná a je možné ju odstrániť jedine sušením [13].

### 1.4.2 Polyelektrolytický charakter

Rovnako ako aj iné bielkoviny, tak aj kolagén má charakter amfotérneho polyelektrolytu. Reakcie prebiehajú na základe pH prostredia. To znamená, že časť skupín postranných reťazcov sa ionizuje v alkalickkej a časť v kyslej oblasti pH. Náboj kolagénovej molekuly sa mení s pH. V silne kyslom prostredí má molekula kladný náboj, v alkalickom prostredí má náboj záporný. Izoelektrický bod natívneho kolagénu je pri pH 7 [13].

### 1.4.3 Denaturácia a renaturácia

K denaturácii bielkovín dochádza vplyvom niektorých chemikálií alebo tepelným pôsobením. Denaturáciou kolagénu dochádza k vzniku želatíny. Produktom denaturačnej reakcie vodného roztoku *tropokolagénu* sú dve molekuly líšiac sa molekulovou hmotnosťou, označované ako komponenty  $\alpha$  a  $\beta$ . Komponent  $\beta$  je následne možné rozštiepiť ešte na dva komponenty  $\alpha$ . Vznikajú teda tri štepy odpovedajúce trojitej špirále molekuly kolagénu. Mechanizmus denaturácie *tropokolagénu* je dvojstupňový proces. Najskôr dôjde k rozrušeniu trojitej špirály a makromolekula *tropokolagénu* vytvorí štatistické kĺbko, v ktorom sú ešte jednotlivé reťazce vzájomne pospájané. V druhom stupni sa tieto kĺbká rozpadávajú na tri frakcie: frakcia  $\alpha$  je predstavovaná jedným polypeptidovým reťazcom pôvodnej špirály, frakciu  $\beta$  tvoria dva doposiaľ spojené reťazce a frakciu  $\gamma$ , ktorú tvoria tri reťazce v nezmenenej forme štatistického kĺbka. K renaturácii, teda spätnej rekonštrukcii špirálovej konfigurácie môže dôjsť v prípade, že necháme denaturovaný roztok *tropokolagénu* dlhšie stáť pri nízkej teplote [13].

### 1.4.4 Hydrotermálna stabilita

Pri zahrievaní kolagénových vlákien vo vode dochádza k ich skráteniu asi o jednu tretinu pôvodnej dĺžky vlákna v smere osy. Táto termická kontrakcia je charakterizovaná teplotou zmrštenia. Príčinou zmrštenia je štiepenie intermolekulárnych priečných väzieb a tiež intramolekulárnych väzieb (kedy nastáva denaturácia kolagénu), ktoré udržujú trojitú špirálu v natívnom kolagénovom vlákne v natiahnutom stave. K určeniu stability trojitej špirály sa využíva obvykle meranie denaturačnej teploty prechodu kolagén – želatína, ktorý má ako fázová premena prvého rádu kladnú a výraznú zmenu entalpie. Hodnoty oboch teplôt, teda teploty zmrštenia a teploty denaturácie je možné v určitom rozsahu zvýšiť zosieťovaním kolagénu [13].

### 1.4.5 Premena na želatínu

Zahrievaním kolagénu vo vodnom roztoku vzniká želatína. Z hľadiska teoretických predstáv premeny kolagénu na želatínu rozoznávame tri pochody. V prvom dochádza k štiepeniu priečných kovalentných intermolekulárnych väzieb na úrovni kvartérnej štruktúry. Druhým pochodom je samotná denaturácia na úrovni terciárnej štruktúry a v poslednom dochádza k hydrolytickému štiepeniu peptidových väzieb polypeptidových reťazcov na molekulárnej úrovni. Zásah do štruktúry polypeptidového reťazca má charakter degradácie, depolymerácie a je javom, ktorý je nežiaduci. Čím menej týchto väzieb je rozštiepených, tým lepšie fyzikálne chemické vlastnosti má želatína.

Typickou vlastnosťou želatíny je prechod sol–gél. Gél želatíny sa javí tixotropne a jej viskozita sa mení s časom. Zahriatím na určitú teplotu sa želatína „topí“ a prechádza na sol [13].

## 1.5 Antigénnosť kolagénu

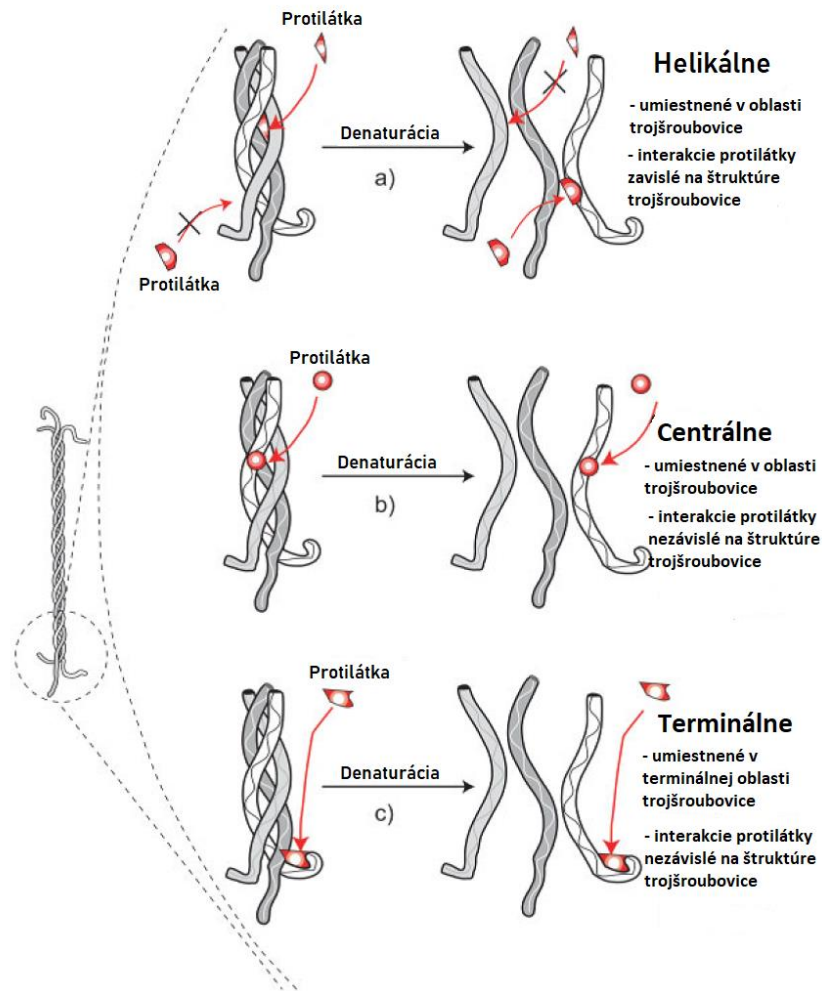
Chemická zlúčenina stimulujúca imunitnú odpoveď sa nazýva *antigén*, alebo *imunogén*. Imunitná odpoveď hostiteľa nie je zameraná na *antigén* ako celok, ale skôr na špecifické chemické skupiny nazývané antigénne determinanty na molekule alebo *epitopy*, ktoré sú zodpovedné za imunogénne vlastnosti antigénu. Dve veľmi dôležité vlastnosti *antigénov* sú *immunogenicita* (špecifická imunitná odozva) a reaktivita (schopnosť reagovať so špecifickým *antigénom*). „Kompletný“ *antigén* má obe tieto vlastnosti, zatiaľ čo „nekompletný“ *antigén* nevykazuje *immunogenicitu* ale je schopný sa viazať s protilátkami [15].

Kolagén ako biomateriál živočíšneho pôvodu vyvoláva obavy týkajúce sa jeho potenciálu vyvolať imunitnú odpoveď. Jeho schopnosť interagovať s vylučovanými protilátkami (*antigénnosť*) a vyvolanie procesu imunitnej odpovede, ktoré zahŕňa syntézu tých istých protilátok (*immunogenicita*), sú spojené s jeho makromolekulárnymi vlastnosťami, ktoré nie sú typické pre hostiteľa. Vďaka dôkazom o schopnosti kolagénu interagovať s protilátkami je v porovnaní s inými proteínmi slabšie imunogénny [16]. Klinické štúdie dokázali, že 2–4 % z celkovej ľudskej populácie má alergiu na kolagén získaný z hovädzieho dobytku [17].

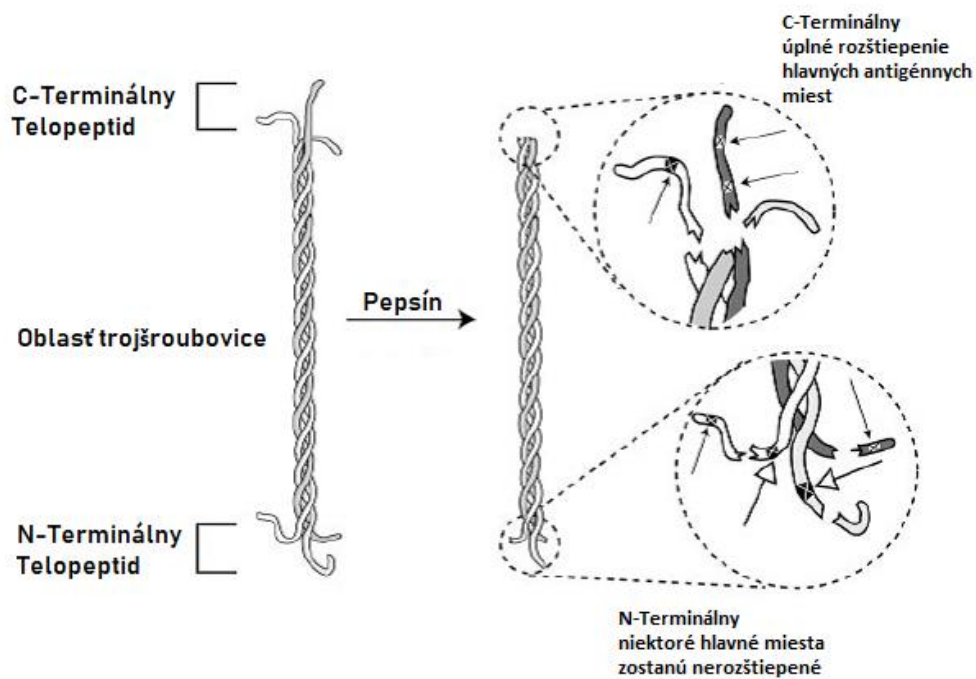
Antigénne determinanty kolagénu môžu byť rozdelené do týchto nasledujúcich kategórií (Obr. 4) [18]:

1. Rozpoznávanie helikálnej štruktúry pomocou protilátok závislé na 3D štruktúre (t.j. prítomnosť intaktnej trojšroubovice).
2. Centrálné rozpoznávanie založené výhradne na sekvencii aminokyselín a nie na 3D konformácii. Často sú skryté, interagujú s protilátkami iba v prípade, že je trojšroubovica rozvinutá, napr. v denaturovanom stave.
3. Antigénne determinanty terminálneho rozpoznávania sú hlavnými determinantami, ktoré sa nachádzajú v nehelikálnych koncových oblastiach (*telepeptidoch*), avšak môžu byť odstránené pôsobením pepsínu, čo vedie k vzniku *atelokolagénu* (Obr. 5) [19],[20],[21]. Štiepenie *telepeptidov* vedie ku vzniku kolagénu, ktorého trojšroubovica je neporušená. Ako aminokyselinové, tak aj karboxylové *telepeptidy* zohrávajú dôležitú úlohu pri sieťovaní a tvorbe vláken. Ich úplné odstránenie má za následok amorfné usporiadanie molekúl kolagénu a výrazne zvyšuje jeho rozpustnosť [18].

Možným spôsobom odstránenia obáv o medzidruhový prenos chorôb by mohlo byť použitie rekombinantného ľudského kolagénu, hoci by sa jednalo o drahšiu alternatívu [22]. Úplné imunogénne čistenie proteínov získaných z rôznych živočíšnych zdrojov je veľmi náročné a použitie týchto proteínov v implantátoch môže vyvolať imunitné odmietnutie. Použitie nečistého kolagénu môže spôsobiť *xenozoonózu* a prenos mikroorganizmov zo živočíšneho tkaniva do ľudského príjemcu [23]. V každom prípade, hoci kolagén získaný zo živočíšnych zdrojov môže vykazovať malý stupeň antigénnosti, je všeobecne považovaný za prijateľný pre využitie v oblasti tkanivového inžinierstva [7]. Okrem toho, v literatúre sa zatiaľ neuvádza žiadny významný dôkaz o imunologických výhodách *atelokolagénu* [24].



Obr. 4: Kategórie antigénnych determinantov kolagénu [18]



Obr. 5: Odstránenie telopeptidu pomocou pepsínu [18]



Iný prístup, ktorý by mohol viesť k zníženiu antigénnosti kolagénu a potlačeniu imunitnej odpovede spočíva v zosieťovaní kolagénu glutaraldehydom, ktoré spôsobí, že aminokyselinové a karboxylové skupiny telopeptidu budú doslova zablokované. Avšak údaje zo štúdií s použitím glutaraldehydu ako sieťovacieho činidla sú ťažko interpretovateľné, pretože je známe, že glutaraldehyd je cytotoxický. Je možné, že znížená antigénnosť spojená so sieťovaním pomocou glutaraldehydu je skôr spôsobená nešpecifickou cytotoxicitou ako špecifickým účinkom na antigénne determinanty [15].

## **1.6 Diferenčná kompenzačná kalorimetria**

Schopnosť posúdiť a modulovať stabilitu proteínov je hnacou silou bioterapeutického vývoja, od výberu vhodného kandidáta cez vývoj zloženia až po spracovanie. Historicky najbežnejšie využívanou a najdostupnejšou metódou na meranie tepelnej stability proteínov je diferenčná kompenzačná kalorimetria [25]. Denaturovaný proteín má vyššiu tepelnú kapacitu ako proteín v natívnom stave. Zmeny tepelnej kapacity spojené s rozkladom proteínov sú primárne spôsobené zmenou hydratácie postranných reťazcov, ktoré boli v natívnom stave nedostupné a v denaturovanom stave sú vystavené rozpúšťadlu. Za skladanie a stabilitu natívnych proteínov je zodpovedných mnoho faktorov vrátane hydrofóbných interakcií, vodíkových väzieb atď. Okrem toho je teplota denaturácie indikátorom termostability proteínov a vo všeobecnosti platí, že čím je teplota denaturácie vyššia, tým je proteín termodynamicky stabilnejší. Proteíny s vyššou teplotou denaturácie sú menej náchylné k rozvinutiu a denaturácii pri nižších teplotách [26].

Pri meraní termálnej stability proteínov pomocou DSC sa referenčná aj meraná vzorka nachádzajú v jednej kalorimetrickej cele a sú umiestnené na samostatných teplotných čidlách, ktoré sú spojené tepelným mostom. V meranej vzorke dochádza k zmene teploty v dôsledku exotermického alebo endotermického prechodu. Teplota ako meranej tak aj referenčnej vzorky je meraná nepretržite [27].

### **1.6.1 Teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria**

Tepelný tok je tvorený z dvoch častí, pričom jedna časť pripadá ohrevu vzorky a druhá časť patrí prebiehajúcim fázovým prechodom. DSC je schopná merať len celkovú sumu tepelného toku, zatiaľ čo TMDSC je schopné tieto dve zložky od seba oddeliť na nereverzibilnú a reverzibilnú časť. Celkový tepelný tok je vypočítaný ako priemer nameraných hodnôt modulovaného tepelného toku použitím Fourierovej transformácie. Reverzibilný signál tepelného toku je počítaný z reverzibilnej tepelnej kapacity. Nereverzibilný signál tepelného toku je získaný rozdielom celkového tepelného toku a reverzibilnej zložky tepelného toku [28].

Princíp merania oproti DSC sa líši v tom, že pri teplotnej modulácii sa využívajú dve súbežné rýchlosti ohrevu – lineárny ohrev, ktorý poskytuje informáciu ako pri použití nemedulovanej DSC a modulovaný ohrev, ktorý umožňuje simultánne meranie tepelnej kapacity vzorky. Výsledný signál je odvodený z troch meraných parametrov a to modulovaná teplota, modulovaný tepelný tok a čas. Medzi najhlavnejšie výhody TMDSC patrí zvýšená citlivosť pri detekcii skleneného prechodu, zvýšená rozlišovacia schopnosť, schopnosť merať tepelnú kapacitu aj počas fázového prechodu a meranie veľmi nízkych tepelných vodivostí [29].

Pri použití teplotne modulovanej DSC je nutné zohľadniť výber optimálnych hodnôt periódy, základnej rýchlosti ohrevu a amplitúdy ohrevu. Perióda sa udáva v sekundách a je to čas odpovedajúci jednému cyklu modulácie. Perióda musí byť dostatočne dlhá, aby bolo možné v zvolenom čase kvantitatívne meranie tepelného toku medzi referenciou a vzorkou. Rýchlosť ohrevu by mala byť čo najvyššia aby bola dosiahnutá maximálna produktivita, ale zároveň by mala byť dostatočne pomalá aby bol v oblasti prechodu získaný minimálny počet modulovaných cyklov. V oblasti prechodu by mali byť minimálne štyri modulované cykly. Amplitúda udáva sínusovú zmenu rýchlosti ohrevu, ktorá osciluje okolo základnej rýchlosti ohrevu. Väčšia hodnota amplitúdy spôsobuje nárast citlivosti pri zaznamenaní prechodov spojených so zmenou tepelnej kapacity [28]. Podľa toho či je vzorka počas merania zahrievaná alebo chladená rozlišujeme tri módy merania *heat-iso*, *heat-only* a *heat-cool*. Pri použití *heat-iso* sa vzorka chvíľu zahrieva a chvíľu je teplota konštantná. Rýchlosť ohrevu sa periodicky mení medzi základnou rýchlosťou ohrevu, amplitúdou ohrevu a nulou. Tento mód vykazuje maximálny pomer signálu k šumu. V *heat-only* móde je volená amplitúda malá a dochádza tam len k zahrievaniu vzorky. Nevýhodou je zlý pomer signálu k šumu. Múd *heat-cool* používa veľkú amplitúdu a vzorka sa počas merania periodicky zahrieva a chladí. Výhodou je možnosť použitia vysokej rýchlosti ohrevu a dobrý pomer signálu k šumu. Hlavnou nevýhodou je striedavé zahrievanie a chladenie vzorky počas merania, čo môže najmä pri analýze polymérov spôsobiť problém, keďže sa môžu vyskytovať odlišné procesy počas zahrievania a iné počas chladenia [30].

## 2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

### 2.1 Denaturácia proteínov

Biologicky funkčný stav proteínu je považovaný za jeho „natívny“ stav, ktorý je zvyčajne veľmi kompaktný, s dobre definovanou štruktúrou, ktorá je situovaná okolo hydrofóbného jadra. Jadro je tvorené z vedľajších hydrofóbných reťazcov, ktoré vyčnievajú z rôznych častí sekundárnej štruktúry proteínu. Spoločným prvkom sekundárnej štruktúry je tzv.  $\alpha$ -helix, ktorý má amfifilický charakter, čo znamená, že má ako hydrofóbnu, tak aj hydrofilnú časť. Ako už bolo spomenuté, hydrofóbná časť tvorí súčasť jadra. Kedysi bolo uvádzané, že proteín v denaturovanom stave je len náhodne usporiadaný polypeptidový reťazec. Moderné spektroskopické štúdie však ukazujú, že denaturovaný proteín sa vyskytuje vo forme náhodne usporiadaného polypeptidového reťazca len veľmi zriedka. Denaturovaný stav zvyčajne predstavuje zmes rôznych štruktúr. Typickým znakom denaturovaného stavu je, že hydrofóbné jadro je čiastočne alebo úplne vystavené pôsobeniu rozpúšťadla [31].

Denaturácia môže byť vyvolaná chemickými látkami alebo zahrievaním a môže byť reverzibilná alebo ireverzibilná. Proces denaturácie je pri vyššej teplote endotermický. Proteíny môžu denaturovať aj pri ochladzovaní. Teplota pri denaturácii za studena je však hlboko pod bodom mrazu. Väčšina proteínov vykazuje maximálnu stabilitu pri fyziologickej teplote [31].

Všetky praktické aplikácie kolagénu sú založené na jeho natívnej štruktúre trojšroubovice, ktorá určuje jeho špecifické vlastnosti a funkcie. Kolagén ako proteín je náchylný na zmenu teploty, ktorá môže vyvolať porušenie trojšroubovice a tým tepelnú denaturáciu kolagénu na želatínu. V dôsledku toho je znalosť tepelnej denaturácie kolagénu dôležitá na pochopenie

jeho termálnej stability, ktorá je základom pre praktické spracovanie a využitie tohto biomateriálu [32].

Kolagénová trojšroubovica je stabilizovaná jednak intermolekulárnymi vodíkovými väzbami a taktiež vodíkovými väzbami, ktoré tvorí kolagén s molekulami vody. Prítomnosť hydroxyprolínových zvyškov v štruktúre kolagénu je rozhodujúca, pretože v prítomnosti vody dochádza k tvorbe vodíkových väzieb sprostredkovaných molekulami vody práve medzi týmito hydroxyprolínovými reziduami. V dôsledku toho je zbalenie molekúl kolagénu z veľkej časti závislé od ich hydratácie. Proces denaturácie kolagénu začína v tzv. labilných doménach, v ktorých je koncentrácia hydroxyprolínových zvyškov nízka. Denaturácia kolagénu môže byť vratná alebo nevratná [33]. Teplota denaturácie kolagénu závisí od obsahu vody, stupňa zosieťovania a obsahu hydroxyprolínu. Viazaná voda sa javí ako veľmi dôležitá pre pochopenie fyzikálne-chemických, štrukturálnych a biologických vlastností biopolymérov, najmä bielkovín. Teplota, nad ktorou dochádza k denaturácii kolagénu závisí taktiež aj od vzorky kolagénu. Napríklad k denaturácii ľudského kolagénu typu I dochádza nad teplotou 41,5 °C, zatiaľ čo kolagén z kože ryby žijúcej v ľadových vodách denaturuje pri 6 °C [34].

## 2.2 Siet'ovanie kolagénu

K intra/intermolekulárnemu siet'ovaniu kolagénu dochádza najmä v oblasti telopeptidov. Jednotlivé kolagénové  $\alpha$ -reťazce sa môžu polymerizovať buď fyziologickým zosieťovaním alebo pomocou nefyziologických siet'ovacích činidiel. Siet'ovanie taktiež vedie k zníženiu antigénnosti kolagénu a v niektorých formách znižuje jeho kalcifikáciu [1]. Ideálne siet'ovadlo biomateriálov by malo mať nízku cenu a nemalo by byť cytotoxické. Jeho úlohou je zlepšiť mechanické vlastnosti materiálov. Siet'ovacie činidlá by sme mohli rozdeliť na chemické a prírodné. Medzi chemické siet'ovacie činidlá patria napríklad aldehydy, epoxydové zlúčeniny, karbodiimidy atď. Do skupiny prírodných siet'ovacích činidiel patrí napríklad genipin, kyselina nordihydroguaiaretová (NDGA), kyselina tanínová a prokyanidíny [35] – [39].

Natívne kolagénové vlákno vykazuje dobré mechanické vlastnosti. Kolagén vyrobený v laboratóriu, izolovaný zo surového materiálu vykazuje oveľa nižšiu pevnosť v ťahu, je náchylný na vlhkosť a zvýšenú teplotu a v neposlednom rade je charakteristický nekontrolovateľnou enzymatickou degradáciou. Všetky tieto vlastnosti limitujú je použitie v rôznych aplikáciách. Okrem toho spôsob natívneho zosieťovania nie je zabezpečený v podmienkach *in vitro*. Preto musí byť tento kolagén zosieťovaný aby sa dosiahla jeho stabilita v roztoku, znížila enzymatická senzitivita a zvýšila mechanická pevnosť vlákien tak ako aj teplota denaturácie [1].

### 2.2.1 Chemické siet'ovanie

Siet'ovacie činidlá sú zvyčajne využívané za účelom zlepšenia mechanických vlastností a zníženia biodegradácie kolagénových materiálov [40],[41]. Chemické siet'ovanie má dlhú históriu, napríklad v kožiarskom priemysle pri činení koží a odnedávna sa využíva hlavne v medicínskych a kozmetických aplikáciách. Zvýšenie mechanickej pevnosti vlákien je sprevádzané zvýšením teploty denaturácie. Vzhľadom na zníženú schopnosť hydratácie a

nižšiu prístupnosť pre enzýmy sú zosieťované kolagény menej náchylné k enzymatickej degradácii [42].

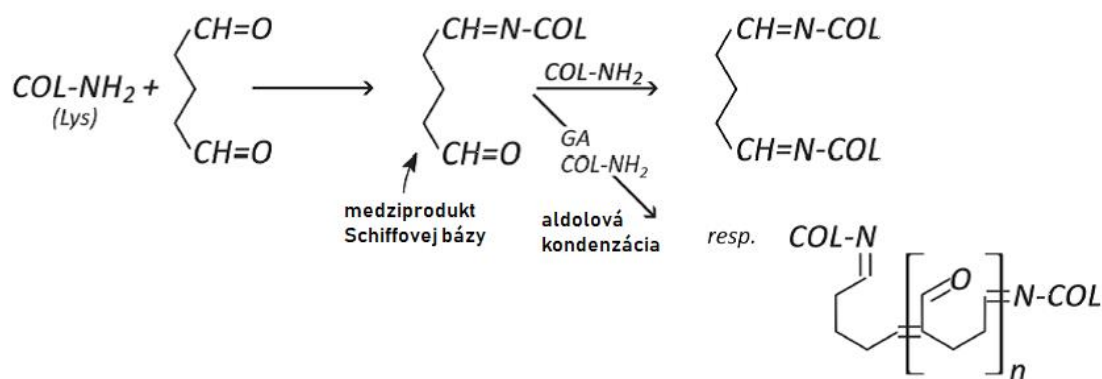
Hlavnou nevýhodou niektorých sieťovacích činidiel je ich nekontrolované uvoľňovanie, čo môže mať za následok cytotoxicitu alebo kalcifikáciu tkaniva [43]. Zistilo sa však, že sieťovadlá ako napr. difenylfosforylazid, 1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid/N-hydroxysukcínimid (EDC/NHS), genipin sú netoxické. Chemické zosieťovanie kolagénu môžeme dosiahnuť prostredníctvom kovalentnej amínovej/imínovej väzby, hlavne s  $\epsilon$ -aminoskupinou lyzínového zvyšku (napr. glutaraldehyd), takisto prostredníctvom karboxylovej skupiny v kolagéne (napr. EDC), pomocou vodíkovej väzby medzi polyfenolickou OH skupinou a rôznymi aminokyselinami (napr. genipin), alebo tvorbou komplexu kov-proteín (napr. sieťovanie chrómom). V súčasnosti sa vo veľkej miere využívajú najmä karbodiimidy (EDC), glutaraldehyd a genipin (získaný z rastlín) [1].

### 2.2.1.1 Glutaraldehyd

Glutaraldehyd je lacné a vysoko účinné chemické sieťovadlo s dlhou tradíciou a bežne sa využíva pri sieťovaní biomateriálov na báze kolagénu. Využíva sa najmä kvôli svojej vysokej reaktivite, dobrej rozpustnosti vo vodnom roztoku a po sieťovaní je materiál veľmi stabilný. Glutaraldehyd bol dlhé roky považovaný za zlatý štandard pri sieťovaní prasacieho kolagénu získaného zo srdcových chlopní [44]. Avšak neustále správy o cytotoxicite glutaraldehydu (toxický pre bunky, pomalá degradácia) a dôkazy, že môže spôsobiť lokálny zápal a kalcifikáciu tkaniva obmedzujú jeho využitie pri sieťovaní biomateriálov [45]. Napriek tejto skutočnosti bol glutaraldehyd historicky zahrnutý medzi netoxické chemické sieťovadlá. Mnohé štúdie testujúce nové biokompatibilné sieťovacie činidlá často používajú glutaraldehyd pre porovnanie efektivity sieťovania.

Glutaraldehyd vytvára adukty s voľnými primárnymi amínmi v proteínoch, hlavne s lyzínovými postrannými reťazcami a príležitostne s karboxylovou skupinou arginínu resp. glutamínu [45],[46]. Reakcia glutaraldehydu s lyzínovými alebo hydroxylizínovými zvyškami vedie k vytvoreniu medzi produktu Schiffovej bázy (Obr. 6) a následná reakcia vedie k aldolovej kondenzácii a dochádza k zosieťovaniu [47]. Nie všetky aminoskupiny kolagénu sú prístupné pre reakciu s glutaraldehydom. Množstvo voľných aminoskupín závisí na pH použitém počas sieťovania. Pri vyššom pH bol pozorovaný nižší obsah voľných aminoskupín. Aj keď je sieťovanie pri zásaditom pH o niečo efektívnejšie, tak všeobecne sa využíva sieťovanie pri kyslom pH (pH 5), pretože po sieťovaní pri tomto pH vykazovali vzorky nižšiu toxicitu. Príliš vysoká koncentrácia sieťovadla a príliš dlhá doba sieťovania vedú k zníženiu sieťovacej hustoty a vo vzorke sa nachádza mnoho voľných molekúl glutaraldehydu [48]. Glutaraldehyd je schopný sa sám polymerizovať a tvoriť tak 3D sieť.

Jednokrokové sieťovanie kolagénovej matrice sa ukázalo lepšie ako trojkrokové sieťovanie s postupným zvyšovaním koncentrácie sieťovadla. Jednokrokovú sieťovanú matricu vykazovala vyššiu odolnosť voči enzymatickej degradácii a vyššiu teplotu denaturácie ako matrica sieťovaná trojkrokovú. S najväčšou pravdepodobnosťou je to spôsobené „účinkom nepriepustnosti“, pri ktorom vyššia koncentrácia glutaraldehydu a krátka doba sieťovania spôsobili, že povrch matrice bol veľmi husto zosieťovaný a slúžil ako akási bariéra voči enzymatickému pôsobeniu na vnútornú menej zosieťovanú štruktúru [49].

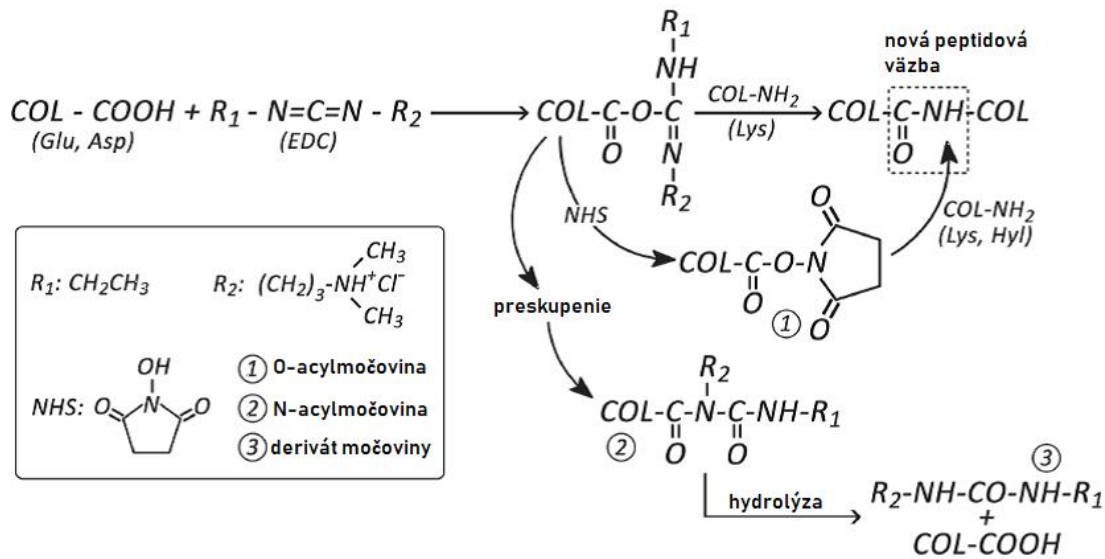


Obr. 6: Základná schéma sieťovania kolagénu pomocou glutaraldehydu a aldolová kondenzácia pri veľkom nadbytku glutaraldehydu [1]

### 2.2.1.2 Karbodiimidy a acylazidy

Karbodiimidy a acylazidy sú považované za relatívne biokompatibilné, vo vode rozpustné a však oveľa rýchlejšie degradované sieťovadlá ako glutaraldehyd. Karbodiimidy vytvárajú izopeptidové väzby medzi susednými molekulami [50]. Nezreagované funkčné skupiny karbodiimidu sa ťažko odstraňujú, preto je po sieťovaní potrebné viacnásobné premytie glycínom, aby sa odstránili zvyšky sieťovadla, ktoré môžu byť toxické najmä v prípade biologických aplikácií [1].

Kovalentné sieťovanie pomocou 1-etyl-3-(3-dimetylamínopropyl)karbodiimidu/N-hydroxysukcínimidu (EDC/NHS) je dnes bežne využívanou metódou. Reakcia je založená na tvorbe peptidovej väzby medzi NH<sub>2</sub> z lyzínu alebo hydroxylyzínu a C=O z kyseliny glutamovej alebo kyseliny asparagovej [46]. EDC sa nezúčastňuje väzby pri sieťovaní ale transformuje sa na vo vode rozpustné deriváty močoviny. EDC je známe ako málo cytotoxické sieťovadlo, pretože nie je začlenený do zosieťovanej štruktúry, avšak deriváty močoviny vytvorené ako vedľajšie produkty môžu vykazovať určitý stupeň cytotoxicity [51],[52]. Potenciálna depolymerizácia zosieťovaných štruktúr pomocou EDC nevedie k vzniku toxických produktov [53],[54]. Pri sieťovaní kolagénových vlákien malo EDC ako sieťovadlo príliš rýchly a silný účinok a tak bola použitá kombinácia EDC/NHS. Reakčné produkty NHS môžu byť odstránené premytím [54]. Kombinácia EDC/NHS vedie k spomaleniu sieťovania, keďže NHS konkuruje EDC v reakcii a pridáva ďalší reakčný krok (Obr. 7). Dochádza taktiež k inhibícii hydrolyzy a znižuje sa tvorba vedľajších produktov a medziproduktov (deriváty N-acylmočoviny a O-acylmočoviny) [46]. Rýchlosť sieťovania môže byť kontrolovaná koncentráciou EDC a pomerom EDC/NHS. Štúdie uvádzajú, že kolagénové skafoldy zosieťované pomocou EDC/NHS boli cytocompatibilné a štruktúrne stabilné. Zdá sa teda, že EDC/NHS predstavuje lepšie sieťovacie činidlo ako je napríklad glutaraldehyd alebo genipin [54].



Obr. 7: Schéma siet'ovania kolagénu buď pomocou EDC alebo v kombinácii s NHS, aby bolo modifikované množstvo medziproduktov a vedľajších produktov [1]

### 2.2.1.3 Epoxidové zlúčeniny

Epoxidové zlúčeniny obsahujú niekoľko epoxidových skupín, ktoré môžu reagovať s aminoskupinami, karboxylovými skupinami a hydroxylovými skupinami. Používajú sa na uchovávanie biologických tkanivových materiálov a táto fixačná technika bola použitá na zosieťovanie srdcových chlopní a cievnych štepov [35],[36]. Skafoldy zosieťované pomocou epoxidov sú biele, mäkké, nezmršťujú sa a kolagén si v nich udržiava prirodzený stav. Siet'ovanie pomocou epoxidov je však lineárne a nie je možné dosiahnuť vysoký stupeň zosieťovania. Takto siet'ovaný kolagén má nízku stabilitu a nedokáže odolať enzymatickej degradácii [55]. Epoxidové zlúčeniny vykazujú aj určitú úroveň cytotoxicity a vyvolávajú imunitnú odpoveď a kalcifikáciu tkaniva podobne ako glutaraldehyd [36],[55],[56].

### 2.2.1.4 Deriváty karboxylových kyselín

Siet'ovanie je založené na reakcii karboxylových skupín činidla s kolagénovými aminoskupinami. Na siet'ovanie kolagénu sa využíva napríklad ester kyseliny citrónovej. Uvádza sa, že kolagén zosieťovaný pomocou esteru citrónovej kyseliny vykazuje určité rozdiely napríklad pri botnaní, ktoré je citlivé na pH [1]. Kolagénové gély po siet'ovaní vykazovali antitrombogenetické vlastnosti a dobrú bunkovú proliferáciu [57].

Okrem kyseliny citrónovej môže byť na siet'ovanie použitá aj kyselina jantárová. Takéto siet'ovanie je nekovalentné a pravdepodobne je založené na interakcii  $NH_3^+$  a  $COO^-$  a na vzniku intramolekulárnych vodíkových väzieb. Kolagén zosieťovaný kyselinou jantárovou vykazoval lepšie mechanické a tepelné vlastnosti. Kyselina jantárová je netoxická a mohla by byť preto vhodná na využitie v bioaplikáciách [58].

### 2.2.1.5 Prírodné siet'ovadlá

#### Genipin

Genipin sa získava z látky nazývanej geniposid, ktorá sa extrahuje z plodov *Gardenia jasminoides Ellis* a je jednou z aktívnych zložiek využívaných v čínskej medicíne. Patrí k iridoidným zlúčeninám, ktoré majú viacero aktívnych skupín, ako napríklad hydroxylovú

a karboxylovú [59]. V niektorých biomateriáloch môže genipin spontánne reagovať s voľnými aminoskupinami lyzínu, hydroxylyzínu a arginínu, vytvárať iridoidné nitrídy a následne tvoriť intramolekulárne a intermolekulárne zosieťovanie polymerizáciou s heterocyklickou štruktúrou [55],[60]. Genipin vytvára prstencové zosieťovanie, ktoré je stabilnejšie než retikulárne zosieťovanie tvorené napríklad glutaraldehydom. V porovnaní s glutaraldehydom vykazujú materiály sieťované genipinom nižšiu cytotoxicitu a nedochádza k uvoľňovaniu genipinu v procese konzervácie [55],[61]. Avšak vysoká cena, komplexný extrakčný proces a tmavomodré sfarbenie zosieťovaných materiálov výrazne limitujú využitie genipinu ako sieťovadla [55].

#### *Kyselina nordihydroguaiaretová*

Kyselina nordihydroguaiaretová (NDGA) je prirodzená rastlinná polyfenolová zlúčenina obsahujúca dva funkčné orto-katecholy na koncoch krátkeho alkánu [55]. Reakčný mechanizmus sieťovania s NDGA sa líši od mechanizmov sieťovania s glutaraldehydom a karbodiimidmi. Glutaraldehyd tvorí adukty s voľnými primárnymi amínmi v proteínoch, najmä s lyzínovými bočnými reťazcami. Karbodiimid vytvára izopeptidové väzby medzi susednými molekulami. Presný mechanizmus sieťovania NDGA nie je úplne jasný, zdá sa však, že NDGA je chemicky naviazaný na kolagénové vlákna a zapuzdruje kolagénové vlákna tvoriace niečo pripomínajúce NDGA maticu. Odolnosť matrice voči enzymatickému účinku ešte nie je úplne jasná. NDGA polymér nie je náchylný k proteolytickej degradácii, pretože neobsahuje žiadne peptidové väzby. Kolagénové vlákna obsiahnuté v polymerizovaných vláknach však môžu byť degradované špecifickými enzýmami, ktoré prenikajú do molekuly [1]. Zosieťované kolagénové vlákna sú hnedé, čo je podobné prírodným kolagénovým vláknam. Koncentrácia NDGA priamo ovplyvňuje mechanickú pevnosť a tvrdosť kolagénu avšak koncentrácia vyššia než 100  $\mu\text{M}$  je pre bunky toxická [55],[62].

#### *Kyselina tanínová*

Kyselina tanínová je polyfenolická zlúčenina vyskytujúca sa v ovocí, semenách strukovín, obilninách a rôznych nápojoch (víno, čaj, kakao a jablkový džús) [55]. Má relatívne vysokú molekulovú hmotnosť a môže reagovať so sacharidmi, proteínmi a inými biomakromolekulami [63]. Interakcia s kolagénom je hlavne vďaka vodíkovým väzbám a hydrofóbnemu efektu a jej mechanizmus je ovplyvňovaný molekulovou hmotnosťou a trojrozmernou priestorovou štruktúrou biomateriálu [64],[65].

### **2.2.2 Fyzikálne sieťovanie**

Okrem chemických činidiel môže byť sieťovanie indukované aj niekoľkými fyzikálnymi faktormi, ako je gama alebo UV žiarenie, prípadne tepelne [66]. Výhodou fotochemického sieťovania je, že sa dá ľahko regulovať intenzitou žiarenia a dobou expozície. Niektoré štúdie dokonca uvádzajú, že účinok fyzikálneho sieťovania môže byť lepší ako použitie chemického sieťovania [67].

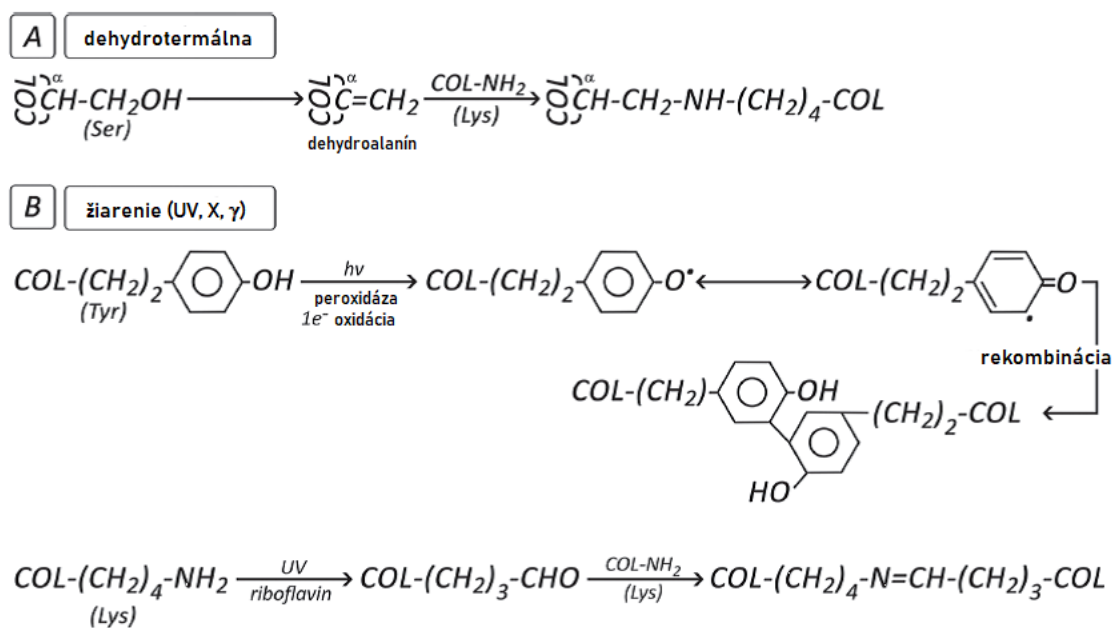
### 2.2.2.1 Dehydrotermálna metóda

Dehydrotermálna metóda (Obr. 8 (A)) sa používa hlavne v priemysle v kombinácii s rozsiahlou dehydratáciou vo vákuu, aby sa vytvoril nerozpustný zosieťovaný kolagén s vysokou denaturačnou teplotou. Alternatívne môže byť táto metóda kombinovaná aj s UV žiarením [68].

### 2.2.2.2 Siet'ovanie s využitím žiarenia

Bolo zistené, že kolagén je dokonca možné siet'ovať pomocou röntgenového alebo gama žiarenia, avšak tento spôsob je pravdepodobne sprevádzaný degradáciou [66],[68]. Ožarovanie vlhkého kolagénu vedie k jeho zosieťovaniu, kým ožarovanie kolagénu v suchom stave vedie k degradácii [69]. Je zrejmé, že ďalšie faktory, ako je doba expozície a teplota okolia ovplyvňujú to, či bude mať prednosť siet'ovanie alebo degradácia [1].

Metóda využívajúca UV žiarenie (Obr. 8 (B)) je založená na modifikácii aminoskupín lyzínu, hydroxylyzínu a tyrozínových zvyškov [1]. Udáva sa, že UV žiarenie má podobný účinok ako röntgenové žiarenie alebo gama žiarenie a otázka, či prevažuje siet'ovanie alebo degradácia závisí od prítomnosti kyslíka, pH, typu kolagénu, vlnovej dĺžky UV svetla a času expozície [1],[68].



Obr. 8: Príklad fyzikálneho siet'ovania kolagénu: a) dehydrotermálne siet'ovanie, b) siet'ovanie s využitím radikálovej oxidácie a žiarenia [1]



## 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Použité chemikálie

- Kolagén z prasat'a (CEITEC)
- Kolagén z Tilapie (Collado s.r.o)
- Kolagén z koňa (Collado s.r.o)
- Kolagén z kravy (Collado s.r.o)
- Kolagén z krokodýla (Collado s.r.o)
- *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid hydrochlorid, EDC (Sigma Aldrich)
- *N*-hydroxysukcínimid, NHS (Sigma Aldrich)
- Hydrogénfosforečnan sodný, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( Lachema a.s.)
- Lyofix (Collado s.r.o)
- Ultračistá voda (typ II podľa ISO 3696) bola pripravená na Elix 5UV Water Purification System (Merck spol. s.r.o.)
- Chlorid sodný, NaCl (Sigma Aldrich)
- Chlorid draselný, KCl (Sigma Aldrich)
- Hydrogénfosforečnan draselný, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich)
- Kolagenáza z *Clostridium histolyticum* (Sigma Aldrich)

### 3.2 Použité prístroje

- Analytické váhy – DENVER INSTRUMENT, SI-234A
- Dezintegrátor – IKA Ultra Turrax ® T18 basic
- Centrifúga – Med. Instruments, MPW-350R
- Lyofilizátor – ALPHA 2-4 LSC, Chaist ®
- DSC analyzátor – TA Instruments, DSC Q2000
- DSC analyzátor – TA Instruments, Discovery DSC
- Skenovací elektrónový mikroskop Megellen 400/L, FEI
- Termogravimetrický analyzátor Q5000IR, TA Instruments
- FTIR spektrofotometer Nicolet iS50

### 3.3 Príprava roztokov

#### 3.3.1 Príprava zásobného roztoku PBS

Roztok PBS o pH 7,4 bol pripravený rozpustením 8 g NaCl, 200 mg KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 240 mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> v 1000 ml ultračistej vody.

#### 3.3.2 Príprava roztoku kolagenázy

Roztok kolagenázy, ktorý bol použitý na degradáciu kolagénových filmov bol pripravený rozpustením 2,2 mg kolagenázy z *Clostridium histolyticum* v 1000 ml zásobného roztoku PBS.

### 3.4 Príprava vzoriek

#### 3.4.1 Príprava 1% roztoku kolagénu

Na analytických váhach bolo odvážené potrebné množstvo lyofilizovaného kolagénu, ktoré bolo následne rozstrihané na malé kúsky. Po nabotnaní v ultračistej vode bola vzniknutá zmes zhomogenizovaná pomocou dezintegrátoru po dobu niekoľkých minút až do vzniku

homogénnej suspenzie (Príloha 1 (A)). Roztok bol následne zbavený bubliniek vzduchu centrifugáciou pri 2500 ot./min po dobu 5 minút.

### 3.4.2 Príprava kolagénových filmov

Pripravený roztok kolagénu bol odvážený na analytických váhach do polystyrénových Petriho misiek, v ktorých bol potom sušený v digestore na vzduchu až do konštantnej hmotnosti (Príloha 1 (B)).

### 3.4.3 Siet'ovanie kolagénových filmov

Pripravené kolagénové filmy boli siet'ované dvoma rôznymi spôsobmi a to pomocou vodného roztoku 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimidu/N-hydroxysukcínimidu (EDC/NHS) a pomocou vodného roztoku Lyofix-u, čo je zmes etylénglykolu, formaldehydu a metanolu.

Na siet'ovanie pomocou EDC/NHS bol do odmernej banky pripravený vodný roztok, v ktorom bola koncentrácia EDC  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a koncentrácia NHS  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pripravené kolagénové filmy boli ponorené do takto pripraveného roztoku po dobu 2 hodín a došlo k ich zosiet'ovaniu. Filmy boli následne ponorené do 0,1 M roztoku  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  na 30 minút. Tento proces premývania bol opakovaný dvakrát. Potom boli filmy ponorené do destilovanej vody tiež na 30 minút a tento proces premývania bol opakovaný trikrát.

Na siet'ovanie pomocou Lyofix-u bol do odmernej banky pripravený roztok o koncentrácii 2,2 obj. %. Kolagénové filmy boli ponorené do roztoku Lyofix-u po dobu 2 minút a následne boli ihneď umiestnené do destilovanej vody po dobu 10 minút, čím došlo k premytiu kolagénových filmov a odstráneniu prebytočného siet'ovacieho činidla.

## 3.5 Charakterizácia vzoriek

### 3.5.1 Stupeň nabotnania a obsah vody

Vzorka pripraveného filmu bola zvážená a ponorená do ultračistej vody. V určitých časových intervaloch (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 a 180 minút) bola vzorka vybratá, zbavená povrchovej vody pomocou filtračného papiera a znova zvážená.

Stupeň nabotnania kolagénových filmov bol definovaný ako pomer hmotnosti mokrej vzorky ( $w$ ) ku hmotnosti suchej vzorky ( $w_0$ ), vid' (R 1). Každá hodnota bola spriemerovaná z troch paralelných meraní.

Obsah vody bol vypočítaný ako pomer nárastu hmotnosti ( $w - w_0$ ) ku hmotnosti mokrej vzorky ( $w$ ), vid' (R 2).

$$\text{Stupeň nabotnania} = \frac{w}{w_0}, [-] \tag{R 1}$$

$$\text{Obsah vody} = \frac{w - w_0}{w} \cdot 100, [\%] \tag{R 2}$$

### 3.5.2 Enzymatická degradácia

Vzorky kolagénových filmov boli umiestnené do vialiek a následne bolo ku vzorkám pridaných 5 ml zásobného roztoku PBS. Vzorky boli umiestnené do inkubátoru pri  $37^\circ\text{C}$  po

dobu 1 hodiny aby došlo k ich nabotnaniu. Po nabotnaní bol roztok PBS z vialiek odstránený a ku každej vzorke bolo pridaných 5 ml roztoku kolagenázy o koncentrácii 2,2 mg/l. Vialky so vzorkami boli opäť umiestnené do inkubátoru a v určitých časových intervaloch (1 h, 4 h, 8 h, 1 deň, 2 dni, 3 dni, 6 dní a 9 dní) boli vzorky vybraté z roztoku, osušené filtračným papierom a zvážené.

Úbytok hmotnosti bol vypočítaný podľa rovnice (R 3), kde  $w_d$  je hmotnosť vzorky kolagénového filmu v daný deň merania a  $w_n$  je hmotnosť vzorky v maximálnom stupni nabotnania. Ako  $w_n$  bola použitá hmotnosť po 60 minútach botnania v prvý deň merania, kedy boli všetky vzorky filmov maximálne nabotnané.

$$Degradácia = 100 - \frac{w_d \cdot 100}{w_n}, [\%]$$

(R 3)

### 3.5.3 Diferenčná kompenzačná kalorimetria

#### 3.5.3.1 Optimalizácia

Na optimalizačnú časť kalorimetrických meraní bol použitý DSC analyzátor DSC Q2000, TA Instruments. Prístroj bol pred samotným meraním kalibrovaný podľa predpísaného postupu. Samotná optimalizácia bola pre ďalšiu prácu dôležitá z hľadiska posúdenia vplyvu rýchlosti ohrevu, voľby amplitúdy a periódy na denaturáciu kolagénových vzoriek. Ako referencia pri meraní bola použitá prázdna hermeticky uzavretá hliníková panvička. Meranie bolo vykonané so vzorkou nesieťovaného kolagénového filmu pripraveného z prasacieho kolagénu.

#### *Vplyv rýchlosti ohrevu*

Po kalibrácii prístroja bola do Tzero hliníkovej panvičky navážená vzorka kolagénového filmu. Panvička bola hermeticky uzavretá a následne vložená do meracej cely. Vzorka bola lineárne zahrievaná v teplotnom rozmedzí od 10 °C do 100 °C s rôznou rýchlosťou ohrevu. Zvolené rýchlosti ohrevu boli 1, 2 a 5 °C/min. Meranie bolo pri každej rýchlosti ohrevu zopakované trikrát vždy s novou vzorkou.

#### *Vplyv amplitúdy a periódy modulácie*

Vzorka kolagénového filmu bola na analytických váhach navážená do panvičky. Meranie prebiehalo pri lineárnom ohreve, cez ktorý bola preložená sínusová teplotná modulácia. Vzorka bola lineárne zahrievaná v rozmedzí od 10 °C do 100 °C. Meranie prebiehalo pri dvoch rôznych periódach a troch rôznych módoch merania, ktorým zodpovedajú príslušné hodnoty amplitúdy (viď. Tab. 2). Každé meranie bolo zopakované trikrát vždy s novou vzorkou.

Tab. 2: Zodpovedajúce hodnoty amplitúdy pre jednotlivé periódy a módy

Rýchlosť ohrevu	2 °C/min		
Periódka	Mód	60 s	100 s
Amplitúda	<i>Heat-only</i>	± 0,159 °C	± 0,265 °C
	<i>Heat-iso</i>	± 0,318 °C	± 0,53 °C
	<i>Heat-cool</i>	± 0,636 °C	± 1,06 °C

### **3.5.3.2 Stanovenie teploty denaturácie kolagénových filmov**

Po optimalizácii a vybratí najvhodnejších parametrov pre stanovenie teploty denaturácie kolagénových filmov boli vzorky merané na DSC analyzátore Discovery DSC, TA Instruments. Prístroj bol pred samotným meraním kalibrovaný podľa predpísaného postupu.

Pre jednotlivé vzorky kolagénových filmov bola stanovená ich teplota denaturácie a výsledky boli následne porovnané. Meranie každej vzorky bolo zopakované trikrát.

### **3.5.4 Infračervená spektroskopia**

FTIR analýza bola vykonaná za účelom kvalitatívneho stanovenia väzieb prítomných v pripravených kolagénových vzorkách a porovnania nesieťovaných a sieťovaných vzoriek. Vzorky boli merané vo forme suchých kolagénových filmov. Na meranie bol použitý FTIR spektrofotometer Nicolet iS50 s diamantovým kryštálom. Spektrum bolo získané ako priemer 32 skenov v rozsahu 4 000 až 400  $\text{cm}^{-1}$ . FTIR spektrá boli vyhodnotené pomocou softvéru OMNIC 9.2.106.

### **3.5.5 Termogravimetrická analýza**

Prostredníctvom termogravimetrickej analýzy, ktorá bola vykonaná pomocou prístroja TGA Q5000 (TA Instruments), boli stanovené percentuálne úbytky hmotnosti vzorky v závislosti na vzrastajúcej teplote (25 °C až 800 °C) v oxidačnej atmosfére suchého vzduchu a v inertnej dusíkovej atmosfére s rýchlosťou ohrevu 10 °C/min.

### **3.5.6 Skenovacia elektrónová kryomikroskopia**

Prostredníctvom techniky kryo-SEM bola na Ústave prístrojovej techniky AV ČR v Brne pozorovaná štruktúra kolagénových filmov pred a po denaturácii. Na analýzu boli použité filmy z prasacieho kolagénu sieťované pomocou EDC/NHS, sieťované pomocou Lyofix-u a nesieťované. Vzorky boli pripravené v dvoch sadách, kde jednu sadu tvorili vzorky určené k denaturácii a druhú sadu vzorky, ktoré nebudú zahrievané a denaturované. Filmy boli následne umiestnené do vialiek s destilovanou vodou, po dobu 60 minút kedy boli filmy maximálne nabotnané. Následne bola jedna sada vzoriek zahriata nad teplotu denaturácie stanovenej pomocou DSC pre jednotlivé typy sieťovania. Pripravené vzorky boli potom pomocou kvapalného dusíku rýchlo zamrazené. Pred týmto šokovým zmrazením boli vzorky ponechané pri izbovej teplote. Ďalej boli vzorky vložené (stále pri teplote kvapalného dusíku) do kryo vákuovej komory (ACE600, Leica Microsystems), kde boli zamrazené vzorky rozlomené a krátko sublimované pri -95 °C. Takto vysušená vzorka bola premiestnená pomocou tzv. člunku pri vysokom vákuu do SEM (Magellen 400/L, FEI), vybaveným chladiacim zariadením. Rozlomené vzorky boli pozorované elektrónovým lúčom o napätí 1 keV pri -135 °C.

## **4 VÝSLEDKY A DISKUSIA**

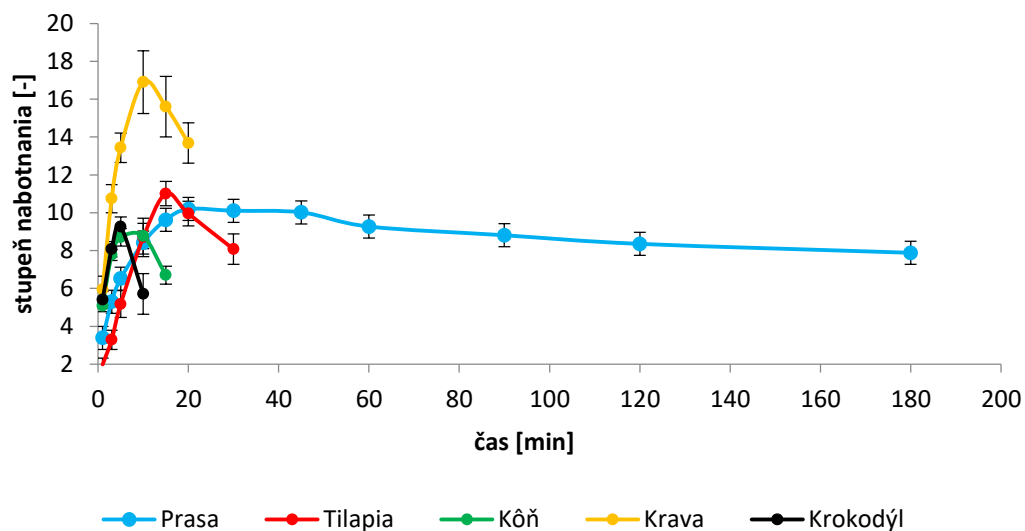
### **4.1 Stupeň nabotnania a obsah vody**

Schopnosť kolagénových filmov botnať bola študovaná v ultračistej vode. Už po niekoľkých minútach filmy absorbovali veľké množstvo vody a približne po 45 minútach boli všetky

vzorky kolagénových filmov maximálne nabotnané. Stupeň nabotnania nám vypovedá o kompaktnosti filmu a o schopnosti viazať vodu do jeho štruktúry.

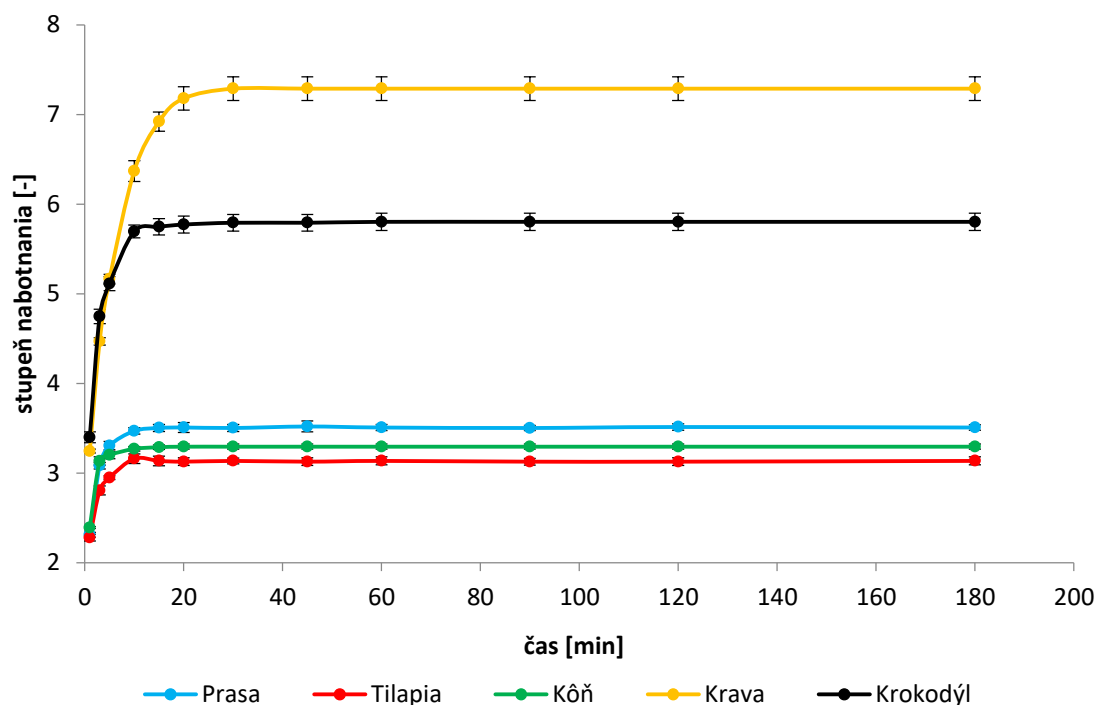
Stupeň nabotnania nesieťovaných kolagénových filmov bolo problematické stanoviť, pretože už po pár minútach dochádzalo pri sušení filmov filtračným papierom k ich rozpadu a tým pádom ich nebolo možné ďalej zväžiť. Najstabilnejšie sa v tomto prípade javila vzorka filmu pripraveného z prasacieho kolagénu, ktorú bolo možné zväžiť vo všetkých časových intervaloch merania. Avšak z Graf 1 je vidieť, že približne po 45 minútach začalo dochádzať aj k degradácii tohto filmu, keďže dochádza k znižovaniu stupňa nabotnania. Degradácia tejto vzorky však nebola až taká výrazná ako tomu bolo pri ostatných. Príčinou vyššej stability filmu z prasacieho kolagénu by mohla byť skutočnosť, že zatiaľ čo vzorky kolagénu koňa, kravy, Tilapie a krokodýla pochádzali z kože, tak prasací kolagén bol získaný zo šľachy.

V Príloha 2 je kvôli lepšej prehľadnosti zobrazený graf stupňa nabotnania nesieťovaných kolagénových filmov počas prvých 40 minút.



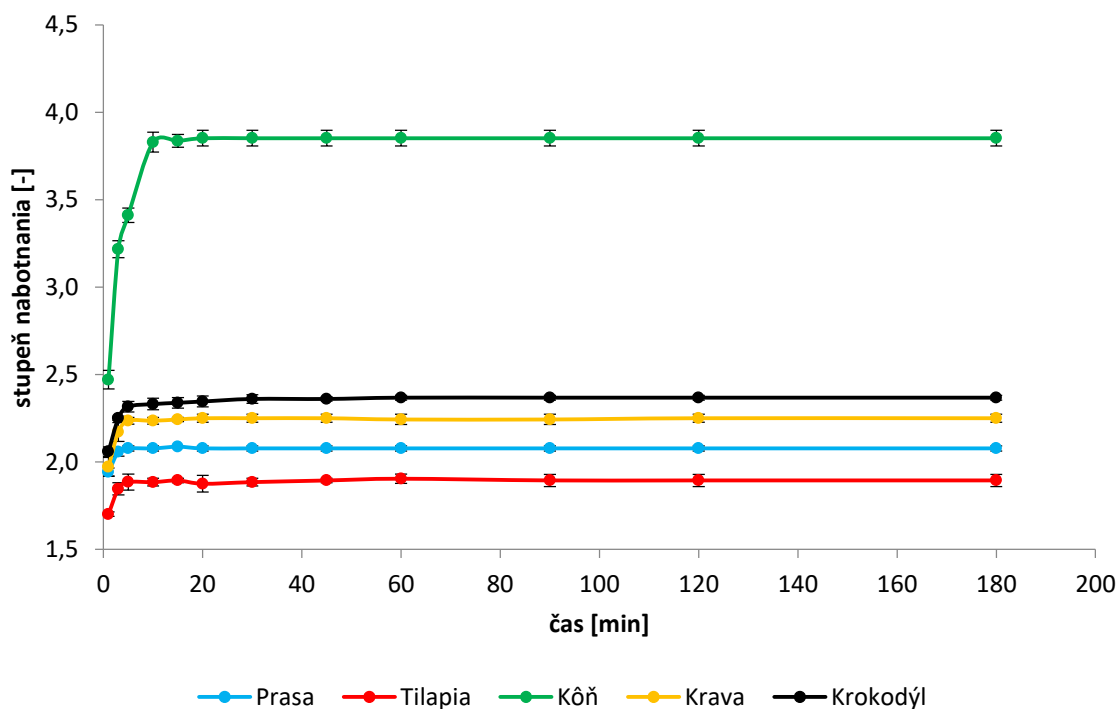
Graf 1: Stupeň nabotnania nesieťovaných kolagénových filmov

V Graf 2 je zobrazená závislosť stupňa nabotnania kolagénových filmov sieťovaných pomocou EDC/NHS na čase. V porovnaní z Graf 1 vidíme, že sieťovanie ovplyvnilo štruktúru a filmy boli stabilnejšie. Najvyšší stupeň nabotnania vykazovali filmy pripravené z kolagénu z kravy a krokodýla, čo znamená, že sieťovanie neovplyvnilo schopnosť filmov viazať vodu tak výrazne ako tomu bolo v prípade ostatných vzoriek. Naopak najnižší stupeň nabotnania mal film pripravený z kolagénu z Tilápie. V tomto prípade teda vzorka obsahovala najmenej väzobných miest, kam by sa mohla naviazať voda a môžeme predpokladať, že tento film bol najlepšie zosieťovaný a jeho štruktúra bola najkompaktnejšia.



Graf 2: Stupeň nabotnania kolagénových filmov sieťovaných pomocou EDC/NHS

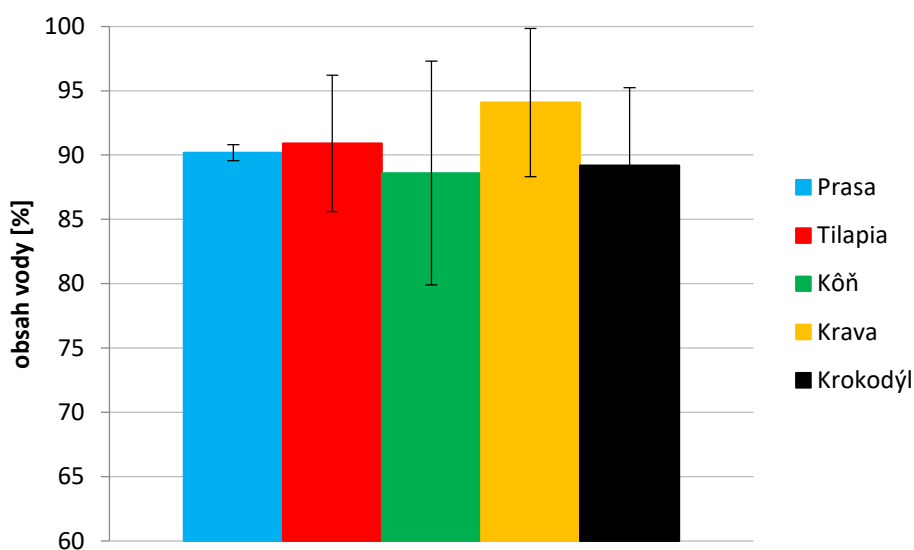
Sieťovanie Lyofix-om taktiež zamedzilo degradácii vzoriek. Stupeň nabotnania jednotlivých filmov bol v porovnaní s filmami sieťovanými EDC/NHS výrazne nižší. To znamená, že voda nebola schopná dobre prenikať do ich štruktúry. Najvyšší stupeň nabotnania vykazovala vzorka filmu pripravená z konského kolagénu. Na sieťovanie pomocou Lyofix-u sú vo vzorke potrebné voľné aminoskupiny, keďže stupeň nabotnania filmu z konského kolagénu bol v porovnaní s ostatnými vzorkami výrazne vyšší, môžeme predpokladať, že táto vzorka kolagénu neobsahovala vo svojej štruktúre veľké množstvo voľných aminoskupín, ktoré by sa mohli zúčastniť sieťovania a preto nebolo sieťovanie Lyofix-om tak efektívne ako v prípade ostatných vzoriek. Tento predpoklad bol potvrdený stanovením teploty denaturácie jednotlivých vzoriek v kapitole 4.3.3. Stupeň nabotnania ostatných vzoriek sa pohyboval približne v rozmedzí od 1,9 do 2,4. Najnižší stupeň nabotnania rovnako ako v prípade sieťovania EDC/NHS vykazovala vzorka filmu z Tilapie.



Graf 3: Stupeň nabotnania kolagénových filmov sieťovaných pomocou Lyofix-u

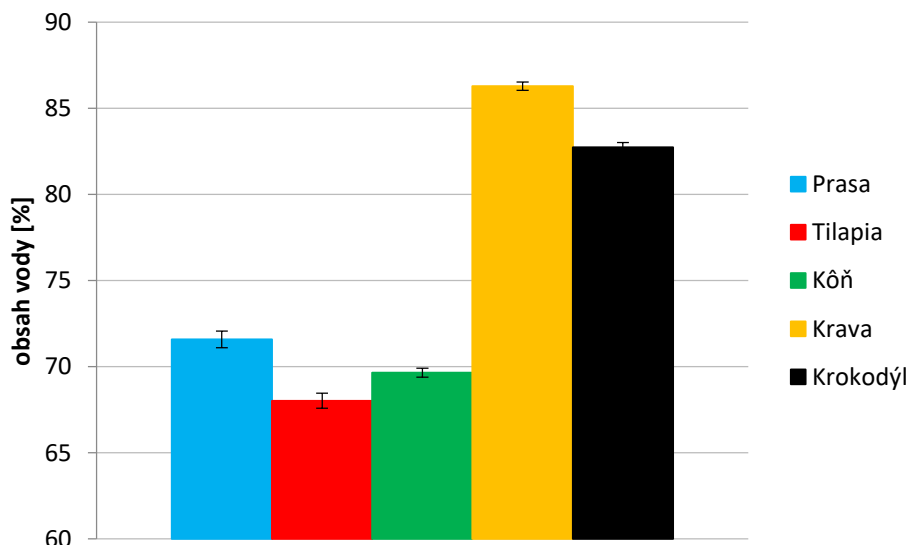
Obsah vody vo vzorkách kolagénových filmov bol stanovený ako množstvo vody obsiahnuté vo vzorke v maximálnom stupni nabotnania. Pre sieťované vzorky bol stanovený obsah vody v čase botnania 45 minút, kedy mali všetky filmy maximálny stupeň nabotnania. Obsah vody v nesieťovaných filmoch bol taktiež stanovený, ale keďže vzorky degradovali, tak časy kedy mali vzorky najvyšší stupeň nabotnania boli pre jednotlivé filmy rôzne.

V nesieťovaných kolagénových filmoch sa obsah vody pohyboval približne okolo 90 %. Takéto vysoké množstvo vody vo vzorke je spôsobené tým, že filmy neboli nijak zosieťované a voda mohla bez obmedzenia difundovať do vzoriek a vytvárať vodíkové väzby v štruktúre filmu.



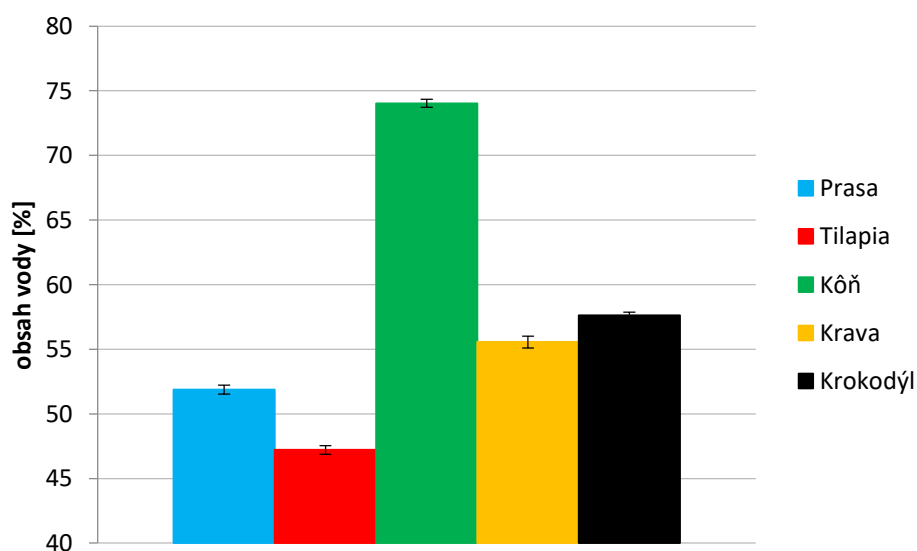
Graf 4: Obsah vody v nesieťovaných kolagenových filmoch

Graf 5 zobrazuje množstvo vody obsiahnutej vo vzorkách sieťovaných pomocou EDC/NHS v ich maximálnom stupni nabotnania. Obsah vody je úmerný stupňu nabotnania. Vo vzorkách z kolagénu z kravy a krokodýla bol najvyšší obsah vody a to približne 86 resp. 82 %. V ostatných vzorkách bol zistený obsah vody nižší približne o 15 %. Najnižší obsah vody mala vzorka filmu z kolagénu z Tilapie (68 %).



Graf 5: Obsah vody v kolagenových filmoch sieťovaných pomocou EDC/NHS

Obsah vody vo vzorkách sieťovaných pomocou Lyofix-u bol v porovnaní so vzorkami sieťovanými EDC/NHS nižší o desiatky percent. Najvyšší obsah vody bol vo vzorke filmu z konského kolagénu (74 %). V ostatných vzorkách predstavovala voda približne 50 až 60 % celkovej hmotnosti nabotnanej vzorky. Najnižší obsah vody bol rovnako pri sieťovaní EDC/NHS vo vzorke z Tilapie (47 %).



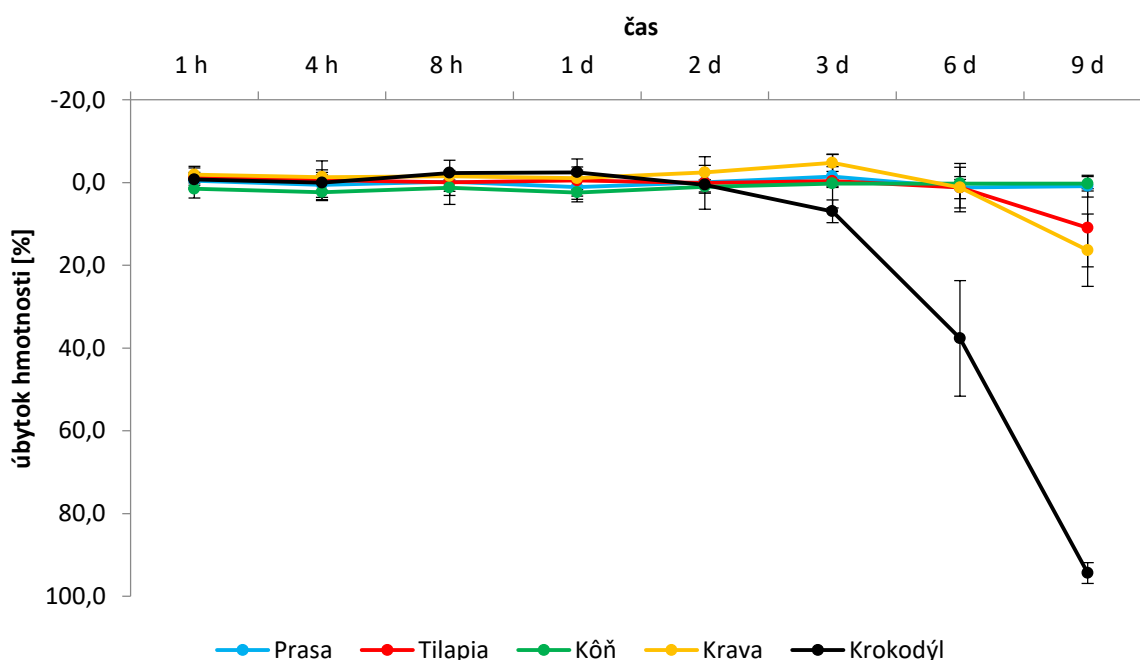
Graf 6: Obsah vody v kolagenových filmoch sieťovaných pomocou Lyofix-u



## 4.2 Enzymatická degradácia

Degradácia kolagénových filmov bola simulovaná v inkubátore v roztoku kolagenázy pri 37 °C. Schopnosť degradácie bola študovaná na zosieťovaných kolagénových filmoch. Degradácia nesieťovaných kolagénových filmov v roztoku kolagenázy nebola študovaná, keďže už v ultračistej vode dochádza pri nesieťovaných filmoch k degradácii po niekoľkých minútach.

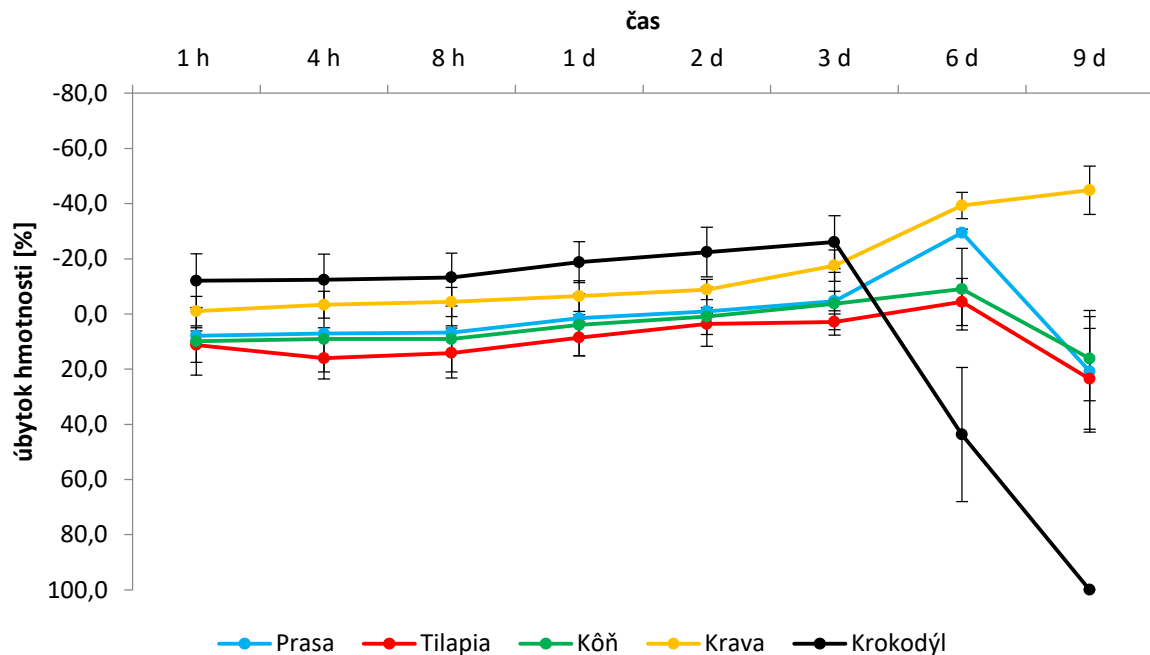
Graf 7 zobrazuje závislosť úbytku hmotnosti kolagénového filmu na čase degradácie kolagénových filmov zosieťovaných pomocou EDC/NHS. Z grafu vidíme, že počas prvých 24 hodín experimentu nebol badateľný takmer žiadny úbytok hmotnosti pri všetkých vzorkách. Po 48 hodinách začalo dochádzať k výraznejšiemu úbytku hmotnosti vo vzorke filmu z krokodýla, kde po 9 dňoch bol úbytok hmotnosti až 94 %. Prvý hmotnostný úbytok vo vzorkách filmov z kravy a Tilapie bol zaznamenaný po 6 dňoch a celkový úbytok hmotnosti po 9 dňoch bol približne 16 % respektíve 11 %. Pri vzorkách filmov z prasaťa a koňa nebol ani po skončení experimentu zaznamenaný výraznejší úbytok hmotnosti. Z grafu taktiež vidieť, že pri niektorých vzorkách dochádzalo k nárastu hmotnosti, čo môže byť v dôsledku pôsobenia kolagenázy, čím začalo dochádzať k zanikaniu väzieb v štruktúre filmu a vďaka tomu mohla voda lepšie difundovať a vytvárať tak vodíkové väzby s voľnými skupinami v štruktúre filmu.



Graf 7: Závislosť úbytku hmotnosti na čase degradácie kolagénových filmov zosieťovaných pomocou EDC/NHS

V Graf 8 je zobrazená závislosť úbytku hmotnosti na čase degradácie filmov sieťovaných pomocou Lyofix-u. Počas prvých 3 dní experimentu opäť nedochádzal k degradácii filmov, skôr naopak, u všetkých vzoriek došlo k nárastu hmotnosti. Pravdepodobná príčina bola vysvetlená pri predošlom grafe. Tak ako v prípade sieťovania pomocou EDC/NHS došlo k najväčšiemu úbytku hmotnosti pri vzorke filmu z krokodýla. V tomto prípade bol po 9 dňoch úbytok hmotnosti 100 % a teda kolagénový film z krokodýla zdegradoval v roztoku

kolagenázy úplne. V posledný deň experimentu došlo aj k degradácii filmov z Tilapie, prasat'a a koňa. Hmotnostný úbytok v týchto prípadoch bol približne 20 %. Zaujímavé je, že kolagénový film pripravený z kravského kolagénu nedegradoval počas celej doby experimentu, ba naopak dochádzalo k jeho botnaniu. Môžeme z toho vyvodit' záver, že kolagénový film pripravený z kravského kolagénu nijak nedegraduje v roztoku kolagenázy ani po 9 dňoch, v porovnaní s ostatnými vzorkami, pri ktorých došlo k čiastočnej alebo dokonca úplnej degradácii.

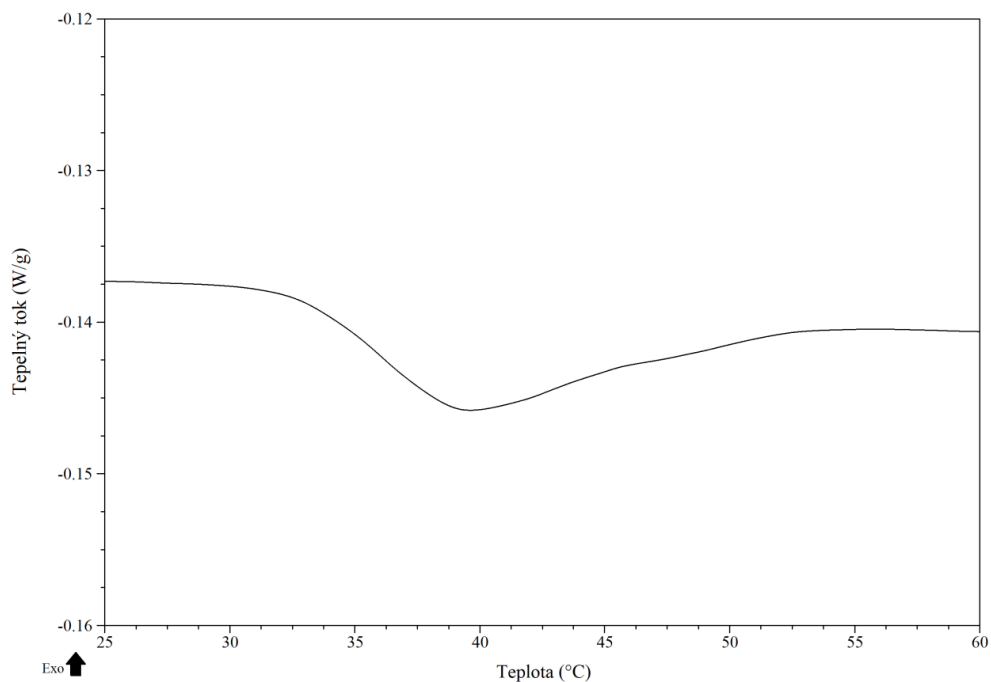


Graf 8: Závislosť úbytku hmotnosti na čase degradácie kolagénových filmov zosieťovaných pomocou Lyofix-u

### 4.3 Diferenčná kompenzačná kalorimetria

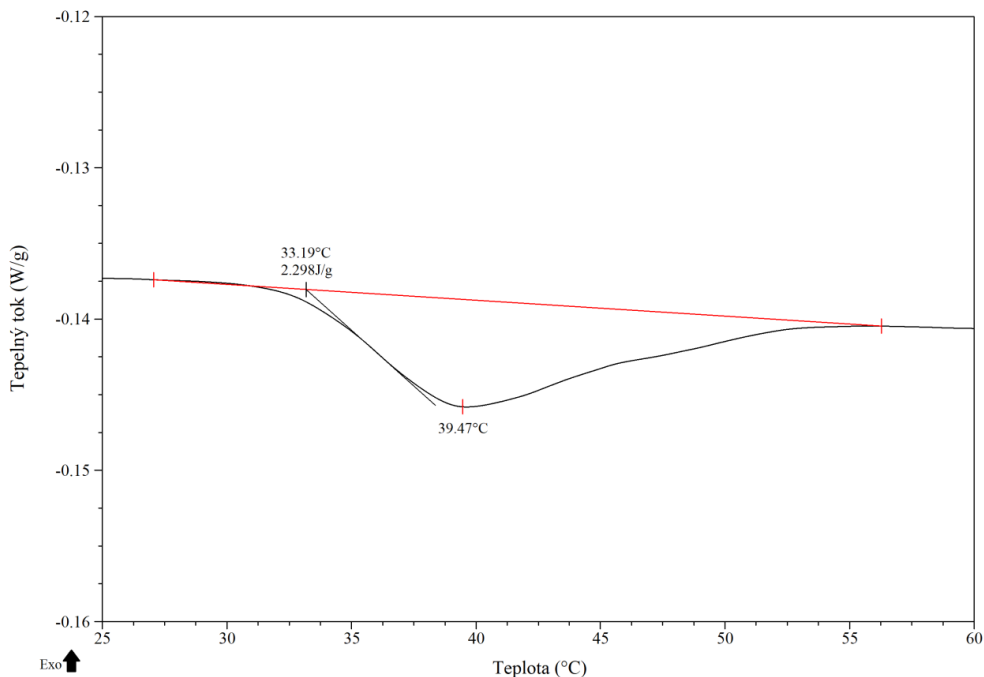
#### 4.3.1 Optimalizácia

Zahrievaním dochádza k denaturácii vzorky a nastáva rozdiel teplôt medzi referenciou a meranou vzorkou. Musí teda dôjsť k teplotnému vyrovnaniu medzi vzorkami. Denaturácia je tak charakterizovaná zmenou tepelného toku, ktorá je úmerná teplu potrebnému k vyrovnaniu teplôt. Výstupom je potom termogram, čo je závislosť tepelného toku na teplote (Obr. 9). Z tejto závislosti sme schopný určiť či pri danej zmene prebehol dej endotermický alebo exotermický, charakteristickú teplotu deja a množstvo dodaného resp. spotrebovaného tepla. Z výsledku merania (Obr. 9) vidíme, že denaturácia nesieťovaného kolagénového filmu z prasat'a má endotermický charakter, keďže pík smeruje nadol a program vyhodnocuje meranie exotermického deja smerom nahor. Z termogramu vidíme, že k denaturácii začalo dochádzať po prekročení teploty cca 31 °C.



*Obr. 9: Termogram – závislosť tepelného toku na teplote*

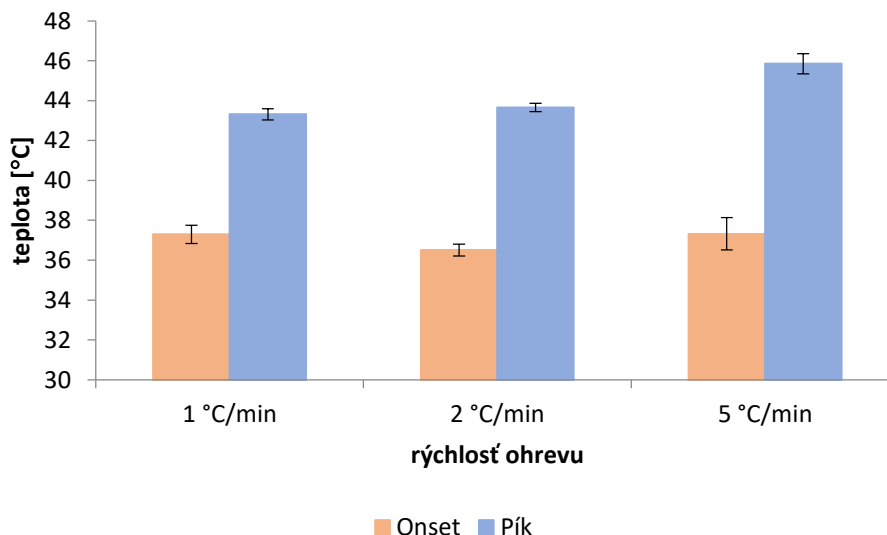
Pomocou integrácie piku je možné získať hodnoty teploty onsetu (počiatočná teplota prechodu), piku a dodané množstvo tepla na 1 gram vzorky. Integráciou piku na Obr. 10 bola určená teplota onsetu 33,19 °C, teplota piku 39,47 °C a množstvo dodaného tepla bolo 2,298 J na gram vzorky, čo odpovedá 23,422 J na gram suchého nesieťovaného kolagénového filmu z prasat'a.



Obr. 10: Príklad integrácie piku

#### 4.3.1.1 Vplyv rýchlosti ohrevu

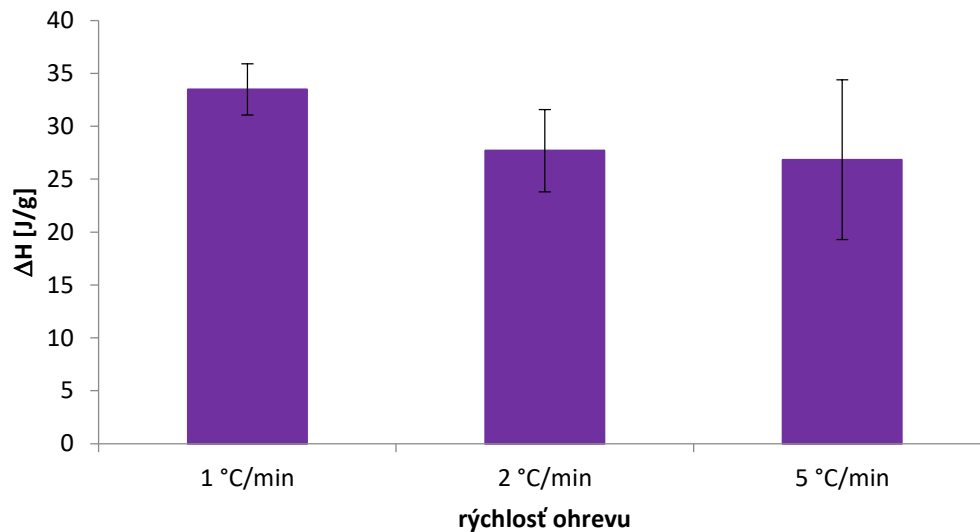
Prvým krokom optimalizácie bolo porovnanie vplyvu vybraných rýchlostí ohrevu na priebeh denaturácie. Vybraté rýchlosti ohrevu boli 1, 2 a 5 °C/min a pre každú rýchlosť ohrevu bolo meranie zopakované trikrát. Výsledky boli v programe TA Instruments zintegrované a získané hodnoty boli štatisticky vyhodnotené v MS Excel.



Graf 9: Porovnanie priemerných hodnôt teplôt onsetu a piku pri vybraných rýchlostiach ohrevu

Z Graf 9 je vidieť, že rýchlosť ohrevu nijak neovplyvňuje počiatočnú teplotu prechodu (onset), a že so zvyšujúcou rýchlosťou ohrevu dochádza k posunutiu teploty piku k vyšším

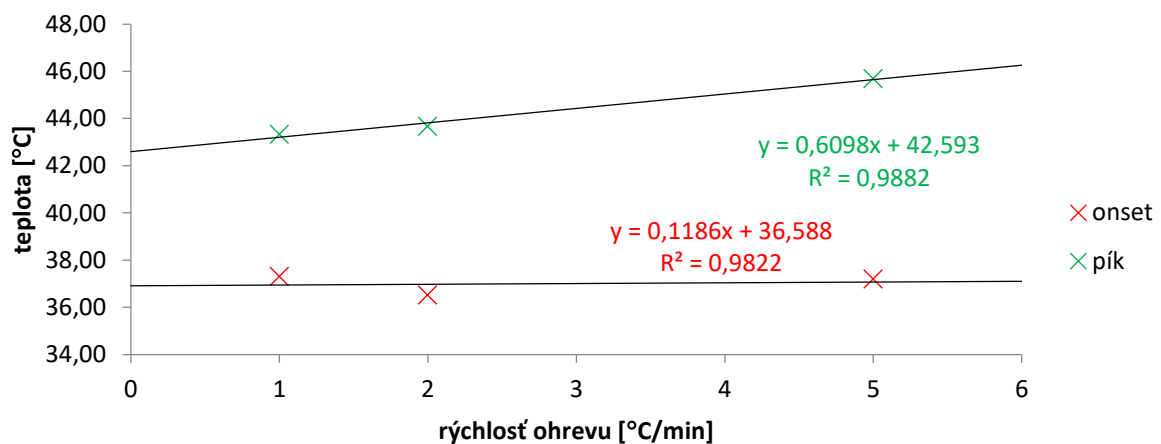
hodnotám. Rýchlosť ohrevu 5 °C/min bola pre analýzu kolagénu príliš rýchla a vo výsledných termogramoch bol vysoký šum v pomere ku signálu. Rýchlosti ohrevu 1 a 2 °C/min boli posúdené ako vhodné na použitie, avšak z hľadiska časovej úspory bola vybraná rýchlosť ohrevu 2 °C/min.



Graf 10: Množstvo dodaného tepla pri vybraných rýchlostiach ohrevu

Spolu s hodnotami teplôt onsetu a piku bolo integráciou plochy piku získané aj množstvo tepla potrebné k denaturácii. Potrebné teplo bolo prepočítané na 1 gram suchého prasacieho kolagénu. Pri prepočte bolo zohľadnené množstvo vody obsiahnuté v analyzovanej vzorke filmu. Do Graf 10 boli pre jednotlivé rýchlosti ohrevu vynesené priemerné hodnoty spotrebovaného tepla pri denaturácii spolu so smerodajnými odchýlkami. Množstvo dodaného tepla pre jednotlivé rýchlosti ohrevu je v rámci chyby takmer rovnaké a nezávisí teda na základnej rýchlosti ohrevu.

Po experimentálnej časti bol ešte pozorovaný vplyv ohrevu na teplotu onsetu a piku. Priemerné hodnoty onsetu a piku boli preložené priamkou a získané hodnoty odpovedajú teplotám pri nulovom zahrievaní.

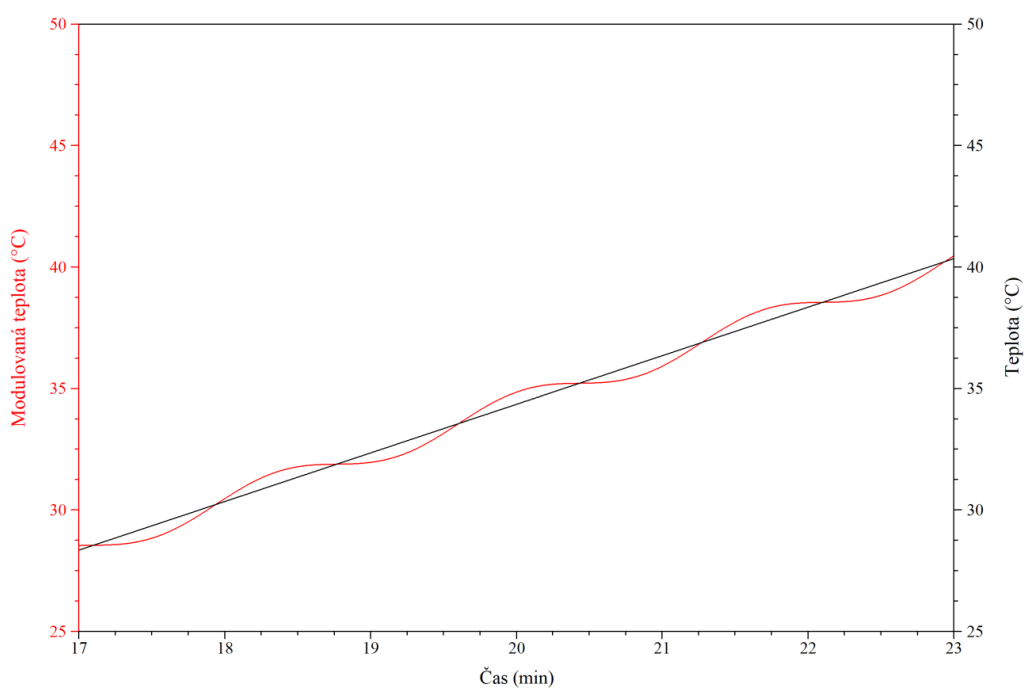


Graf 11: Extrapolácia priemerných hodnôt onsetu a piku

Z výsledkov v Graf 11 vidíme, že teplota onsetu pri nulovom zahrievaní má hodnotu 36,6 °C a teplota piku 42,6 °C. Zo smernice priamky vidíme, že teplota piku je citlivejšia na zahrievanie, to znamená, že dochádza k väčšej chybe v porovnaní s teplotou onsetu, ktorá na zahrievanie nie je tak citlivá.

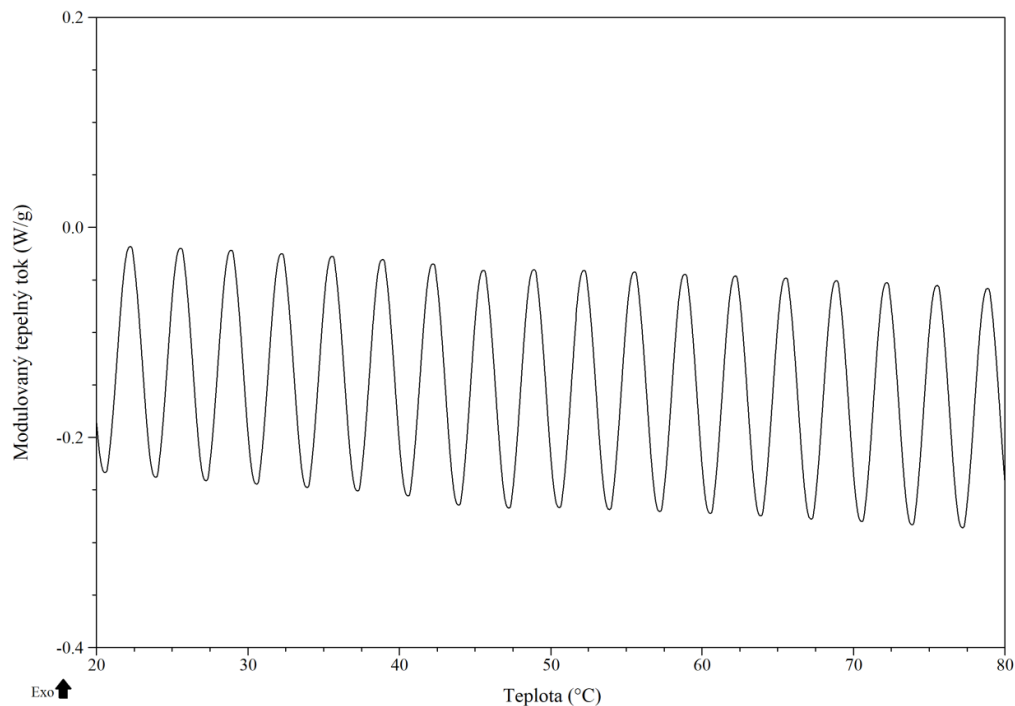
#### 4.3.2 Teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria

Teplotne modulovaná DSC je metóda, pri ktorej je možné rozloženie tepelného toku na reverzibilný a nereverzibilný signál a to nám umožňuje získať ďalšie informácie týkajúce sa vlastností materiálov. Príklad merania je zobrazený na Obr. 11. Rýchlosť ohrevu bola 2 °C/min a je predstavovaná čiernou lineárnou krivkou. Červená krivka zobrazuje rýchlosť okamžitého ohrevu, ktorá osciluje okolo základnej rýchlosti ohrevu s amplitúdou  $\pm 0,53$  °C.



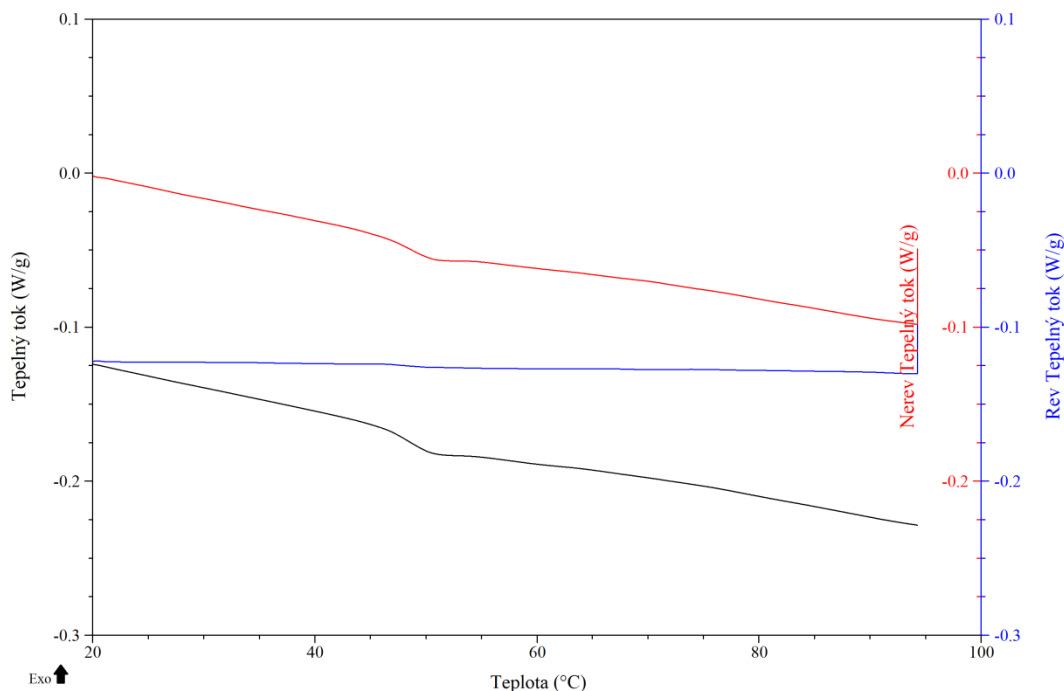
Obr. 11: Sínusová teplotná modulácia

Výsledkom TMDSC je závislosť modulovaného tepelného toku na teplote (vid'. Obr. 12), ktorú definuje teplotný program, okolo ktorého oscilujeme.



*Obr. 12: Závislosť modulovaného toku na teplote*

Celkový tepelný tok sme v softvéri TA Instruments schopný rozdeliť na reverzibilný a nereverzibilný tepelný tok (Obr. 13). Celkový tepelný tok, ktorý je tvorený súčtom nereverzibilného (červená krivka) a reverzibilného tepelného toku (modrá krivka) je naznačený čiernou krivkou.



Obr. 13: Celkový tepelný tok rozložený na reverzibilnú a nereverzibilnú zložku

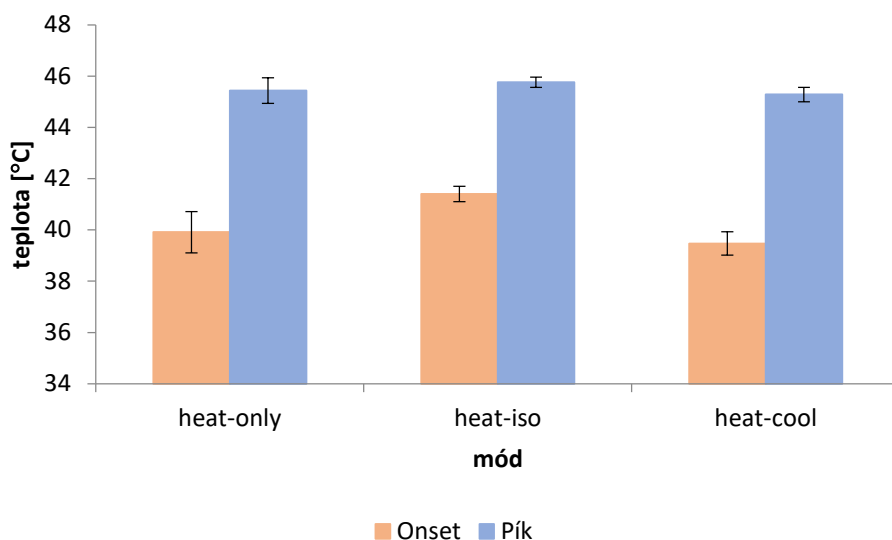
Z rozloženia tepelného toku na reverzibilnú a nereverzibilnú zložku vidíme, že denaturácia kolagénu je nevratný dej keďže je charakterizovaná nereverzibilným tepelným tokom.

#### 4.3.2.1 Vplyv amplitúdy a periódy modulácie

Na základe výsledkov z kapitoly 4.3.1.1 bola zvolená základná rýchlosť ohrevu 2 °C/min. Táto rýchlosť ohrevu bola ďalej používaná pri TMDSC ako základná lineárna rýchlosť ohrevu, okolo ktorej oscilovala modulovaná teplota s amplitúdou, ktorá je charakteristická pre jednotlivé módy. Použité boli *heat-only*, *heat-iso* a *heat-cool*. Hodnota amplitúdy pre každý mód bola určená výpočtom. V Tab. 2, ktorá sa nachádza v kapitole 3.5.3.1 sú amplitúdy, ktoré boli vypočítané pre ten ktorý mód pri periódách 60 resp. 100 sekúnd.

Pri vyhodnocovaní bol použitý rovnaký postup ako pri posudzovaní vplyvu rýchlosti ohrevu. V programe TA Instruments boli zintegrované denaturačné piky zo závislosti tepelného toku na teplote. Získané hodnoty onsetu, piku a množstva dodaného tepla boli vyhodnotené v MS Excel a vynesené do grafov.

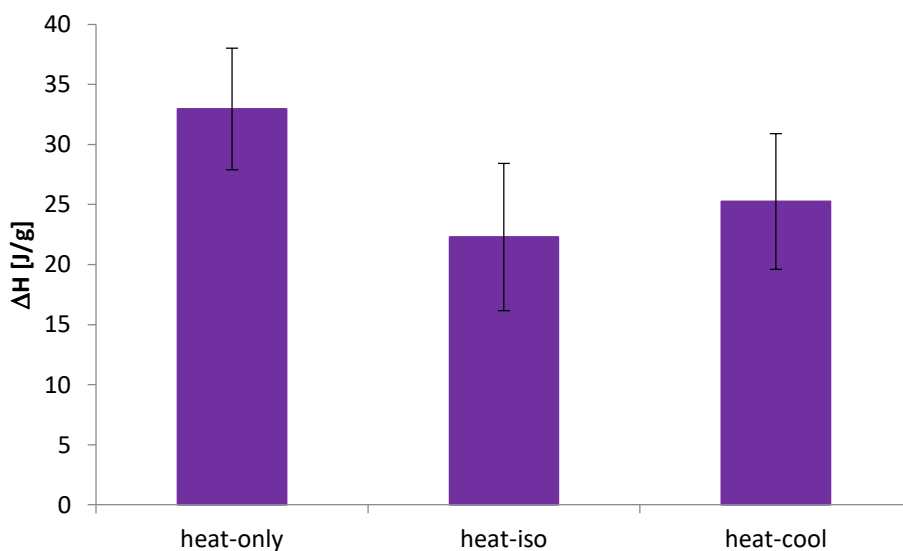




Graf 12: Porovnanie priemerných hodnôt teplôt onsetu a piku pri použití jednotlivých módov a perióde 60 sekúnd

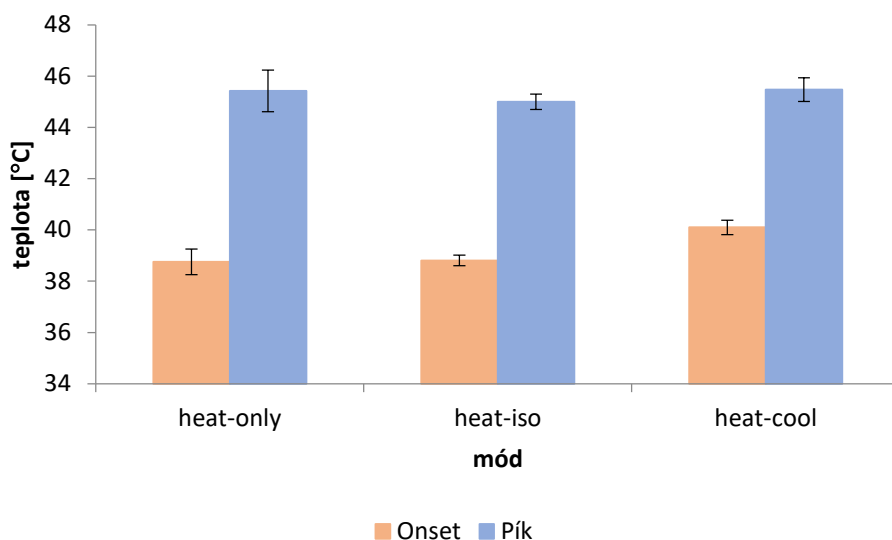
Z výsledkov v Graf 12 vidíme, že pri *heat-iso* móde je ako teplota onsetu tak aj teplota piku posunutá k vyšším hodnotám v porovnaní so zvyšnými dvoma módmi.

Spolu s hodnotami teplôt onsetu a piku bolo integráciou piku získané aj množstvo tepla potrebné k denaturácii. Potrebné teplo bolo prepočítané na 1 gram suchého prasacieho kolagénu. Pri prepočte bolo zohľadnené množstvo vody obsiahnuté v analyzovanej vzorke filmu.



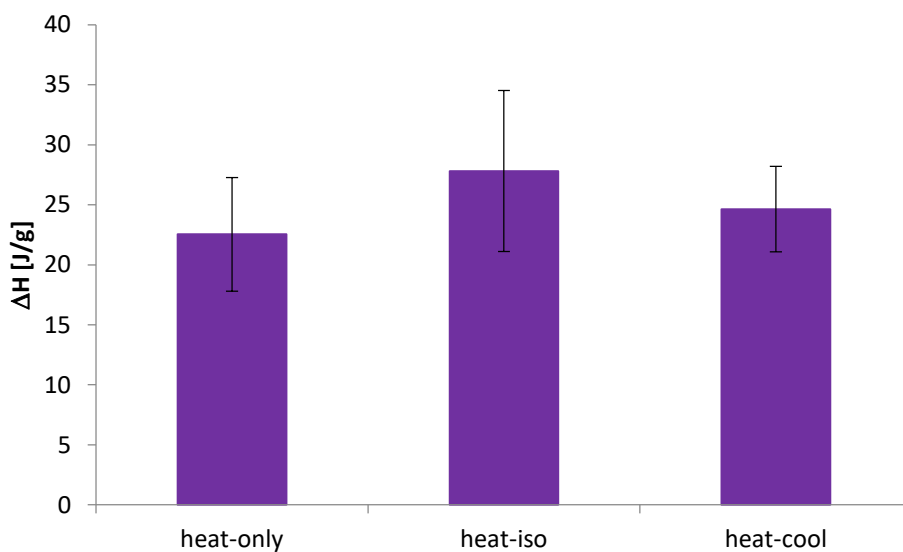
Graf 13: Množstvo dodaného tepla pri použití jednotlivých módov a perióde 60 sekúnd

Z Graf 13 vidíme, že množstvo dodaného tepla bolo pri všetkých módoch v rámci chyby podobné.



Graf 14: Porovnanie priemerných hodnôt teplôt onsetu a piku pri použití jednotlivých módov a perióde 100 sekúnd

Z výsledkov v Graf 14 vidíme, že hodnota teploty onsetu bola najvyššia pri móde *heat-cool* a teploty pikov boli pri všetkých módoch približne rovnaké.



Graf 15: Množstvo dodaného tepla pri použití jednotlivých módov a perióde 100 sekúnd

V Graf 15 môžeme vidieť, že množstvo dodaného tepla bolo pri všetkých troch módoch podobné. V Príloha 3 boli do grafov vnesené teploty onsetu a piku pre jednotlivé módy pri perióde 60 a 100 sekúnd.

Ako najvhodnejší mód pre stanovenie teploty denaturácie kolagénu bol vybraný mód *heat-iso*. Múd *heat-cool* nie je pre analýzu kolagénu a polymérov všeobecne vhodný, pretože počas chladenia vzorky môže dochádzať vo vzorke k odlišným procesom ako počas zahrievania a tým môže vznikáť veľká chyba.

Ako vhodnejšia perióda merania bola zvolená perióda 100 s, čím zabezpečíme dostatočný čas na kvantitatívne meranie tepelného toku medzi meranou vzorkou a referenciou.

Amplitúda ohrevu vypočítaná pre mód *heat-iso* pri perióde 100 s má hodnotu  $\pm 0,53$  °C.

### 4.3.3 Stanovenie teploty denaturácie kolagénových filmov

Na základe výsledkov z kapitol 4.3.1 a 4.3.2 boli na stanovenie denaturačnej teploty kolagénových filmov použité parametre merania zobrazené v Tab. 3. Vzorky boli pred samotným meraním nabotnané po dobu 60 minút.

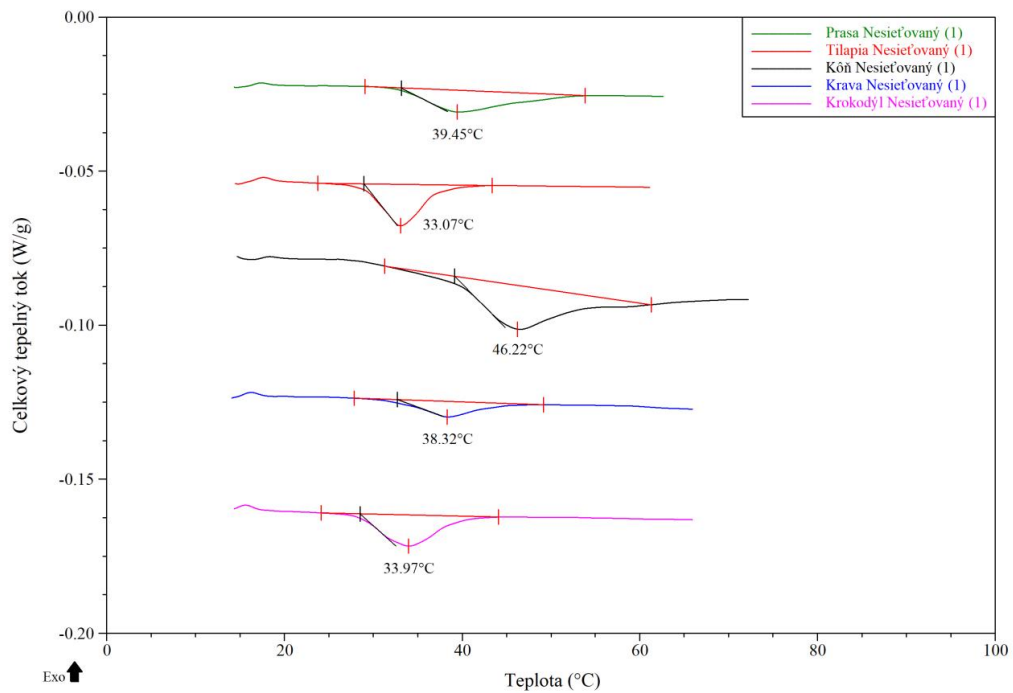
Tab. 3: Parametre meranie pre stanovenie teploty denaturácie kolagenových filmov

Rýchlosť ohrevu [°C/min]	Periódka [s]	Amplitúda [°C]
2	100	± 0,53

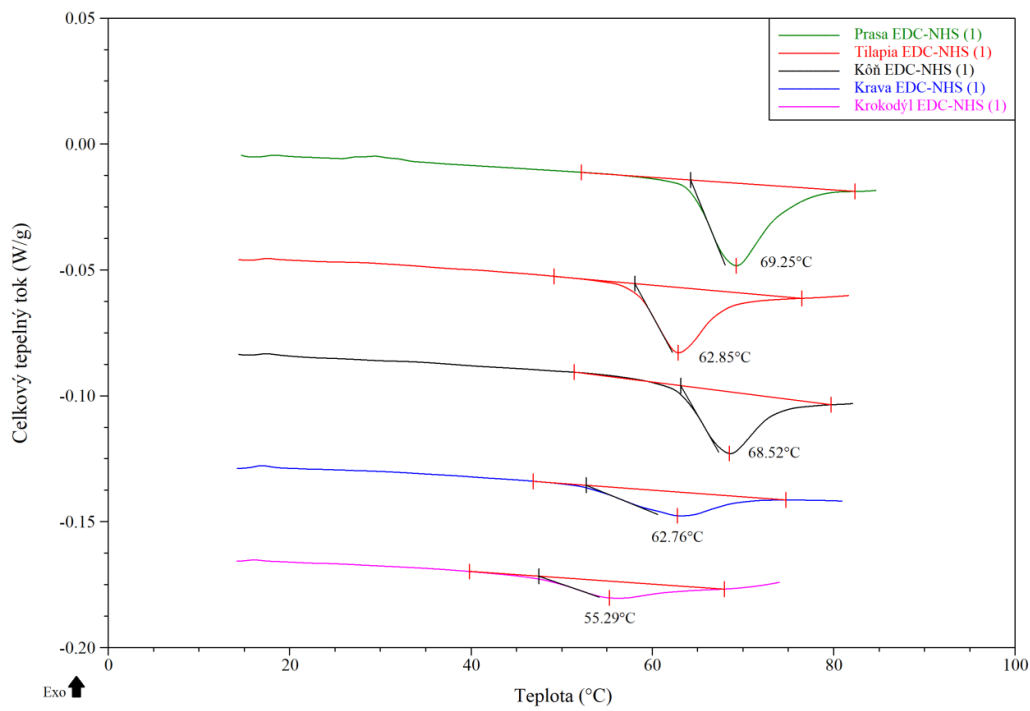
Denaturácia kolagénových filmov bola meraná ako endotermický signál závislý na teplote, ktorý indikuje rozsah intermolekulárneho zosieťovania. Endotermický pík predstavuje denaturáciu terciárnej a sekundárnej štruktúry vo filme. Plocha pod denaturačným píkom predstavuje množstvo energie potrebnej k denaturácii kolagénového filmu. Jednotlivé endotermické krivky v grafoch boli vo všetkých prípadoch posunuté v smere osy y kvôli prehľadnosti výsledkov.

Teplota denaturácie nesieťovaných kolagénových filmov (Obr. 14) sa pohybovala približne od 33 °C do 40 °C. Výnimkou je film pripravený z konského kolagénu, ktorého teplota denaturácie bola približne 46 °C. Najnižšiu teplotu denaturácie mali filmy pripravené z kolagénu z Tilapie a z krokodýla. Túto skutočnosť môžeme vysvetliť tým, že telesná teplota týchto živočíchov je v porovnaní s ostatnými analyzovanými nižšia a pravdepodobne sa ich kolagén líši od ostatných svojím aminokyselinovým zložením. Teplota denaturácie kolagénu úzko súvisí s jeho aminokyselinovým zložením, s množstvom peptidových väzieb a nekovalentných interakcií (vodíkové väzby) vo vzorke filmu.

Po siet'ovaní pomocou EDC/NHS bola opäť stanovená teplota denaturácie vzoriek. Na Obr. 15 vidíme, že siet'ovanie malo za následok výrazné zvýšenie teploty denaturácie u všetkých vzoriek. EDC/NHS ako siet'ovacie činidlo výrazne zvyšuje teplotu denaturácie kolagénových filmov tvorbou nových peptidových väzieb. Po zosiet'ovaní mal najvyššiu teplotu denaturácie film z prasacieho kolagénu, ktorého teplota denaturácie bola takmer 70 °C. Najnižšia teplota denaturácie bola nameraná pre vzorku kolagénu z krokodýla.

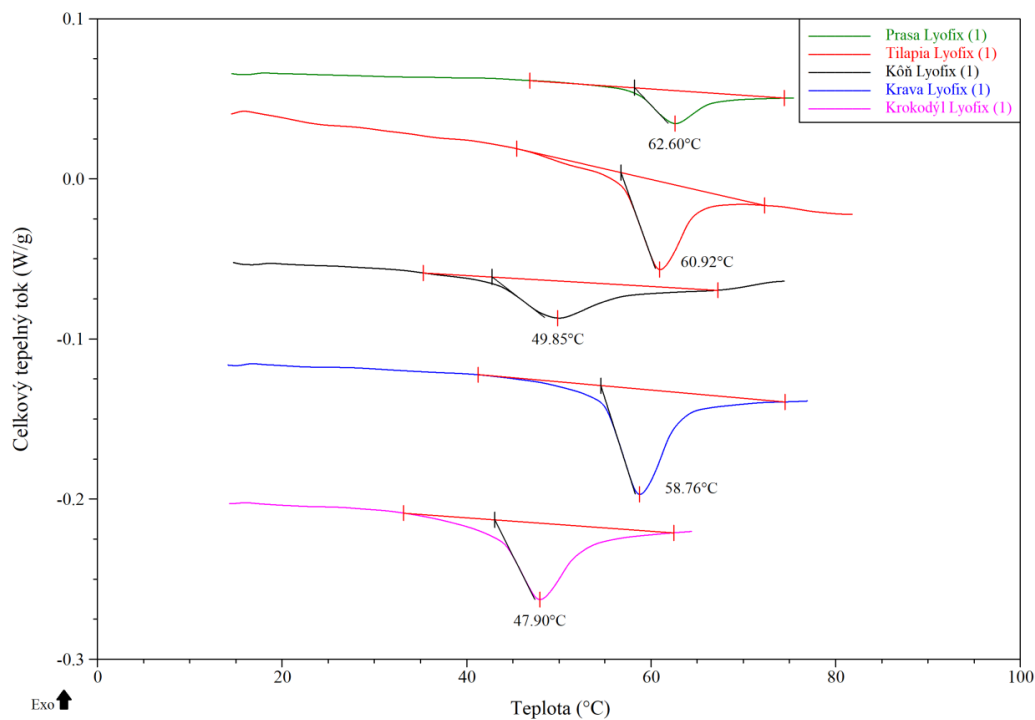


Obr. 14: Teploty denaturácie nesieťovaných kolagénových filmov



Obr. 15: Teploty denaturácie kolagénových filmov zosieťovaných EDC/NHS

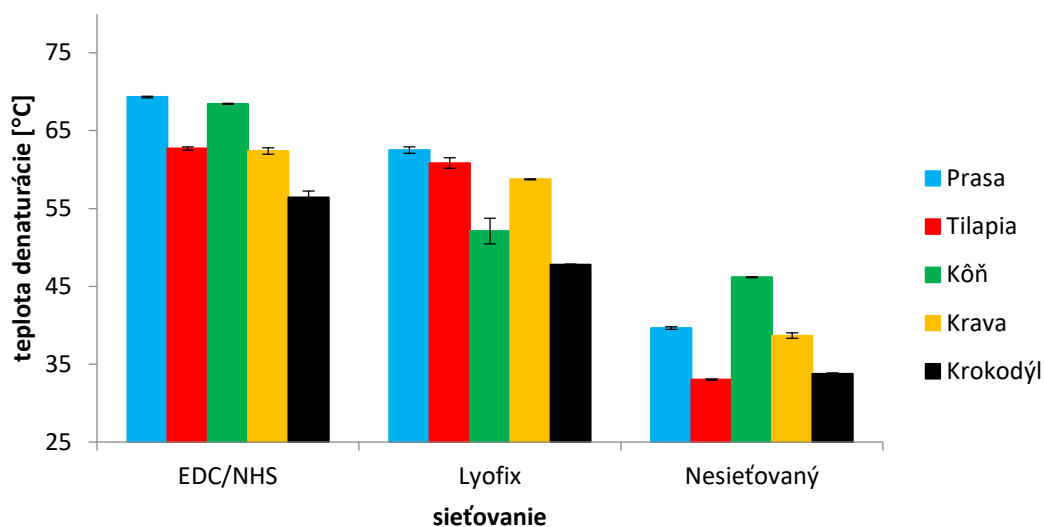
Na Obr. 16 sú zobrazené endotermické krivky kolagénových filmov po sieťovaní Lyofix-om. Vidíme, že tak ako v prípade sieťovania pomocou EDC/NHS viedlo sieťovanie pomocou Lyofix-u k zvýšeniu teploty denaturácie u všetkých vzoriek. Celkovo však nebolo zvýšenie teploty denaturácie kolagénov také výrazné ako po použití EDC/NHS. Rovnako ako pri sieťovaní EDC/NHS bola najvyššia teplota denaturácie nameraná pre vzorku prasacieho kolagénu. Najmenší posun teploty denaturácie v porovnaní s nesieťovanou vzorkou bol pri filme z konského kolagénu. Ako bolo spomínané v kapitole 4.1, malý posun teploty denaturácie súvisí pravdepodobne s množstvom voľných aminoskupín v štruktúre filmu z konského kolagénu a tým, že efektivita zosieťovania Lyofix-om závisí práve na množstve voľných aminoskupín vo vzorke kolagénu. V nadväzujúcej práci by bolo vhodné tieto predpoklady potvrdiť analýzou aminokyselinového zloženia v jednotlivých kolagénoch.



Obr. 16: Teplota denaturácie kolagénových filmov sieťovaných Lyofix-om

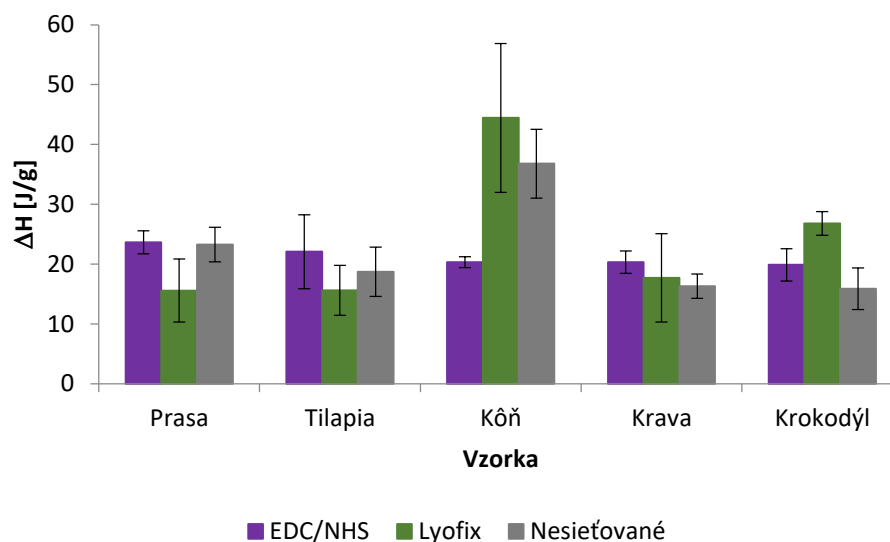
Sieťovanie malo pozitívny vplyv na zvýšenie teploty denaturácie kolagénových filmov. Teplota denaturácie filmov sieťovaných pomocou EDC/NHS bola vo všetkých prípadoch vyššia ako po použití sieťovacieho činidla Lyofix. EDC/NHS je teda pre sieťovanie kolagénových filmov vhodnejším činidlom, jednak z hľadiska zvýšenia teploty denaturácie a takisto aj kvôli tomu, že filmy zosieťované pomocou EDC/NHS by mali byť v porovnaní s tými sieťovanými Lyofix-om cytocompatibilné. Z nesieťovaných kolagénových filmov mala najvyššiu teplotu denaturácie vzorka konského kolagénu a najnižšiu teplotu denaturácie vzorka z kolagénu z Tilapie. Vzorka z prasacieho kolagénu mala po sieťovaní či už EDC/NHS, tak aj Lyofix-om najvyššiu teplotu denaturácie. Najnižšiu teplotu denaturácie po

zosieťovaní mala vzorka z kolagénu z krokodýla a to v oboch prípadoch sieťovania. Kompletné porovnanie teplôt denaturácie pre jednotlivé vzorky sa nachádza v Graf 16.



Graf 16: Porovnanie teplôt denaturácie kolagénových filmov

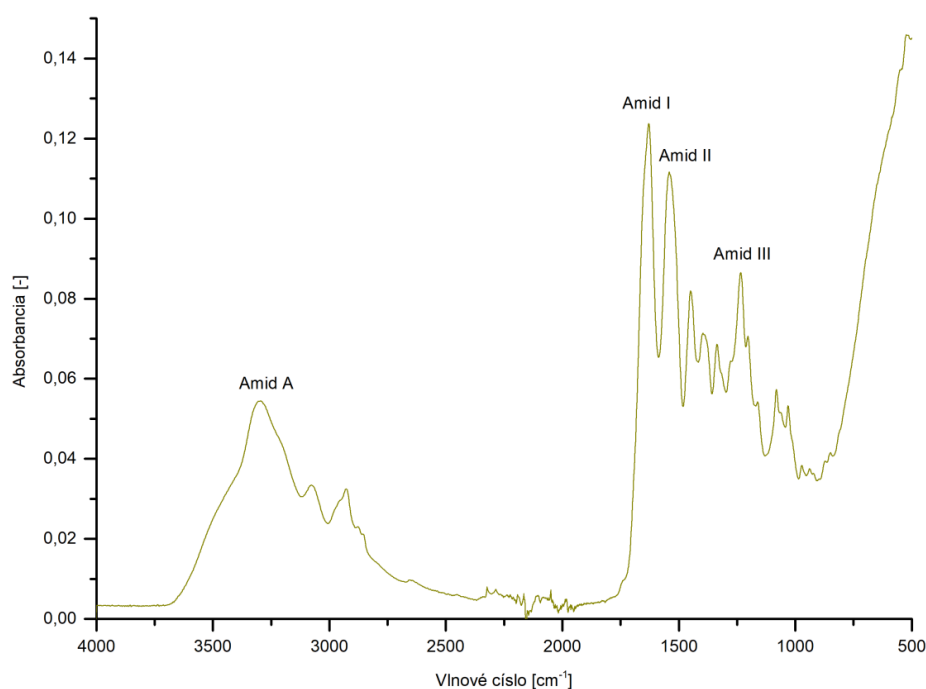
Spolu s hodnotou teploty denaturácie bolo integráciou plochy piku získané aj množstvo tepla potrebné k denaturácii kolagénových filmov. Spotrebované teplo bolo prepočítané na 1 gram suchej vzorky daného kolagénu. Pri prepočte bolo zohľadnené množstvo vody obsiahnuté v analyzovanej vzorke filmu. V Graf 17 sú spolu so smerodajnými odchýlkami zobrazené priemerné množstvá spotrebovaného tepla na denaturáciu jednotlivých vzoriek kolagénových filmov. Aj keď sa obsah plochy pod krivkou denaturácie pre jednotlivé vzorky líšil (Obr. 14 až Obr. 16), tak po prepočte na 1 gram suchého kolagénu vidíme v Graf 17, že množstvo spotrebovaného tepla pri jednotlivých typoch kolagénu bolo v rámci chyby podobné a sieťovanie nijak výrazne neovplyvnilo množstvo dodaného tepla potrebného na denaturáciu vzorky. Vypočítané hodnoty spotrebovaného tepla pre vzorku konského kolagénu sa v prípade sieťovania Lyofixom a nesieťovaného filmu výrazne líšili od ostatných vzoriek. Podrobnejšie vysvetlenie by bolo možné získať štruktúrnou analýzou denaturačného procesu metódou cirkulárneho dichroizmu.



Graf 17: Porovnanie množstva spotrebovaného tepla na denaturáciu jednotlivých kolagénových vzoriek

#### 4.4 Infračervená spektroskopia

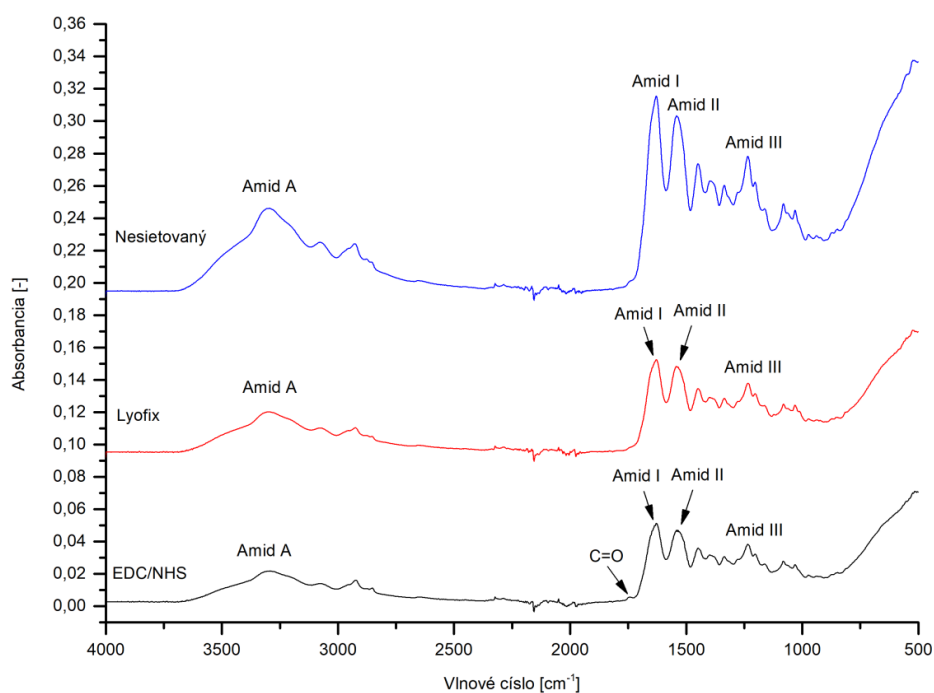
Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (FTIR) je bežne využívanou metódou na štúdium sekundárnej štruktúry kolagénu. Spektrum nesieťovaného filmu z prasacieho kolagénu (Obr. 17) ukazuje typické pásy kolagénu typu I. Hlavnými absorbnými pásmi sú Amid A ( $3\,295\text{ cm}^{-1}$ ), Amid I ( $1\,629\text{ cm}^{-1}$ ), Amid II ( $1\,541\text{ cm}^{-1}$ ) a Amid III ( $1\,234\text{ cm}^{-1}$ ). Voľné vibrácie skupiny N–H sa vyskytujú v rozmedzí  $3\,400$  až  $3\,440\text{ cm}^{-1}$  avšak keď N–H skupiny peptidu tvoria vodíkové väzby, poloha pásu je posunutá k nižším hodnotám, zvyčajne okolo  $3\,300\text{ cm}^{-1}$ . Výsledky ukázali, že N–H skupiny tejto ale zároveň aj zvyšných vzoriek kolagénu analyzovaných pomocou FTIR tvorili vodíkové väzby, pravdepodobne s karboxylovou skupinou peptidového reťazca. Pík Amidu I ( $1\,629\text{ cm}^{-1}$ ) je spojený s valenčnými vibráciami karbonylových skupín pozdĺž polypeptidového reťazca a je najužitočnejším pri analýze sekundárnej štruktúry proteínov pomocou infračervenej spektroskopie. Pík Amidu II bol pozorovaný pri  $1\,541\text{ cm}^{-1}$  a je spôsobený vibračným ohýbaním väzby N–H v spojení s vibračným naťahovaním väzby C–N ( $1\,536 - 1\,544\text{ cm}^{-1}$ ). Amid III ( $1\,234\text{ cm}^{-1}$ ) súvisí s naťahovaním väzieb C–N a N–H zúčastňujúcich sa triple-helix štruktúry kolagénu [70]. Analýza FTIR teda dokazuje existenciu helikálneho usporiadania v analyzovaných kolagénových filmoch.



Obr. 17: ATR-FTIR spektrum nesieťovaného filmu z prasacieho kolagénu

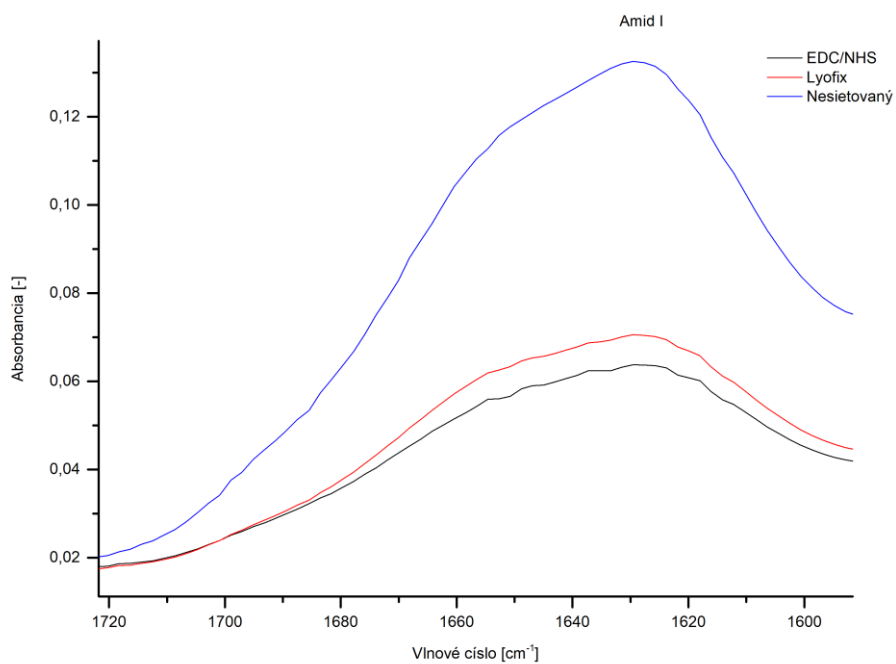
Po sieťovaní či už pomocou EDC/NHS alebo Lyofix-u (Obr. 18, Tab. 4) vidíme, že vlnové čísla charakteristických pásov kolagénu sú takmer rovnaké ako pri vzorke nesieťovanej. Tento výsledok môže naznačovať, že hustota sieťovania bola natoľko nízka, že rozdiely v spektrách nesieťovaných a sieťovaných filmov neboli pozorovateľné. Avšak intenzita pásov sa po použití EDC/NHS a Lyofix-u zmenila. Okrem toho je v spektre filmu sieťovaného pomocou EDC/NHS badateľný absorbný pás pri vlnovom čísle  $1742\text{ cm}^{-1}$ . Tento pás odpovedá vibrácii naťahovania esterovej skupiny C=O, ktorá sa vyskytuje v rozmedzí  $1750$  až  $1730\text{ cm}^{-1}$ . Prítomnosť esterovej skupiny bola pravdepodobne spôsobená nedostatočným premytím kolagénových filmov po sieťovaní, keďže medziprodukt vznikajúci reakciou s NHS obsahuje túto skupinu (vid'. Obr. 7). Tento pás bol pozorovateľný v spektre filmu z Tilapie (Príloha 4A) a z krokodýla (Príloha 4D). Po analýze FTIR spektra filmu z kolagénu z Tilapie (Príloha 4A) vidíme, že spomínaný absorbný pás esterovej skupiny C=O sa vyskytuje aj v spektre nesieťovaného filmu a v spektre filmu sieťovaného Lyofix-om. V tomto prípade to mohlo byť spôsobené nedostatočnou čistotou kolagénu využívaného na prípravu filmov, kde tento kolagén mohol obsahovať zvyšky lipidov, ktoré obsahujú esterové skupiny. Vo FTIR spektrách filmov z kravského a konského kolagénu zosieťovaných pomocou EDC/NHS nebol pozorovaný absorbný pás esterovej skupiny a tak môžeme predpokladať, že v týchto prípadoch došlo k úplnému vymytiu medziproduktu po sieťovaní.



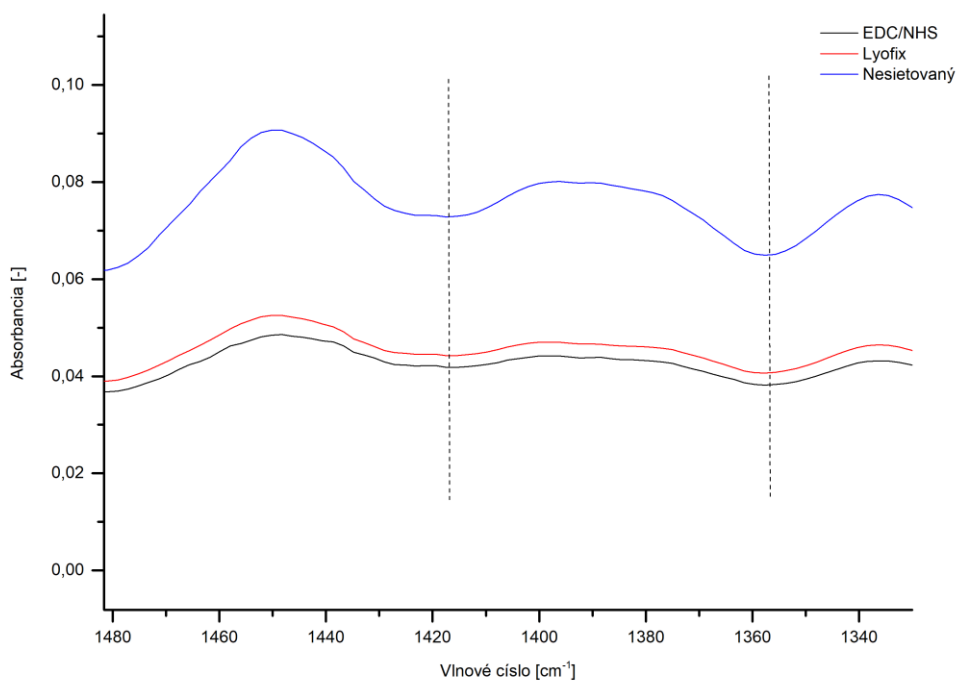


Obr. 18: Porovnanie ATR-FTIR spektier filmov z prasacieho kolagénu

Absorbčný pás Amidu I, ktorý je najužitočnejším pásom pri analýze sekundárnej štruktúry proteínov vykazuje po použití EDC/NHS a Lyofix-u pokles intenzity (Obr. 19). Tento pokles je v dôsledku vytvorenia nových kovalentných väzieb v procese sieťovania. Okrem toho pás charakteristický pre naťahovanie C=O väzby karboxylovej skupiny v oblasti približne od 1 420 do 1 360  $\text{cm}^{-1}$  sa objavuje v spektre nesieťovaného kolagénu, ale po sieťovaní intenzita tohto pásu výrazne klesla (Obr. 20). Tento fakt znamená, že reakcie pri sieťovaní kolagénu sa zúčastňujú aj karboxylové skupiny. Hoci nebol pozorovaný žiadny výrazný prírastok väzieb N–H (pás Amid A), tak zníženie intenzity pásov Amidu I naznačuje viac kovalentne zosieťovanú štruktúru a zároveň došlo k zníženiu počtu karboxylových skupín v dôsledku tvorby nových väzieb. Tieto výsledky sú navyše v súlade s výsledkami v kapitole 4.3.3, kde bolo preukázané, že sieťovanie viedlo k zvýšeniu teploty denaturácie vzoriek.



Obr. 19: Zobrazenie absorbného pásu Amid I



Obr. 20: Priblíženie absorbného pásu C=O pre karboxylovú skupinu

Tab. 4: Zhrnutie charakteristických pásov a ich vlnových čísel [ $\text{cm}^{-1}$ ] v jednotlivých vzorkách kolagénových filmov

	Sieťovanie	Amid A	Amid I	Amid II	Amid III	Ester
Prasa	Nesieťovaný	3 295	1 629	1 541	1 234	/
	EDC/NHS	3 292	1 629	1 541	1 233	1 742
	Lyofix	3 303	1 629	1 541	1 233	/
Tilapia	Nesieťovaný	3 308	1 630	1 544	1 236	1 741
	EDC/NHS	3 290	1 632	1 538	1 234	1 741
	Lyofix	3 296	1 630	1 542	1 235	1 741
Kôň	Nesieťovaný	3 304	1 628	1 543	1 235	/
	EDC/NHS	3 295	1 629	1 540	1 234	/
	Lyofix	3 301	1 628	1 540	1 236	/
Krava	Nesieťovaný	3 304	1 628	1 539	1 234	/
	EDC/NHS	3 294	1 629	1 541	1 235	/
	Lyofix	3 305	1 632	1 544	1 234	/
Krokodýl	Nesieťovaný	3 306	1 628	1 543	1 235	/
	EDC/NHS	3 295	1 630	1 541	1 234	1 742
	Lyofix	3 304	1 630	1 543	1 234	/

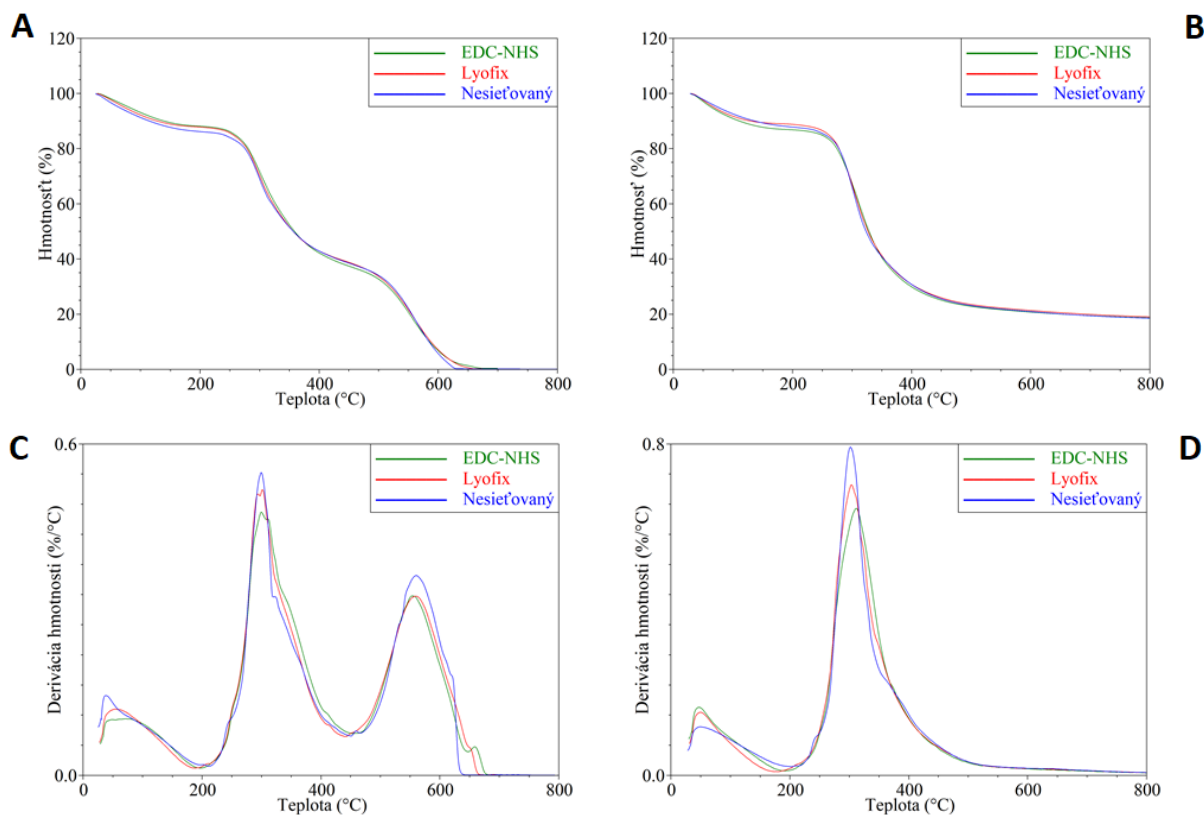
#### 4.5 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza bola realizovaná na prístroji TGA Q5000 (TA Instruments) za účelom stanovenia úbytku hmotnosti kolagénových filmov v závislosti na vzrastajúcej teplote (25 až 800 °C) v oxidačnej atmosfére vzduchu a potom aj v inertnej atmosfére dusíku s rýchlosťou ohrevu 10 °C/min.

Bol očakávaný vplyv kovalentného sieťovania na termálnu stabilitu vzoriek a na posun teplôt, pri ktorých dochádza k ich termochemickej degradácii. Ako je ale vidieť na Obr. 21, pokles hmotnosti vzoriek bol pre sieťované a nesieťované vzorky rovnaký, ako vo vzdušnej atmosfére (Obr. 21 A), tak aj v atmosfére dusíku (Obr. 21 B). Z grafov C resp. D, v ktorých je vynesená závislosť derivácie hmotnosti na teplote vidíme, že pri teplote približne 50 °C je prvý pík, ktorý nám hovorí že dochádza k úbytku hmotnosti a tento úbytok sa pravdepodobne týka odparovania vody. Pri teplote približne 300 °C dochádza k degradácii termicky labilných organických štruktúr (dekarboxylácia, deaminácia atď.). Posledný pík, ktorý sa vyskytuje len pri analýze vzoriek v oxidačnej atmosfére vzduchu má svoje maximum približne pri 550 °C a zodpovedá úbytku hmotnosti, ktorý je spojený so spaľovaním zostávajúcej organickej hmoty.

Pomocou termogravimetrickej analýzy bolo teda zistené, že sieťovanie nezvýšilo termálnu stabilitu suchých vzoriek. Ostatnými experimentmi sme však dokázali, že sieťovanie malo vplyv na stupeň naboťnania, čas degradácie, morfológiu, porozitu a v neposlednom rade teplotu denaturácie kolagénových vzoriek. Z výsledkov tohto experimentu môžeme usúdiť, že

aj keď boli vzorky zosieťované, tak hustota sieťovania bola natoľko nízka, že významne neovplyvnila termálnu stabilitu vzoriek.



Obr. 21: Termogravimetrický záznam (A, B) a derivačný termogravimetrický záznam (C, D) v rozmedzí 25 až 800 °C v oxidačnej atmosfére vzduchu (A, C) resp. inertnej atmosfére dusíku (B, D)

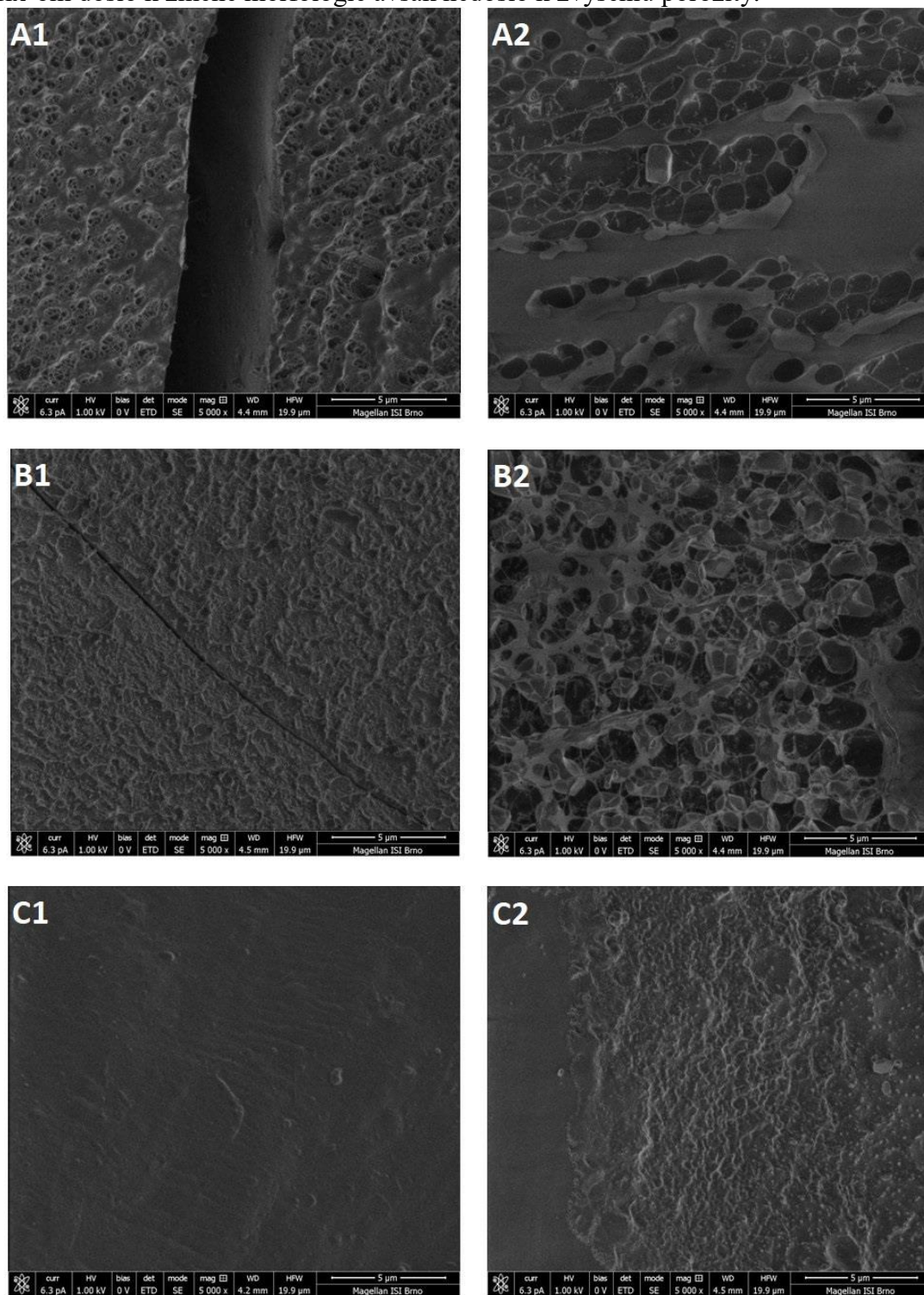
#### 4.6 Skenovacia elektrónová kryomikroskopia

Pri metóde kryo-SEM dochádza k zmrazeniu vzorky pred meraním a počas merania je vzorka stále udržiavaná v zmrazenom stave. To umožňuje aby zostala vzorka hydratovaná aj vo vysokom vákuu. Zmrazenie umožní zachovanie pôvodnej štruktúry a technika kryo-SEM je vhodná pre štúdium morfológie vzoriek.

Na Obr. 22 vidíme snímky zobrazujúce morfológiu nesieťovaných a sieťovaných filmov z prasacieho kolagénu pred (vľavo) resp. po denaturácii (vpravo). Porovnaním snímok prvej sady filmov A1 (nesieťovaný), B1 (sieťovaný EDC/NHS) a C1 (sieťovaný Lyofix-om) pozorujeme viditeľné rozdiely v štruktúre filmov. Na snímke A1 vidíme, že nesieťovaný kolagénový film sa vyznačuje vyššou porozitou a štruktúra nepôsobí tak kompaktné ako na snímkach B1 a C1, kde sú zobrazené filmy po sieťovaní. Na týchto snímkach vidíme, že sieťovanie malo vplyv na morfológiu a porozitu vzoriek.

Kolagénové filmy z druhej sady (snímky A2, B2 a C2) boli zahriate nad teplotu denaturácie, ktorá bola zistená pre jednotlivé vzorky v kapitole 4.3.3. Následne bola porovnaná zmena morfológie medzi nedenaturovanými vzorkami (vľavo) a denaturovanými vzorkami (vpravo). Po denaturácii došlo k očakávanej zmene štruktúry vzoriek, došlo k premene kolagénu na želatínu a výrazne sa zvýšila porozita vzoriek. Najmenej

pozorovateľná zmena porozity bola na snímke C2, kde po denaturácii filmu sieťovaného Lyofix-om došlo k zmene morfológie avšak nedošlo k zvýšeniu porozity.



Obr. 22: Morfológia kolagénových filmov pred (1) a po denaturácii (2). Nesieťovaný (A), sieťovaný pomocou EDC/NHS (B), sieťovaný pomocou Lyofix (C)

## 5 ZÁVER

Cieľom diplomovej práce bolo pripraviť filmy z kolagénu získaného z rôznych živočíšnych zdrojov (prasa, Tilapia, kôň, krava, krokodýl), zosieťovať ich pomocou chemických činidiel EDC/NHS a Lyofix a ako pripravené kolagénové filmy tak aj vplyv sieťovania následne analyzovať a porovnať. Experimentálna časť je rozdelená na dve hlavné časti. Prvá časť sa zameriava na študovanie botnácich a degradačných vlastností pripravených filmov a optimalizáciu merania pomocou diferenčnej kompenzačnej kalorimetrie (DSC). Druhá časť sa zameriava na samotnú analýzu pripravených vzoriek, kde boli na charakterizáciu filmov využité metódy teplotne modulovanej DSC, infračervenej spektroskopie, termogravimetrickej analýzy a skenovacej elektrónovej kryomikroskopie.

Schopnosť vzoriek botnať bola študovaná v ultračistej vode. Stanovenie stupňa nabotnania nesieťovaných kolagénových filmov bolo problematické nakoľko pri ich sušení filtračným papierom pred zvážením v danom intervale sa vzorky rozpadali a nebolo možné ich zvážiť. Výnimku tvorila vzorka z prasacieho kolagénu, ktorú bolo možné zvážiť vo všetkých časových intervaloch experimentu. Vyššia stabilita tejto vzorky bola pravdepodobne spôsobená tým, že prasací kolagén bol získaný zo šľachy, zatiaľ čo ostatné vzorky použitých kolagénov boli z kože. Po zosieťovaní filmov pomocou EDC/NHS došlo k zvýšeniu stability vzoriek, keďže nedochádzalo k ich degradácii. Najvyšší stupeň nabotnania (7,3) vykazovala vzorka filmu z kravského kolagénu. Hustota sieťovania v tejto vzorke bola natoľko nízka, že výrazne neovplyvnila schopnosť filmu viazať vodu avšak sieťovanie bolo efektívne, keďže nedochádzalo k degradácii vzorky. Najnižší stupeň nabotnania (3,3) mala vzorka filmu z kolagénu z Tilapie. V tomto prípade bola hustota sieťovania vyššia, nakoľko vzorka filmu nebola schopná naviazať do svojej štruktúry väčšie množstvo vody. Sieťovanie pomocou Lyofix-u viedlo podobne ako pri EDC/NHS k zvýšeniu stability a potlačeniu degradácie vzoriek. Celkovo bol stupeň nabotnania filmov po sieťovaní Lyofix-om znateľne nižší ako po sieťovaní EDC/NHS. Najvyšší stupeň nabotnania (3,9) mala vzorka z konského kolagénu, ktorý bol oproti ostatným vzorkám takmer dvojnásobný. Sieťovanie Lyofix-om závisí na prítomnosti aminoskupín vo vzorke a môžeme teda predpokladať, že vysoký stupeň nabotnania konského kolagénu bol spôsobený nízkym obsahom voľných aminoskupín, ktoré by sa mohli zúčastniť sieťovania a to viedlo k tomu, že hustota sieťovania bola nižšia a schopnosť vzorky botnať a viazať vodu bola tým pádom vyššia. Najnižší stupeň nabotnania (1,9) mala podobne ako po sieťovaní EDC/NHS vzorka kolagénu z Tilapie.

Obsah vody priamo súvisí so stupňom nabotnania vzoriek a bol stanovený ako množstvo vody vo vzorke v maximálnom stupni nabotnania. Stupeň nabotnania sieťovaných kolagénových filmov bol maximálny po 45 minútach. Čas maximálneho stupňa nabotnania nesieťovaných kolagénových filmov sa líšili, keďže dochádzalo k ich degradácii. V nesieťovaných vzorkách kolagénu bol vo všetkých prípadoch obsah vody približne 90 %. Voda mohla bez obmedzenia difundovať a viazať sa vodíkovými väzbami na voľné väzbové miesta v štruktúre filmu. Po sieťovaní EDC/NHS bol najvyšší obsah vody vo vzorke z kravského kolagénu (86 %) a najnižší obsah vody mala vzorka filmu z kolagénu z Tilapie (68 %). Obsah vody vo vzorkách sieťovaných pomocou Lyofix-u bol ešte nižší ako po sieťovaní EDC/NHS. Najvyšší obsah vody bol vo vzorke z konského kolagénu (74 %) a najnižší obsah bol vo vzorke z kolagénu z Tilapie (47 %).

Degradácia kolagénových filmov bola študovaná počas 9 dní pri 37 °C v roztoku kolagenázy. Vo vzorkách sieťovaných pomocou EDC/NHS nebol počas prvých 24 hodín pozorovaný výrazný úbytok hmotnosti. Po 48 hodinách došlo k výraznejšiemu úbytku vo vzorke z kolagénu z krokodýla, ktorej úbytok hmotnosti po 9 dňoch bol približne 94 %. Prvý hmotnostný úbytok vo vzorkách z kravy a Tilapie bol zistený po 6 dňoch a celkový úbytok hmotnosti po 9 dňoch bol 16 % respektíve 11 %. Vo vzorkách z prasacieho a konského kolagénu nedochádzalo k degradácii ani po 9 dňoch. Pri štúdiu degradácie vzoriek sieťovaných pomocou Lyofix-u nedochádzalo počas prvých 3 dní k úbytku hmotnosti, práve naopak, vzorky ešte botnali. Príčinou bolo pravdepodobne narušenie štruktúry filmov pôsobením kolagenázy a zvýšenie schopnosti vody difundovať a vytvárať so štruktúrou filmu vodíkové väzby. Najviac degradovala rovnako ako po sieťovaní EDC/NHS vzorka kolagénu z krokodýla, kde po 9 dňoch vzorka zdegradovala úplne. V posledný deň experimentu bol zaznamenaný hmotnostný úbytok aj vo vzorkách kolagénov z Tilapie, prasaťa a koňa, ktorý bol približne 20 %. Film z kravského kolagénu počas celej doby experimentu nedegradoval, ale dochádzalo k jeho botnaniu.

Optimalizácia metódy DSC spočívala vo výbere vhodnej rýchlosti ohrevu, periódy a módu na stanovenie teploty denaturácie kolagénových filmov. Z použitých rýchlostí ohrevu 1, 2 a 5 °C/min bola ako najvhodnejšia zvolená rýchlosť 2 °C/min. Rýchlosť ohrevu 5 °C/min nebola vhodná kvôli vysokému šumu v pomere ku signálu vo výslednom termograme a rýchlosť 1 °C/min bola posúdená ako vhodná avšak meranie pri tejto rýchlosti by trvalo dvakrát dlhšie ako pri 2 °C/min. Z troch použitých módov *heat-only*, *heat-iso* a *heat-cool* bol ako najvhodnejší zvolený mód *heat-iso* a z použitých períód 60 a 100 sekúnd bola ako vhodnejšia zvolená perióda 100 s, čím bol zabezpečený dostatočný čas na kvantitatívne meranie tepelného toku. Vypočítaná amplitúda ohrevu pre mód *heat-iso* pri període 100 s mala hodnotu  $\pm 0,53$  °C.

Teplota denaturácie kolagénových filmov bola stanovená na prístroji Discovery DSC (TA Instruments). Z nesieťovaných kolagénových filmov mal najvyššiu teplotu denaturácie film z konského kolagénu (približne 46 °C). Najnižšia teplota, pri ktorej dochádzalo k denaturácii vzoriek bola nameraná pre filmy z Tilapie a krokodýla, ktorých teplota denaturácie bola približne 33 °C. Po sieťovaní došlo k zvýšeniu teploty denaturácie u všetkých vzoriek. Vzorky sieťované pomocou EDC/NHS mali vo všetkých prípadoch vyššiu teplotu denaturácie ako filmy sieťované pomocou Lyofix-u. V oboch prípadoch denaturovala pri najvyššej teplote vzorka prasacieho kolagénu (69,2 °C po sieťovaní EDC/NHS a 62,5 °C po sieťovaní Lyofix-om). Najnižšia teplota denaturácie bola nameraná pre vzorku kolagénu z krokodýla a to konkrétne 56,4 °C po sieťovaní EDC/NHS a 47,8 °C po použití Lyofix-u. Najnižší posun teploty denaturácie medzi nesieťovanými a sieťovanými vzorkami bol zaznamenaný pre film z konského kolagénu, kde síce teplota denaturácie nesieťovanej vzorky bola približne 46 °C avšak po sieťovaní Lyofix-om došlo k zvýšeniu teploty len o približne 6 °C. Tento nízky posun pravdepodobne súvisí s množstvom voľných aminoskupín vo vzorke konského kolagénu ako už bolo spomínané vyššie. Celkovo je ako sieťovacie činidlo vhodnejšie EDC/NHS a to nielen kvôli tomu, že posunulo teplotu denaturácie vzoriek k vyšším hodnotám ako Lyofix, ale aj kvôli tomu, že v porovnaní s Lyofix-om nie sú filmy sieťované EDC/NHS cytotoxické. Celkové spotrebované teplo prepočítané na gram suchého kolagénu

sa až na jednu výnimku sieťovaním nezmenilo, čo naznačuje to, že obsah štruktúrnych motívov, ktoré sa denaturáciou narušujú, je prakticky rovnaký. V dôsledku sieťovania sú však stabilnejšie a k ich „rozpleteniu“ dochádza pri vyššej teplote. Vzorka konského kolagénu, pri ktorej bolo spotrebované teplo v nesúlade s ostatnými by mohlo byť predmetom ďalších, predovšetkým štruktúrnych analýz.

FTIR analýza bola vykonaná za účelom štúdia sekundárnej štruktúry kolagénových filmov. V spektrách kolagénových filmov sa nachádzali typické absorbné pásy a to Amid A, Amid I, Amid II a Amid III. Zo spektier sieťovaných kolagénových filmov bolo zistené, že vlnové čísla charakteristických pásov kolagénu sú takmer rovnaké ako pri vzorke nesieťovanej. Jedným z pozorovateľných rozdielov medzi spektrami nesieťovaných a sieťovaných filmov bola znížená intenzita absorbných pásov a absorbný pás esterovej skupiny vyskytujúci sa v niektorých spektrách filmov sieťovaných pomocou EDC/NHS. Prítomnosť tejto esterovej skupiny bola pravdepodobne spôsobená nedostatočným premytím kolagénových filmov po sieťovaní. V prípade kolagénového filmu z Tilapie bol absorbný pás esterovej skupiny pozorovateľný aj v spektre nesieťovanej vzorky a vzorky sieťovanej pomocou Lyofix-u. Pravdepodobnou príčinou bola nedostatočná čistota používaného kolagénu, kedy mohol obsahovať zvyšky lipidov.

Úbytok hmotnosti v závislosti na vzrastajúcej teplote bol stanovený pomocou termogravimetrickej analýzy. Z výsledkov bolo zistené, že trend úbytku hmotnosti so zvyšovaním teploty bol rovnaký ako pre nesieťované tak aj pre sieťované vzorky. Hustota sieťovania bola pravdepodobne natoľko nízka, že nezvýšila termálnu stabilitu sieťovaných kolagénových filmov.

Morfológia kolagénových filmov bola pozorovaná metódou skenovacej elektrónovej kryomikroskopie. Okrem porovnania morfológie sieťovaných a nesieťovaných vzoriek, bola porovnaná aj morfológia vzoriek pred a po denaturácii. Z výsledkov bolo viditeľné, že sieťovanie malo veľký vplyv na morfológiu a porozitu vzoriek. Sieťované filmy sa vyznačovali nižšou porozitou a štruktúra v porovnaní s nesieťovaným filmom pôsobila kompaktnejšie. Po denaturácii došlo k zväčšeniu pórov v štruktúre a celkovej zmene morfológie. Najmenšia zmena morfológie a porozity po denaturácii bola pozorovateľná na vzorke filmu sieťovaného Lyofix-om. Zatiaľ čo pomocou predošlých experimentov (botnanie, DSC, FTIR) boli získané nepriame dôkazy o vplyve sieťovania na štruktúru kolagénových filmov, tak pomocou kryo-SEM bolo priamo overené, že sieťovanie viditeľne ovplyvňuje štruktúru a vlastnosti kolagénových filmov.



## 6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] RÝGLOVÁ, Šárka, Martin BRAUN a Tomáš SUCHÝ. *Collagen and Its Modifications-Crucial Aspects with Concern to Its Processing and Analysis*. DOI: 10.1002/mame.201600460. ISBN 10.1002/mame.201600460. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mame.201600460>
- [2] GIL, Camila S. B., Viviane S. B. GIL, Sandhra M. CARVALHO, et al. Recycled collagen films as biomaterials for controlled drug delivery. *New J. Chem.* 2016, **40**(10), 8502-8510. DOI: 10.1039/C6NJ00674D. ISSN 1144-0546. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6NJ00674D>
- [3] PARENTEAU-BAREIL, Rémi, Robert GAUVIN a François BERTHOD. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials*. 2010, **3**(3), 1863-1887. DOI: 10.3390/ma3031863. ISSN 1996-1944. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/3/3/1863/>
- [4] WANG, Yan, Xiaoting WANG, Jin SHANG, Huan LIU, Yi YUAN, Yu GUO, Bo HUANG a Yue ZHOU. Repairing the ruptured annular fibrosus by using type I collagen combined with citric acid, EDC and NHS: an in vivo study. *European Spine Journal*. 2017, **26**(3), 884-893. DOI: 10.1007/s00586-016-4898-1. ISSN 0940-6719. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00586-016-4898-1>
- [5] SAITO, Hirofumi, Shun MURABAYASHI, Yoshinori MITAMURA a Tetsushi TAGUCHI. Characterization of alkali-treated collagen gels prepared by different crosslinkers. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008, **19**(3), 1297-1305. DOI: 10.1007/s10856-007-3239-7. ISSN 0957-4530. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-007-3239-7>
- [6] FERREIRA, Ana Marina, Piergiorgio GENTILE, Valeria CHIONO a Gianluca CIARDELLI. *Collagen for bone tissue regeneration*. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.06.014. ISBN 10.1016/j.actbio.2012.06.014. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706112002620>
- [7] FRIESS, Wolfgang. *Collagen – biomaterial for drug delivery* | *Dedicated to Professor Dr. Eberhard Nürnberg, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, on the occasion of his 70th birthday.1*. DOI: 10.1016/S0939-6411(98)00017-4. ISBN 10.1016/S0939-6411(98)00017-4. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641198000174>
- [8] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1
- [9] NEIL A. CAMPBELL, ADAPTATION ET RÉVISION SCIENT. DE RICHARD MATHIEU a TRAD. DE SERGE ALLARD.. [ET AL.]. *Biologie générale*. [3e éd.]. Saint-Laurent: Ed. du Renouveau Pédagogique, 1995. ISBN 27-613-0653-8.
- [10] BRINCKMANN, Jürgen., Holger. NOTBOHM a P. K. MÜLLER. *Collagen: primer in structure, processing, and assembly*. New York: Springer, c2005. ISBN 978-3-540-23272-8.
- [11] TRELSTAD, Robert L. a Kimiko HAYASHI. Tendon collagen fibrillogenesis: Intracellular subassemblies and cell surface changes associated with fibril growth. *Developmental Biology*. 1979, **71**(2), 228-242. DOI: 10.1016/0012-

- 1606(79)90166-0. ISSN 00121606. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0012160679901660>
- [12] BONFANTI, Lidia, Alexander A MIRONOV, José A MARTÍNEZ-MENÁRGUEZ, et al. Procollagen Traverses the Golgi Stack without Leaving the Lumen of Cisternae. *Cell*. 1998, **95**(7), 993-1003. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81723-7. ISSN 00928674. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400817237>
- [13] PETERKOVÁ, P., LAPČÍK, L: Kolagen - vlastnosti, modifikace a aplikace. *Chemické Listy*, 94, 371-379 (2000)
- [14] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers*. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 35-273-0223-9.
- [15] ROSARIO PIGNATELLO. *Biomaterials applications for nanomedicine*. Rijeka: InTech, 2011. ISBN 978-953-3076-614.
- [16] GORHAM, Stephen D. Collagen. *Biomaterials*. London: Palgrave Macmillan UK, 1991, 55-122. DOI: 10.1007/978-1-349-11167-1\_2. ISBN 978-1-349-11169-5. Dostupné také z: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-349-11167-1\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-1-349-11167-1_2)
- [17] COOPERMAN, Linda a Dov MICHAELI. The immunogenicity of injectable collagen. I. A 1-year prospective study. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1984, **10**(4), 638-646. DOI: 10.1016/S0190-9622(84)80271-6. ISSN 01909622. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962284802716>
- [18] LYNN, A.K., I.V. YANNAS a W. BONFIELD. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2004, **71B**(2), 343-354. DOI: 10.1002/jbm.b.30096. ISSN 0021-9304. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.b.30096>
- [19] CHEVALLAY, B. a D. HERBAGE. *Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy*. 2000, **38**(2), 211-218. DOI: 10.1007/BF02344779. ISSN 0140-0118. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02344779>
- [20] YIN HSU, Fu, Shan-Chang CHUEH a Yng JIIN WANG. Microspheres of hydroxyapatite/reconstituted collagen as supports for osteoblast cell growth. *Biomaterials*. 1999, **20**(20), 1931-1936. DOI: 10.1016/S0142-9612(99)00095-2. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961299000952>
- [21] KIKUCHI, Masanori, Hiroko N. MATSUMOTO, Takeki YAMADA, Yoshihisa KOYAMA, Kazuo TAKAKUDA a Junzo TANAKA. Glutaraldehyde cross-linked hydroxyapatite/collagen self-organized nanocomposites. *Biomaterials*. 2004, **25**(1), 63-69. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00472-1. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961203004721>
- [22] OLSEN, D. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003, **55**(12), 1547-1567. DOI: 10.1016/j.addr.2003.08.008. ISSN 0169409x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X03001819>

- [23] CANCEDDA, Ranieri, Beatrice DOZIN, Paolo GIANNONI a Rodolfo QUARTO. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology*. 2003, **22**(1), 81-91. DOI: 10.1016/S0945-053X(03)00012-X. ISSN 0945053x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X0300012X>
- [24] WAHL, DA a JT CZERNUSZKA. Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair. *European Cells and Materials*. 2006, **11**, 43-56. DOI: 10.22203/eCM.v011a06. Dostupné také z: <http://ecmjournal.org/journal/papers/vol011/pdf/v011a06.pdf>
- [25] LIU, Wentao, Zhenhua TIAN, Conghu LI a Guoying LI. Thermal denaturation of fish collagen in solution: A calorimetric and kinetic analysis. *Thermochimica Acta*. 2014, **581**, 32-40. DOI: 10.1016/j.tca.2014.02.012. ISSN 00406031. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040603114000549>
- [26] BRUYLANTS, G., J. WOUTERS a C. MICHAUX. Differential Scanning Calorimetry in Life Science: Thermodynamics, Stability, Molecular Recognition and Application in Drug Design. *Current Medicinal Chemistry*. 2005, **12**(17), 2011-2020. DOI: 10.2174/0929867054546564. ISSN 09298673.
- [27] ŠTARHA, Pavel a Zdeněk TRÁVNÍČEK. *Termická analýza*. Olomouc, 2011. Dostupné také z: [http://agch.upol.cz/userfiles/file/pdf/Termicka\\_analyza.pdf](http://agch.upol.cz/userfiles/file/pdf/Termicka_analyza.pdf)
- [28] THOMAS, Leonard C. *High Heating Rate Modulated DSC® Using Tzero™ DSC Technology*. New Castle, 2005. Dostupné také z: <http://www.tainstruments.com/pdf/literature/TA267.pdf>
- [29] VANÍČEK, Jiří. *Metódy termické analýzy*. Liberec, 2006. Dostupné také z: <http://docplayer.cz/36623267-Metody-termicke-analyzy-4-diferencni-termicka-analyza-dta-a-diferencni-scanovaci-kalorimetrie-dsc.html>
- [30] KESSLER, Michael. Thermal Analysis of Composites Using DSC. *Advanced topics in characterization of composites*. Victoria, BC: Trafford, 2004, s. 11-35. ISBN 978-1-41203-639-9.
- [31] FERSHT, A.R. Denaturation (Proteins). *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Elsevier, 2013, 2013, , 302-303. DOI: 10.1016/B978-0-12-374984-0.00393-4. ISBN 9780080961569. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123749840003934>
- [32] LIU, Wentao, Zhenhua TIAN, Conghu LI a Guoying LI. Thermal denaturation of fish collagen in solution: A calorimetric and kinetic analysis. *Thermochimica Acta*. 2014, **581**, 32-40. DOI: 10.1016/j.tca.2014.02.012. ISSN 00406031. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040603114000549>
- [33] GURDAK, Elzbieta, John BOOTH, Clive J. ROBERTS, Paul G. ROUXHET a Christine C. DUPONT-GILLAIN. Influence of collagen denaturation on the nanoscale organization of adsorbed layers. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2006, **302**(2), 475-484. DOI: 10.1016/j.jcis.2006.06.064. ISSN 00219797. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979706005716>
- [34] GAUZA-WŁODARCZYK, Marlena, Leszek KUBISZ, Sławomir MIELCAREK a Dariusz WŁODARCZYK. Comparison of thermal properties of fish collagen and bovine collagen in the temperature range 298–670 K. *Materials Science and*

- Engineering: C.* 2017, **80**, 468-471. DOI: 10.1016/j.msec.2017.06.012. ISSN 09284931. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116315697>
- [35] SUNG, Hsing-Wen, Chin-Sheng HSU a Yuag-Shein LEE. Physical properties of a porcine internal thoracic artery fixed with an epoxy compound. *Biomaterials*. 1996, **17**(24), 2357-2365. DOI: 10.1016/S0142-9612(96)00081-6. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961296000816>
- [36] SUNG, Hsing-Wen, Hung-Liang HSU, Chin-Chin SHIH a Der-Shyu LIN. Cross-linking characteristics of biological tissues fixed with monofunctional or multifunctional epoxy compounds. *Biomaterials*. 1996, **17**(14), 1405-1410. DOI: 10.1016/0142-9612(96)87282-6. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0142961296872826>
- [37] JORGE-HERRERO, E, P FERNÁNDEZ, J TURNAY, N OLMO, P CALERO, R GARCÍA, I FREILE a J.L CASTILLO-OLIVARES. Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen. *Biomaterials*. 1999, **20**(6), 539-545. DOI: 10.1016/S0142-9612(98)90205-8. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961298902058>
- [38] CAO, Hui a Shi-Ying XU. EDC/NHS-crosslinked type II collagen-chondroitin sulfate scaffold: characterization and in vitro evaluation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008, **19**(2), 567-575. DOI: 10.1007/s10856-007-3281-5. ISSN 0957-4530. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-007-3281-5>
- [39] DAMINK, L. In vitro degradation of dermal sheep collagen cross-linked using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials*. 1996, **17**(7), 679-684. DOI: 10.1016/0142-9612(96)86737-8. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0142961296867378>
- [40] BRODSKY, Barbara a Anton V. PERSIKOV. Molecular Structure of the Collagen Triple Helix. *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers*. Elsevier, 2005, , 301-339. Advances in Protein Chemistry. DOI: 10.1016/S0065-3233(05)70009-7. ISBN 9780120342709. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065323305700097>
- [41] FIELDS, Gregg B. A model for interstitial collagen catabolism by mammalian collagenases. *Journal of Theoretical Biology*. 1991, **153**(4), 585-602. DOI: 10.1016/S0022-5193(05)80157-2. ISSN 00225193. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022519305801572>
- [42] BI, Long, Zheng CAO, Yunyu HU, et al. Effects of different cross-linking conditions on the properties of genipin-cross-linked chitosan/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2011, **22**(1), 51-62. DOI: 10.1007/s10856-010-4177-3. ISSN 0957-4530. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-010-4177-3>
- [43] ZHANG, Ling, Kuifeng LI, Wenqian XIAO, Li ZHENG, Yumei XIAO, Hongsong FAN a Xingdong ZHANG. Preparation of collagen–chondroitin sulfate–hyaluronic acid hybrid hydrogel scaffolds and cell compatibility in vitro. *Carbohydrate Polymers*.

- 2011, **84**(1), 118-125. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.11.009. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710008970>
- [44] ROSE, James, Settimio PACELLI, Alicia HAJ, Harminder DUA, Andrew HOPKINSON, Lisa WHITE a Felicity ROSE. Gelatin-Based Materials in Ocular Tissue Engineering. *Materials*. 2014, **7**(4), 3106-3135. DOI: 10.3390/ma7043106. ISSN 1996-1944. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/7/4/3106/>
- [45] KOOB, Thomas J. a Daniel J. HERNANDEZ. Material properties of polymerized NDGA–collagen composite fibers: development of biologically based tendon constructs. *Biomaterials*. 2002, **23**(1), 203-212. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00096-5. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961201000965>
- [46] GORGIEVA, Selestina a Vanja KOKOL. Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. InTech, 2011. DOI: 10.5772/24118. ISBN 978-953-307-661-4. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/biomaterials-applications-for-nanomedicine/collagen-vs-gelatine-based-biomaterials-and-their-biocompatibility-review-and-perspectives>
- [47] FIGUEIRO, S, J GOES, R MOREIRA a A SOMBRA. On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan–collagen films. *Carbohydrate Polymers*. 2004, **56**(3), 313-320. DOI: 10.1016/j.carbpol.2004.01.011. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861704000608>
- [48] KEW, S.J., J.H. GWYNNE, D. ENEA, et al. Regeneration and repair of tendon and ligament tissue using collagen fibre biomaterials. *Acta Biomaterialia*. 2011, **7**(9), 3237-3247. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.06.002. ISSN 17427061. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S174270611100239X>
- [49] ZEUGOLIS, Dimitrios I., Gordon R. PAUL a Geoffrey ATTENBURROW. Cross-linking of extruded collagen fibers-A biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009, **89A**(4), 895-908. DOI: 10.1002/jbm.a.32031. ISSN 15493296. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.32031>
- [50] KATO, Y.Pedro, David L. CHRISTIANSEN, Rita A. HAHN, Sheu-Jane SHIEH, Jack D. GOLDSTEIN a Frederick H. SILVER. Mechanical properties of collagen fibres: a comparison of reconstituted and rat tail tendon fibres. *Biomaterials*. 1989, **10**(1), 38-42. DOI: 10.1016/0142-9612(89)90007-0. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0142961289900070>
- [51] DIGENIS, George A., Thomas B. GOLD a Vinod P. SHAH. Cross-Linking of Gelatin Capsules and Its Relevance to Their in Vitro-in Vivo Performance. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1994, **83**(7), 915-921. DOI: 10.1002/jps.2600830702. ISSN 00223549. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915495401>
- [52] KUIJPERS, A. J., G. H. M. ENGBERS, J. FEIJEN, et al. Characterization of the Network Structure of Carbodiimide Cross-Linked Gelatin Gels. *Macromolecules*.

- 1999, **32**(10), 3325-3333. DOI: 10.1021/ma981929v. ISSN 0024-9297. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma981929v>
- [53] STAROSZCZYK, Hanna, Katarzyna SZTUKA, Julia WOLSKA, Anna WOJTASZ-PAJĄK a Ilona KOŁODZIEJSKA. Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014, **117**, 707-712. DOI: 10.1016/j.saa.2013.09.044. ISSN 13861425. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142513010512>
- [54] HUANG, Gloria Portocarrero, Shobana SHANMUGASUNDARAM, Pallavi MASIH, Deep PANDYA, Suwah AMARA, George COLLINS a Treena Livingston ARINZEH. An investigation of common crosslinking agents on the stability of electrospun collagen scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2015, **103**(2), 762-771. DOI: 10.1002/jbm.a.35222. ISSN 15493296. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.35222>
- [55] MA, B., X. WANG, C. WU a J. CHANG. Crosslinking strategies for preparation of extracellular matrix-derived cardiovascular scaffolds. *Regenerative Biomaterials*. 2014, **1**(1), 81-89. DOI: 10.1093/rb/rbu009. ISSN 2056-3418. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/rb/article-lookup/doi/10.1093/rb/rbu009>
- [56] JAYAKRISHNAN, A. a S.R. JAMEELA. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials*. 1996, **17**(5), 471-484. DOI: 10.1016/0142-9612(96)82721-9. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0142961296827219>
- [57] SAITO, Hirofumi, Shun MURABAYASHI, Yoshinori MITAMURA a Tetsushi TAGUCHI. Unusual Cell Adhesion and Antithrombogenic Behavior of Citric Acid-Cross-Linked Collagen Matrices. *Biomacromolecules*. 2007, **8**(6), 1992-1998. DOI: 10.1021/bm070122k. ISSN 1525-7797. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm070122k>
- [58] SHIH, Yu-Ru V., Chung-Nan CHEN, Shiao-Wen TSAI, Yng Jiin WANG a Oscar K. LEE. Growth of Mesenchymal Stem Cells on Electrospun Type I Collagen Nanofibers. *Stem Cells*. 2006, **24**(11), 2391-2397. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0253. ISSN 10665099. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2006-0253>
- [59] CHIONO, Valeria, Ettore PULIERI, Giovanni VOZZI, Gianluca CIARDELLI, Arti AHLUWALIA a Paolo GIUSTI. Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008, **19**(2), 889-898. DOI: 10.1007/s10856-007-3212-5. ISSN 0957-4530. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-007-3212-5>
- [60] LIANG, Huang-Chien, Wen-Hsiang CHANG, Ko-Jung LIN a Hsing-Wen SUNG. Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a drug carrier for intramuscular administration: In vitro and in vivo studies. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2003, **65A**(2), 271-282. DOI: 10.1002/jbm.a.10476. ISSN 0021-9304. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.10476>
- [61] CHANG, Yen, Chen-Chi TSAI, Huang-Chien LIANG a Hsing-Wen SUNG. In vivo evaluation of cellular and acellular bovine pericardium fixed with a naturally occurring

- crosslinking agent (genipin). *Biomaterials*. 2002, **23**(12), 2447-2457. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00379-9. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961201003799>
- [62] KOOB, Thomas J. a Daniel J. HERNANDEZ. *Mechanical and thermal properties of novel polymerized NDGA–gelatin hydrogels*. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00465-9. ISBN 10.1016/S0142-9612(02)00465-9. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961202004659>
- [63] RIVERO, S., M.A. GARCÍA a A. PINOTTI. Crosslinking capacity of tannic acid in plasticized chitosan films. *Carbohydrate Polymers*. 2010, **82**(2), 270-276. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.04.048. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710003292>
- [64] BARBEHENN, Raymond V. a C. PETER CONSTABEL. Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry*. 2011, **72**(13), 1551-1565. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.01.040. ISSN 00319422. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942211000690>
- [65] FRAZIER, Richard A., Eddie R. DEAVILLE, Rebecca J. GREEN, Elisabetta STRINGANO, Ian WILLOUGHBY, John PLANT a Irene MUELLER-HARVEY. Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010, **51**(2), 490-495. DOI: 10.1016/j.jpba.2009.05.035. ISSN 07317085. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708509003483>
- [66] WEADOCK, Kevin S., Edward J. MILLER, Lisa D. BELLINCAMPI, Joseph P. ZAWADSKY a Michael G. DUNN. Physical crosslinking of collagen fibers: Comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1995, **29**(11), 1373-1379. DOI: 10.1002/jbm.820291108. ISSN 0021-9304. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.820291108>
- [67] WALTERS, B.D. a J.P. STEGEMANN. Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales. *Acta Biomaterialia*. 2014, **10**(4), 1488-1501. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.08.038. ISSN 17427061. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706113004303>
- [68] FRATZL, Peter. *Collagen: structure and mechanics*. New York: Springer, 2008. ISBN 978-0-387-73905-2.
- [69] BAILEY, Allen J. *Effect of Ionizing Radiation on Connective Tissue Components*. Elsevier, 1968, , 233-281. International Review of Connective Tissue Research. DOI: 10.1016/B978-1-4831-6754-1.50012-1. ISBN 9781483167541. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781483167541500121>
- [70] RIZK, Moustafa A. a Nasser Y. MOSTAFA. Extraction and Characterization of Collagen from Buffalo Skin for Biomedical Applications. *Oriental Journal of Chemistry*. 2016, **32**(3), 1601-1609. DOI: 10.13005/ojc/320336. ISSN 0970020X. Dostupné také z: <http://www.orientjchem.org/vol32no3/extraction-and-characterization-of-collagen-from-buffalo-skin-for-biomedical-applications/>

## 7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

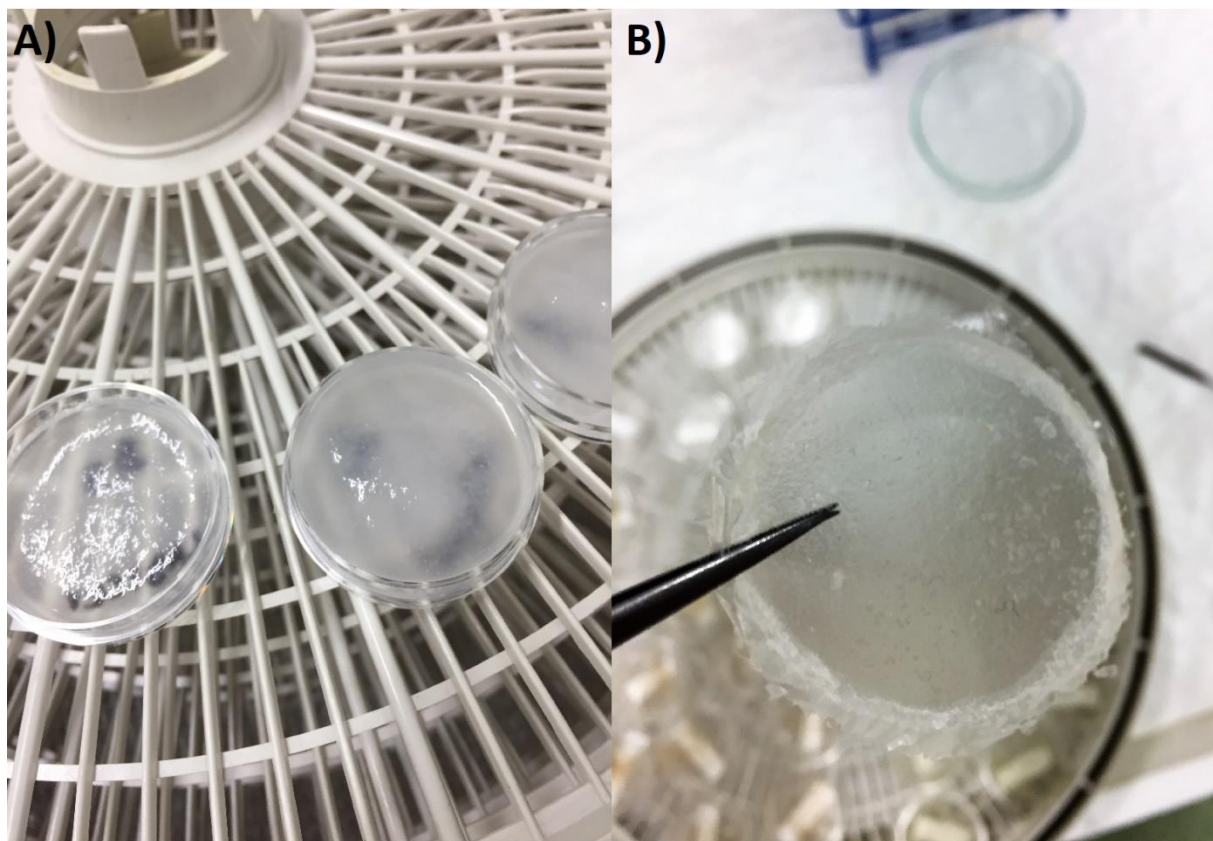
$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\gamma$	gama
3D	trojrozmerný
$\text{Ca}^{2+}$	vápenatý kation
C=O	karbonylová skupina
$\text{COO}^-$	karboxylát
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid hydrochlorid
Gly	glycín
MMP	matricové metaloproteinázy
N-H	amidová skupina
NHS	N-hydroxysukcínimid
$\text{NH}_3^+$	amónium
Obr.	obrázok
OH	hydroxylová skupina
PBS	fosfátový pufer
resp.	respektíve
Tab.	tabuľka
tzv.	takzvané
UV	ultrafialové
$\text{Zn}^{2+}$	zinočnatý kation
°C	stupeň Celzia



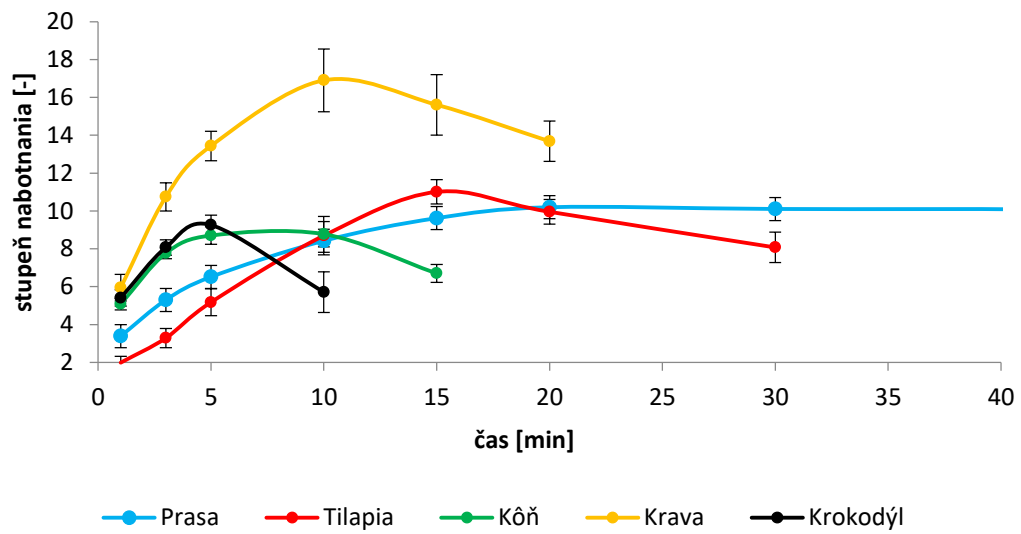
## 8 ZOZNAM PRÍLOH

Príloha 1: Homogénna suspenzia kolagénu (A), suchý kolagénový film (B).....	66
Príloha 2: Stupeň nabotnania nesieťovaných kolagenových filmov (detail) .....	67
Príloha 3: Porovnanie teplôt onsetu (A) a piky (B) pre jednotlivé módy .....	68
Príloha 4: ATR-FTIR spektrá kolagenových filmov.....	70
Príloha 5: Porovnanie teplôt denaturácie sieťovaných a nesieťovaných kolagenových filmov .....	73

## 9 PRÍLOHY

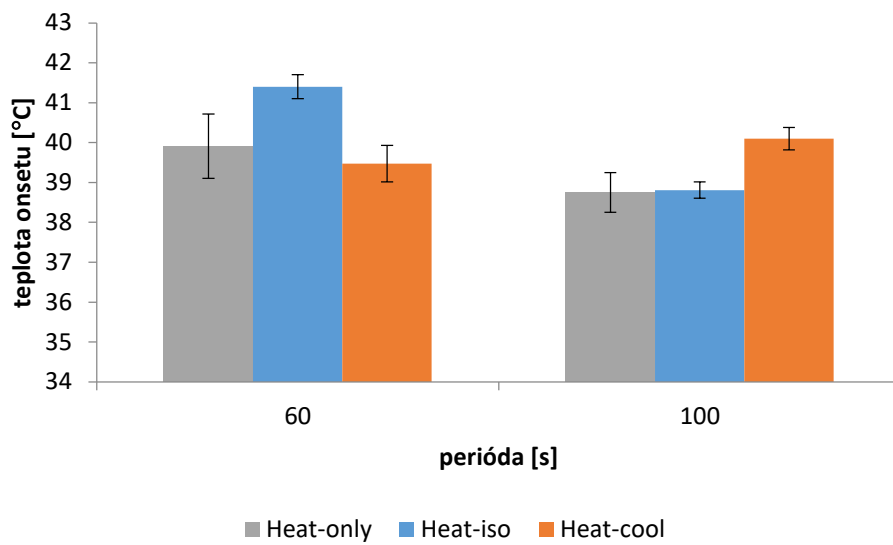


*Príloha 1: homogénna suspenzia kolagénu (A), suchý kolagénový film (B)*

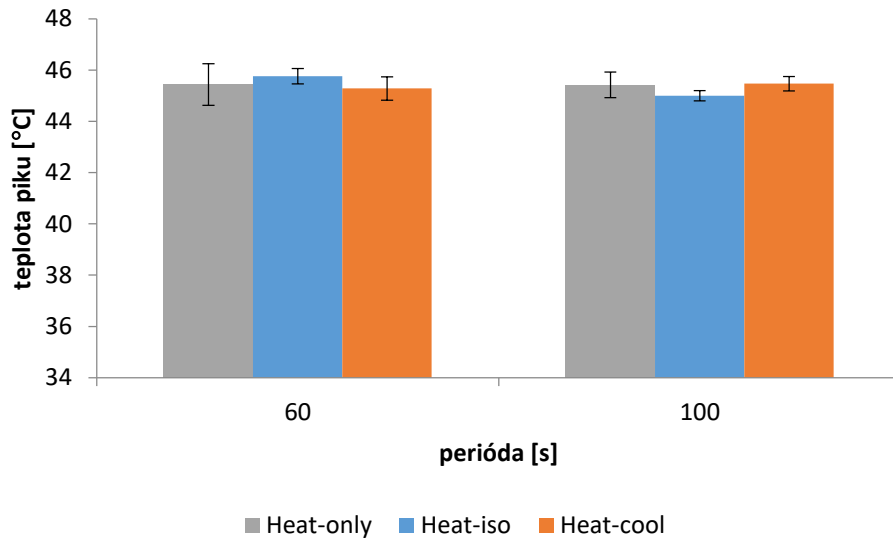


Príloha 2: Stupeň nabotnania nesieťovaných kolagenových filmov (detail)

A)

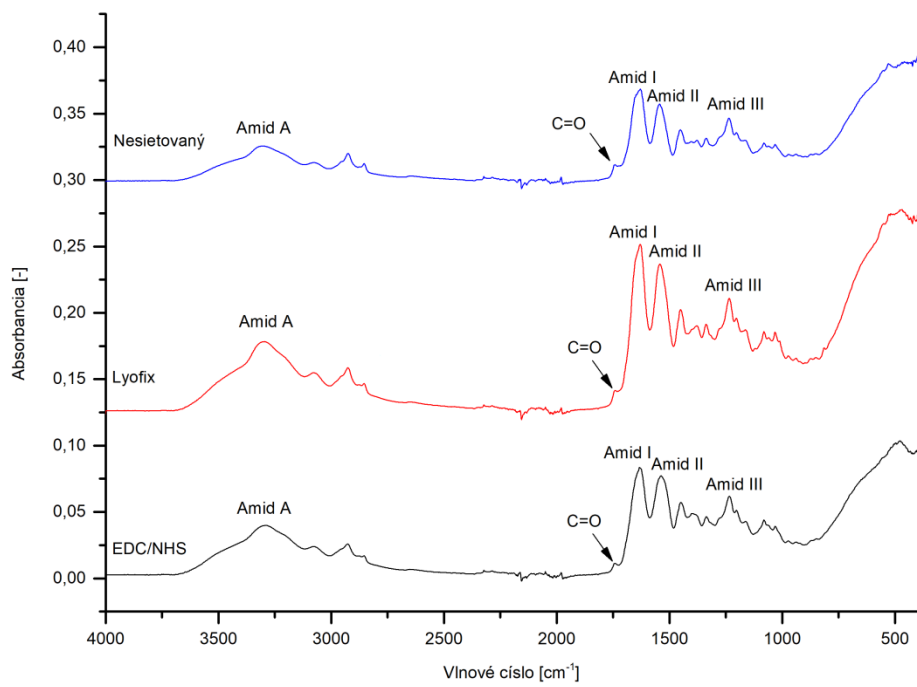


B)

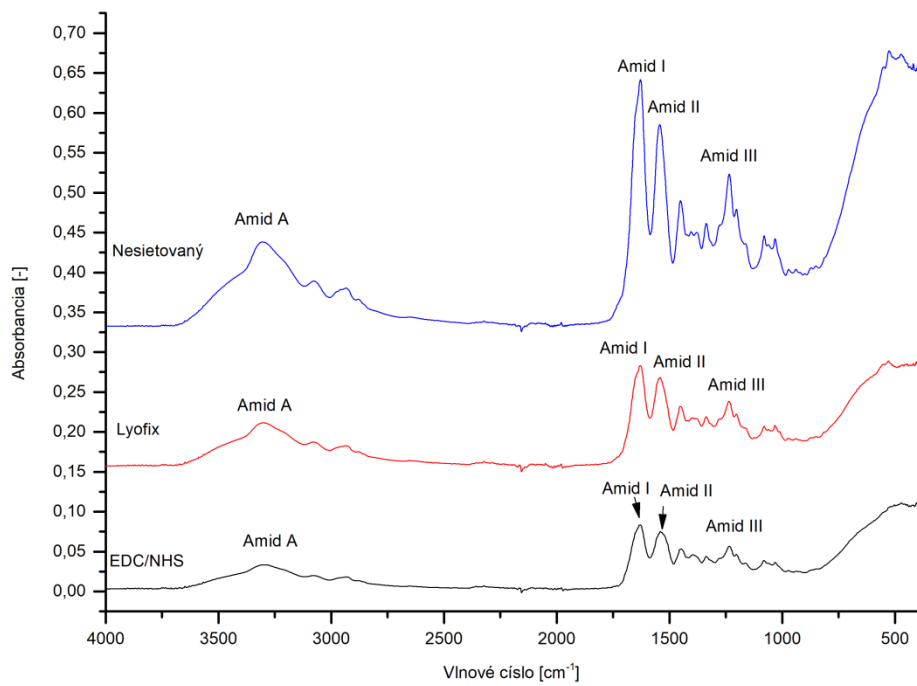


*Príloha 3: Porovnanie teplôt onsetu (A) a pikú (B) pre jednotlivé módy v závislosti na použitej perióde*

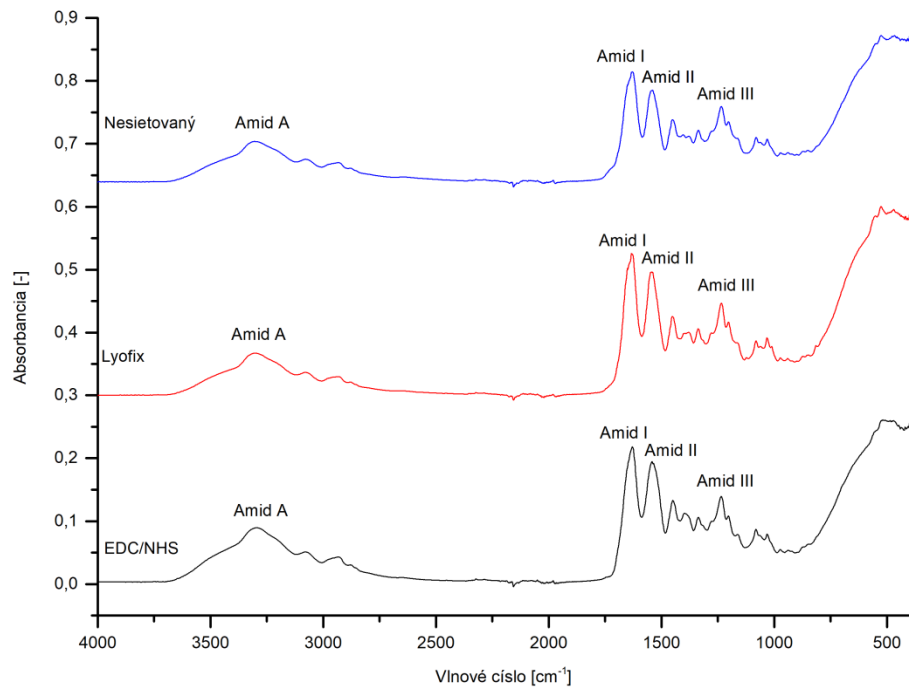
A)



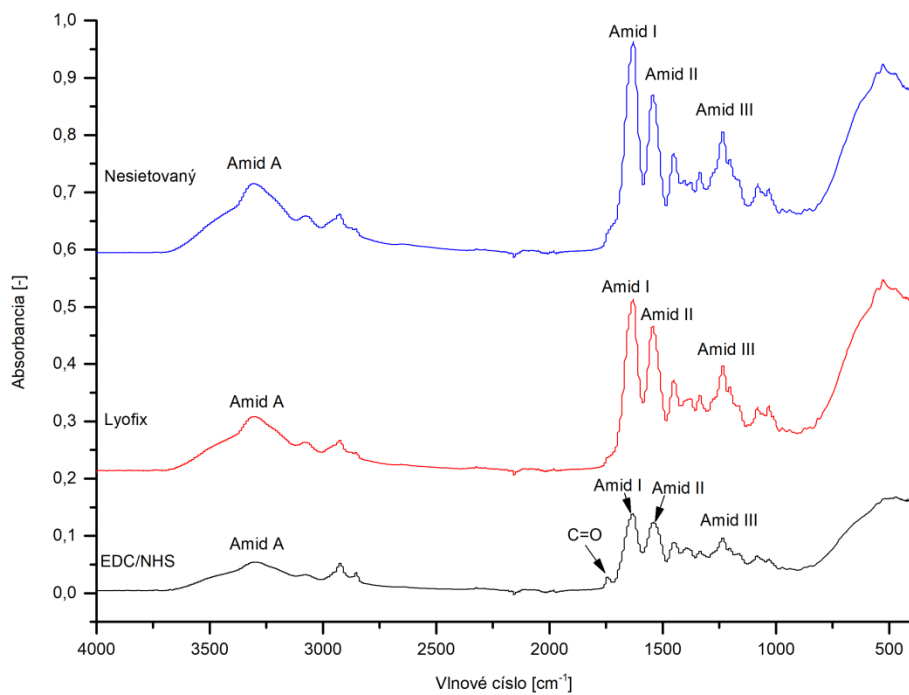
B)



C)

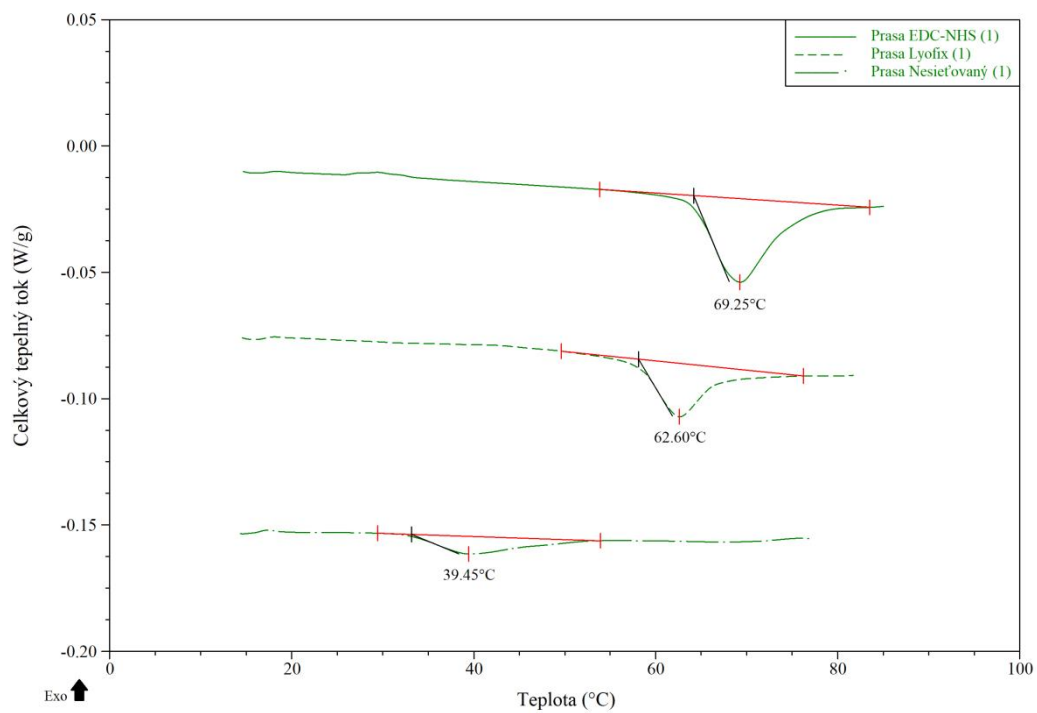


D)

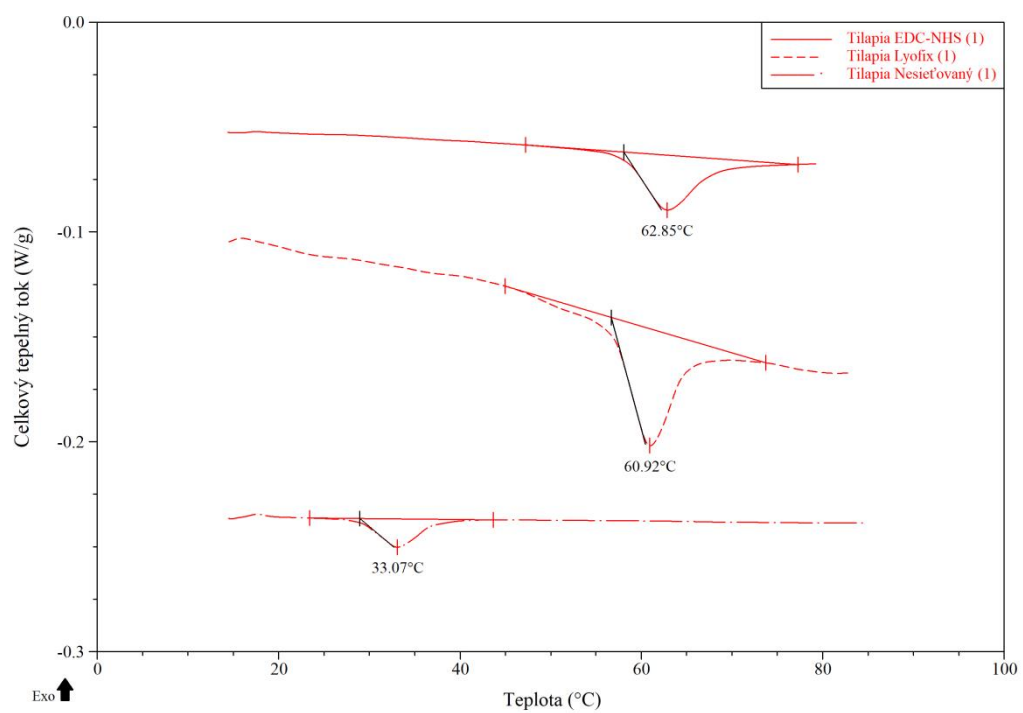


Príloha 4: ATR-FTIR spektrá kolagenových filmov: tilapia (A), kôň (B), krava (C), krokodýl (D)

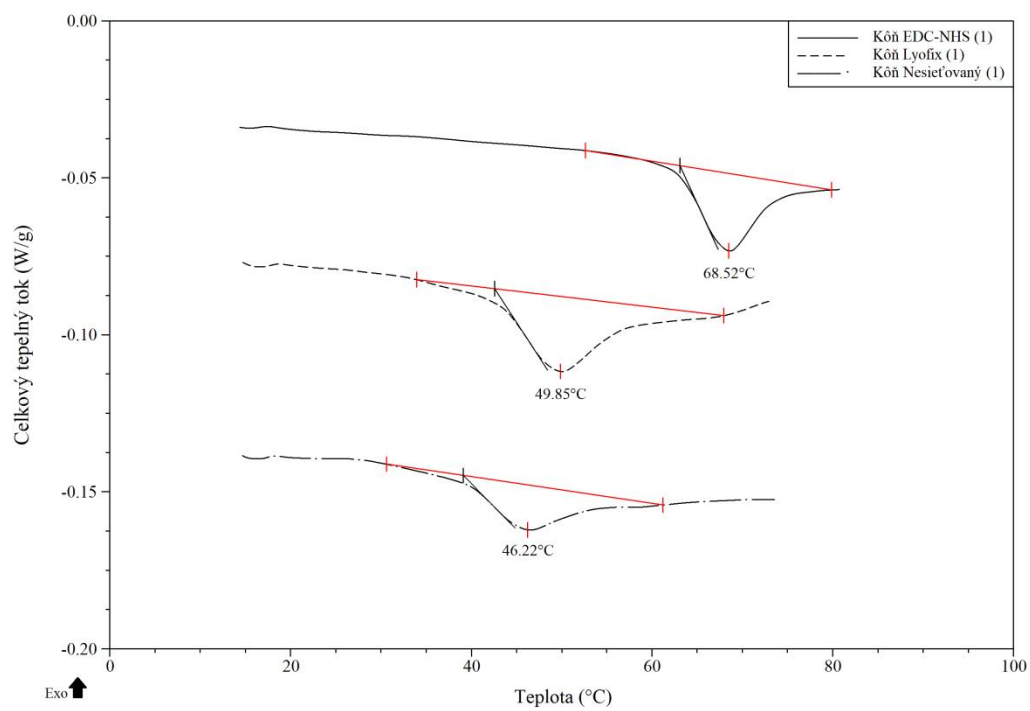
A)



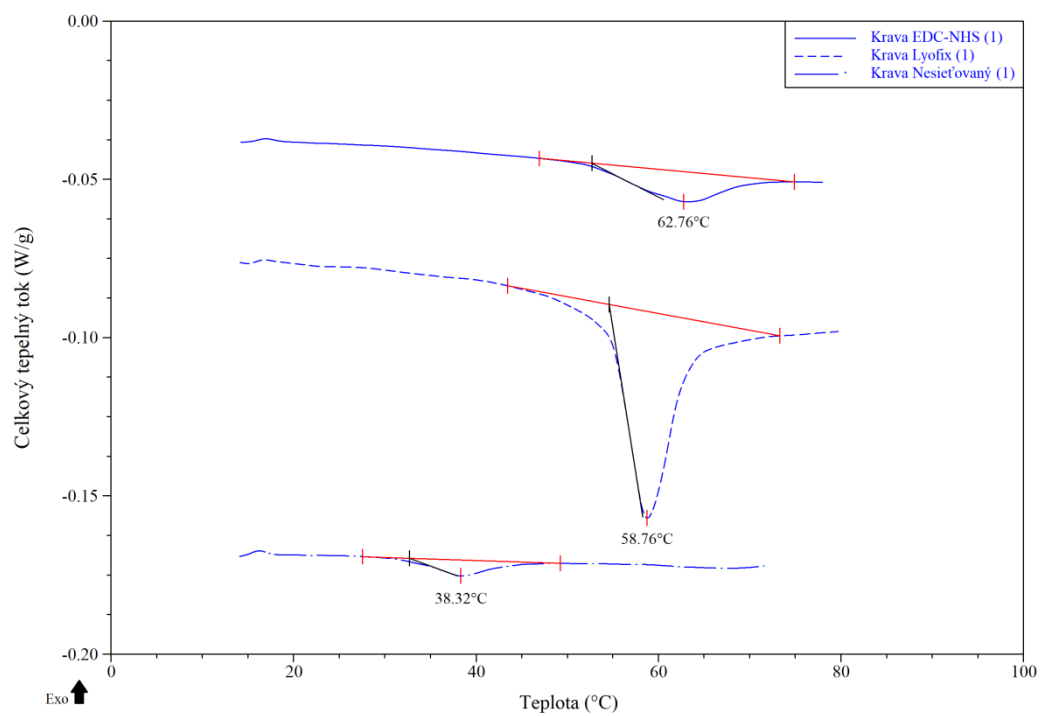
B)



C)

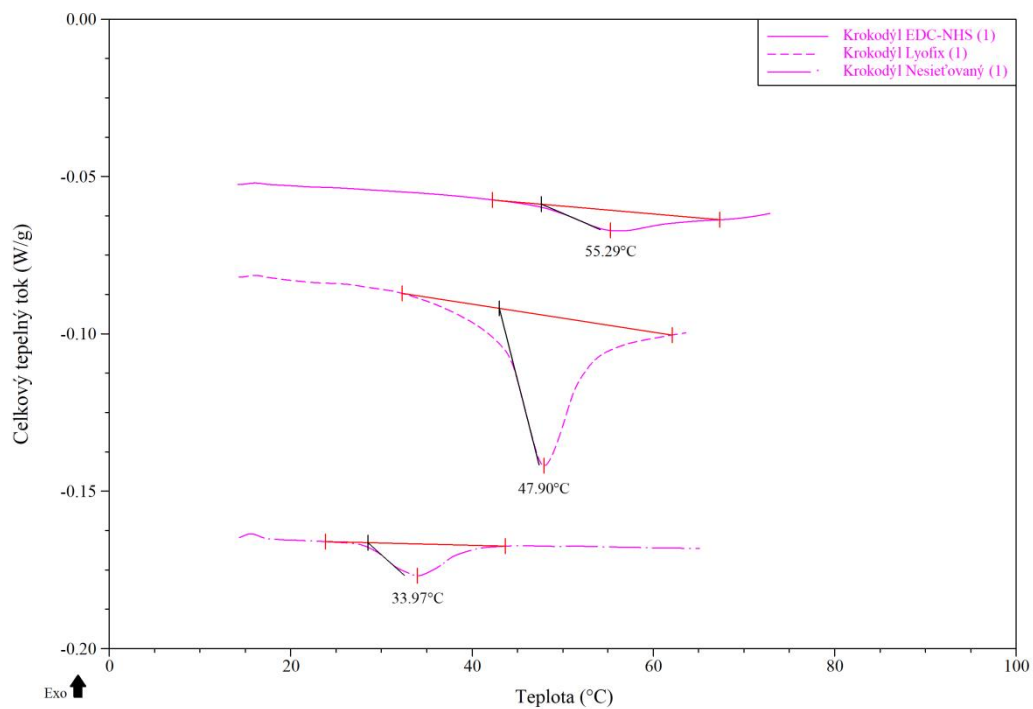


D)





E)



Príloha 5: Porovnanie teplôt denaturácie sieťovaných a nesieťovaných kolagenových filmov: prasa (A), tilapia (B), kôň (C), krava (D) a krokodýl (E)