VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE MATERIÁLŮ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE

REOLOGIE HYDROGELŮ KOLAGENU A JEHO NANOKOMPOZITŮ

RHEOLOGY OF COLLAGEN HYDROGELS AND ITS NANOCOMPOSITES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR´S THESIS

AUTOR PRÁCE MICHAELA VOLDÁNOVÁ
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE prof. RNDr. JOSEF JANČÁŘ, CSc.
SUPERVISOR

BRNO 2014

Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	**FCH-BAK0772/2013**	Akademický rok: **2013/2014**
Ústav:	Ústav chemie materiálů	
Student(ka):	**Michaela Voldánová**	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie, technologie a vlastnosti materiálů (2808R016)	
Vedoucí práce	**prof. RNDr. Josef Jančář, CSc.**	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Reologie hydrogelů kolagenu a jeho nanokompozitů

Zadání bakalářské práce:

Práce směřuje k fenomenologickému popisu reologického chování kolagenu I a jeho nanokompozitů s hydroxyapatitem za podmínek, kdy je kolagen rozpustný ve vodě (4oC) a za podmínek simulujících lidské tělo (37oC).

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

- -	- -	- -
Michaela Voldánová	prof. RNDr. Josef Jančář, CSc.	prof. RNDr. Josef Jančář, CSc.
Student(ka)	Vedoucí práce	Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

- -
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce směřuje k fenomenologickému popisu reologického chování čistého kolagenu I i jeho nanokompozitů s příměsí hydroxyapatitu ve čtyřech koncentracích. Měření bylo prováděno na reometru v konfiguraci kužel – deska pro rozsah smykových rychlostí od 0 s^{-1} do 100 s^{-1} za definovaných podmínek. Při teplotě 4 °C je kolagen ve vzorcích o daném složení rozpuštěn, zachovává si zde svůj nativní charakter a prekurzory hydrogelů setrvávají v kapalném stavu. Zahříváním vodného roztoku kolagenu o neutrálním pH dochází k spontánnímu procesu zesítění do fibrilárních struktur. Při 37 °C fibrily dorůstají do struktury gelu, ovšem rychlost jeho vzniku je závislá na obsahu kolagenových vláken. Naměřená data jsou zpracována ve formě tokových a viskozitních křivek, z nichž je vyhodnoceno a porovnáno reologické chování vzorků či strukturální a transformační změny jako odezva na mechanické zatížení a změnu teploty. Tyto poznatky mohou být využity při manipulaci s hydrogely. Obecně mohou posloužit jako základ pro další výzkum kolagenu, jeho interakcí s HAP a faktorů ovlivňujících jejich stabilitu či účinnost.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the phenomenological description of the rheological behavior of pure collagen I and its nanocomposites with addition of hydroxyapatite in four concentrations. Measurements were performed on a rheometer in the configuration cone – plate for a range of shear rates from 0 s^{-1} to 100 s^{-1} under defined conditions. At 4 °C, the collagen in samples of a specific composition remains dissolved; collagen retains his native character and the precursors of hydrogel are in the liquid state. By heating the aqueous solution of collagen with neutral pH leeds to spontaneous crosslinking process into fibrillar structure. At 37 °C, fibrils grow into the gel structure, however, the rate of its formation is dependent on the amount of collagen fibers. The measured data are processed in the form of flow and viscosity curves, from which the rheological behavior of the sample or structural and transformational changes in response to mechanical stress and temperature changes are evaluated and compared. This knowledge can be used to manipulate with hydrogels. Generally, it can help as a basis for further development of collagen, its interaction with HAP and factors influencing their stability or effectiveness.

KLÍČOVÁ SLOVA

biomateriál, hydrogel, hydroxyapatit, kolagen, reologie

KEY WORDS

biomaterial, hydrogel, hydroxyapatite, collagen, rheology

VOLDÁNOVÁ, M. *Reologie hydrogelů kolagenu a jeho nanokompozitů.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 54 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Josef Jančář, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem citovala správně a úplně. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

……
podpis studenta

Poděkování

Mé poděkování patří zejména vedoucímu bakalářské práce prof. RNDr. J. Jančářovi, CSc. za odborné vedení a cenné rady.

OSNOVA

1 ÚVOD 7

2 TEORETICKÁ ČÁST 8

2.1 Obecná charakteristika kolagenu 8

2.2 Struktura kolagenu 9

2.2.1 Molekulární struktura 9

2.2.2 Fibrilární struktura 10

2.3 Syntéza a rozklad kolagenu 11

2.3.1 Syntéza 11

2.3.2 Degradace 13

2.4 Vlastnosti kolagenu 14

2.4.1 Polyelektrolytický charakter 14

2.4.2 Botnání 14

2.4.3 Denaturace a renaturace 15

2.4.4 Hydrotermální stabilita 15

2.4.5 Hydratace kolagenu 15

2.4.6 Přeměna na želatinu 15

2.4.7 Fibrilogeneze 16

2.5 Hydroxyapatit 17

2.6 Biomedicínské aplikace 18

2.6.1 Kompozit na bázi kolagen/HAP 18

2.6.2 Hydrogely 19

2.7 Reologie 19

2.7.1 Newtonské kapaliny 20

2.7.2 Nenewtonské kapaliny 21

2.7.3 Metody měření viskozity 23

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 25

3.1 Chemikálie, přístroje a programy 25

3.2 Příprava vzorků 25

3.3 Reologické měření 27

3.4 Vyhodnocení dat 27

4 VÝSLEDKY A DISKUZE 28

4.1 Vodné roztoky čistého kolagenu i jeho nanokompozitů při 4 °C 28

4.2 Hydrogely čistého kolagenu a jeho nanokompozitů při 37 °C 35

4.3 Konformační přechod helix – globule 41

5 ZÁVĚR 42

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ 44

6.1 Seznam zkratek 44

6.2 Seznam symbolů 44

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ 45

8 SEZNAM PŘÍLOH 48

9 PŘÍLOHY 49

1 ÚVOD

V současné době se neustále rozšiřuje výzkum materiálů pro tkáňové inženýrství na bázi hydrogelů, především v regenerativní medicíně. Biopolymerní hydrogely jsou velmi vhodné pro tuto aplikaci vzhledem k jejich dobré biokompatibilitě, biodegradabilitě, hydrofilitě a absenci toxicity. Jedinečnými biologickými a chemickými vlastnostmi disponuje právě kolagen, jež je nejdůležitější bílkovinou pojivových tkání. Kolagenové hydrogely mohou být provedeny při fyziologickém pH a teplotě, přičemž začleněním jiných komponent v našem případě nanočástic hydroxyapatitu, je snaha napodobit klíčové aspekty fyziologického prostředí.

Kolagen je unikátní zejména svou schopností tvořit pevná, stabilní a nerozpustná vlákna se strukturou pravotočivé šroubovice složené ze tří polypeptidických řetězců. Zvýšením teploty se tyto zpočátku nezesítěné monomery dokážou shlukovat do různě distribuovaných struktur, které jsou v pozdější fázi fibrilogeneze předpokladem pro vytvoření opěrné trojrozměrné sítě, jež je základním stavebním prvkem gelu.

Hydroxyapatit je hlavní anorganickou složkou mnoha tvrdých tkání, a z tohoto důvodu jsou jeho mechanické i biochemické vlastnosti značně podobné těm, které mají kosti či zuby. HAP je tvrdý a křehký, tudíž jej nemůžeme aplikovat samostatně. Pro jeho využití jako biomateriálu se vytváří spojení s jinými materiály, zejména kolagenovou matricí.

Pro výzkum v této oblasti je velmi využívaná metoda reologie, která studuje deformaci a tokové vlastnosti látek coby odezvu na mechanické namáhání. Tokové chování různých látek lze roztřídit na základě existujících reologických modelů lišících se závislostí smykového napětí na smykové rychlosti. Mírou úměrnosti mezi těmito dvěma veličinami je dynamická viskozita. Vyjádřením tokových a viskozitních křivek lze posoudit, jakým modelem se látka řídí, jak se bude deformovat s časem nebo zda-li se bude měnit viskozita s rostoucím gradientem rychlosti a podobně.

Obecně přínosem tohoto měření je schopnost předvídat odezvu na mechanické zatížení a změnu teploty. Výsledky mohou být poté využity pro zlepšení vlastností materiálu nebo při manipulaci s ním. Konkrétním cílem předložené bakalářské práce je popsat chování vodných roztoků i hydrogelů a jejich nanokompozitů různých koncentrací při dvou teplotách ve stejném rozsahu smykového namáhání a posoudit, jaké strukturální a transformační změny se v nich odehrávají.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Obecná charakteristika kolagenu

Buňky v tkáních jsou obklopeny mikroprostředím známým jako extracelulární matrix, který obsahuje biomakromolekuly zahrnující kolagen, glykosaminoglykany, proteoglykany, glykoproteiny. [1]

Kolagen, nejhojnější vláknitý protein ECM, je základní komponentou pojivových tkání savců. Ze všech proteinů nacházejících se v těle má právě kolagen zastoupení 25 – 35 %. V současnosti se rozlišuje přibližně 29 geneticky odlišných typů kolagenu, jež se liší výskytem v těle a s tím spojenou biologickou funkcí, kterou zde zastávají (*tabulka 1*). [2, 3]

Biomakromolekuly ECM včetně kolagenu jsou odpovědné za integritu a mechanické vlastnosti měkkých i tvrdých tkání. Téměř všechny tkáně obsahující kolagenové fibrily mají z hlediska struktury velmi podobnou chemii na úrovni makromolekulární a fibrilární. Nicméně k určité diferenciaci zde dochází, neboť fibrily jsou uspořádány na základě toho, jaké vlastnosti má daná tkáň mít, což je však obecně považováno za funkci ne-kolagenových molekul. [4]

Tabulka 1: *Distribuce různých typů kolagenu v těle.* [5, 6]

Typ	Distribuce v lidském těle
I	arachnoidea (pavučnice), bubínek, děloha, dentin, kosti, kůra vaječníků, kůže, pleura (blána vystýlající dutinu hrudní a pokrývající plíce), rohovka, střeva, šlachy, tuková tkáň, vazivová chrupavka, závěsný aparát zubu
II	hyalinní chrupavky, sklivec, vaziva, stroma jater, kostní dřeně, lymfatických uzlin, nadledvin, sleziny, štítné žlázy
III	koexistence s kolagenem I (s výjimkou kostí, šlach, rohovky), kolagen embryonálního vývoje, cévy, srdeční chlopně
IV	bazální membrány
V	dáseň, intersticiální tkáně, hyalinní chrupavka, kosti, rohovka, šlachy, zevní laminy svalových elementů, glií
VI	intersticiální tkáň, játra, kůže, ledviny, srdeční sval
VII	kůže, placenta, plíce, rohovka, tkáně epitelu
VIII	endotelové buňky
IX	v chrupavkách společně s kolagenem II

Kolagen typu I je v lidských tkáních nejhojnější, představuje přibližně 90 % všech kolagenů v těle. Strukturní stabilita a mechanické vlastnosti kolagenních vláken v živém organismu jsou do značné míry funkcí jejich hierarchické struktury. [7, 8]

Díky jeho biologickým vlastnostem má tento typ kolagenu rozsáhlé využití, a to nejen při výrobě potravinových doplňků vyživujících kostní tkáň, klouby, kůži a podobně, ale také při výrobě kosmetických přípravků proti stárnutí pokožky. V bioinženýrství se využívá jako biologicky rozložitelný materiál pro tmely, implantáty, injekční aplikace, jako nosiče léčiv

pro léčbu nádorových onemocnění nebo regeneraci tkání. V těchto aplikacích hraje důležitou roli schopnost jednotlivých molekul kolagenu se shlukovat do agregátů. Bylo zjištěno, že počáteční fáze růstu těchto agregátů je doprovázena obvykle zvýšením viskozity. Z tohoto důvodu hraje podstatnou roli výzkum jeho reologických vlastností se zaměřením na oscilační reometrii [9].

Kolagen typu II je ze všech typů kolagenu nejhojněji zastoupen v chrupavčitých tkáních, kde přispívá k podpůrné funkci. Fibrily poskytují pevnost v tahu a udržují integritu chrupavky prostřednictvím sítě, která je odolná vůči narůstajícímu tlaku z hydratace polyaniontových proteoglykanů v ECM. Na rozdíl od kolagenu typu I se skládá ze tří identických polypeptidických *α*1 řetězců, které obsahují více hydroxylysinu a více postranních řetězců cukrů. Často je využíván ve tkáňovém inženýrství jako „pletivo“, na kterém se uchycují a rozmisťují chondrocyty. [10, 11]

Kolagen typu III obsahuje fibrily, jež jsou spojeny do vláken tvořící retikulární sítě, ve kterých jsou více či méně pravidelně uspořádány. Retikulární sítě jsou oporou měkkých tkání, proto tento typ kolagenu nalezneme právě v nich. Příkladem mohou být hladké svalové buňky či nervová vlákna, obsažen je také ve stěnách cév. Svou stavbou je značně podobný kolagenu I, obsahuje ale více proteoglykanů a glykoproteinů. Především jej však odlišuje přítomnost disulfidických můstků na –C konci a vysoký obsah hydroxyprolinu.

Kolagen typu IV je součástí bazálních membrán, kde netvoří ani fibrily, ani vlákna, je zde jako amorfní. Stejně jako předchozí typy je tvořen helikálními strukturami, k nimž jsou však připojeny také oblasti nehelikální, které jeho strukturu narušují. [11]

2.2 Struktura kolagenu

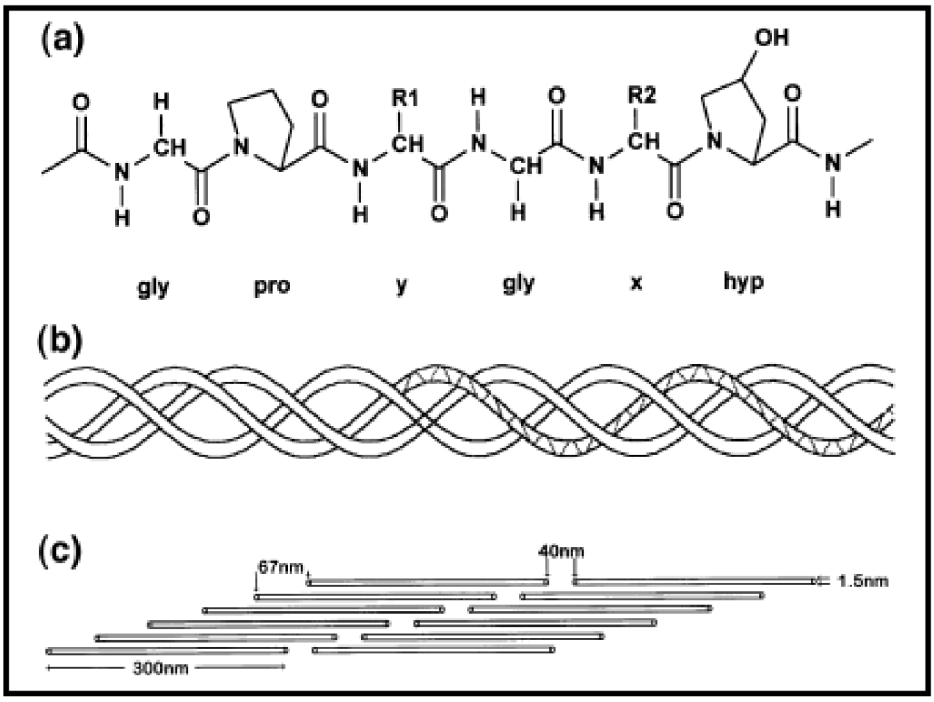
2.2.1 Molekulární struktura

Podobnosti ve struktuře kolagenních fibril začínají již na molekulární úrovni v uspořádání aminokyselin v peptidovém řetězci. Spojením dvou naprosto identických řetězců označovaných *α*1 a třetího (*α*2), který se od nich liší jen málo pořadím aminokyselin resp. jejich obsahem, vzniká trojitá spirála označována jako tropokolagen. Zřídka se však vyskytuje i trimer ze tří identických řetězců. Každý z řetězců obsahuje více než 1 000 aminokyselin. [4, 5, 12]

Kolagen obsahuje zejména aminokyseliny jako je glycin, prolin, hydroxyprolin, které tvoří více než 50 % z celkového obsahu aminokyselin. Všechny tyto tři aminokyseliny mají své klíčové role. Konformace obsahující prolin a hydroxyprolin podmiňují stérickou rigiditu, která se projevuje jako nemožnost volného otáčení okolo vazby Cα–N a zatížením okolo vazby C*α*–CO. Diferenciace různých typů kolagenu je na základě přítomnosti jiných aminokyselinových skupin. [4, 11]

Studiem primární struktury polypeptidických řetězců kolagenu bylo zjištěno, že v této bílkovině dochází k pravidelnému střídání dvou oblastí, nepolárních a polárních. Nepolární oblasti jsou relativně uniformí, pravidelně se v nich střídají sekvence Gly–Pro–X nebo Gly–X–Hyp, kde X může být jakýkoliv z různých dalších aminokyselinových zbytků např. hydroxylysin, arginin, kyselina asparagová, fenylalanin apod. Tento druh pravidelného

opakování a vysoký obsah glycinu můžeme pozorovat u několika dalších fibrilárních proteinů jako je hedvábí, ve kterém se objevuje sekvence (Glycine – Alanine)$_n$. V případě globulárních proteinů se s tímto nesetkáme s výjimkou velmi krátkých úseků. Pro polární oblasti je typické, že postrádají pravidelnost opakování Gly–X–Y, kde X a Y jsou často iminokyseliny (prolin, hydroxyprolin). [13,14]



***Obrázek 1**: Struktura kolagenu typu I. (a) primární sekvence aminokyselin, (b) sekundární levotočivý helix a terciární pravotočivý superhelix, (c) kvartérní struktura.* [5]

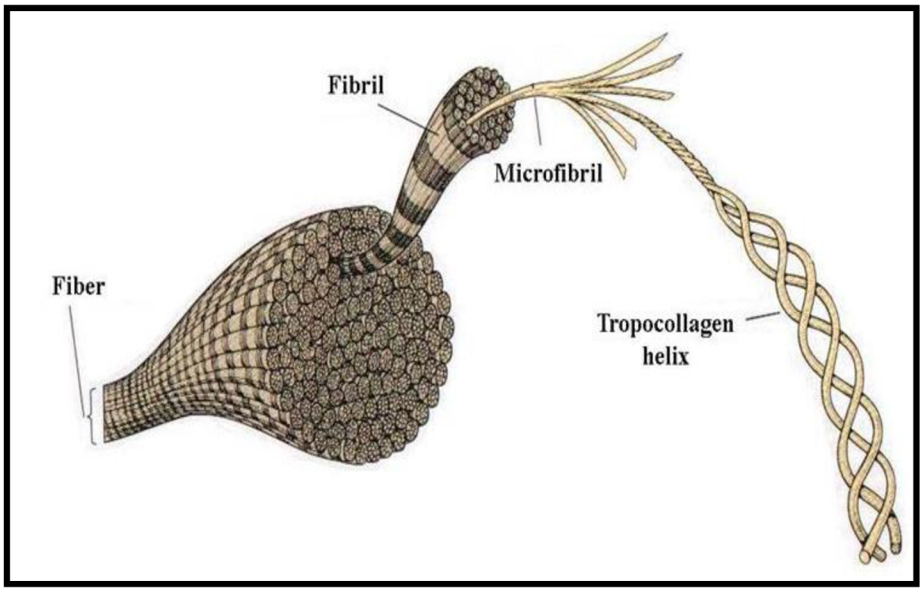
2.2.2 Fibrilární struktura

Základem molekuly kolagenu jsou tři navzájem ovinuté levotočivé polypeptidové řetězce se společnou osou, které jsou stočeny ve směru od N-koncové skupiny k C-koncové skupině. Tyto terminální konce molekuly nejsou zahrnuty do spirálové oblasti a jsou označovány jako telopeptidy. Společně vytvářejí pravotočivou strukturu superhelixu (tropokolagenu) s délkou přibližně 300 nm a 1,5 nm v průměru. Tento poměr rozměrů řetězce vede k vyšší viskozitě v roztoku a vyšší mobilitě v elektrickém poli. [15]

Soudržnost vzniklého provazcovitého útvaru tropokolagenu je dána vodíkovými můstky, které vznikají pouze tehdy, jsou-li všechny tři řetězce v těsné blízkosti. U kolagenu je to umožněno právě přítomností glycinu, který se nachází na každé třetí pozici v řetězci. Při vzniku trojité šroubovice není na vnitřní straně spirály dostatečný prostor pro dlouhé boční řetězce, s výjimkou atomu vodíku pocházejícímu právě z glycinu. Vodíkové můstky spojují NH– skupinu glycinu s karbonylovou skupinou nacházející se na sousedním řetězci. [16]

Spojením čtyř až osmi molekul tropokolagenu, obvykle však pěti, vzniká útvar zvaný mikrofibrila, jež je základním stavebním kamenem větších útvarů fibril. Finální fibrilu tvoří

soustředné uspořádání mikrofibrilárních vrstev. Průměry fibril závisí jak na typu tkáně, tak na stádiu vývoje v rozsahu od 10 do 500 nm. [5, 15]



***Obrázek 2**: Fibrilární struktura kolagenu.* [17]

Orientace a osové uspořádání tropokolagenových molekul ve fibrilách ukazuje příčné pásování s periodou 67 nm (označováno jako D-perioda). Původ tohoto pásování vychází z předpokladu, že kolagenové molekuly jsou ve fibrile uspořádány paralelně a jsou vůči sobě posunuty o vzdálenost 67 nm. Z toho následně vychází, že hodnota délky tropokolagenu odpovídá 4,46D a hodnota pro vzdálenost mezi sousedními konci molekul kolagenu ve fibrile 0,54D. [15]

Vzniklé fibrily se dále mohou spolu spojovat do větších a delších svazků, které jsou hlavní komponentou všech pojivových tkání. Kolagenové agregáty v různých strukturních kombinacích a koncentracích poskytují tkáním odlišné vlastnosti. Vysoce organizovaná struktura kolagenového materiálu má za následek velmi stálý protein ECM s vysokou mechanickou pevností a na druhou stranou dobré elastické vlastnosti. [15]

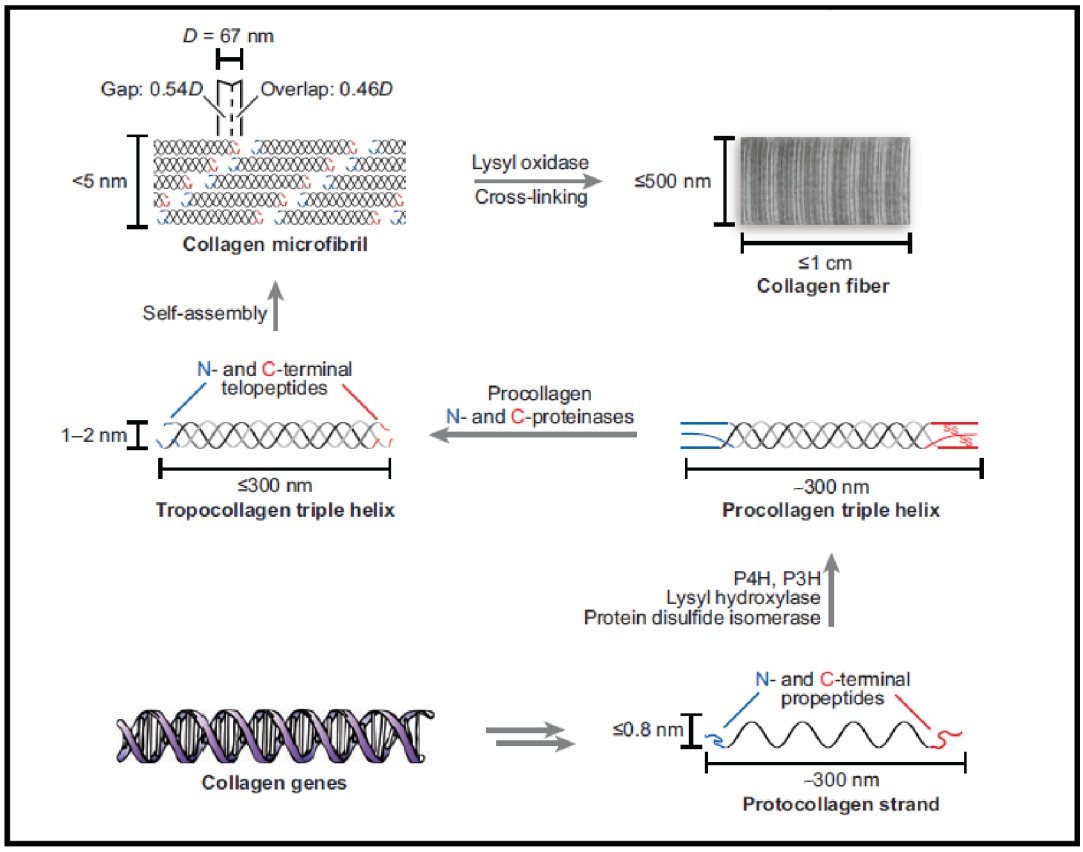
2.3 Syntéza a rozklad kolagenu

2.3.1 Syntéza

Kolagen je produkován především buňkami vazivovými (fibroblasty), buňkami chrupavky (chondroblasty), kostí (osteoblasty) nebo také buňkami epitelovými. Do tvorby molekuly kolagenu je zahrnuto okolo 34 genů, přičemž každý z nich kóduje určitou sekvenci mRNA, do které jsou přepisovány v procesu transkripce. Konečná mRNA vystupuje z buněčného jádra a vstupuje do cytoplazmy, kde se napojuje na ribozomy, v nichž probíhá proces translace. Při této fázi jsou k hrubému endoplazmatickému retikulu přiváděny pomocí tRNA aminokyseliny, které jsou následně sestavovány do primární struktury bílkovin podle informace, jejíž nositelkou je mRNA. [18]

Po sestavení aminokyselin do polypeptidového řetězce vzniká pre-prokolagen, který obsahuje N-konec a C-konec představující tzv. signální části. Signální peptidy jsou štěpeny a díky tomu je vytvářena molekula propeptid. Následně na propeptidu dochází k hydroxylaci lysinu a prolinu pomocí enzymů prolylhydroxylázy a lysylhydroxylázy (intracelulární enzymy), při které se vytváří hydroxyprolin a hydroxylysin, čímž se tedy napomáhá k zesítění řetězců. Tento enzymatický děj vyžaduje vitamin C jako kofaktor. [18]

Přidáním glukózy nebo galaktózy na monomery obsahující hydroxylové skupiny dochází ke glykosylaci skupin, jež jsou umístěny na lysinu. Po tomto kroku dochází ke stáčení tří polypeptidových řetězců za tvorby pravotočivé šroubovice známé jako prokolagen. Prokolagen je rozpustná trimerní molekula, která obsahuje tři odlišné domény: N-terminální propeptid, centrální triple-helikální kolagenovou doménu a C-terminální propeptid. [19]



***Obrázek 3**: Biosyntéza kolagenových vláken.* [20]

Než nastává vylučování prokolagenu z buňky exocytózou, uskutečňuje se jeho poslední post-translační modifikace v Golgiho aparátu. V této fázi syntézy dochází k přidání oligosacharidů a poté je prokolagen balen do sekrečních váčků. Jakmile je prokolagen vně buňky, membránové enzymy tzv. kolagenové peptidázy odstraňují volné konce na prokolagenu za vzniku útvaru tropokolagenu. [18]

Po sestavení fibril do vláken dochází k jejich stabilizaci pomocí kovalentního zesítění, které může mít jak enzymatický, tak neenzymatický charakter. Enzymatická tvorba

vazeb je řízena lysylhydroxylázou (viz. výše) a lysyloxidázou (extracelulární enzym), který iniciuje oxidační deaminaci, přičemž dochází k vytvoření aldehydových skupin. Tyto aldehydové skupiny mohou reagovat s ostatními aminoskupinami za vzniku zesítění. Naopak neenzymové můstky mají tendenci se tvořit ve stáří nebo při určitých patologických stavech jako je např. diabetes mimo regulaci enzymů. [12, 13]

2.3.2 Degradace [21]

Při degradaci neboli proteolýze se jedná o částečný nebo úplný rozklad kolagenu na menší části (peptidy) a na aminokyseliny, jež mohou být opět využity při jeho syntéze. K samotnému rozkladu může dojít několikero způsoby:

- *HYDROLYTICKÁ DEGRADACE*

Kolagen v roztoku podléhá tomuto typu degradace doprovázené ztrátou mnoha fyzikálních vlastností. Hlavními faktory ovlivňujícími rychlost tohoto rozkladného procesu jsou teplota, pH systému a částečně vnitřní tlak v roztoku a povaha rozpouštědel, které mohou být přítomny. Závislost hydrolýzy na teplotě je taková, že s rostoucí teplotou rychlost hydrolýzy roste. Pokud pH systému je neutrální, postupuje degradace pomaleji než v případě pH kyselého či zásaditého, kdy probíhá rychleji. Při hydrolýze dochází jak ke štěpení kovalentních vazeb, zejména esterových, tak se současně štěpí i vazby peptidické. Při kyselé hydrolýze je štěpení obou těchto typů vazeb téměř stejné, naopak u alkalické hydrolýzy je počet rozštěpených peptidových vazeb mnohem menší.

- *ENZYMATICKÁ DEGRADACE*

Nativní kolagen je odolný vůči působení běžných proteolytických enzymů s výjimkou tzv. kolagenáz, které štěpí peptidové řetězce kolagenu. Mezi kolagenázy řadíme metaloproteinázy obsahující zinek a zpravidla vyžadující vápník jako kofaktor nebo enzymy, jež byly izolovány ze specifických bakterií. Dále například želatinázy, které štěpí primární fragmenty na malé peptidy a aminokyseliny či elastázy a katepsiny. [5]

Fibrily jako agregáty kolagenových molekul jsou na počátku degradovány z vnějšku. Kolagenáza se pevně váže na triple-helix a narušuje jeho sekundární strukturu. Každý peptidový řetězec je pak schopen zaujmout větší počet konformací, a tím se svou orientací přizpůsobit aktivnímu centru enzymu, tudíž se zpřístupní téměř všem proteolytickým enzymům. Ty přednostně hydrolyzují vazby obsahující aromatické zbytky, jiné zase štěpí vazby peptidové, estery nebo amidy.

- *OXIDAČNÍ ŠTĚPENÍ*

Oxidační štěpení je založeno na reakci činidla s kolagenem, kde se pro různé oxidační stavy značně liší. Příslušné činidlo např. peroxid vodíku, jodistan sodný a podobně atakuje sacharidy, jež jsou obsaženy v molekule.

2.4 Vlastnosti kolagenu

Fyzikální vlastnosti kolagenu jsou určeny uspořádáním ve vyšších strukturních celcích, naopak vlastnosti chemické jsou dány jeho primární strukturou, tzn. aminokyselinami, jež tvoří polypeptidické řetězce.

2.4.1 Polyelektrolytický charakter [11, 21]

Kolagen podobně jako i jiné bílkoviny se řadí mezi polyamfolyty, což jsou látky, které ve své molekule obsahují zároveň kyselé i bazické funkční skupiny schopné disociace. Jeho iontové reakce probíhají v závislosti na pH prostředí. V kyselém prostředí získává kolagen kladný náboj a v prostředí alkalickém náboj záporný.

Charakteristickou konstantou, na níž je silně závislá reaktivita kolagenu, se nazývá izoelektrický bod. Izoelektrický bod je taková hodnota pH v roztoku, při němž má kolagen nulový náboj. U nativního kolagenu se vyskytuje při pH = 7. Při tomto pH nesou polypeptidické řetězce minimální množství nábojů, přičemž kladné i záporné náboje jsou v rovnováze, jinými slovy počet protonů připojených ke skupině $–NH_2$ je roven množství protonů odtržených od skupiny –COOH.

V oblasti izoelektrického bodu vykazuje kolagen i odlišné vlastnosti např. dochází ke snížení hydrofilnosti, tzn. v oblasti toho pH je kolagen nejméně rozpustný. Snížení hydrofilnosti je způsobeno poklesem počtu volných nábojů v polypeptidických řetězcích. Kolagen zde vykazuje i minimální botnání. Stupeň botnání jde ovlivnit přídavkem kyseliny nebo přídavkem elektrolytu, zásada však na něj nemá vliv, jelikož molekula kolagenu obsahuje větší množství bazických skupin.

2.4.2 Botnání [11, 21]

Z fyzikálně chemického hlediska je kolagen gel, který se řadí ke koloidním systémům. Hlavní vlastností gelů je jejich schopnost botnat. Po ponoření do vody vlákno kolagenu omezeně botná (exotermní proces), čímž dochází ke změně jeho objemu, délky a pružnosti. V nabotnalém kolagenu se vyskytuje tzv. voda botnací, kterou lze odstranit mechanickým účinkem a voda hydratační, odstranitelná pouze sušením.

Z hlediska mechanismu lze rozlišit botnání osmotické a lyotropní. Při osmotickém botnání proniká voda styčnou plochou mezi pevnou látkou a rozpouštědlem v důsledku gradientu osmotického tlaku. Gradient je dán rozdílem koncentrací všech pohyblivých iontů ve vnitřní fázi (gelu) a ve vnější fázi (roztoku). Po určité době se ustanoví rovnováha, při níž je botnací tlak vykompenzován pevností makromolekulární sítě. Lyotropní botnání nastává působením extrémní hodnoty pH nebo lyotropních činidel, kde dochází k rozrušení stabilizujících vazeb, což způsobí snížení protitlaku pevné fáze proti průniku vody. Rovnováhy se dosáhne při vyšším stupni nabotnání. Vlivem podmínek vyvolávajících botnání, dojde k rozrušení vodíkových vazeb stabilizujících molekulu, což vyvolá další zbotnání a následné zhroucení šroubovicové konformace (denaturace).

2.4.3 Denaturace a renaturace [11, 21]

Při denaturaci ztrácí kolagen vlivem některých chemikálií nebo tepelným účinkem své původní nativní vlastnosti a mění se na želatinu. Mechanismus denaturace vodného roztoku tropokolagenu je dvoustupňový proces. Nejdříve dochází ke zborcení spirály a makromolekula tropokolagenu se stáhne do statistického klubka, v němž jsou řetězce navzájem stále spojeny. V druhém stupni se klubko rozpadává na tři frakce: frakci *α* tvoří jeden polypeptidický řetězec původní spirály, frakci *β* tvoří dva dosud spojené řetězce a frakci *γ*, kterou tvoří tři řetězce v nezměněné formě statistického klubka. Zůstane-li denaturovaný roztok delší dobu stát při nízké teplotě, probíhá z části renaturace, což je zpětná obnova spirálové struktury.

2.4.4 Hydrotermální stabilita [11, 21]

Zahříváním roztoku, ve kterém se vyskytují kolagenová vlákna, dochází k jejich termické kontrakci přibližně o třetinu vlákna ve směru osy. Smrštění nastává v důsledku štěpení intermolekulárních vazeb (příčných) a intramolekulárních vazeb, které udržují triple-helix natažený v nativním kolagenovém vláknu.

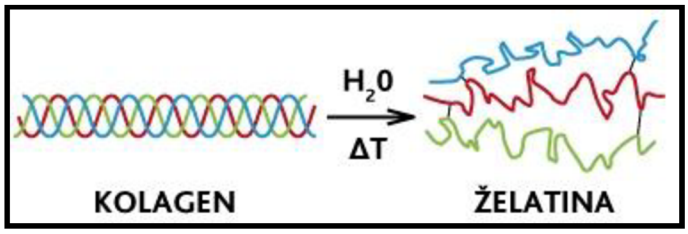
Pro popis se využívá teplota smrštění T_g, což představuje teplotu tání kolagenu v krystalických oblastech. Tato teplota může být ovlivňována přítomností lyotropních činidel způsobujících kontrakci spojenou s poklesem T_g. Dalším kritériem vyjadřujícím stabilitu struktury je tzv. denaturační teplota přechodu kolagen-želatina T_d. Hodnoty obou teplot lze částečně zvýšit zesíťováním kolagenu.

2.4.5 Hydratace kolagenu [11, 21]

Obecně proteiny obsahují dva typy hydrofilních center, jež jsou schopny elektrostatickými silami a vodíkovými vazbami vázat vodu. První z nich jsou polární skupiny přítomné v bočních řetězcích některých aminokyselinových zbytků a druhým centrem dusík a kyslík obsaženy v peptidické vazbě. Pro udržení fyzikálních vlastností kolagenu je potřeba určité minimální množství vody, tvořící přibližně 20 % hmotnosti. Nachází-li se kolagen v suchém stavu, tak vykazuje pohybové omezení peptidových řetězců, přičemž přidáním vody se toto omezení odstraňuje. Navíc dochází k prodloužení vzdálenosti mezi polypeptidickými řetězci v hydratovaném stavu na 1,5 až 1,6 nm z původního 1 nm v suchém stavu.

2.4.6 Přeměna na želatinu [11, 21]

Zahřívá-li se kolagen ve vodném prostředí, dochází k jeho přeměně na želatinu. Želatinu lze považovat za velmi čistou formu kolagenu, jelikož se v ní nevyskytují nevláknité bílkoviny, tuky a mukopolysacharidy. Lze připravit způsobem alkalickým i kyselým. U alkalického způsobu je v konečné želatině menší koncentrace argininu, tyrosinu a amidicky vázaného dusíku, naopak želatina připravená kysele se vyznačuje takovým složením aminokyselin, jež se nejvíce blíží kolagenu.



***Obrázek 4**: Přeměna kolagenu na želatinu zahříváním ve vodném prostředí.* [11]

Mechanismus je tvořen třemi kroky. Nejprve z hlediska struktury kvartérní dochází ke štěpení příčných kovalentních vazeb a následně probíhá denaturace na úrovni terciární. Závěrečná fáze probíhá již na úrovni molekulární, kde se hydrolyticky štěpí peptidické vazby v řetězcích. Tento krok má degradační charakter, jež je zcela nežádoucí, protože čím méně vazeb se rozštěpí, tím lepší vlastnosti si želatina zachová.

Charakteristickou vlastností želatiny je přechod sol-gel. Gel je tixotropní látkou, zahřátím na určitou teplotu „taje“ a přechází na sol. Tato přeměna je inverzní, nikoliv vratná: přeměna gel → sol (34°C) a sol → gel (28°C).

2.4.7 Fibrilogeneze

Fibrilární kolageny jsou ve vodě rozpustné pouze tehdy, je-li pH roztoku nízké, např. ve zředěné kyselině octové. Pokud je pH roztoku upraveno na neutrální hodnotu a teplota zvýšena na fyziologickou, dochází ke spontánnímu vytváření fibril. Struktura výsledných útvarů je ovlivňována několika parametry: složení pufru, neporušenost telopeptidů, přítomnost jiných typů kolagenu apod.

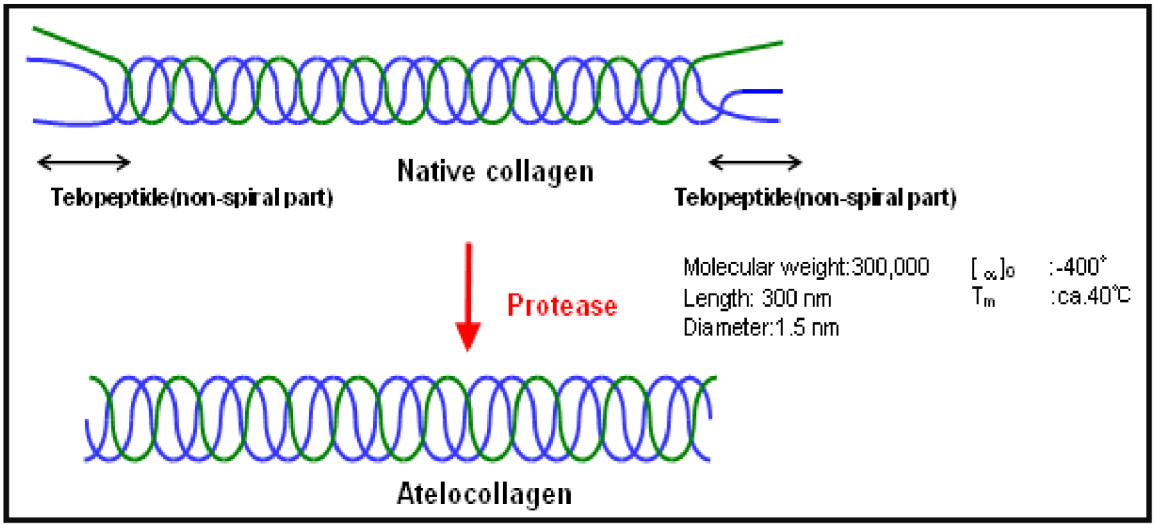
Komerčně dostupné fibrilární kolageny jsou dvojího typu. Kyselinou solubilizovaný kolagen má neporušené telopeptidy, díky jejichž pomoci se iniciuje fibrilogeneze za vzniku dlouhých cylindrických forem. Druhým typem je kolagen solubilizovaný pepsinem, což je proteolytický enzym, jež dokáže zpracovat většinu proteinů s výjimkou kolagenového triple-helixu, kde narušuje pouze nespirálové telopeptidy. V prvním případě hovoříme o tropokolagenu, v druhém o atelokolagenu. [22]

Právě přítomnost telopeptidů hraje důležitou roli nejen při tvorbě kovalentních příčných vazeb mezi monomerními molekulami kolagenu, ale vede i k rozdílným fyzikálním vlastnostem připravených gelů. Gel vzniklý z tropokolagenů je tvořen sítí rovných fibril, naopak u atelokolagenů jsou fibrily mírně zkroucené a síť je houbovitého charakteru. Kyselinou solubilizovaný kolagen vytváří silnější polymerní síť. [23]

Během procesu in vitro dochází za specifických podmínek k vlastní montáži molekul kolagenu, směřující až k tvorbě gelu. Velikost vláken, jejich chemické interakce, jakož i výsledná mikrostruktura jsou upravovány na základě tří parametrů: pH, iontová síla roztoku a teplota. U kolagenu savců jsou vybírány takové podmínky, které odpovídají normálním tělesným hodnotám, tzn. 37 °C, mírně zásadité pH a fyziologické koncentrace v PBS.

Mechanismus vlastní montáže vláken in vitro je zahájen nukleací, tj. agregací rozpustných kolagenních monomerů za vzniku dimerů, trimerů a jiných náhodně distribuovaných shluků. Kolagenové agregáty obsahující zejména mikrofibrily jsou tvořeny až poté, co koncentrace kolagenu dosáhne určité kritické hodnoty. Následující růstová fáze

je charakterizována sigmoidním zvýšením zákalu roztoku a vytvořením příčného pásování s periodou 67 nm. Fibrilární pásování je zapříčiněno kontaktem ne-spirálových telopeptidů se sousedními molekulami kolagenu. V případě atelokolagenu, jež postrádá tyto ne-spirálové konce, je proces vlastní montáže obtížnější.



***Obrázek 5**: Solubilizace tropokolagenu obsahujícího telopeptidové fragmenty proteolytickým enzymem pepsinem za vzniku atelokolagenu.* [24]

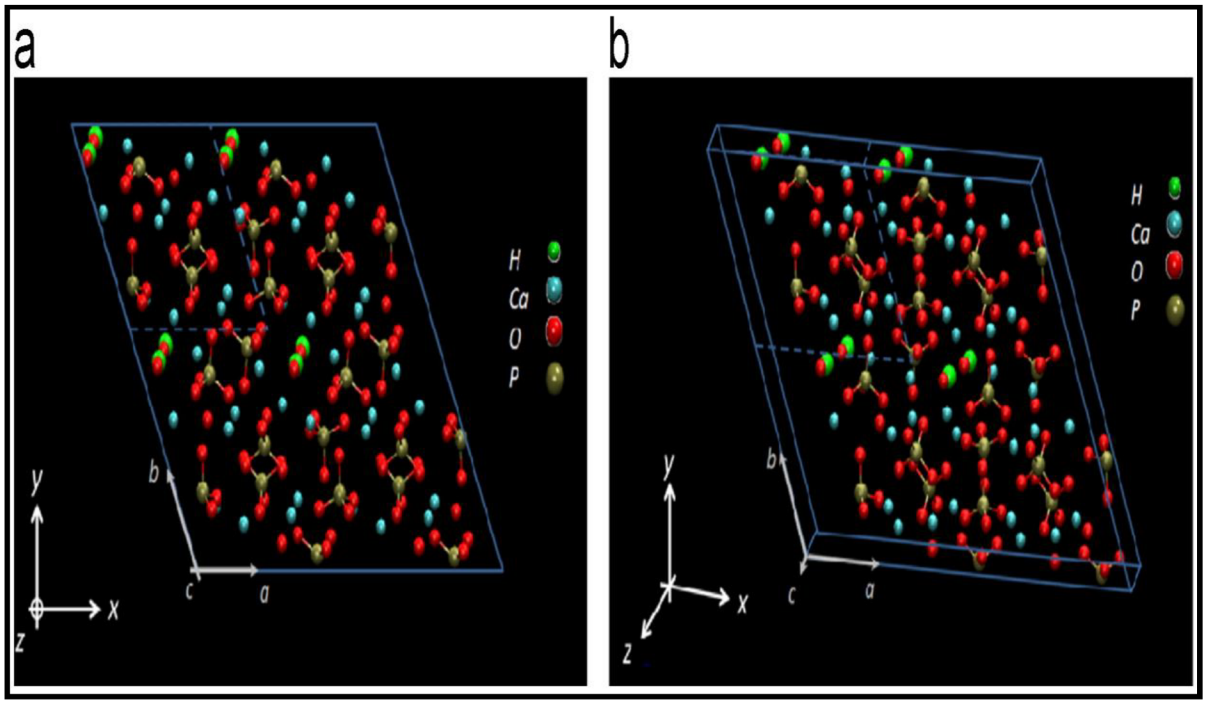
2.5 Hydroxyapatit

Apatity obecně jsou kalcium-fosfátové minerály s obecným vzorcem $Ca_5(PO_4)_3X$, jež se v přírodě mohou vyskytovat v různých formách v závislosti na příměsi. Nejčastějšími druhy jsou chlorapatity (X = Cl), florapatity (X = F) a hydroxyapatity (X = OH). [25]

Hydroxyapatit je hlavní anorganickou složkou mnoha tvrdých tkání jako jsou dentin, sklovina, kosti a je jedním z nejvýznamnějších biokeramických materiálů. Běžně se vyskytuje ve dvou strukturách: monoklinické a hexagonální, která je častější. Krystalová jednotka HAP obsahuje dvě molekuly, a z toho důvodu se obvykle zapisuje ve formě $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. [25, 26]

Hexagonální krystal obsahuje tři typy iontů vápníků, které se rozlišují podle toho, zda sousedí se třemi, čtyřmi nebo šesti atomy kyslíku. Jednotková buňka obsahuje také šest fosfátových skupin, které mají rovnocennou symetrii. Hydroxylové skupiny leží v rozích bazální struktury a podél jejich kolmých sloupců se v pravidelných intervalech opakují. Toto uspořádání má za následek, že paralelně s osou *c* se vytváří vnitřní kanály. Šest z deseti iontů vápníku jsou v těchto sloupcích spojeny s hydroxylovými ionty, což vede k jejich silné interakci. [25, 27]

Rovina (001) je nejstabilnější a má důležitou roli v kostech, protože HAP krystaly jsou v souladu s orientací kolagenových fibril. Rovina (010) je bohatá na vápník a nejvíce reaktivní s vodou, zároveň zde dochází k růstu účinku kolagenové matrice. Také má elektrostatické vlastnosti, negativní náboj je na povrchu, jež obsahuje značné množství hydroxylových skupin, naopak náboj kladný je na povrchu s ionty vápníku. V případě roviny (100) a (010) jsou geometrické a chemické vlastnosti podobné. [25]



***Obrázek 6**: Jednotková buňka HAP. (a) bazální rovina (001), (b) trojrozměrný model.* [25]

(Bio)chemické a mechanické vlastnosti HAP jsou podobné těm, které mají kosti a zuby. Obecně je HAP rozpustný v kyselých roztocích, nerozpustný v zásaditých a částečně rozpustný v destilované vodě, kde lze ovlivnit přídavkem elektrolytu. Rozpustnost se dále mění přítomností aminokyselin, proteinů, enzymů a dalších organických látek. [27]

HAP vykazuje vynikající biokompatibilitu a bioaktivitu, díky jeho schopnosti vytvářet silné chemické vazby s hostitelskou tkání, jako jsou kůže, svaly a dásně. Z tohoto důvodu se stal ideálním materiálem pro zubní a ortopedické implantáty. Nicméně jeho vlastnosti tvrdost, křehkost a nedostatek flexibility neumožňují využít HAP samostatně, tudíž se omezuje jeho využití jako nosný implantát. Aby se však dal využít v tkáňovém inženýrství, začal se kombinovat například s různými polymery, celulózou, chitosanem a v neposlední řadě i s kolagenem. [26, 28]

2.6 Biomedicínské aplikace

2.6.1 Kompozit na bázi kolagen/HAP

Kost je biologickým kompozitem, jenž se skládá ze 70 % minerální části tvořené hydroxyapatitem a 30 % organické části obsahující glykoproteiny, proteoglykany a zejména kolagen. Mechanické vlastnosti kostí vyplývají právě z této hierarchické struktury na molekulární úrovni. K opravě nebo obnovení kostní funkce jsou často používány tradiční syntetické materiály, jako jsou kovy, keramika a polymery. Nevýhodou těchto materiálů je jejich omezená biologická aktivita, tzn. menší schopnost vyvolat tvorbu kostní tkáně. Výsledkem je nižší fixace implantátu, což má za následek delší hojení. Z tohoto důvodu se do většiny biologicky odbouratelných materiálů pro tkáňové inženýrství kostí a chrupavek

zavádí kompozit z kolagenové matrice obsahující nanočástice HAP pro výztuž, což zlepšuje mechanické vlastnosti a biologickou aktivitu materiálu. Kombinací s hydrofilní povahou kolagenu se zlepšuje smáčivost a propustnost materiálů, což vede k lepšímu pronikání do kultivačního média, které je příznivé pro buněčnou adhezi. [29, 30, 31]

Klíčová role HAP ve spojení s kolagenem je při určování tuhosti a pevnosti, jelikož má větší pevnost nejen v tahu v důsledku vyššího modulu pružnosti vůči kolagenu. Obecně kosti vykazují velkou tvrdost, a to i přes křehkost minerálních složek, díky nanometrickým rozměrům HAP. Tento jev byl podpořen modelem napětí-smyk, který popisuje přenos zatížení mezi minerální a bílkovinou fází. Z toho následně pro kosti i biokompozity vyplynulo, že minerální destičky nesou většinu zatížení v tahu, zatímco kolagen přenáší zatížení mezi destičkami smykem. Tahové napětí může vést ke vzniku mikrotrhlin v blízkosti konce minerálních destiček. Nicméně, tyto trhliny většinou nehrají rozhodující roli při strukturální integritě biokompozitů, na rozdíl od tradičních materiálů, kde jsou trhliny spojené se ztrátou tuhosti a pevnosti. Bylo také prokázáno, že destičkový tvar HAP krystalů má vliv jak na vlastnosti, tak zajišťuje velkou interakci s kolagenem, a to z důvodu vysokého poměru povrchu k objemu. [25]

2.6.2 Hydrogely

Hydrogel je obecně definován jako dvoufázový materiál, jež je schopen absorbovat velké množství vody a přesto se stále chovat jako látka pevná. Pevná fáze materiálu tvořena trojrozměrnou sítí, je jakousi opěrnou strukturou, která představuje pouze malou část celkové hmotnosti a objemu. V případě, že k vytvoření sítě je použita látka hydrofilní povahy, pak taková struktura bude zadržovat právě vodu. Kolagenové hydrogely se sestávají z volně propojené rozvětvené sítě kolagenových fibril naplněné velkým přebytkem intersticiální tekutiny, jíž může být více než 99,5 %. [28, 32, 33]

Vzhledem k dobré biokompatibilitě a jedinečným biologickým vlastnostem jsou kolagenové hydrogely nejpoužívanějšími biomateriály v regenerativní medicíně. Pozornost je převážně věnována biologicky odbouratelným hydrogelům, které se v současné době používají jako „lešení“ v tkáňovém inženýrství pro opravu tkání. Dále je jejich využití v mnoha klinických aplikacích například pro nosiče léčiv s řízeným uvolňováním. [28, 32, 34]

Dnes je stále častěji s výzkumem biomateriálů spojován pojem reologie. Důvodem je hledání odpovědí na otázku deformace tkáňových a orgánových struktur a jejího průběhu v čase coby odezvy na vnější mechanické zatížení. Znalosti reologických vlastností umožňují předvídat odezvu na mechanické zatížení a aplikovat je na vývoj biomateriálů.

2.7 Reologie

Vědní obor reologie se zabývá deformovatelností a tokovými vlastnostmi látek (pevných i tekutých), jež jsou vyvolány působením vnějších sil. Každý materiál při působení síly podléhá deformaci. Pokud se deformace zvětšuje s dobou působení síly, materiál teče. Matematickým vyjádřením tokových vlastností jsou reologické stavové rovnice, které zpravidla vyjadřují vztah mezi deformačním smykovým (tečným) napětím τ a deformací látky

(smykovou rychlostí). Mírou úměrnosti mezi napětím a rychlostí deformace je materiálová vlastnost viskozita. [35]

K popisu tokového chování se využívá následujících reologických modelů.

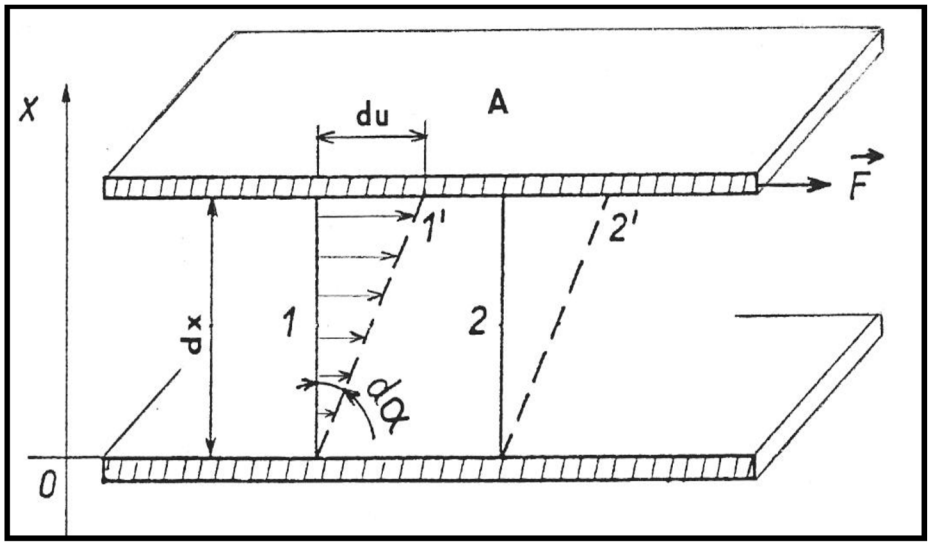
2.7.1 Newtonské kapaliny [35, 36]

Nejjednodušším modelem, který lze použít pro popis reologického chování během smykového namáhání, je Newtonův zákon:

$$\tau = \eta \cdot \frac{du}{dx} = \eta \cdot \dot{\gamma} \qquad (1)$$

kde součinitel η je dynamická viskozita, charakterizující vnitřní tření newtonské kapaliny, *du* je vzájemná rychlost pohybu smykových rovin vzdálených o *dx* a $\dot{\gamma}$ rychlost deformace (rychlost smyku, smykový spád), charakterizuje tvarové změny v proudící tekutině.

Při jeho definici vyjdeme z představy látky umístěné mezi dvěma deskami (*obrázek 7*). Dolní deska je stacionární, horní deska se pohybuje rychlostí u_0 vyvolanou smykovou sílou $\vec{F}$ působící v rovině desky s plochou *A*.



***Obrázek 7**: Model reologického chování během smykového namáhání.* [35]

Odpor materiálu vůči deformaci se vyjadřuje jako smykové napětí:

$$\tau = \frac{F}{A} \text{ [Pa]} \qquad (2)$$

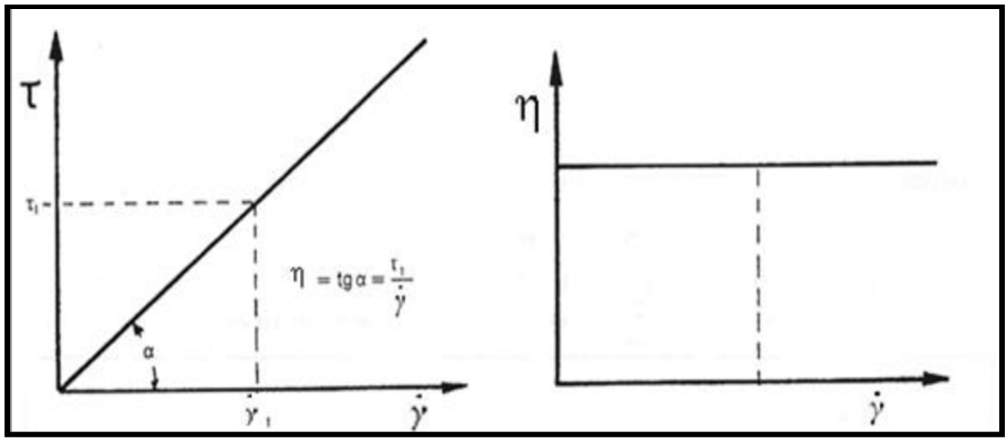
Relativní posunutí (mezi dvěma vrstvami) vyjadřuje smykovou deformaci:

$$\gamma = \frac{u}{x} \text{ [s}^{-1}\text{]} \qquad (3)$$

Látky řídící se Newtonovým zákonem jsou označovány jako newtonské, zpravidla sem patří látky nízkomolekulární. Dynamická viskozita η [Pa·s = kg·m^{-1}·s^{-1}] je látkovou

charakteristikou, jejíž hodnota s rostoucí teplotou klesá a s rostoucím tlakem roste. U newtonských látek je nezávislá na čase a rychlosti smykové deformace (*obrázek 8*). Podíl dynamické viskozity η a hustoty tekutiny ρ se nazývá viskozita kinematická, která se využívá při popisu dějů závisejících jak na viskozitě, tak na hustotě.

$$\upsilon = \frac{\eta}{\rho} \ [m^2 \cdot s^{-1}] \qquad (4)$$



***Obrázek 8**: Toková a viskozitní křivka newtonské látky.* [35]

2.7.2 Nenewtonské kapaliny [32, 33]

Vedle newtonských kapalin existují i kapaliny reologicky složitější, které se Newtonovým zákonem neřídí. Označují se proto jako nenewtonské kapaliny. Platí pro ně:

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \qquad (5)$$

kde η je tzv. zdánlivá viskozita, která není látkovou konstantou, ale závisí na rychlosti deformace nebo tečném napětí.

Pro charakterizaci toku nenewtonských kapalin je nutno znát průběh závislosti $\eta = f(\dot{\gamma})$ v širším intervalu $\dot{\gamma}$.

2.7.2.1 Základní typy nenewtonských kapalin [35, 37]

- *PSEUDOPLASTICKÉ LÁTKY*, jejich zdánlivá viskozita se s rostoucím gradientem rychlosti zmenšuje. Podle průběhu tokové křivky se někdy rozlišují dvě podskupiny: pravé pseudoplastické kapaliny a strukturně viskózní kapaliny, u nichž lze stanovit dvě limitní zdánlivé viskozity. Hypotéza pseudoplastického chování předpokládá, že změna struktury nastane okamžitě, jakmile začne působit smykové napětí. Jedná se např. o roztoky a taveniny polymerů, mýdel a detergentů, pasty, kaly, kaučuky, barvy.

- *DILATANTNÍ KAPALINY*, jejich zdánlivá viskozita roste s rostoucím gradientem rychlosti v důsledku lepšího uspořádání částic. Při malých napětích připomínají newtonské kapaliny, zvyšováním působící síly nastává náhlý vzrůst viskozity a gradient rychlosti zůstává při dalším zvyšování prakticky konstantní. Zpravidla je při procesech nežádoucí. Takové

chování vykazují například rozpouštědla barev, některé nátěrové a tiskařské barvy a suspenze.

K vyjádření průběhu tokových křivek uvedených nenewtonských kapalin se užívá:

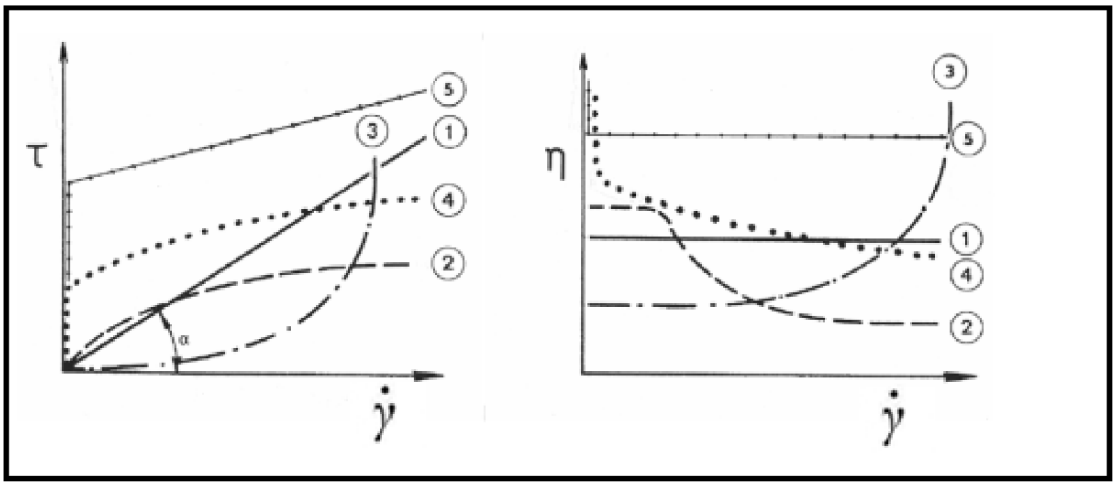
$$\dot{\gamma} = K \cdot \tau^{n} \qquad (6)$$

$n > 1$ pro pseudoplasticitu, $n < 1$ pro dilataci

kde K, n jsou empirické látkové parametry charakterizující vlastnosti toku nenewtonské kapaliny a závisejí pouze na teplotě. Parametr K se nazývá součinitel (koeficient) konzistence a parametr n je index (nebo exponent) toku.

- *BINGHAMSKÉ KAPALINY*, tj. kapaliny s plastickou složkou deformace. Vůči malým napětím se chovají jako tuhá tělesa a deformují se jen elasticky. Po překročení prahového smykového napětí (mez toku, kluzu τ_K), dochází k rozrušování struktury a rychlostní gradient vzrůstá nejprve zvolna, až křivka dosáhne rychle stoupající přímkové části. Jedná se např. o průmyslové kaly, olejové barvy. Pro tyto kapaliny platí:

$$\dot{\gamma} \cdot \eta = \tau - \tau_{\mathrm{K}} \qquad (7)$$

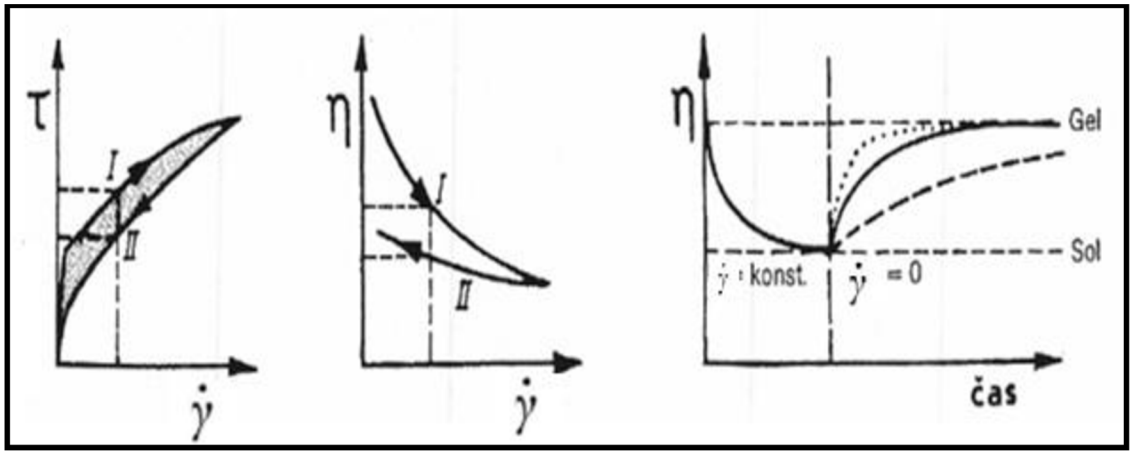


***Obrázek 9**: Tokové a viskozitní charakteristiky kapalin. (1) newtonská kapalin, (2) strukturně viskózní kapalina, (3) dilatantní kapalina, (4) pseudoplastická kapalina, (5) binghamská kapalina.* [35]

Existují také kapaliny s časově závislou složkou deformace, které mění zdánlivou viskozitu s dobou působení napětí. Jejich tokové křivky jsou hysterezní, průběh při zvyšování napětí se liší od průběhu při jeho snižování. Rozlišují se dva základní typy:

- *TIXOTROPNÍ LÁTKY* (látky řídnoucí) jeví zpočátku vysokou zdánlivou viskozitu, která s prodlužující se dobou působení napětí klesá. Je-li systém ponechán v klidu, původní struktury se opět obnovují a viskozita se asymptoticky blíží původní hodnotě. Tento systém vykazuje hysterezní chování, tzn. průběh tokové křivky naměřené při pravidelném zvyšování napětí se neshoduje s průběhem naměřeným při jeho snižování. Na rozdíl od reopexie

probíhá hysterezní smyčka ve směru pohybu hodinových ručiček. Jedná se např. o nátěrové hmoty.



***Obrázek 10**: Charakteristické křivky tixotropních kapalin.* [35]

- *REOPEKTICKÉ LÁTKY* (látky houstnoucí), jejich zdánlivá viskozita během smykového namáhání s časem roste. Je-li systém ponechán v klidu, viskozita se postupně vrátí na původní nízkou hodnotu. Na rozdíl od tixotropie se s tímto chováním můžeme setkat jen zřídka (např. u suspenzí bentonitu).

Anomálie viskozity mohou být velmi různorodé a v praxi se můžeme setkat i s různými kombinacemi chování viskózního s elastickým:

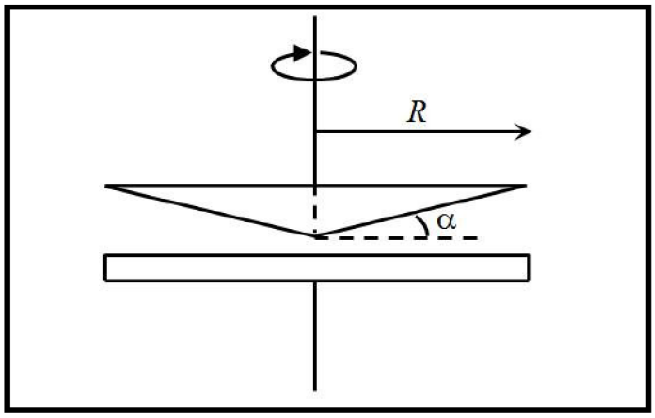
- *VISKOELASTICKÉ LÁTKY*, např. velmi koncentrované suspenze nebo roztoky makromolekul se chovají za určitých podmínek jako vazké kapaliny a za jiných jako pružná tělesa. Po odstranění napětí se částečně vrací do původního tvaru.

2.7.3 Metody měření viskozity

K měření viskozity se běžně používají průtokové, pádové a rotační viskozimetry, z nichž však pouze poslední typ a speciální kapilární viskozimetry umožňují dostatečně charakterizovat tokovou křivku nenewtonských kapalin. V experimentální části této práce se využívá rotačního reometru, tudíž právě tomuto typu viskozimetrů bude věnován zbytek kapitoly. [35]

Obecně se rotační viskozimetry využívají pro měření při nízkých rychlostech smykových deformací (10^{-2} – 10^{2} s^{-1}). Reometr řadící se do této skupiny je laboratorní přístroj, který slouží ke zjišťování tokových vlastností kapalin, u nichž není možná charakteristika jedinou hodnotou viskozity. Během zkoušky se na vzorek látky aplikuje smyková deformace, přičemž se měří vlastnosti tečení vzorku (smyková viskozita při rotačních testech) nebo dynamické materiálové vlastnosti (viskoelastický modul a fázový úhel při oscilačních testech). Měřicí systém reometru je složen z několika vyměnitelných geometrií, jež slouží k interakci vzorku a reometru a definují aplikované napětí. Může

se jednat o typ geometrie válec – válec, deska – deska a v tomto experimentu využívaná geometrie kužel – deska, jež je popsána v následujícím odstavci. [35, 38]



***Obrázek 11**: Geometrické uspořádání kužel – deska.* [38]

Nespornou výhodou tohoto uspořádání je, že tokové podmínky jsou přesně definovány. Deska je stacionární a kužel s poloměrem *R* rotuje kolem své osy konstantní úhlovou rychlostí *ω*. Testovaný vzorek je umístěn mezi deskou a kuželem. Při tomto geometrickém uspořádání jsou rychlost smykové deformace, a stejně tak smykové napětí, nezávislé na pozici mezi kuželem a deskou. Za předpokladu, že úhel *α* mezi deskou a kuželem je malý, lze rychlost smykové deformace odvodit obdobně jako u Newtonova zákona:

$$\dot{\gamma} = \frac{\omega}{\alpha} \tag{8}$$

Vztah mezi smykovým napětím τ a momentem síly M je pro toto uspořádání:

$$\tau = \frac{3M}{2\pi R^3} \tag{9}$$

Tokovou rovnici nenewtonských kapalin lze určovat přímo z naměřených závislostí momentu síly na úhlové rychlosti:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = \frac{3M\alpha}{2\pi R\omega^3} = K \cdot \frac{M}{\omega} \tag{10}$$

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie, přístroje a programy

CHEMIKÁLIE

- Dulbecco's phosphate buffered saline 10X (Sigma) – fosfátový pufr
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Nano-hydroxyapatit (Ústav materiálového inženýrství FSI obor keramiky)
- PureCol (Advanced BioMatrix) – čištěný hovězí kolagenový roztok, ~ 97% kolagen typu I se zbytkem kolagenu typu III, koncentrace 3,0 mg/ml, pH = 2.

PŘÍSTROJE

- Analytické váhy SI-234 A (Denver Instruments)
- Digitální pH metr s čidlem ISFET (ISFETCOM)
- Reometr AR G2 (TA Instruments)

PROGRAMY

- Instrument Control – program umožňující práci s reometrem
- MS Office Excel 2007

***Obrázek 12**: Reometr AR G2 od TA Instruments.* [39]

3.2 Příprava vzorků

Nejprve byly připraveny tyto roztoky: 10 ml zásobního roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 0,1 mol/dm^3 a 40 ml roztoku nano-HAP v PBS o koncentraci 3,0 mg/ml. Připravené roztoky byly uchovány v lednici při nízké teplotě.

Vzorky pro reologická měření byly připraveny do vialek o objemu 20 ml, složení jednotlivých vzorků je uvedeno v následující tabulce (*tabulka 2*). Připravený vzorek byl protřepán a digitálním pH metrem bylo změřeno pH roztoku, které se muselo pohybovat v intervalu 7,2 – 7,6. V případě, že bylo pH nedostatečné, byl po kapkách přidáván 0,1 M roztok hydroxidu sodného a pH bylo opět změřeno. Takto připravené vzorky byly ponechány v lednici a vždy před samotným měřením byly přenášeny v chladící lázni s ledem, aby se předešlo želatinaci.

***Tabulka 2**: Složení měřených vzorků.* [1]

VZORKY KOLAGENU BEZ PŘÍMĚSI HYDROXYAPATITU				
Název vzorku	**C24**	**C18**	**C12**	**C06**
PureCol [ml]	8	6	4	2
PBS [ml]	1	3	5	7
0,1 M NaOH [µl]	950	750	550	350
V_c ⊙ [ml]	9,95	9,75	9,55	9,35
obsah kolagenu v ⊙ [mg]	24	18	12	6
koncentrace kolagenu v ⊙ [mg/ml]	2,412	1,846	1,257	0,642
VZORKY KOLAGENU S PŘÍMĚSÍ HYDROXYAPATITU				
Název vzorku	**CH03**	**CH09**	**CH15**	**CH21**
PureCol [ml]	8	6	4	2
⊙ HAP v PBS [ml]	1	3	5	7
0,1 M NaOH [µl]	950	750	550	350
V_c ⊙ [ml]	9,95	9,75	9,55	9,35
obsah HAP v ⊙ [mg]	3	9	15	21
koncentrace kolagenu v ⊙ [mg/ml]	2,412	1,846	1,257	0,642
koncentrace HAP v ⊙ [mg/ml]	0,302	0,923	1,571	2,246

[1] Názvy vzorků (dále používáno pro značení v grafech): vzorky kolagenu bez příměsi značeny písmenem C, číselné rozlišení dáno celkovým množstvím kolagenu ve vzorku. Vzorky s příměsí značeny CH, číselné rozlišení dáno celkovým obsahem HAP ve vzorku.

3.3 Reologické měření

Reologické měření bylo prováděno na reometru AR G2 od TA Instruments. Pro měření vzorků byl zvolen typ měřící geometrie kužel – deska s kuželem o parametrech 40mm/2° (průměr kužele/úhel zkosení).

V programu Instrument Control, který slouží k ovládání přístroje a práci s naměřenými daty, byla nadefinována oscilační metoda, podle níž samotné měření pobíhalo. Metoda je zde popsána pro 37 °C, u teploty 4 °C by se postupovalo obdobně.

NASTAVENÍ METODY

- Počáteční doba ekvilibrace, při níž dojde k zahřátí vzorku na 37 °C 2 min.
- Působící normálová síla o velikosti 2,0 N.
- Vzorek je udržován při teplotě 37 °C po dobu 40 minut.
- Měření: počáteční hodnota smykové deformace 0 s^{-1}, konečná hodnota smykové deformace 100 s^{-1}, durace 2 min a čas mezi jednotlivým snímáním hodnot 10 s.

Nejprve byla nastavena temperace na 4 °C. Na desku bylo nadávkováno 600 µl vzorku pomocí automatické byrety a byly odstraněny případně vzniklé bublinky. Samotné měření trvalo přibližně 45 minut. Pro obě výše zmíněné metody byl tento postup opakován třikrát pro každý vzorek koncentrační řady roztoku čistého kolagenu i pro všechny vzorky kolagenu s příměsí HAP.

3.4 Vyhodnocení dat

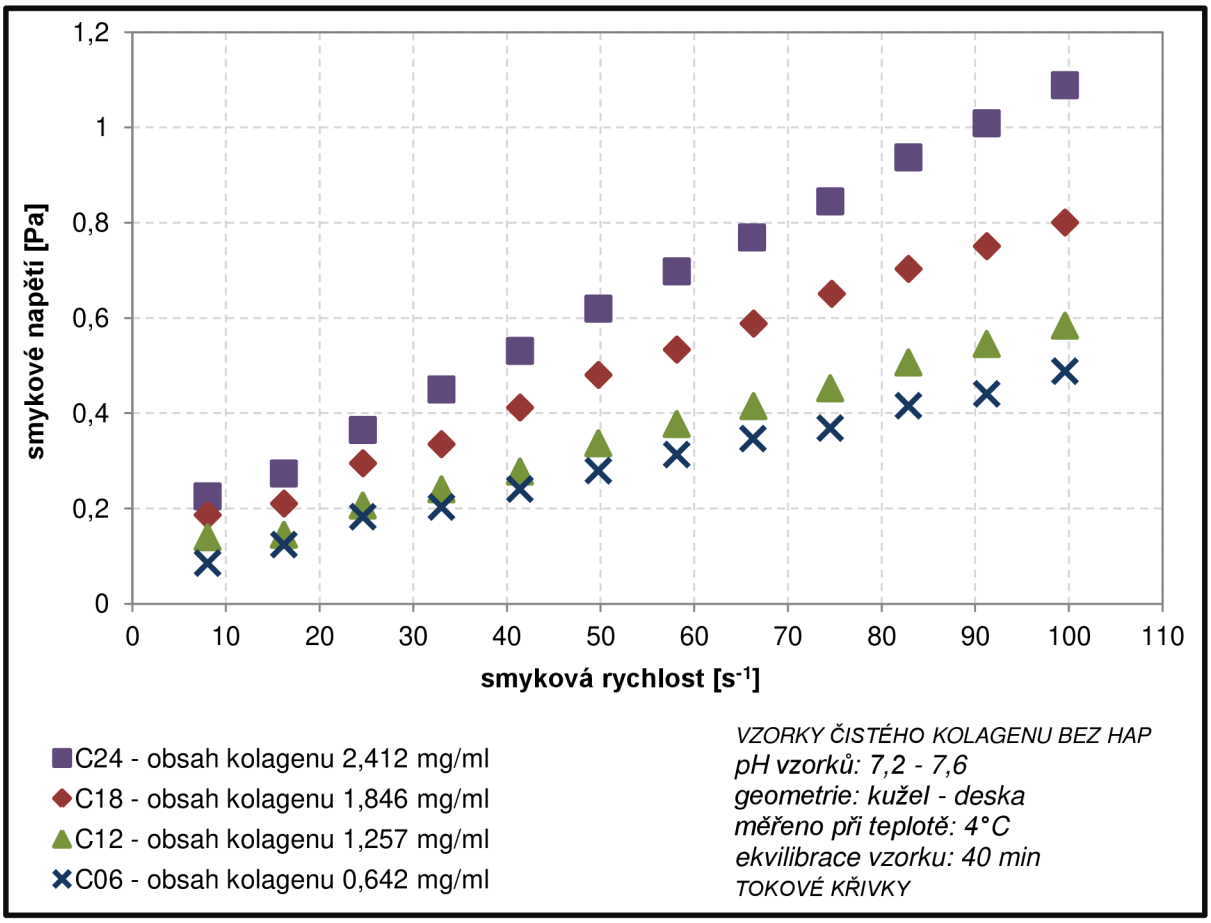
Získaná data jednotlivých měření byla pro další zpracování přeposlána z programu Instrument Control do MS Office Excel 2007. Pro jednotlivé vzorky byly pomocí programu Excel vypočteny ze tří opakování průměrné hodnoty smykových napětí, smykových rychlostí a dynamických viskozit. Z těchto hodnot byly pro zhodnocení reologických vlastností vzorků vytvořeny tokové a viskozitní křivky.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro manipulaci s roztoky kolagenu je potřeba zohlednit jejich měnící se viskozitu s teplotou a mechanickým namáháním. Z tohoto důvodu byla využita metoda reologie, pomocí níž byla pro vzorky o fyziologickém pH změřena závislost smykového napětí na smykové rychlosti u dvou teplot. Při teplotě 4 °C, kdy si kolagen v připravených vzorcích o daném složení zachovává rozpustnost a při 37 °C, což má simulovat reálnou situaci vlastní montáže v lidském těle. Měření za těchto podmínek nám umožňuje předpovědět chování a strukturální změny kolagenových roztoků i hydrogelů nejen v těle, ale obecně poskytuje i informace o stabilitě a účinnosti, což vede k celkovému pochopení, vylepšení a dalšímu rozvoji tohoto biomateriálu.

4.1 Vodné roztoky čistého kolagenu i jeho nanokompozitů při 4 °C

Při 4 °C obsahují vodné roztoky vysoký obsah monomerů. Jedná se v podstatě o prekurzory výsledných hydrogelů, které si na rozdíl od nich zachovávají svůj nativní charakter, tzn. funkční stav.

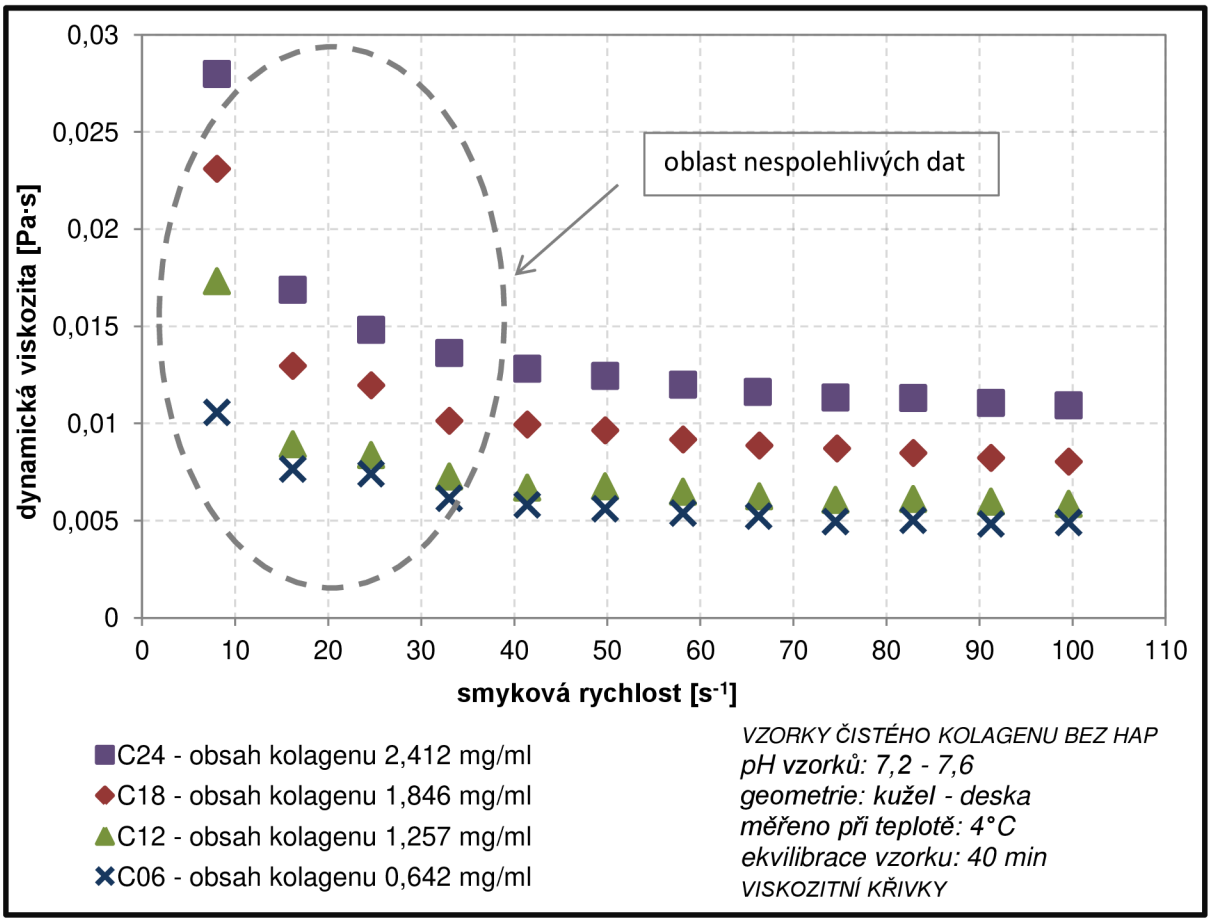


***Obrázek 13**: Tokové křivky pro vzorky čistého kolagenu bez příměsi o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 4 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích v rozsahu 0,642 – 2,412 mg/ml. Ekvilibrace vzorků 40 min, měřící geometrie kužel – deska.*

V grafu (*obrázek 13)* jsou zaznamenány tokové křivky vzorků čistého kolagenu při této teplotě. Z naměřených hodnot je patrné, že pro rozsah smykových rychlostí 0 až 100 s^{-1} mají všechny křivky lineární závislost smykového napětí na smykové rychlosti, z čehož lze usoudit, že se jedná o látku newtonského charakteru.

Tokové křivky vyjadřují přímou úměrnost mezi smykovým napětím a smykovou rychlostí. Jejich porovnáním bylo zjištěno, že s rostoucím časem dosahují tokové křivky při stejných smykových rychlostech rozdílné hodnoty napětí. Největší rozptyl vykazuje vzorek C24, jež obsahuje 2,412 mg/ml kolagenu, tzn. na stejnou deformaci ve srovnání s jinými vzorky je potřeba většího smykového napětí. Naopak nejmenší rozptyl je zaznamenán u vzorku C06 s 0,642 mg/ml kolagenu.

V grafu (*obrázek 14*) jsou zaznamenány viskozitní křivky z dat, jež byly spočítány přístrojem při samotném měření závislosti smykového napětí na smykové rychlosti. Jak již bylo v předchozím odstavci řečeno, jedná se o látku newtonského charakteru, tudíž by měla vykazovat nezávislost na rychlostním gradientu. Z fyzikálního hlediska lze tedy usoudit, že jsou data v grafu zatíženy určitou chybou měření, jelikož průběh těchto křivek neodpovídá povaze newtonských látek.



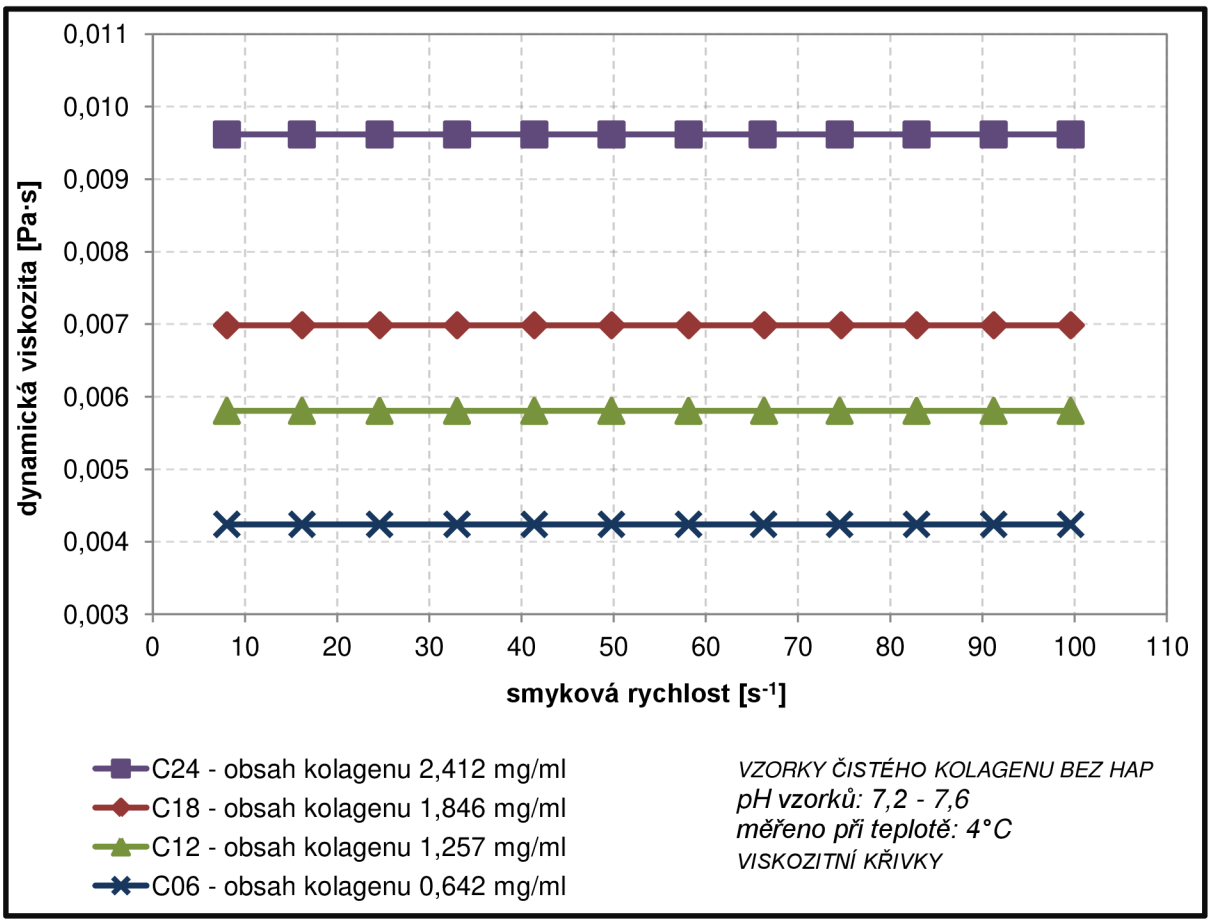
***Obrázek 14**: Viskozitní křivky z dat vypočtených přístrojem pro vzorky čistého kolagenu bez příměsi o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 4 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích v rozsahu 0,642 – 2,412 mg/ml. Ekvilibrace vzorků 40 min, měřící geometrie kužel – deska.*

Pro posouzení skutečné viskozity byly tokové křivky vzorků (*obrázek 13*) v programu Excel proloženy lineární spojnicí trendu. Následně byla zobrazena rovnice regrese a hodnota spolehlivosti (*tabulka 3*). Jednotlivé rovnice regrese nebo-li směrnicové rovnice přímky, lze napsat v obecném tvaru $y = kx + q$, kde k je tzv. směrnice, což je tangens úhlu, který svírá daná přímka s kladným směrem osy x. Z grafů (*obrázek 8*) je tedy patrné, že touto směrnicí je právě viskozita.

Chyba měření přístroje spočívá v tom, že reometr stanovuje viskozitu v konkrétním bodě na základě podílu právě změřených hodnot smykového napětí a smykové rychlosti a neposuzuje ji s ohledem na celkový tok látky v daném rozsahu smykového gradientu.

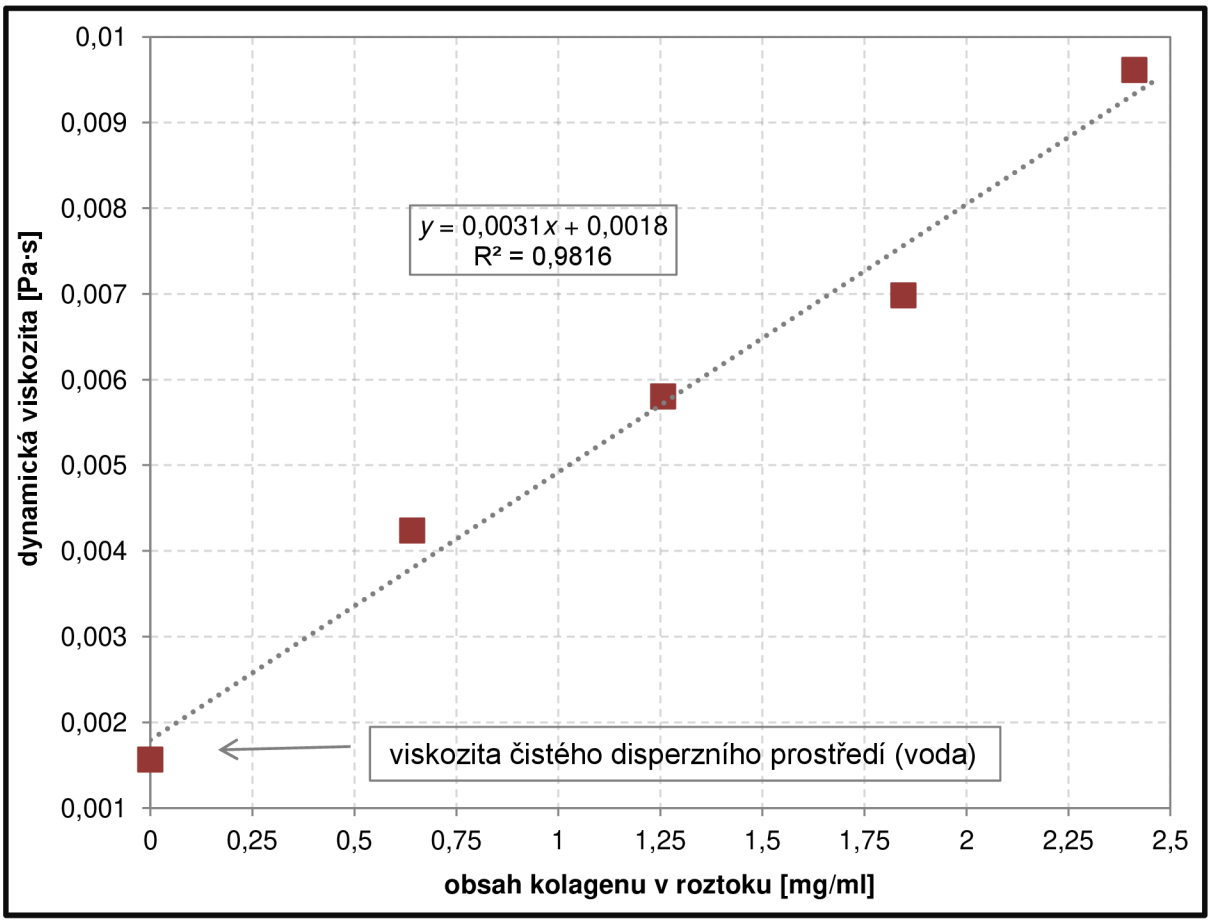
***Tabulka 3**: Rovnice regrese a výsledné viskozity pro tokové křivky (obrázek 13).*

Vzorky	Rovnice regrese	Hodnota spolehlivosti	Viskozita [Pa·s]
C24 obsah kolagenu 2,412 mg/ml	$y = 0{,}009x + 0{,}133$	$R^2 = 0{,}999$	0,00962
C18 obsah kolagenu 1,846 mg/ml	$y = 0{,}007x + 0{,}119$	$R^2 = 0{,}996$	0,00699
C12 obsah kolagenu 1,257 mg/ml	$y = 0{,}005x + 0{,}078$	$R^2 = 0{,}996$	0,00581
C06 obsah kolagenu 0,642 mg/ml	$y = 0{,}004x + 0{,}062$	$R^2 = 0{,}996$	0,00424



***Obrázek 15**: Viskozitní křivky získané ze směrnic tokových křivek zaznamenaných v tabulce 3 pro vzorky čistého kolagenu bez příměsi o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 4 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích v rozsahu 0,642 – 2,412 mg/ml.*

V grafu (*obrázek 15*) lze vidět skutečnou viskozitu odpovídající naměřeným tokovým křivkám. Viskozita vykazuje konstantní závislost na smykové rychlosti resp. na čase, je tedy konstantou. U vzorku C24 je hodnota viskozity nejvyšší, jelikož tento vzorek obsahuje značné množství kolagenu, lze jej považovat za roztok koncentrovaný. V případě vzorku C06 bychom mohli mluvit o vzorku zředěném, neboť zde obsah kolagenu 0,642 mg/ml neovlivňuje viskozitu tolik jako předchozím případě.



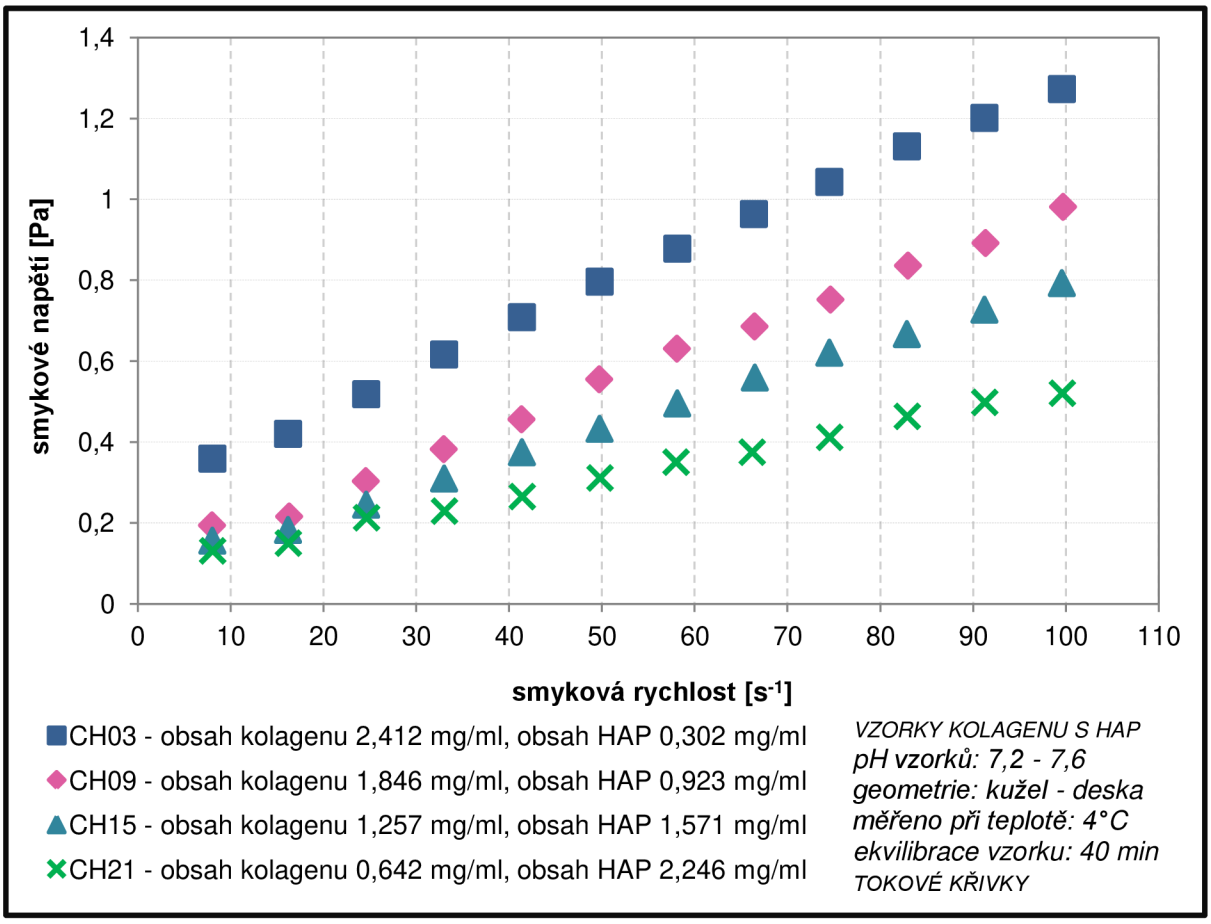
***Obrázek 16**: Závislost dynamické viskozity na množství kolagenu v roztoku pro vzorky čistého kolagenu bez příměsi o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 4 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích v rozsahu 0,642 – 2,412 mg/ml. Pro srovnání tabelovaná hodnota dynamické viskozity vody při 4 °C představující čisté disperzní prostředí.*

V grafu (*obrázek 16*) lze s menšími odchylkami pozorovat lineární závislost dynamické viskozity systému na množství kolagenu v něm obsaženém. Znázorněná spojnice trendu nám umožňuje přibližně určit hodnotu dynamické viskozity systému o jiných složeních, než se kterými bylo v této práci měřeno.

Z výsledků vyplývá, že teplota 4 °C je obecně vhodná pro manipulaci s těmito prekurzory hydrogelů, jelikož molekuly kolagenu zůstávají rozpuštěny v roztoku a nedochází zde k jejich seskupování do asociačních struktur a tím změně viskozity, což je nespornou výhodou pro jeho aplikaci do lidského těla. Vzorek si zachovává kapalný charakter.

Částice v koloidním systému vykonávají tepelný tzv. Brownův pohyb, při kterém získávají svou kinetickou energii srážkami s jinými částicemi. Účinnou srážkou dochází k seskupování částic do asociačních struktur. Kinetika částic pod 1 μm je však výrazně ovlivňována teplotou tekutiny, tzn. rychlost pohybu částic se zvyšuje s rostoucí teplotou. Při teplotě 4 °C nemají částice dostatečnou kinetickou energii pro účinnou srážku, a tudíž se zde neobjevují žádné struktury, které by se působením smykového napětí rozrušovaly, což by se projevilo jiným průběhem závislosti dynamické viskozity na smykové rychlosti v grafu (*obrázek 15*). Změnou teploty (kapitola 4.2) jsou schopny vytvořit spojitou síť tzv. gel.

Přidáním nanočástic HAP do vodných roztoků kolagenu nedochází k ovlivnění reologického modelu, opět se jedná o newtonskou látku. V grafu (*obrázek 17*) je průběh tokových křivek nanokompozitního systému lineární a samotné zhodnocení průběhu je stejné jako v předchozím případě.



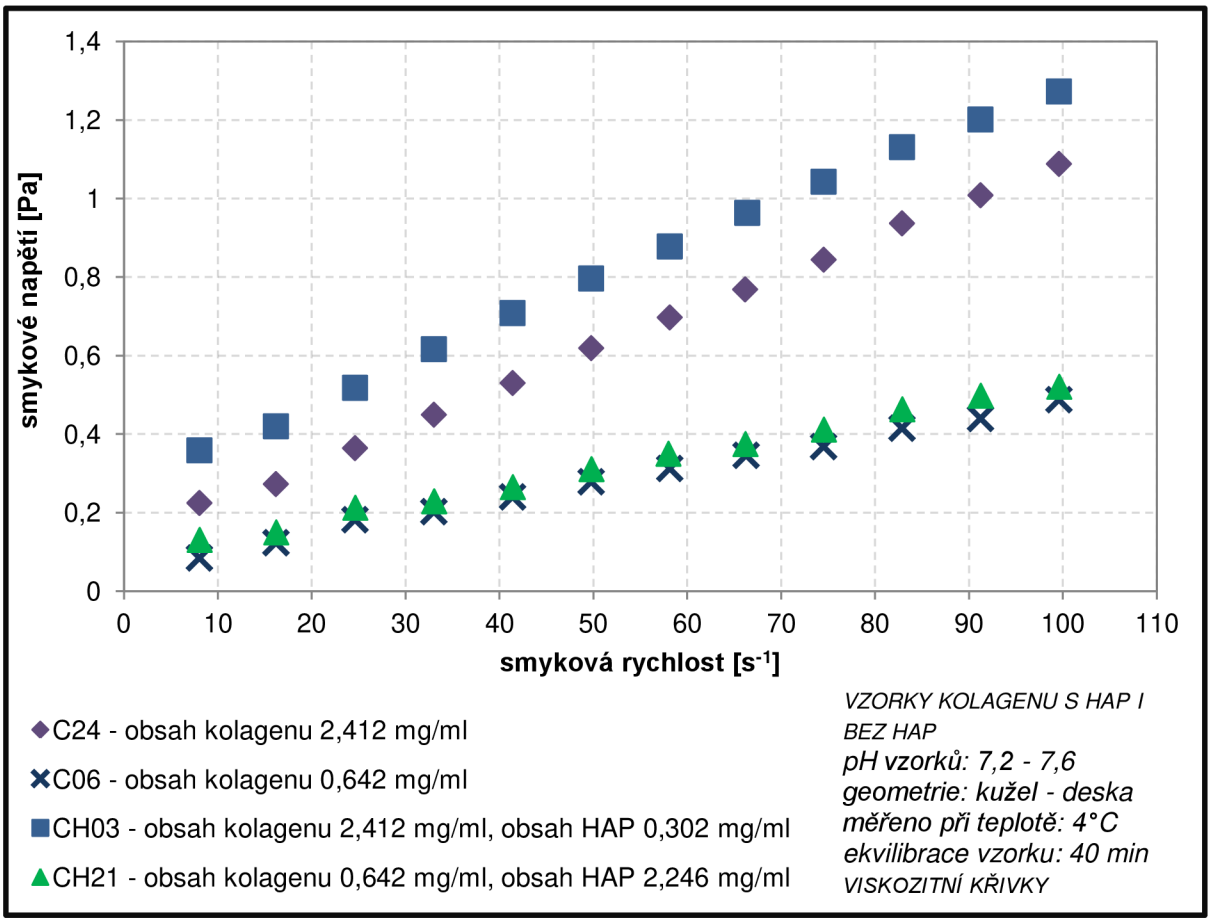
***Obrázek 17**: Tokové křivky pro vzorky kolagenu s příměsí HAP o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 4 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích v rozsahu 0,642 – 2,412 mg/ml a obsahem HAP 0,302 – 2,246 mg/ml. Ekvilibrace vzorků 40 min, měřící geometrie kužel – deska.*

Při měření bylo pracováno se dvěma proměnnými, tzn. obsah kolagenu a obsah nanočástic. Výsledky ovšem ukazují, že se zde v menší míře začínají projevovat výztužné účinky HAP, které jsou více patrné na *obrázku 18*. Tento graf představuje, jak se v rámci jednoho vzorku ovlivní toková křivka, jestliže jsou do roztoku přidány nanočástice HAP a jaký vliv mají různé poměry složení na tokové vlastnosti. Při stejných smykových

rychlostech dochází k posunu k vyšším hodnotám smykového napětí, tzn. vzorek je odolnější vůči deformaci, což má za následek vyšší tuhost a pevnost systému.

Na základě článku *Directional Dependence of Hydroxyapatite-Collagen Interactions on Mechanics of Collagen* [40] bylo založeno následující tvrzení: Voda má silnější interakci s HAP, což zapříčiňuje, že molekuly vody jsou silně vázány a hustě seskupeny okolo jeho povrchu. Voda působí jako prostředník mezi kolagenem a HAP, díky čemuž napomáhá HAP ovlivňovat mechanické vlastnosti kolagenu i přes relativně nízkou interakční energii. Pokud je systém zatížen, molekuly kolagenu jsou lépe orientovány a mohou překonat přitažlivé interakce vody, čímž dojde k navázání kolagenu na HAP.

V případě vzorku CH03, jež obsahuje 2,412 mg/ml kolagenu a 0,302 mg/ml HAP je posun mnohem výraznější, jelikož se zde nachází velké množství kolagenových vláken, které snáze překonají interakce mezi vodou a HAP. U vzorku CH21 s 0,642 mg/ml kolagenu 2,246 mg/ml HAP je posun téměř nepatrný, protože v roztoku je nedostatečné množství kolagenu na vyšší obsah nanočástic, toto složení je tudíž neefektivní.

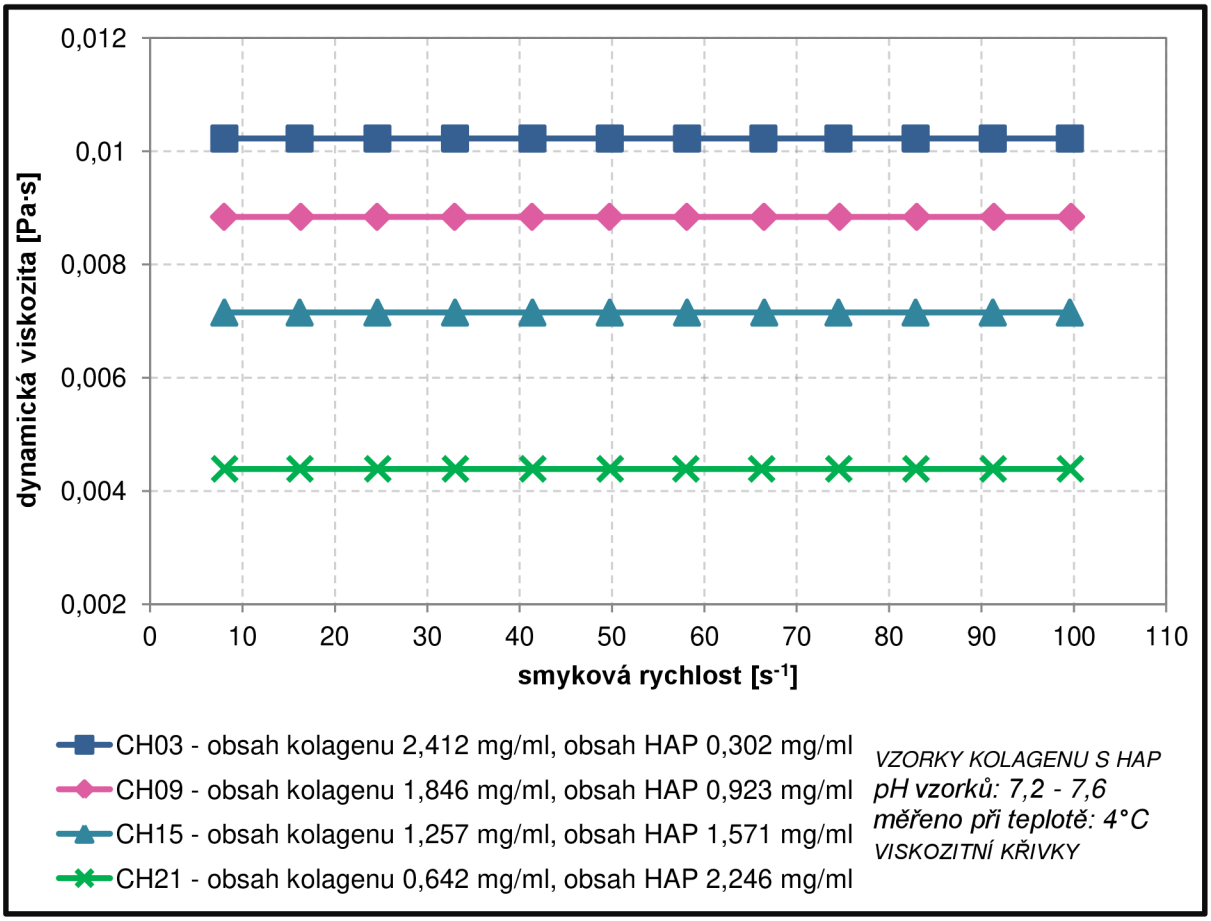


***Obrázek 18**: Srovnání tokových křivek pro vzorky čistého kolagenu i jeho nanokompozitů se stejným obsahem kolagenu 0,642 a 2,412 mg/ml a s příměsí HAP s obsahem 0,302 a 2,246 mg/ml o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 4 °C. Ekvilibrace vzorků 40 min, měřící geometrie kužel – deska.*

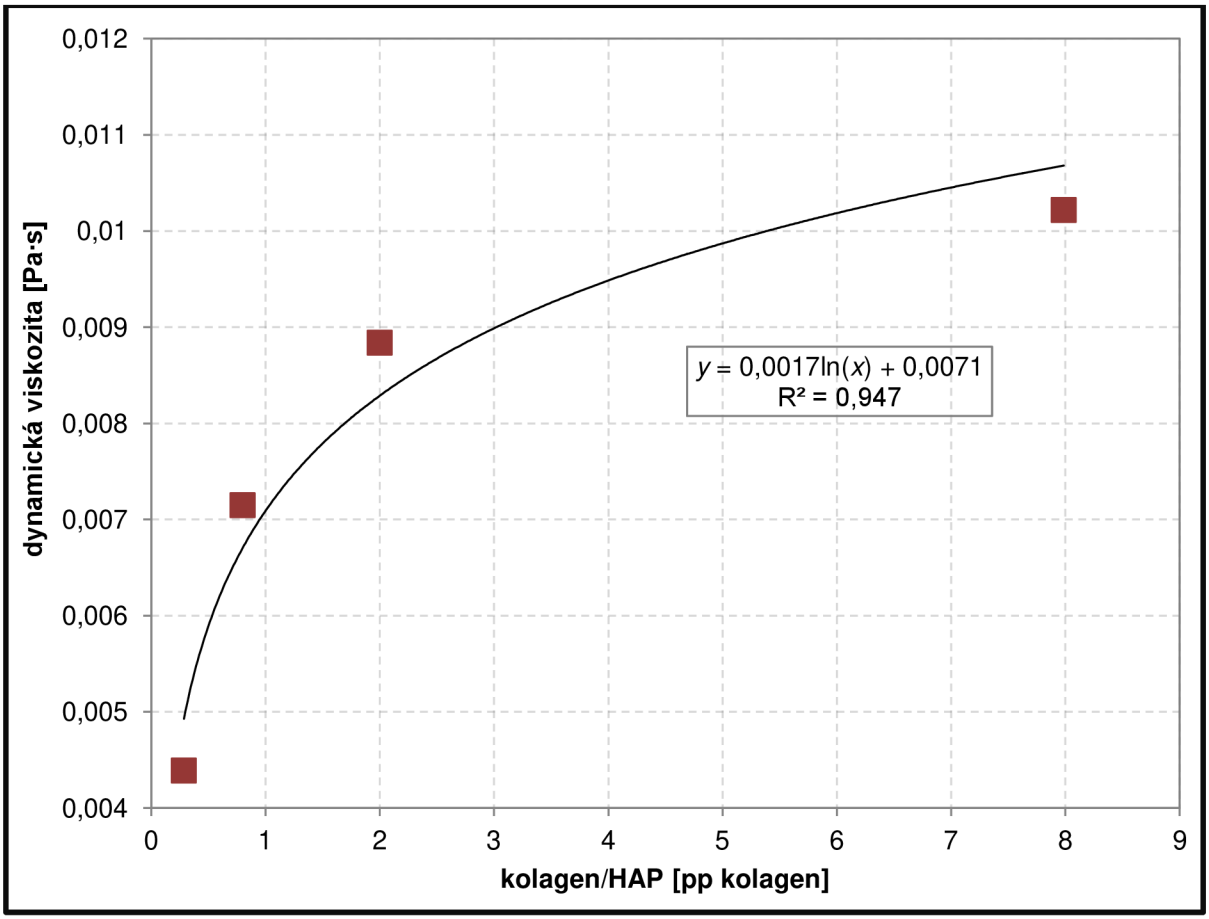
V grafu (*obrázek 19*) jsou znázorněny viskozitní křivky roztoků s obsahem nanočástic odpovídající newtonskému chování. Stejně jako v předchozím případě byla data spočítána přístrojem zatížena chybou, a tedy pro posouzení skutečné viskozity byly využity rovnice regrese tokových křivek (*tabulka 4*). Viskozita vzorků obsahujících HAP je vyšší oproti vzorkům čistého kolagenu.

***Tabulka 4**: Rovnice regrese a výsledné viskozity pro tokové křivky (obrázek 17).*

Vzorky	Rovnice regrese	Hodnota spolehlivosti	Viskozita [Pa·s]
CH03 obsah kolagenu 2,412 mg/ml, obsah HAP 0,302 mg/ml	$y = 0{,}010x + 0{,}276$	$R^2 = 0{,}999$	0,01022
CH09 obsah kolagenu 1,846 mg/ml, obsah HAP 0,923 mg/ml	$y = 0{,}009x + 0{,}098$	$R^2 = 0{,}997$	0,00884
CH15 obsah kolagenu 1,257 mg/ml, obsah HAP 1,571 mg/ml	$y = 0{,}007x + 0{,}079$	$R^2 = 0{,}998$	0,00715
CH21 obsah kolagenu 0,642 mg/ml, obsah HAP 2,246 mg/ml	$y = 0{,}004x + 0{,}090$	$R^2 = 0{,}996$	0,00439



***Obrázek 19**: Viskozitní křivky získané ze směrnic tokových křivek zaznamenaných v tabulce 4 pro vzorky kolagenu s příměsí HAP o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 4 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích v rozsahu 0,642 – 2,412 mg/ml a obsahem HAP 0,302 – 2,246 mg/ml.*



***Obrázek 20**: Závislost dynamické viskozity na poměru koncentrací složek (kolagen/HAP) pro vzorky kolagenu s příměsí o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 4 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích v rozsahu 0,642 – 2,412 mg/ml a obsahem HAP 0,302 – 2,246 mg/ml.*

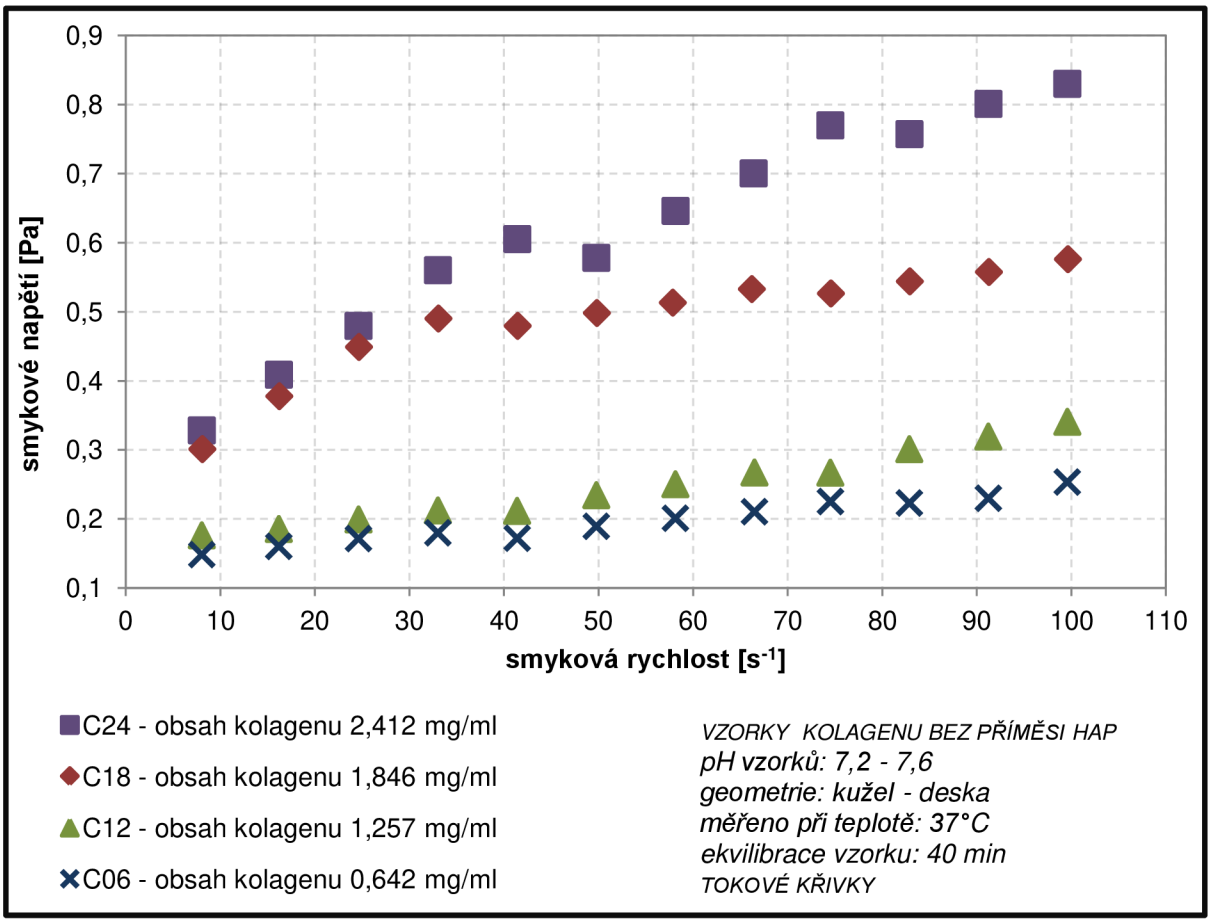
Jelikož množství HAP není ve vzorcích konstantní, bylo pro vyjádření koncentrace využito poměru mezi obsahem kolagenu a HAP ve vzorku. V grafu (*obrázek 20*) byla vypočtená data proložena logaritmickou spojnicí trendu. Znázorněná spojnice trendu nám umožňuje přibližně určit hodnotu dynamické viskozity systému o jiných poměrech, než se kterými bylo pracováno.

4.2 Hydrogely čistého kolagenu a jeho nanokompozitů při 37 °C

Zahříváním roztoku monomerního kolagenu o neutrálním pH dochází ke spontánnímu procesu zesítění sestavováním do fibrilárních struktur. Tento proces je označován jako fibrilogeneze. Fibrily nakonec dorostou do porézní struktury gelu, kde je kolagen vysoce organizován. Ovšem rychlost vzniku gelu v prostředí o fyziologické teplotě závisí na obsahu kolagenových vláken ve vzorku. V případě, že se jedná o koncentrovanou disperzi kolagenových vláken ve vodném roztoku (vzorek C24 s obsahem kolagenu 2,412 mg/ml a C18 s 1,846 mg/ml), můžeme po ekvilibraci při 37 °C hovořit již o hydrogelu. Pokud však je disperze zředěná (vzorek C12 s koncentrací 1,257 mg/ml a C06 s 0,642 mg/ml), gel vzniká až v průběhu samotného měření. Na základě

tohoto je založena interpretace dat, jelikož se jednotlivé dvojice vzorků nacházejí v odlišné fázi tvorby či zániku gelu působením smykového napětí.

Tento jev je projevem tzv. fázové inverze. V bodě fázové inverze jsou domény kolagenu už natolik tuhé nebo-li je jich ve vzorku dostatečné množství, že reometr nerozrušuje kapky kapaliny, ale molekuly kolagenu. Vlivem působícího napětí lze tedy pozorovat rozdílné transformace struktury.



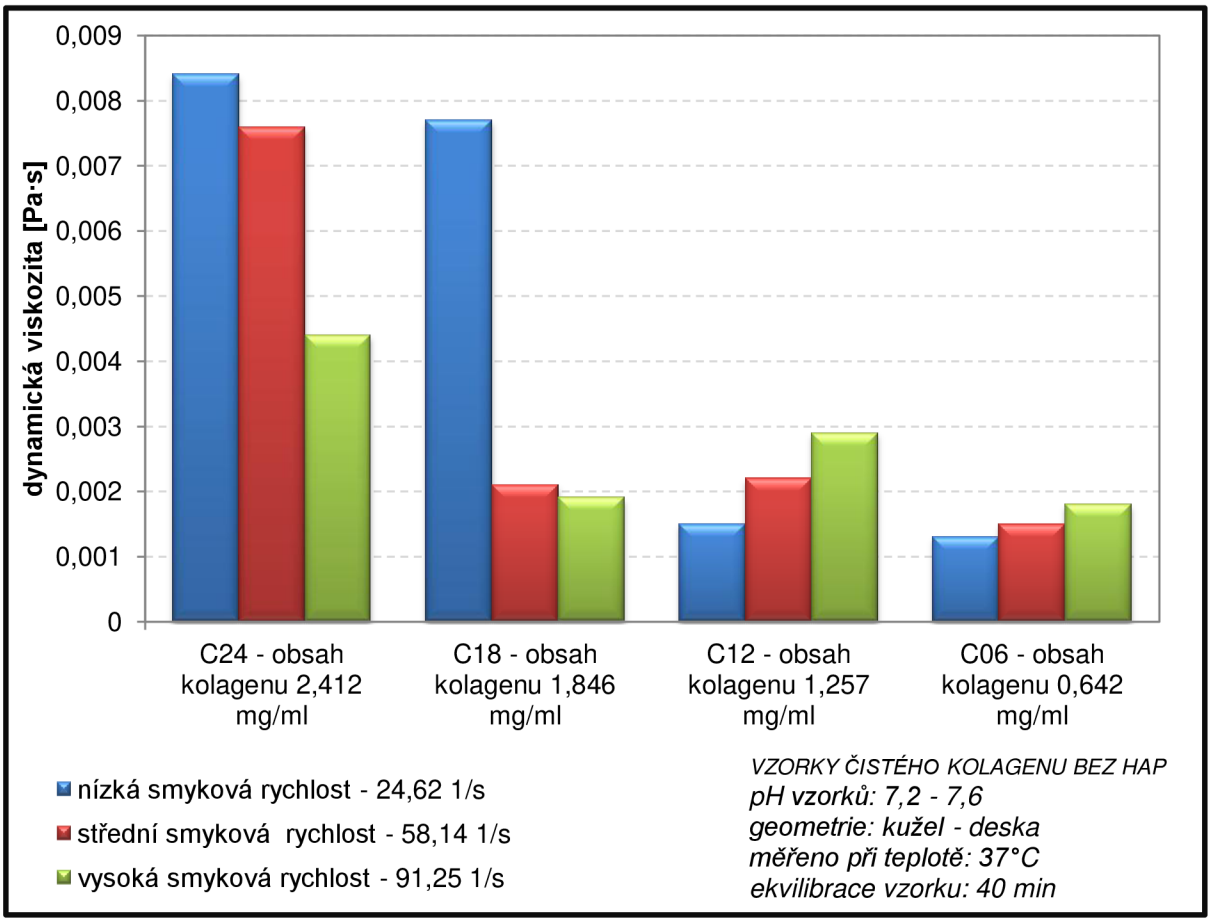
***Obrázek 21**: Tokové křivky pro vzorky čistého kolagenu bez příměsi o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 37 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích v rozsahu 0,642 – 2,412 mg/ml. Ekvilibrace vzorků 40 min, měřící geometrie kužel – deska.*

V grafu (*obrázek 21*) jsou zaznamenány tokové křivky vzorků kolagenu bez příměsi HAP, které nevykazují čistou lineární závislost, jako tomu bylo u tokových křivek prekurzorů hydrogelů při 4 °C. V grafech (*příloha 2 a 4*) je detailnější znázornění průběhů těchto křivek, na nichž lze také patrněji pozorovat zlomy související s ustanovením nové struktury v čase.

U výše zmíněných vzorků představujících koncentrovanou disperzi zvyšováním smykové rychlosti lineárně roste napětí působící na vzorek, látka se chová v daném intervalu smykových rychlostí newtonsky, tzn. nijak nedochází k ovlivnění struktury gelu. Při určité hodnotě smykové rychlosti dochází k přetransformování struktury, při čemž působením smykového napětí dochází k zániku vazeb a rozpadu sítě. Struktura se nově ustálí, zachovává si svůj newtonský charakter a opět odolává působení napětí až do určité

hodnoty smykové rychlosti. Změna struktury nastává nejpozději u vzorku C24 s obsahem kolagenu 2,412 mg/ml, díky většímu počtu kolagenových vláken. Vlákna se podílejí na vzniku trojrozměrné sítě, která je tím pevnější, čím více vazeb udržuje její stabilitu. Vzorek s největším obsahem kolagenu vytváří nejtužší 3D síť, která je odolnější vůči deformaci.

V případě zředěných disperzí se při zvyšování smykové rychlosti projevuje látka opět newtonsky. Působením smykového napětí se molekuly kolagenu i vzniklé asociační centra v roztoku lépe orientují, což je předpokladem pro spojování do dalších mikrofibril. Asociační struktury odolávají zvyšování napětí až do následujícího zlomu znázorněného v grafu (*příloha 4*). Zlom stejně jako v předchozím případě představuje okamžitou transformaci s tím, že částice se opět vhodně zorientovaly v systému, což vedlo k jejich interakcím. Změna struktury nastává nejdříve u vzorku C12 o koncentraci 1,257 mg/ml, jelikož obsahuje větší množství kolagenu pro rychlejší srážku vedoucí ke vzniku asociací.



***Obrázek 22**: Porovnání hodnot viskozit pro vzorky čistého kolagenu bez příměsi o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 37 °C při třech různých smykových rychlostech. Obsah kolagenu ve vzorcích v rozsahu 0,642 – 2,412 mg/ml.* [2]

[2] Pro lepší přehlednost grafu byly zvoleny konkrétní smykové rychlosti reprezentující daný interval gradientu rychlosti o stejné dynamické viskozitě (*viz. příloha 2 – 5*).

Porovnáním naměřených dat bylo zjištěno, že se zvyšující se smykovou deformací dosahují tokové křivky při stejných smykových rychlostech rozdílné hodnoty napětí. Největší rozptyl byl zaznamenán u vzorku C24 s obsahem kolagenu 2,412 mg/ml, naopak nejmenší u vzorku C06 s obsahem 0,642 mg/ml.

Z předchozích odstavců vyplývá, že viskozita bude pro lineární intervaly závislosti smykového napětí na smykové rychlosti konstantní, avšak se zlomem na tokových křivkách přichází i změna viskozity. Jelikož měřením při 4 °C se ukázalo, že přístroj nedokáže posoudit viskozitu na základě toku látky, nastává tento problém i zde. Jednotlivé lineární rostoucí úseky odpovídající newtonskému charakteru látek byly proloženy v programu Excel lineárními spojnicemi trendu a ze zobrazené rovnice regrese byla zjištěna viskozita jako směrnice pro daný interval smykových rychlostí (*příloha 2 a 4*).

V grafu (*obrázek 22*) lze vidět skutečnou měnící se viskozitu odpovídající naměřeným tokovým křivkám. U koncentrovaných disperzí smykem vyvolané strukturální změny vedou k morfologickým změnám gelu nebo-li „řídnutí“ sítě. U vzorku C12 a C06 s obsahem kolagenu 1,257 a 0,642 mg/ml se naopak projevuje jev smykového „zahuštění“, kdy dochází k vlastní montáži kolagenových vláken z roztoku, při níž se spojováním molekulárních řetězců v souvislou strukturu vytváří a postupně zpevňuje prostorová síť.

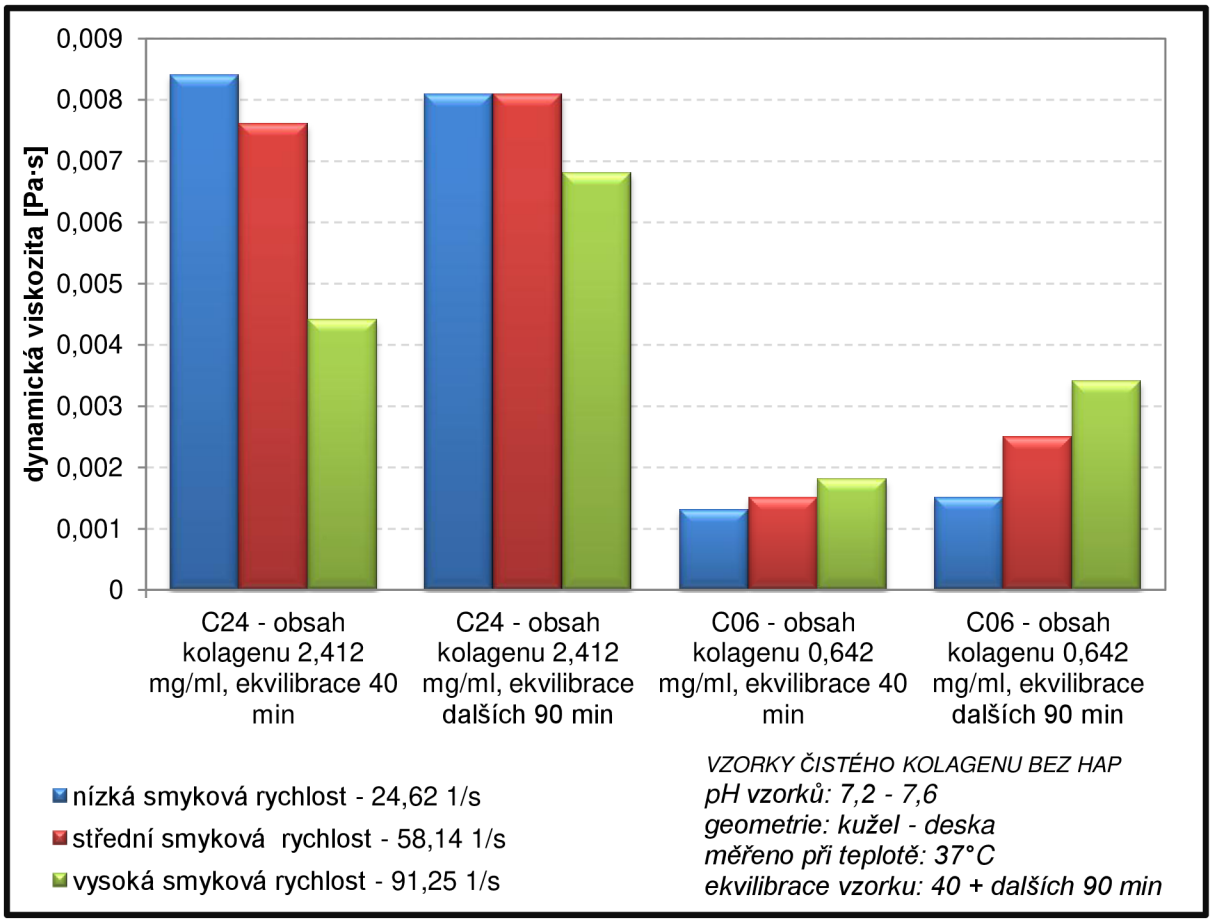
Hydrogel, odpovídající vzorku C24 s obsahem 2,412 mg/ml kolagenu má nejvyšší hodnotu viskozity a celková změna viskozity není tolik výrazná, jako je tomu u vzorků C18 o koncentraci 1,846 mg/ml. Tento vzorek při vysoké smykové rychlosti 91,25 s^{-1} se svou viskozitou blíží vypočteným hodnotám viskozit vzorků, jež jsou ve stádiu vzniku gelu a hovoříme prozatím o nich jako o velmi viskózních kapalinách. Naopak o vzorcích zředěných disperzí lze říci, že vznik gelu probíhá rychleji u vzorku C12 s 1,257 mg/ml kolagenu.

Pro zjištění povahy vzorků po ukončení měření byly dva vzorky ponechány dalších 90 minut při teplotě 37 °C a měření bylo zopakováno. V grafu (*příloha 6*) je zobrazen průběh tokových křivek pouze pro vzorek s nejvyšší a naopak s nejnižší koncentrací kolagenu s tím, že na základě předchozího pozorování se zbylé dva vzorky budou chovat zcela analogicky. Výstupem tohoto měření bylo opět získat viskozitu, což bylo provedeno výše zmíněnou metodou využití lineárních spojnic trendu pro úseky newtonského chování. Výsledky jsou zobrazeny v grafu (*obrázek 23*), kde je pro úplnou přehlednost zobrazena i měnící se viskozita vzorků po 40-ti minutové ekvilibraci.

Po další 90-ti minutové ekvilibraci, kdy byla koncentrovaná disperze ponechána v klidu bez působení napětí, se původní struktury obnovily, což se projevuje viskozitou blížící se původní hodnotě. Po takto dlouhé ekvilibraci disponuje hydrogel dostatečnou pevností, díky níž dokáže odolávat daleko většímu rozsahu smykového napětí bez změny struktury, jakož tomu je u měření po 40-ti minutové ekvilibraci. U zředěné disperze se také viskozita blíží původní hodnotě, jelikož molekuly kolagenu se bez působícího napětí od sebe částečně vzdálily. Zvyšováním smykové deformace dochází k většímu nárůstu viskozity než po 40-ti minutové ekvilibraci, neboť se zde už nacházelo více asociačních struktur, než tomu bylo na počátku.

Ze všech shromážděných dosavadních výsledků můžeme chování jednotlivých vzorků zařadit do pseudonewtonského reologického modelu. V malém rozsahu smykových

napětí jsou prudké změny viskozity téměř nemožné, ale z grafu znázorňujících jednotlivé tokové křivky vyplývá, že systém nemění v rámci tohoto intervalu smykových rychlostí své chování, nýbrž dochází pouze k přetransformování struktury související s rozpadem polymerní sítě či vytváření mikrofibril vedoucí naopak k jejímu vzniku.



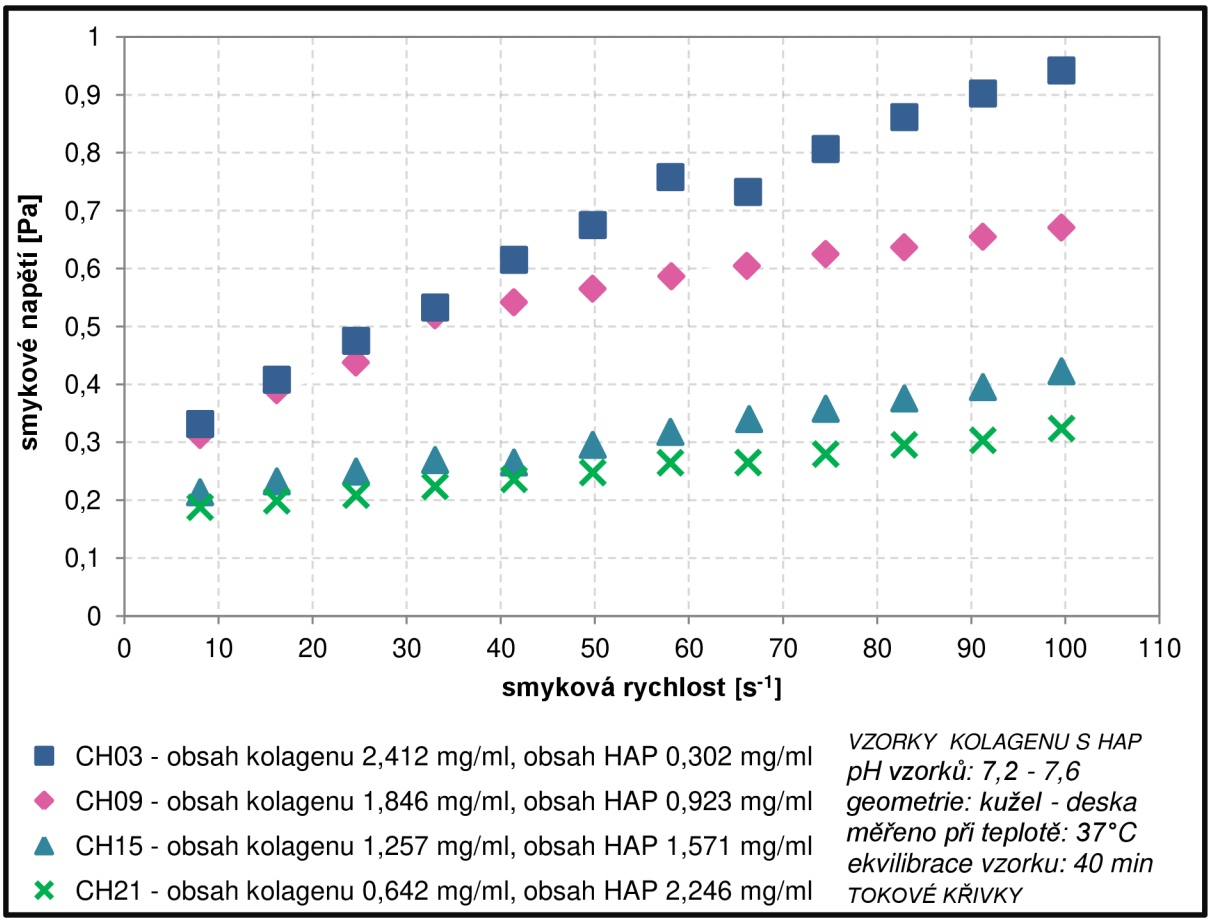
***Obrázek 23**: Průběh viskozit po 40 a dalších 90 minutách ekvilibrace pro vzorky čistého kolagenu bez příměsi o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 37 °C při třech různých smykových rychlostech. Vzorky s obsahem kolagenu 2,412 a 0,642 mg/ml.*

Nanočástice HAP ovlivňují jen určité aspekty v reologickém chování oproti hydrogelům bez příměsi. Pseudonewtonský charakter koncentrovaných i zředěných disperzí zůstává zde zachován.

V grafu (*obrázek 24*) jsou zaznamenány tokové křivky vzorků kolagenu s příměsí nanočástic, jejichž detail je znázorněn na obrázcích v *příloze 7 a 9*. Chování kolagenu v koncentrovaných či zředěných disperzích je totožné jako v čistých hydrogelech, co však ovlivňuje vzhled tokových křivek je hydroxyapatit.

U vzorků s vyšším obsahem kolagenu než HAP se výztužné účinky související s přítomností HAP projevují následujícím způsobem: změna struktury gelu u vzorku CH03 s nejvyšším obsahem kolagenu a 0,302 mg/ml HAP nastává až při vyšších hodnotách smykové rychlosti než je tomu u vzorku bez přídavku nanočástic (pro srovnání ve smykové rychlosti 41,41 s^{-1}). Po překročení smykové rychlosti 58,14 s^{-1} dochází účinkem vnější síly

k deformaci systému a zániku vazeb. Změna struktury v rozsahu měření 0 až 100 s^{-1} nastává pouze dvakrát na rozdíl od hydrogelu čistého kolagenu. V případě vzorku CH09 změna struktury nastává při stejné smykové rychlosti jako u čistého hydrogelu s totožným obsahem kolagenu, struktura gelu se však už díky HAP v tomto rozsahu dále nemění. Odolnost vzorku vůči deformaci se projevuje i tím, že v případě nanokompozitního hydrogelu je na stejnou deformaci potřeba většího smykového napětí. U vzorku CH15 a CH21 se uplatňuje HAP analogicky.



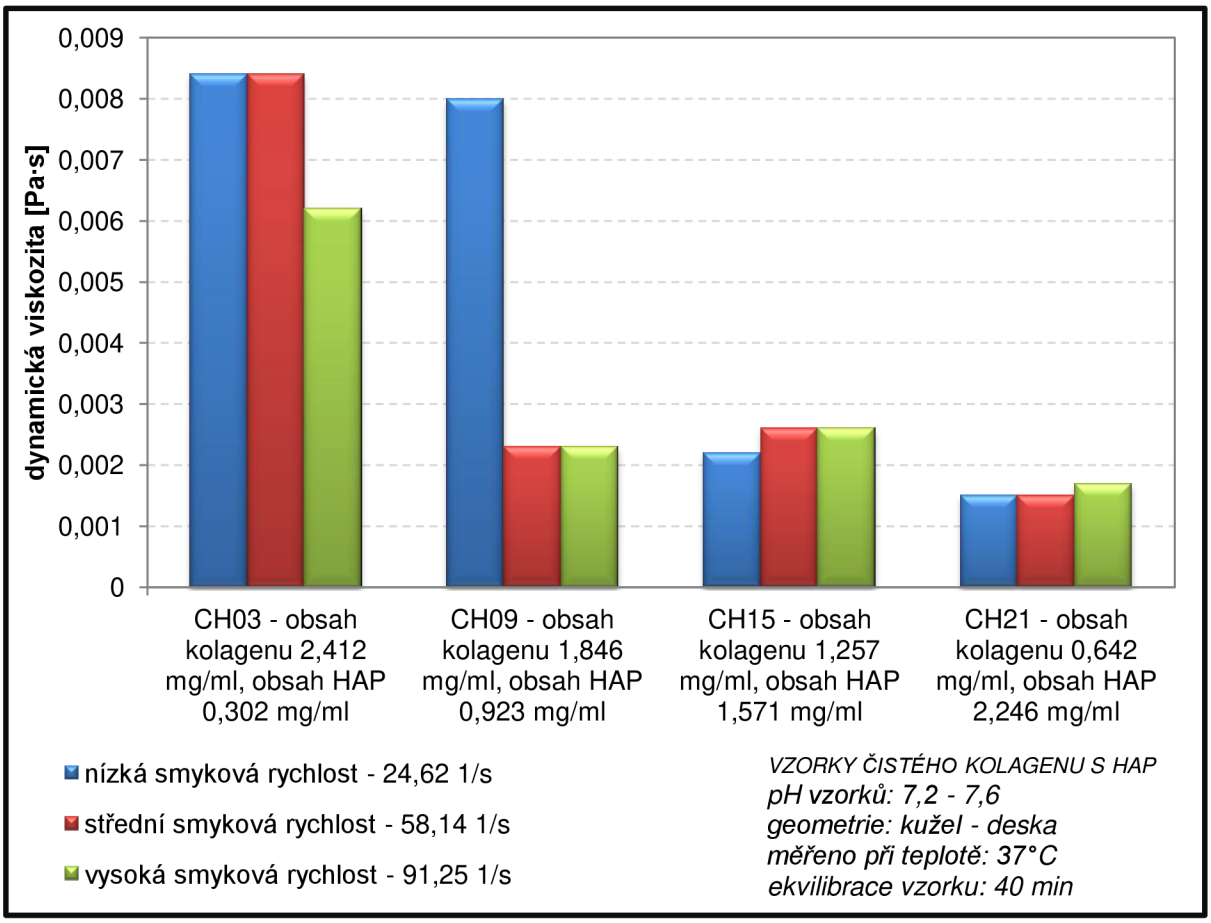
***Obrázek 24**: Tokové křivky pro vzorky kolagenu s příměsí HAP o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 37 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích v rozsahu 0,642 – 2,412 mg/ml a obsahem HAP 0,302 – 2,246 mg/ml při 37 °C. Ekvilibrace vzorků 40 min, měřící geometrie kužel – deska.*

V grafu (*obrázek 25*) lze vidět dynamickou viskozitu systému při třech zvolených smykových rychlostech. Viskozity byly opět získány z rovnic regresí tokových křivek (*příloha 7 a 9*).

Z grafu je patrné, že u koncentrovaných disperzí strukturální změny vzniklé smykem vedou k „řídnutí“ sítě, což však není tolik dramatické jako v případě čistého hydrogelu. Důvodem je právě dobrá adheze mezi oběma komponentami, při které HAP odlehčuje kolagenovou výztuž od působícího napětí a deformace není tolik výrazná.

V případě vzorků CH15 a CH21, které obsahují více HAP než kolagenové matrice opět hovoříme o smykovém „zahuštění“, ovšem vznik gelu je zpomalován právě nadbytkem

HAP. Přítomnost HAP brání molekulám kolagenu, jež jsou od sebe odděleny spojitou fází rozpouštědla, aby se spojily resp. aby proběhla účinná srážka. Vyšší smykové napětí, na rozdíl od čistého hydrogelu zorientuje částice tak, že vzniknou asociační struktury.



***Obrázek 25**: Porovnání hodnot viskozit pro vzorky kolagenu s příměsí HAP o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 37 °C při třech různých smykových rychlostech. Obsah kolagenu ve vzorcích v rozsahu 0,642 – 2,412 mg/ml a obsah HAP 0,302 – 2,246 mg/ml.*

4.3 Konformační přechod helix – globule

Molekuly kolagenu ve vodném roztoku reagují na změnu teploty transformací z nativní triple-helikální šroubovnice stabilizované vodíkovými můstky do neuspořádané formy makromolekulárního klubka. Tato transformace je běžně pozorovatelná z měření viskozit a to v závislosti na měnící se teplotě a koncentraci.

Z porovnání naměřených viskozit vzorků při 4 a 37 °C lze pozorovat, že při nižší teplotě jsou viskozity jednotlivých vzorků vyšší. Částečným důvodem je, že voda nacházející se v systému má při teplotách blížících se nule nejvyšší hodnotu viskozity, ovšem hlavním důvodem je tvar molekul kolagenu. Helix, jakožto tyčinkovitý útvar vykazuje díky své asymetrii větší odpor vůči toku. Zahříváním systému na teplotu 37 °C dochází k narušení vazeb a protein získává pružnější strukturu globule, jež má menší odpor vůči toku (nehovoříme ještě o statickém klubku). U vzorků pozorujeme postupné snižování viskozity s rostoucí teplotou.

5 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce byla zaměřena na popis chování vzorků kolagenu a jejich nanokompozitů různých koncentrací o fyziologickém pH. Měření bylo prováděno na reometru pomocí měřící geometrie kužel – deska při dvou teplotách v rozsahu smykového namáhání 0 s^{-1} až 100 s^{-1}.

V rámci studované problematiky byla vypracována literární rešerše shrnující dosavadní poznatky o struktuře a vlastnostech kolagenu, jež jsou základem pro pochopení strukturálních změn. Její součástí je také výčet základních reologických modelů, podle nichž lze posoudit, jaká bude odezva látky na mechanické zatížení.

V experimentální části byly z naměřených výsledků zpracovány viskozitní a tokové křivky pro teplotu 4 °C, kdy si kolagen v připravených vzorcích o daném složení zachovává rozpustnost a pro 37 °C, představující fyziologickou teplotu. Zahříváním vodného roztoku kolagenu docházelo k spontánnímu procesu zesítění. Fibrily vytvářely opěrnou strukturu hydrogelu, přičemž rychlost jeho vzniku závisela na obsahu kolagenových vláken ve vzorku.

Při 4 °C vykazovali tokové křivky vzorků čistého kolagenu i jejich nanokompozitů newtonský charakter. Přítomnost HAP ve vzorcích o vyšším obsahu kolagenu se projevovala výztužnými účinky, neboť při stejných smykových rychlostech docházelo k posunu k vyšším hodnotám smykového napětí. U vzorku se složením 0,642 mg/ml kolagenu a 2,246 mg/ml HAP byl posun nepatrný, díky nedostatečnému množství kolagenu případající na vyšší obsah nanočástic, čímž se prokázala neefektivita tohoto složení.

Látka newtonského charakteru vykazuje nezávislost na rychlostním gradientu, tudíž hodnoty viskozit spočtené přístrojem nebyly vhodné pro interpretaci dat. Pro posouzení skutečné viskozity byly tokové křivky vzorků proloženy spojnicemi trendu a ze zobrazených rovnic regresí byla získána viskozita jako směrnice přímky. Viskozita pro všechny vzorky vykazovala konstantní závislost na smykové rychlosti resp. na čase. Částice, jejichž rychlost je ovlivňována teplotou, neměli dostatečnou kinetickou energii pro účinnou srážku, a tudíž se zde neobjevily žádné struktury, které by se působením smykového napětí rozrušovaly. Viskozita vzorků obsahujících HAP je vyšší oproti vzorkům čistého kolagenu, což je způsobeno právě jeho přítomností, neboť vykazuje větší odpor vůči toku.

Při teplotě 37 °C byla pozorována fázová inverze. Vzorky s obsahem kolagenu 2,412 a 1,846 mg/ml tvořily po ekvilibraci již hydrogel, naopak u vzorků s 1,257 mg/ml a 0,642 mg/ml vznikal gel postupně mechanickým namáháním. Vzorky čistého kolagenu i jejich nanokompozitů vykazovaly pseudonewtonský charakter, tzn. odolávaly působení smykového napětí až do určité hodnoty smykové rychlosti, kde docházelo k přetransformování struktury. U koncentrovaných disperzí tato transformace souvisela s rozpadem polymerní sítě, u zředěných docházelo působením smykového napětí k lepšímu zorientování vláken a vytváření mikrofibril vedoucímu až ke vzniku sítě. Po této transformaci se struktura nově ustálila a opět si zachovávala svůj newtonský charakter.

Výztužné účinky související s přítomností HAP se projevovaly následujícími způsoby: na rozdíl od hydrogelu čistého kolagenu nastávala změna struktury u vzorku s nejvyšším obsahem kolagenu a 0,302 mg/ml HAP až při vyšších hodnotách smykové rychlosti. Změna struktury v rozsahu měření 0 až 100 s^{-1} nastávala pouze dvakrát na rozdíl od hydrogelu bez nanočástic. V případě vzorku s obsahem 1,846 mg/ml kolagenu a 0,923 mg/ml HAP

nastávala změna struktury při stejné smykové rychlosti jako u čistého hydrogelu s totožným obsahem kolagenu, struktura gelu se však už díky HAP v tomto rozsahu dále neměnila. Odolnost vzorku vůči deformaci se projevovala i tím, že v případě nanokompozitního hydrogelu bylo na stejnou deformaci potřeba většího smykového napětí. U vzorků s vyšším obsahem HAP se přítomnost nanočástic projevoval zcela analogicky.

S transformací struktury docházelo i ke změně viskozity. U koncentrovaných disperzí smykem vyvolané strukturální změny vedly k morfologickým změnám gelu nebo-li „řídnutí“ sítě. Přídavkem HAP nebyla tato změna tolik dramatická, díky dobré adhezi mezi oběma komponentami, při které HAP odlehčoval kolagenovou výztuž od působícího napětí. U vzorku s obsahem kolagenu 1,257 a 0,642 mg/ml se naopak projevovalo smykového „zahuštění“, kdy docházelo k vlastní montáži kolagenových vláken z roztoku, při níž se spojováním molekulárních řetězců v souvislou strukturu vytvářela a postupně zpevňovala prostorová síť. Přítomnost HAP zpomaloval vznik gelu, jelikož bránil molekulám kolagenu, aby se spojily resp. aby proběhla účinná srážka. Až vyšší smykové napětí ve srovnání s čistým hydrogelem vhodně zorientovalo částice za vzniku asociačních struktur.

Měřením po dalších 90 minutách ekvilibrace bez působení napětí bylo prokázáno, že se viskozity systému blížily původní hodnotě. U koncentrované disperze se obnovily počáteční struktury, naopak u disperze zředěné se spojení molekul rozvolnilo.

Molekuly kolagenu ve vodném roztoku reagovali na změnu teploty transformací z nativní triple-helikální šroubovnice stabilizované vodíkovými můstky do pružnější struktury globule. Tato transformace byla pozorovatelná z porovnání viskozit vzorků při jednotlivých teplotách. Při 4 °C byly viskozity vyšší, jelikož voda při této teplotě má vyšší hodnotu viskozity, ale také tyčinkovitý tvar helixu vykazuje větší odpor vůči toku než globule.

Poznatky shrnuty v této práci jsou pouze základem pro další výzkum kolagenu, jeho interakcí s HAP a faktorů ovlivňujících jejich stabilitu či účinnost.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

6.1 Seznam zkratek

ECM	extracelulární matrix
Gly	glycin
HAP	hydroxyapatit
Hyp	hydroxyprolin
PBS	dulbecco's phosphate buffered saline
Pro	prolin

6.2 Seznam symbolů

α	úhel mezi deskou a kuželem v geometrickém upořádání kužel – deska
$\dot{\gamma}$	rychlost deformace (rychlost smyku, smykový spád)
η	dynamická viskozita
υ	kinematická viskozita
ρ	hustota tekutiny
τ	smykové (tečné) napětí
τ_K	mez toku (kluzu)
ω	úhlová rychlost rotujícího kužele
A	plocha desky, na níž působí smyková síla
du	vzájemná rychlost pohybu smykových rovin vzdálených o dx
$\vec{F}$	smyková síla vyvolávající pohyb desky
K	součinitel (koeficient) konzistence kapaliny
M	moment síly
n	index (nebo exponent) toku
R	poloměr kužele v geometrickém upořádání kužel – deska
T_d	denaturační teplota přechodu kolagen-želatina
T_g	teplota smrštění (teplota tání kolagenu v krystalických oblastech)
V_c ⊙	celkový objem roztoku

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] YANG, Y., KAUFMAN, L.J. Rheology and Confocal Reflectance Microscopy as Probes of Mechanical Properties and Structure during Collagen and Collagen/Hyaluronan Self-Assembly. *Biophysical Journal*. 2009, roč. 96, č. 4, s. 1566-1585.

[2] MANDAL, A. Collagen: What is collagen. *The Medical News: Latest Medical News and Research from Around the World* [online]. 2013 [cit. 2013-12-21]. Dostupné z: <http://www.news-medical.net/health/Collagen-What-is-Collagen.aspx>

[3] WANG, L., LIANG, Q., WANG, Z., XU, J., LIU, Y., MA, H. Preparation and characterisation of type I and V collagens from the skin of Amur sturgeon (Acipenser schrenckii). *Food Chemistry*. 2014, roč. 148, s. 410-414.

[4] CUI, F.Z, JUN, G., YAN, L. Self-assembly of mineralized collagen composites. *Materials Science and Engineering: Reports*. 2007, roč. 57, 1-6, s. 1-27.

[5] FRIESS, WOLFGANG. Collagen - biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1998, roč. 45, č. 2, s. 113-136.

[6] OLSEN, D., YANG, C., BODO, M., CHANG, R., LEIGH, S., aj. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003, roč. 55, č. 12, s. 1547-1567.

[7] MANDAL, A. Collagen Types and Linked Disorders. *The Medical News: Latest Medical News and Research from Around the World* [online]. 2013 [cit. 2013-12-21]. Dostupné z: <http://www.news-medical.net/health/Collagen-Types-and-Linked-Disorders.aspx>

[8] BROWN, E.M. Development and utilization of a bovine type I collagen microfibril model. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013, roč. 53, s. 20-25.

[9] FATHIMA, N.N., DHATHATHREYAN, A., RAMASAMI, T., MILLER, R. Degree of crosslinking of collagen at interfaces: Adhesion and shear rheological indicators. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2011, roč. 48, č. 1, s. 67-73.

[10] YASUDA, T., TCHETINA, E., OHSAWA, K., ROUGHLEY, P.J., WU, W., MOUSA, A. Peptides of type II collagen can induce the cleavage of type II collagen and aggrecan in articular cartilage. *Matrix Biology*. 2006, roč. 25, č. 7, s. 419-429.

[11] Kolagen-Pevnost-Integrita-Struktura. ORLING S.R.O. *Originální české doplňky stravy a doplňková krmiva* [online]. Ústí nad Orlicí [cit. 2013-12-23]. Dostupné z: <http://www.orling.cz/>

[12] KWANSA, A.L., VITTA, R.D., FREEAMN, J.W. Mechanical recruitment of N- and C-crosslinks in collagen type I. *Matrix Biology*. 2013.

[13] HOLMES, D.F., GRAHAM, H.K., TROTTER, J.A., KADLER, K.E. STEM/TEM studies of collagen fibril assembly. *Micron*. 2001, roč. 32, č. 3, s. 273-285.

[14] MANDAL, A. Collagen Molecular Structure. *The Medical News: Latest Medical News and Research from Around the World* [online]. 2013 [cit. 2013-12-21]. Dostupné z: <http://www.news-medical.net/health/Collagen-Molecular-Structure.aspx>

[15] CISNEROS, D.A., HUNG, C., FRANZ, C.M., MULLER, D.J. Observing growth steps of collagen self-assembly by time-lapse high-resolution atomic force microscopy. *Journal of Structural Biology*. 2006, roč. 154, č. 3, s. 232-245.

[16] KADLER, K.E., HOLMES, D.F., TROTTER, J.A., CHAPMANN, J.A. Collagen fibril formation. *Biochemical Journal*. 1996, roč. 316, s. 1-11.

[17] HABERMEHL, Jason. Collagen. In: *Université Laval: Accueil* [online]. Québec, 2005 [cit. 2013-12-25]. Dostupné z: <http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/23201/ch01.html>

[18] MANDAL, A. Collagen Synthesis. *The Medical News: Latest Medical News and Research from Around the World* [online]. 2013 [cit. 2014-01-19]. Dostupné z: <http://www.news-medical.net/health/Collagen-Synthesis.aspx>

[19] PARKINSON, J., KADLER, K.E., BRASS, A. Simple Physical Model of Collagen Fibrillogenesis Based on Diffusion Limited Aggregation. *Journal of Molecular Biology*. 1995, roč. 247, č. 4, s. 823-831.

[20] SHOULDERS, M.D., RAINES, R.T. Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry*. 2009, roč. 78, s. 929-958.

[21] PETERKOVÁ, P., LAPČÍK, L. Kolagen - Vlastnosti, modifikace a aplikace. *Chemické listy*. 2000, roč. 94, s. 371-379.

[22] FRATZL, Peter. *Collagen: Structure and Mechanics* [online]. Springer, 2008 [cit. 2014-04-22]. ISBN 978-0-387-73905-2.

[23] Advanced BioMatrix: Innovative 3D Matrix Products. ADVANCED BIOMATRIX, Inc. [online]. San Diego [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://www.advancedbiomatrix.com/>

[24] Cosmobio Co., Ltd.: Inspiration for Life Science. COSMO BIO, Co. [online]. Japan, 1997, 2014 [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://www.cosmobio.co.jp/>

[25] LIBONATI, F., NAIR, A.K., VERGANI, L., BUEHLER, M.J. Fracture mechanics of hydroxyapatite single crystals under geometric confinement. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2013, roč. 20, s. 184-191.

[26] DHAND, V., RHEE, K.Y., PARK, S.J. The facile and low temperature synthesis of nanophase hydroxyapatite crystals using wet chemistry. *Materials Science and Engineering: C*. 2014, roč. 36, s. 152-159.

[27] PARK, J. Hydroxyapatite. *Bioceramics: Properties, Characterizations and Applications*. 2008, s. 192-203.

[28] CHANG, C., PENG, N., HE, M., TERAMOTO, Y., NISHIO, Y., ZHANG, L. Fabrication and properties of chitin/hydroxyapatite hybrid hydrogels as scaffold nano-materials. *Carbohydrate Polymers*. 2013, roč. 91, č. 1, s. 7-13.

[29] CHEN, L., HU, J., RAN, J., SHEN, X., TONG, H. Preparation and evaluation of collagen-silk fibroin/hydroxyapatite nanocomposites for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014, roč. 65, s. 1-7.

[30] FAN, Y., DUAN, K., WANG, R. A composite coating by electrolysis-induced collagen self-assembly and calcium phosphate mineralization. *Biomaterials*. 2005, roč. 26, č. 14, s. 1623-1632.

[30] JIA, L., DUAN, Z., FAN, D., MI, Y., HUI, J., CHANG, L. Human-like collagen/nano-hydroxyapatite scaffolds for the culture of chondrocytes. *Materials Science and Engineering: C*. 2013, roč. 33, s. 727-734.

[32] WALTERS, B.D., STEGEMANN, J.P. Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales. *Acta Biomaterialia*. 2013.

[33] BUSBY, G.A., GRANT, M.H., MACKAY, S.P., RICHES, P.E. Confined compression of collagen hydrogels. *Journal of Biomechanics*. 2013, roč. 46, č. 4, s. 837-840.

[34] YANG, X., GUO, L., FAN, Y., ZHANG, X. Preparation and characterization of macromolecule cross-linked collagen hydrogels for chondrocyte delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013, roč. 61, s. 487-493.

[35] PIRKL, S. Reologie a reometrie kapalin. [online]. [cit. 2014-02-01]. Dostupné z: <http://kf.upce.cz/st_literatura.html>

[36] UFMI.FT.UTB. Tokové chování polymerních tavenin: Rologické modely. [online]. [cit. 2014-02-01]. Dostupné z: <http://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika_pol/FP_02.pdf>

[37] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M. *Co je co v povrchové a koloidní chemii: Výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2014-02-01].

[38] UFMI.FT.UTB. Měření tokových vlastností. [online]. [cit. 2014-02-02]. Dostupné z: <http://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika_pol/FP_05.pdf>

[39] TA INSTRUMENTS. *AR & ARES Rheometer: Certified User Course I*. USA, 2006.

[40] DINESH, R.K., SHASHINDRA, M.P., KAPLANA, S.K. Directional dependence of hydroxyapatite-collagen interactions on mechanics of collagen. *Journal of Biomechanics*. 2010, roč. 43, č. 9, s. 1723-1730.

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Závislost dynamické viskozity na složení roztoku pro vzorky kolagenu s příměsí HAP o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 4 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích v rozsahu 0,642 – 2,412 mg/ml a obsahem HAP 0,302 – 2,246 mg/ml.

Příloha 2 Tokové křivky pro vzorky čistého kolagenu bez příměsi o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 37 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích 1,846 a 2,412 mg/ml. Ekvilibrace vzorků 40 min, měřící geometrie kužel – deska. Znázornění lineárních spojnic trendu pro jednotlivé úseky smykových rychlostí pro zjištění lokálních viskozit.

Příloha 3 Rovnice regrese a výsledné viskozity pro tokové křivky (*příloha 2*).

Příloha 4 Tokové křivky pro vzorky čistého kolagenu bez příměsi o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 37 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích 0,642 a 1,257 mg/ml. Ekvilibrace vzorků 40 min, měřící geometrie kužel – deska. Znázornění lineárních spojnic trendu pro jednotlivé úseky smykových rychlostí pro zjištění lokálních viskozit.

Příloha 5 Rovnice regrese a výsledné viskozity pro tokové křivky (*příloha 4*).

Příloha 6 Tokové křivky pro vzorky čistého kolagenu bez příměsi o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 37 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích 0,642 a 2,412 mg/ml. Měření po 40-ti minutové ekvilibraci a po dalších 90 minutách, měřící geometrie kužel – deska.

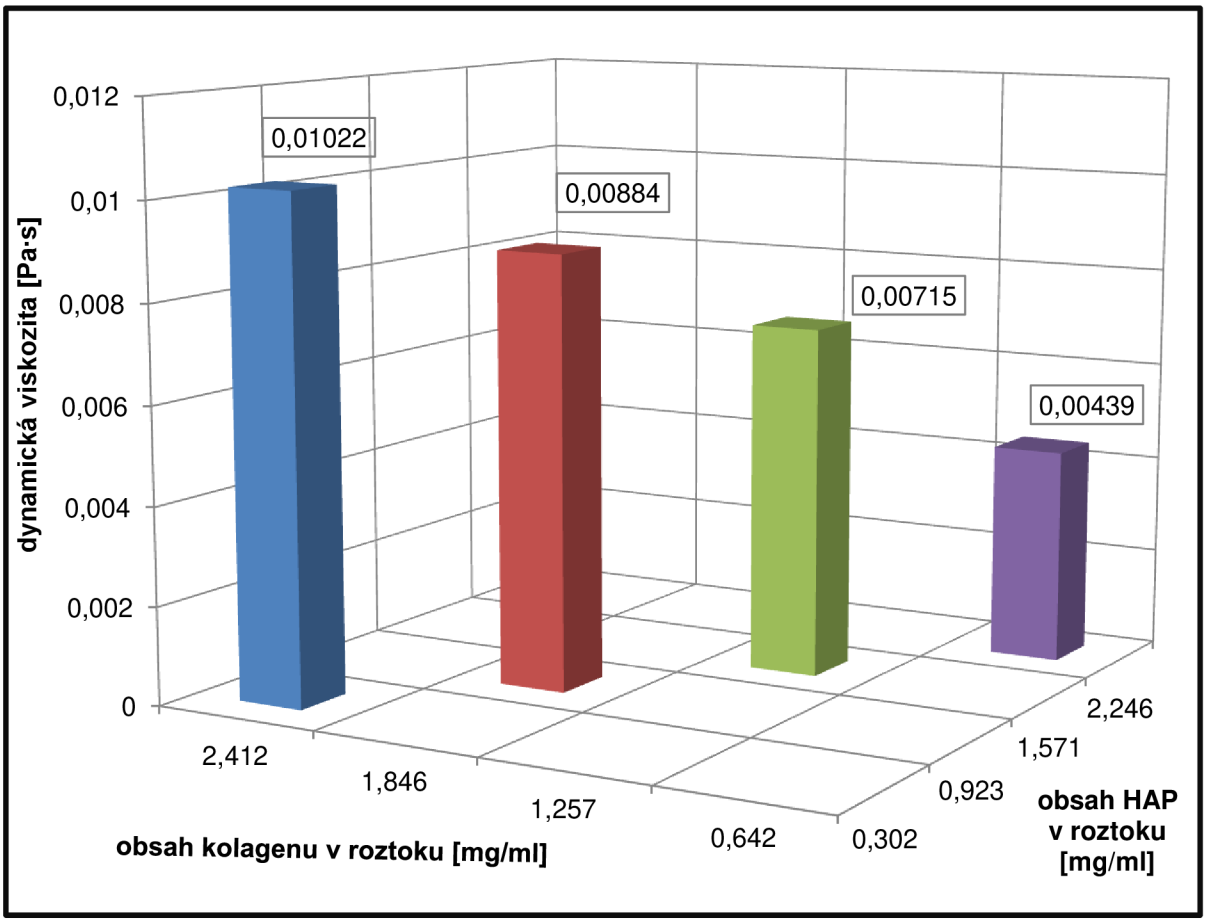
Příloha 7 Tokové křivky pro vzorky kolagenu s příměsí HAP o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 37 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích 1,846 a 2,412 mg/ml a obsahem HAP 0,302 a 0,923 mg/ml. Ekvilibrace vzorků 40 min, měřící geometrie kužel – deska. Znázornění lineárních spojnic trendu pro jednotlivé úseky smykových rychlostí pro zjištění lokálních viskozit.

Příloha 8 Rovnice regrese a výsledné viskozity pro tokové křivky (*příloha 7*).

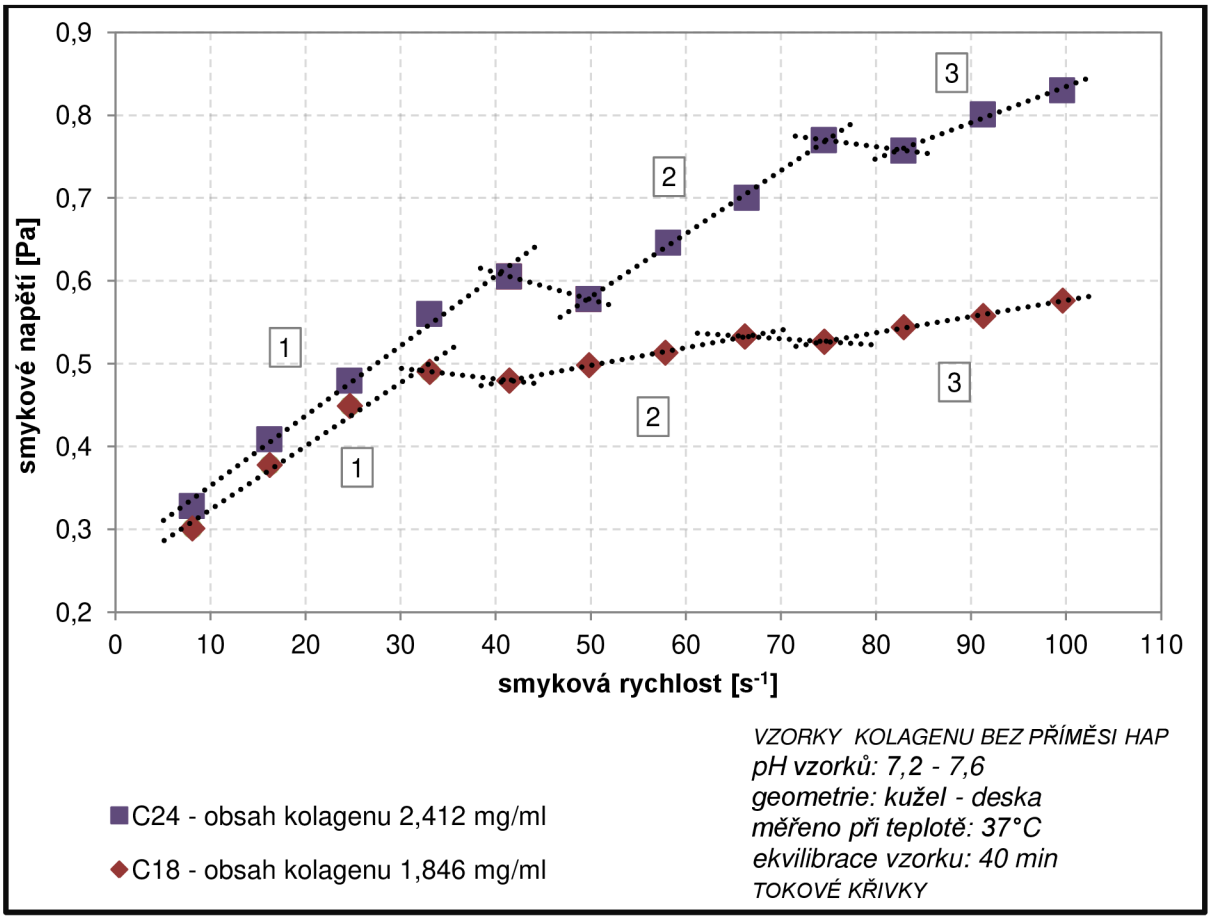
Příloha 9 Tokové křivky pro vzorky kolagenu s příměsí HAP o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 37 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích 1,257 a 0,642 mg/ml a s obsahem HAP 1,271 a 2,246 mg/ml. Ekvilibrace vzorků 40 min, měřící geometrie kužel – deska. Znázornění lineárních spojnic trendu pro jednotlivé úseky smykových rychlostí pro zjištění lokálních viskozit.

Příloha 10 Rovnice regrese a výsledné viskozity pro tokové křivky (*příloha 9*).

9 PŘÍLOHY



***Příloha 1**: Závislost dynamické viskozity na složení roztoku pro vzorky kolagenu s příměsí HAP o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 4 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích v rozsahu 0,642 – 2,412 mg/ml a obsahem HAP 0,302 – 2,246 mg/ml.*

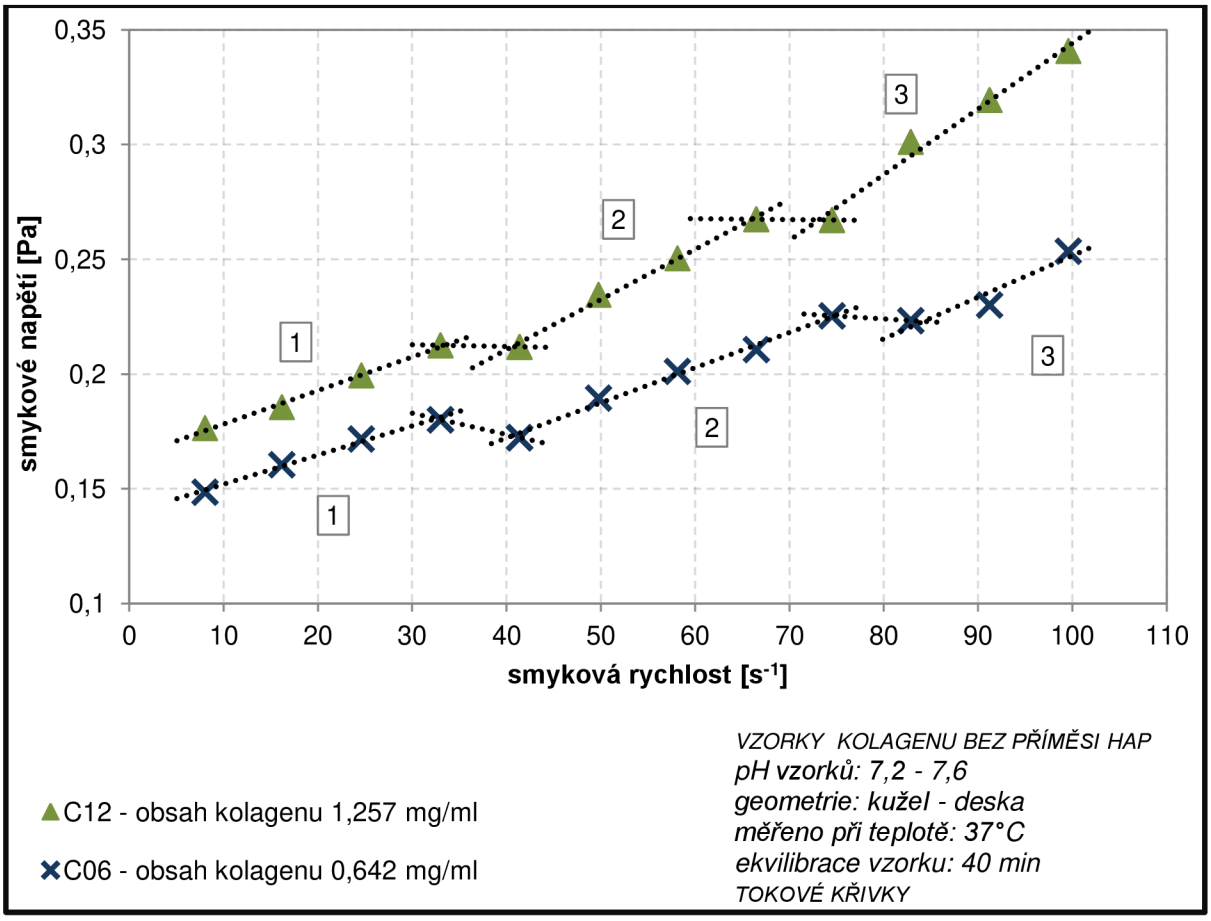


***Příloha 2**: Tokové křivky pro vzorky čistého kolagenu bez příměsi o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 37 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích 1,846 a 2,412 mg/ml. Ekvilibrace vzorků 40 min, měřící geometrie kužel – deska. Znázornění lineárních spojnic trendu pro jednotlivé úseky smykových rychlostí pro zjištění lokálních viskozit.* [3]

***Příloha 3**: Rovnice regrese a výsledné viskozity pro tokové křivky (příloha 2).*

Úsek	Rovnice regrese	Hodnota spolehlivosti	Viskozita [Pa·s]
C24 – OBSAH KOLAGENU 2,412 mg/ml			
1	$y = 0{,}0084x + 0{,}2684$	$R^2 = 0{,}992$	0,0084
2	$y = 0{,}0076x + 0{,}1989$	$R^2 = 0{,}998$	0,0076
3	$y = 0{,}0044x + 0{,}3983$	$R^2 = 0{,}987$	0,0044
C18 – OBSAH KOLAGENU 1,846 mg/ml			
1	$y = 0{,}0077x + 0{,}2475$	$R^2 = 0{,}982$	0,0077
2	$y = 0{,}0021x + 0{,}3917$	$R^2 = 0{,}998$	0,0021
3	$y = 0{,}0019x + 0{,}3819$	$R^2 = 0{,}997$	0,0019

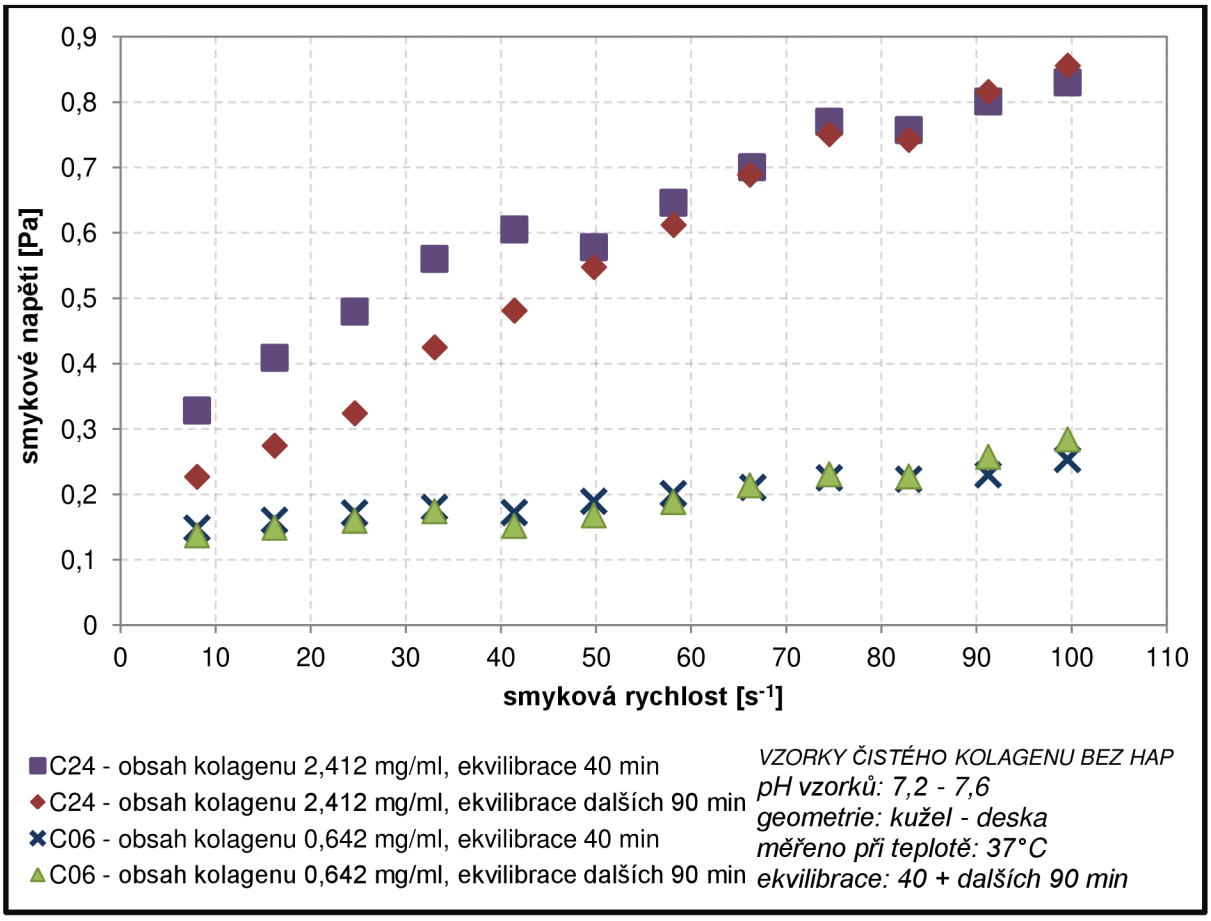
[3] Čísla v rámečcích odpovídají příslušným rovnicím regrese v tabulce (*příloha 3*).



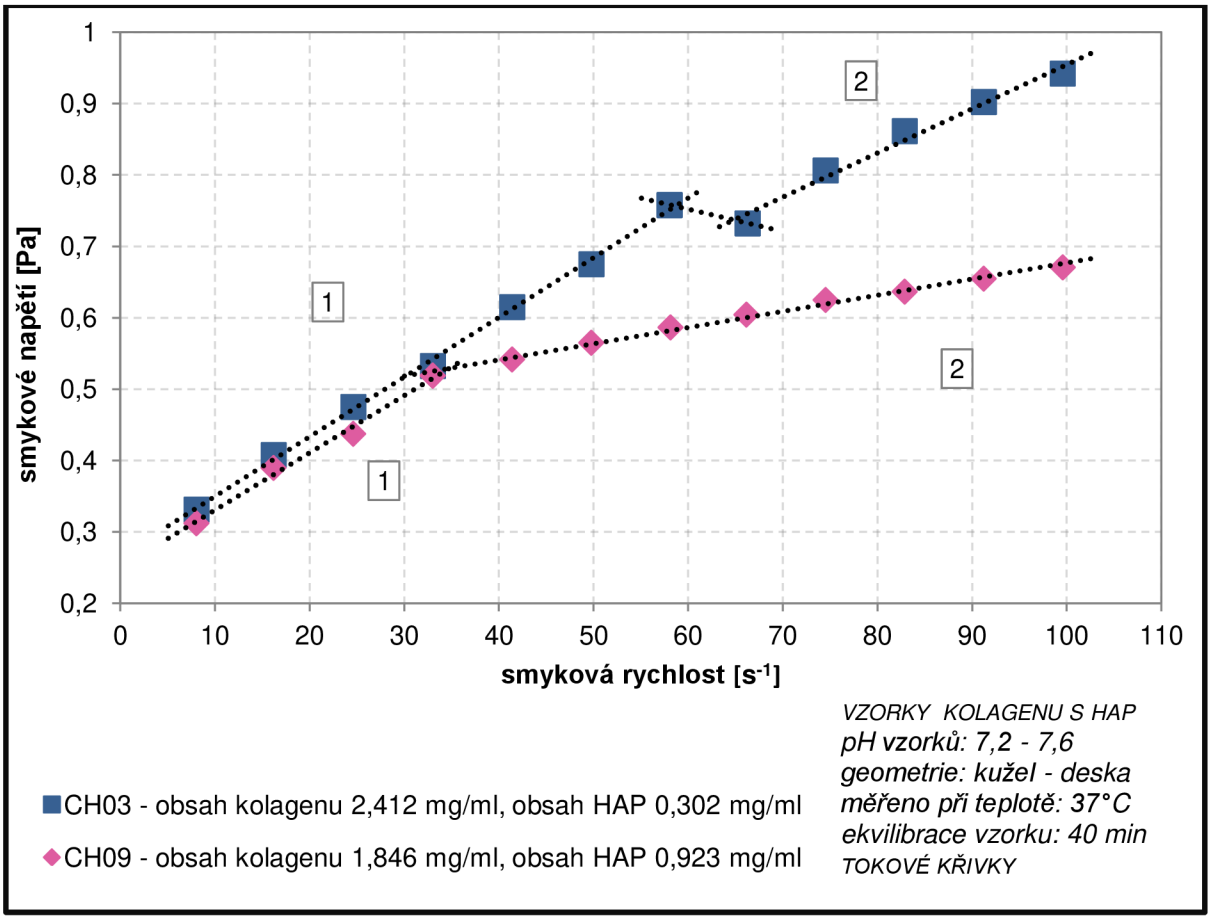
***Příloha 4**: Tokové křivky pro vzorky čistého kolagenu bez příměsi o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 37 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích 0,642 a 1,257 mg/ml. Ekvilibrace vzorků 40 min, měřící geometrie kužel – deska. Znázornění lineárních spojnic trendu pro jednotlivé úseky smykových rychlostí pro zjištění lokálních viskozit.*

***Příloha 5**: Rovnice regrese a výsledné viskozity pro tokové křivky (příloha 4).*

Úsek	Rovnice regrese	Hodnota spolehlivosti	Viskozita [Pa·s]
C12 – OBSAH KOLAGENU 1,257 mg/ml			
1	$y = 0{,}0015x + 0{,}1635$	$R^2 = 0{,}994$	0,0015
2	$y = 0{,}0022x + 0{,}1233$	$R^2 = 0{,}993$	0,0022
3	$y = 0{,}0029x + 0{,}0578$	$R^2 = 0{,}980$	0,0029
C06 – OBSAH KOLAGENU 0,642 mg/ml			
1	$y = 0{,}0013x + 0{,}1390$	$R^2 = 0{,}992$	0,0013
2	$y = 0{,}0015x + 0{,}1107$	$R^2 = 0{,}990$	0,0015
3	$y = 0{,}0018x + 0{,}0702$	$R^2 = 0{,}909$	0,0018



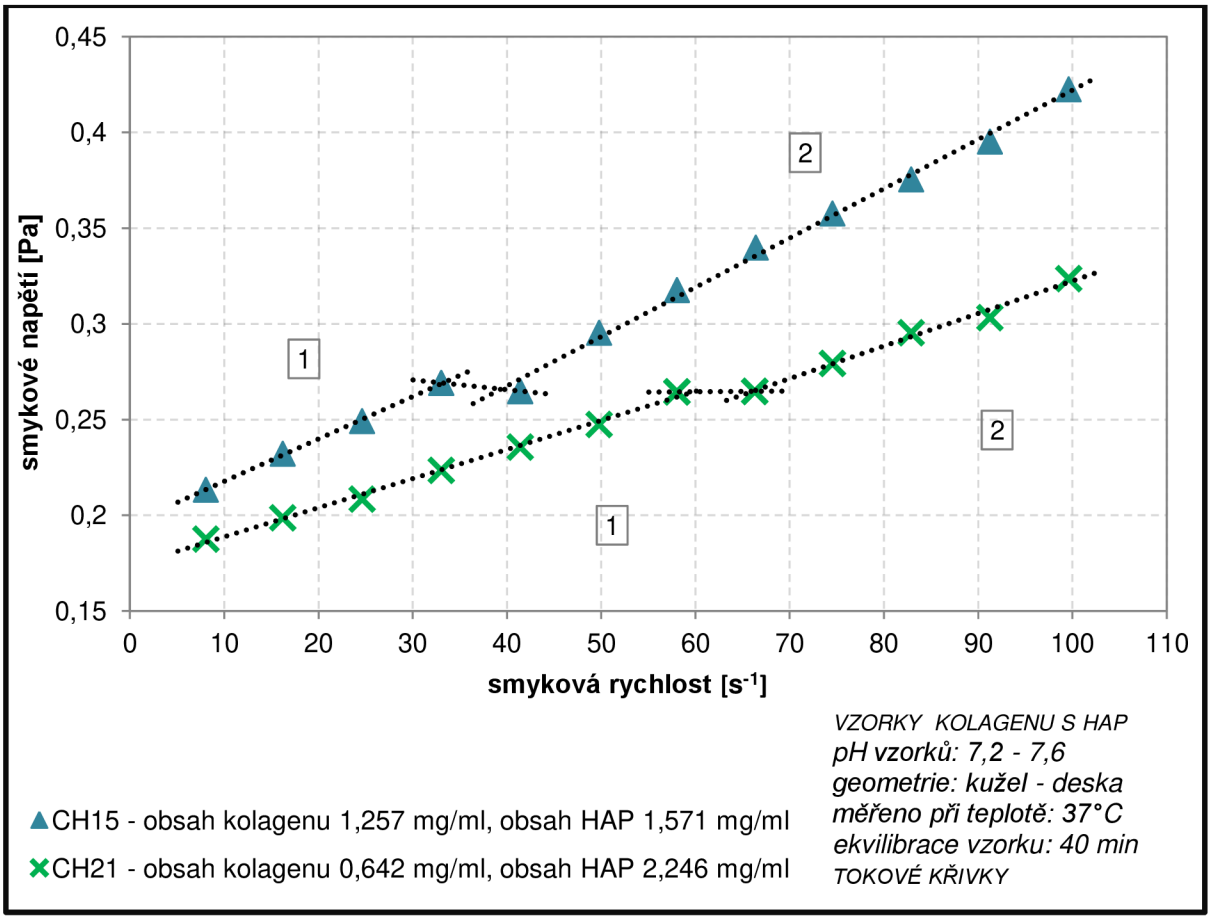
***Příloha 6**: Tokové křivky pro vzorky čistého kolagenu bez příměsi o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 37 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích 0,642 a 2,412 mg/ml. Měření po 40-ti minutové ekvilibraci a po dalších 90 minutách, měřící geometrie kužel – deska.*



***Příloha 7**: Tokové křivky pro vzorky kolagenu s příměsí HAP o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 37 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích 1,846 a 2,412 mg/ml a obsahem HAP 0,302 a 0,923 mg/ml. Ekvilibrace vzorků 40 min, měřící geometrie kužel – deska. Znázornění lineárních spojnic trendu pro jednotlivé úseky smykových rychlostí pro zjištění lokálních viskozit.*

***Příloha 8**: Rovnice regrese a výsledné viskozity pro tokové křivky (příloha 7).*

Úsek	Rovnice regrese	Hodnota spolehlivosti	Viskozita [Pa·s]
CH03 – OBSAH KOLAGENU 2,412 mg/ml, OBSAH HAP 0,302 mg/ml			
1	$y = 0{,}0084x + 0{,}2662$	$R^2 = 0{,}998$	0,0084
2	$y = 0{,}0062x + 0{,}3362$	$R^2 = 0{,}980$	0,0062
CH09 – OBSAH KOLAGENU 1,846 mg/ml, OBSAH HAP 0,923 mg/ml			
1	$y = 0{,}0080x + 0{,}2507$	$R^2 = 0{,}990$	0,0080
2	$y = 0{,}0023x + 0{,}4505$	$R^2 = 0{,}993$	0,0023



***Příloha 9**: Tokové křivky pro vzorky kolagenu s příměsí HAP o fyziologickém pH v rozmezí 7,2 – 7,6 při 37 °C. Obsah kolagenu ve vzorcích 1,257 a 0,642 mg/ml a s obsahem HAP 1,271 a 2,246 mg/ml. Ekvilibrace vzorků 40 min, měřící geometrie kužel – deska. Znázornění lineárních spojnic trendu pro jednotlivé úseky smykových rychlostí pro zjištění lokálních viskozit.*

***Příloha 10**: Rovnice regrese a výsledné viskozity pro tokové křivky (příloha 9).*

Úsek	Rovnice regrese	Hodnota spolehlivosti	Viskozita [Pa·s]
CH15 – OBSAH KOLAGENU 1,257 mg/ml, OBSAH HAP 1,571 mg/ml			
1	$y = 0{,}0022x + 0{,}1957$	$R^2 = 0{,}999$	0,0022
2	$y = 0{,}0026x + 0{,}1647$	$R^2 = 0{,}994$	0,0026
CH21 – OBSAH KOLAGENU 0,642 mg/ml, OBSAH HAP 2,246 mg/ml			
1	$y = 0{,}0015x + 0{,}1735$	$R^2 = 0{,}995$	0,0015
2	$y = 0{,}0017x + 0{,}1524$	$R^2 = 0{,}983$	0,0017