

# KOLAGEN – VLASTNOSTI, MODIFIKACE A APLIKACE

PETRA PETERKOVÁ<sup>a</sup> a LUBOMÍR LAPČÍK, Jr.<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav fyzikální a spotřební chemie, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno, e-mail: peterkova@fch.vutbr.cz, <sup>b</sup>Ústav fyziky a materiálového inženýrství, Fakulta technologická, Vysoké učení technické v Brně, nám. TGM 275, 762 72 Zlín, e-mail: lapcik@zlin.vutbr.cz

Došlo dne 10.VI.1999

Klíčová slova: kolagen, vlastnosti, modifikace, využití

## Obsah

1. Úvod
2. Makromolekulární charakter
  - 2.1. Struktura a složení
  - 2.2. Biosyntéza
  - 2.3. Nebílkovinné komponenty
  - 2.4. Fyzikálně chemické vlastnosti
    - 2.4.1. Polyelektrolytický charakter
    - 2.4.2. Botnání
    - 2.4.3. Denaturace a renaturace
    - 2.4.4. Hydrotermální stabilita
    - 2.4.5. Hydratace kolagenu
    - 2.4.6. Přeměna na želatinu
  - 2.5. Roztok kolagenu
3. Degradace
  - 3.1. Hydrolytická degradace
  - 3.2. Enzymatická degradace
  - 3.3. Oxidační štěpení
4. Chemická modifikace
  - 4.1. Reakce s monofunkčními reagenty
    - 4.1.1. Acylace
    - 4.1.2. Esterifikace
    - 4.1.3. Deaminace
    - 4.1.4. Deguanidinace
  - 4.2. Reakce vedoucí ke tvorbě síťovaného gelu
    - 4.2.1. Aldehydová kondenzace
    - 4.2.2. Oxidace jodistanem
  - 4.3. Reakce se syntetickými polymery – povrchová imobilizace
5. Biomedicínské aplikace

## 1. Úvod

Kolagen je rozšířen v celé říši živých organismů s výjimkou jednobuněčných a patří mezi technicky nejdůležitější vláknité bílkoviny. Je hlavní složkou pojivových tkání, kterým zajišťuje správnou funkci, zejména v souvislosti s jejich mechanickými vlastnostmi<sup>1</sup>. To je dáno jeho specifickou struktu-

rou, charakteristickou vysokým stupněm vnitřní organizace molekul. Kolagen představuje 25–30 % všech bílkovin v těle. Tvoří hlavní organickou složku kůže, kostí, chrupavek, šlach a vaziva. Je rovněž významnou součástí cévních stěn, bazálních membrán a rohovek. Má opěrnou a ochrannou funkci a patří, zejména jako složka mezibuněčné hmoty, ke klíčovým proteinům životních pochodů ve zdravém i v nemocném organismu.

Kolagen je obnovitelnou surovinou a jeho zdroje jsou téměř neomezené. Je proto snaha neustále zdokonalovat preparáty z něho vyráběné a hledat nové možnosti jejich zpracování a využití. Kromě toho, že je kolagen hlavní surovinou kožedělného průmyslu pro výrobu usní (ročně se zpracují asi 4 mil. tun kolagenu<sup>2</sup>), využívá se v řadě dalších oborů. Přehled využití je uveden v tabulce I. Četné aplikace vyplývají z „fyzilogické blízkosti“ nebo dokonce identity aplikovaného kolagenu s tělesným kolagenem, resorbovatelnosti a schopnosti zadržovat vodu.

## 2. Makromolekulární charakter

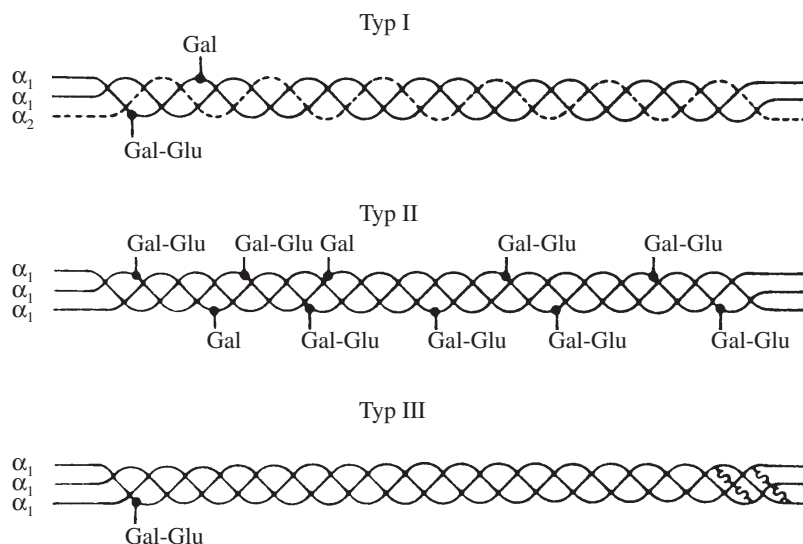
### 2.1. Struktura a složení

Charakteristickou vlastností molekuly kolagenu je pevnost a trojřetězcová helikální (spirálovitá) struktura. Tři kolagenové polypeptidové makromolekuly, nazývané  $\alpha$ -řetězce (z nichž každý obsahuje kolem 1000 aminokyselinových zbytků (AMK) a měří asi 280 nm), se společně stáčí do pravidelné pravotočivé superšroubovice (obr. 1). Úplná otáčka trojitě spirály obsahuje 30 AMK zbytků. Superšroubovice tak tvoří kolagenovou molekulu s délkou asi 300 nm a průměrem 1,5 nm.  $\alpha$ -Řetězce jsou spirálovitě stočeny ve směru od N-kon-

Tabulka I

Strukturální hierarchie kolagenu a přiřazené obory použití

| Strukturální rovina   | Obor použití / produkty   |
|-----------------------|---|
| Pletivo vláken/plocha | výroba usní, krytí ran, náhrada pokožky (kožní implantáty), náhrada cév   |
| Vlákná                | střívká z kolagenových past, obalové fólie, membrány, hemostyptika, prášek na rány  |
| Fibrily               | biokompatibilní plastové nebo keramické materiály, kostní a čelistní chirurgie  |
| Makromolekuly         | nativní kolagen, atelokolagen, desamidokolagen pro kosmetiku a medicínu   |
| Polypeptidy           | želatina, klíž, hydrolyzáty kolagenu, expandéry plasmy, kapsule, želatinační prostředky, tensidy, emulgátory, zahušňovačla, krmiva, hnojiva |



Obr. 1. Schéma tří typů kolagenu. Je patrné rozdílné zastoupení jednotlivých typů polypeptidových řetězců a různý stupeň glykosylace. Disulfidové síťování je naznačeno jen u typu III (převzato z cit.<sup>20</sup> s laskavým svolením Wiley & Sons, Inc., Copyright 1987)

cové skupiny k C-koncové skupině a jsou levotočivé. Molekuly jsou extrémně bohaté na glycin (26 až 28 %) a prolin (nad 15 %). Z prostorových důvodů leží glycinové zbytky uvnitř trojitě spirály (jsou dostatečně malé pro obsazení vnitřního prostoru) a tím umožňují, aby se tři  $\alpha$ -řetězce těsně semkly do konečného kolagenového superhelixu. Prolin, díky své kruhové struktuře, umožňuje vytvořit levotočivou konformaci každého  $\alpha$ -řetězce, s třemi AMK zbytky na otáčku<sup>3</sup>. Přehled proteinogenních AMK shrnuje tabulka II.

Polypeptidový řetězec tvoří opakující se jednotky tripeptidů: (Gly-X-Y)<sub>n</sub>, kde X a Y jsou jakékoliv AMK, zpravidla je jednou z nich prolin. Oblasti, tvořené AMK s nízkou molární hmotností, je možno považovat za krystalické, vysoce orientované úseky. Naopak oblasti s nashromážděnými výšemolekulárními polárními AMK (např. Asp, Glu, Lys, Arg) nemají přísně uspořádanou stavbu, jsou méně orientované až amorfní. Pro jejich konformační volnost a přítomnost polárních skupin je lze považovat za reaktivní místa kolagenové molekuly<sup>4</sup>. Toto rozložení polárních a nepolárních AMK má vztah k pří-

čnému pruhození kolagenových fibril, pozorovanému elektronovým mikroskopem.

Existuje několik typů kolagenů, navzájem se lišících především složením AMK (tabulka III).

## 2.2. Biosyntéza

Kolagen je vylučován zejména buňkami pojivových tkání. Samotné kolagenové polypeptidové řetězce jsou syntetizovány na hraniční membráně ribosomů (jednotlivé AMK se spojují do řetězců kondenzací za odštěpení vody) a následně transportovány do buněčné dutiny endoplasmatického retikula<sup>3</sup> (ER) jako velké prekursorsy, nazývané pro  $\alpha$ -řetězce. Tyto prekursorsy obsahují jednak krátké aminoluminální „signální peptidy“, nutné pro transport vylučovaných proteinů přes membránu ER, a také další AMK, nazývané propeptidy, vyskytující se na aminovém a karboxylovém konci. V buněčné dutině ER jsou prolin a lysin hydroxylovány na hydroxyprolin (Hyp) a hydroxylysin (Hyl). Každý pro  $\alpha$ -řetězec se spojuje se dvěma dalšími prostřednictvím H-vazeb, vzniká trojřárovicová struktura zvaná prokolagen. Vodíková vazba vzniká mezi kyslíkem karboxylové skupiny jedné peptidové vazby a vodíkem iminoskupiny druhé peptidové vazby. Vylučované fibrilární kolageny (kromě typu I) jsou v mimobuněčném prostoru převedeny, odstraněním propeptidů, na kolagenové molekuly. Kolageny jsou vylučovány s nehelikálními prodlouženými na obou koncích<sup>5</sup>. Těmto odštěpitelným částem polypeptidů, extrémně bohatým na aromickou AMK tyrosin, se říká telopeptidy.

4-Hydroxyprolinové a 5-hydroxylysinové zbytky jsou zřídka přítomny v jiných proteinech. Hydroxylové skupiny hydroxyprolinu tvoří meziřetězcové H-vazby pomáhající stabilizovat trojřetězcový helix<sup>6</sup> (okolnosti zabraňující hydroxylaci prolinu, jako nedostatek kyseliny askorbové, inhibují tvorbu prokolagenu). Z posledních studií však vyplývá, že více než H-můstky má na stabilitu molekuly vliv indukční efekt Hyp v Y-pozici<sup>7</sup>. Hydroxylované lysinové zbytky jsou nezastupitelné při neobvyklé glykosylaci lysinu a jsou rozhodující

Tabulka II

Průměrné zastoupení aminokyselin v kolagenu z hovězích kůží<sup>a</sup>

| Aminokyselina       | Hodnota | Aminokyselina | Hodnota |
|---------------------|---------|---------------|---------|
| Hydroxyprolin       | 116,0   | Methionin     | 6,5     |
| Kyselina asparagová | 44,0    | Isoleucin     | 10,0    |
| Threonin            | 15,0    | Leucin        | 24,0    |
| Serin               | 36,0    | Tyrosin       | 2,0     |
| Kyselina glutamová  | 70,0    | Fenylalanin   | 12,0    |
| Prolin              | 122,0   | Hydroxylysin  | 6,5     |
| Glycin              | 321,0   | Lysin         | 30,0    |
| Alanin              | 105,0   | Histidin      | 4,5     |
| Valin               | 20,0    | Arginin       | 47,0    |

<sup>a</sup> Data vyjádřena jako AMK zbytky/1000 zbytků

Tabulka III  
Typy a charakteristika známých kolagenů

| Typ         | Řetězce   | Charakteristika  | Výskyt  |
|-------------|---|--|---|
| I           | $\alpha_1(\text{I}), \alpha_2(\text{I})$                        | nejčastější výskyt, málo hydroxylysinu                             | kosti, šlachy, kůže, zubovina, vazivo, děloha, cévy |
| I<br>Trimer | $\alpha_1(\text{I})$  | vyšší obsah 3- a 4-hydroxyprolinu a 5-hydroxylysinu                | nádorové útvary a zanícená ložiska                  |
| II          | $\alpha_1(\text{II})$   | častý výskyt, relativně bohatý na hydroxylysin a karbohydráty      | chrupavky, sklivec oka                              |
| III         | $\alpha_1(\text{III})$  | bohatý na hydroxylysin obsahující meziřetězcové disulfidické vazby | kůže, cévy, děloha, retikulin                       |
| IV          | $\alpha_1(\text{IV}), \alpha_2(\text{IV})$                      | bohatý na hydroxylysin, obsahuje rozsáhlé globulární regiony       | bazální membrány                                    |
| V           | $\alpha_1(\text{V}), \alpha_2(\text{V}), \alpha_3(\text{V})$    | stejný jako typ IV   | spojovací tkáň                                      |
| VI          | $\alpha_1(\text{VI}), \alpha_2(\text{VI}), \alpha_3(\text{VI})$ | mikrofibrily   | spojovací tkáň                                      |
| VII         |   | dlouhé řetězce   | zpevňující fibrily                                  |
| VIII        | $\alpha_1(\text{VIII})$   | šroubovice zařazené za sebou                                       | některé endotelické buňky                           |
| IX          | $\alpha_1(\text{IX}), \alpha_2(\text{IX}), \alpha_3(\text{IX})$ | vedlejší protein chrupavek, nese glykosaminoglykany                | chrupavky   |
| X           | $\alpha_1(\text{X})$  | krátké řetězce   | hypertrofické chrupavky                             |

pro rozsáhlé síťování kolagenových molekul, které se tvoří během shromažďování kolagenu v mimobuněčném prostoru. Zbytky hydroxylysinu s navázanými sacharidy se podílí na tvorbě intra- a intermolekulárního kovalentního příčného síťování<sup>2</sup>.

Kolageny jsou neustále, i když pomalu, degradovány specifickými mimobuněčnými enzymy, tzv. kolagenasami. Po vyloučení jsou propeptidy prokolagenových molekul odstraněny specifickými proteolytickými enzymy mimo buňku. Tyto přeměňují prokolagenové molekuly na molekuly kolagenu, také nazývaného tropokolagen (1,5 nm v průměru), které se spojují v mimobuněčném prostoru za tvorby rozměrnějších kolagenových fibril (10–300 nm v průměru). Hnací silou tvorby fibril je do jisté míry tendence kolagenu k samoseskupování. Propeptidy mají alespoň dvě funkce: 1) usměrňují vnitrobuněčnou tvorbu trojřetězcových kolagenových molekul, 2) protože jsou odstraněny až po sekreci, zabraňují nitrobuněčné tvorbě velkých kolagenových fibril, která by mohla být pro buňku fatální. Při pozorování izolovaných kolagenových fibril v elektronovém mikroskopu se ukazuje těsné uspořádání kolagenových molekul ve fibrilách a posunutí sousedních molekul o 67 nm, což je téměř 1/4 jejich délky. Tak vznikají, mezi po sobě jdoucími molekulami v řadě, mezery<sup>8</sup> o velikosti 35 nm. Toto uspořádání pravděpodobně zajišťuje agregátům velkou pevnost v tahu. Také rýhovaná struktura kolagenových molekul, viditelná v elektronovém mikroskopu, je dána posunem molekul a vznikem mezer.

Po vytvoření kolagenových fibril v mimobuněčném prostoru následuje jejich vnitřní zpevnění zesíťováním, tj. tvorbou kovalentních vazeb mezi lysinovými zbytky základních kolagenových molekul. Síťování probíhá v několika krocích: 1) lysinové a hydroxylysinové zbytky jsou deaminovány mimobuněčnými enzymy (lysyloxidasami), čímž se zvyšuje reaktivita tvorbou aldehydových skupin, 2) vzniklé aldehydy spontánně reagují s jinými lysinovými, nebo hydroxylysinovými zbytky za tvorby kovalentních vazeb; některé z těchto vazeb jsou nestabilní a dále modifikovány tvoří stabilnější zesíťová-

ní; většinou zesíťování vzniká mezi krátkými nehelikálními konci molekul kolagenu.

Organizace kolagenových fibril v mezibuněčné hmotě je přizpůsobena potřebám tkáně. Fibrily mají různé průměry a jsou v různých tkáních odlišně organizovány. V savčí kůži např. jsou „tkány“ tak, aby odolávaly napětí ve všech směrech. Ve šlachách jsou organizovány do paralelních svazků podél hlavní osy napětí působícího na šlachy<sup>3</sup>. U dospělé kosti a rohovky vytvářejí pravidelně vrstvené struktury podobné překližce, přičemž jednotlivé vrstvy jsou na sebe kolmé. Pojivové tkáň samy určují velikost a uspořádání kolagenových fibril. Buňky mohou provést expresi jednoho nebo více genů pro různé typy fibrilárních prokolagenových molekul a mohou také regulovat jejich rozmístění po sekreci. Nakonec je stupeň zesíťování kolagenu větší nebo menší podle požadované pevnosti v tahu.

Syntéza kolagenových fibril a jejich shromažďování se dají stručně popsat v následujících krocích: 1) procesy probíhající uvnitř buňky: syntéza pro  $\alpha$ -řetězce, hydroxylace a výběr prolinů a lysinů, glykosylace vybraných hydroxylysinů, tvorba trojhelikální formace ze tří pro  $\alpha$ -řetězců; 2) sekrece přes plazmatickou membránu: prokolagenová molekula; 3) procesy vně buňky: rozštěpení propeptidů, vznik kolagenových molekul, jejich shromažďování do fibril, agregace kolagenových fibril do kolagenových vláken.

### 2.3. Nebílkovinné komponenty

Povrch kolagenových fibril hraje důležitou roli ve stavbě a funkci pojivových tkání. Jackson<sup>6</sup> pozoroval, že chondroitin sulfát a jiné glykosaminoglykany (GAG), vázané solnými můstky nebo vodíkovými vazbami, se podílejí na stabilizaci kolagenu ve šlachách. Vysoce čištěný kolagen i po nedegradující extrakci obsahuje malá množství jednoduchých sacharidů, a to pentos a hexos. Hörmann<sup>9</sup> zjistil, že hexosou přítomnou v kolagenu rozpustném v kyselém prostředí je glukosa (3,8 jednotek na 1000 AMK zbytků), zatímco v nerozpustném

kolagenu se vyskytuje jak glukosa tak i galaktosa (celkem 3,5 jednotky na kolagenové vlákno). Rozpustné frakce dále obsahují mannosu, fukosu, rhamnosu a ribosu. Sacharidické složky se vážou prostřednictvím hydroxylysinového zbytku.

## 2.4. Fyzikálně chemické vlastnosti

### 2.4.1. Polyelektrolytický charakter

Kolagen, podobně jako i jiné bílkoviny, má charakter amfoterního polyelektrolytu<sup>4</sup>. Jeho iontové reakce probíhají v závislosti na pH prostředí. To znamená, že část skupin postranních řetězců se ionizuje v alkalické a část v kyselé oblasti pH. Náboj kolagenové molekuly se mění se změnou pH; v silně kyselé oblasti má kladný náboj, v silně alkalické oblasti záporný. Izoelektrický bod nativního kolagenu je při pH 7. Mírnými účinky chemikálií se mění v rozsahu pH 4,5 až 8,0. Většina fyzikálně chemických vlastností vykazuje v této oblasti extrémní hodnoty. Jako izoiontový bod je označována hodnota pH, při níž počet protonů připojených ke skupinám  $-NH_2$  bílkoviny se rovná počtu protonů oddisociovaných ze skupin  $-COOH$ . Proto se bílkovina čistí dialýzou, aby neobsahovala žádné jiné ionty. Hodnota pH se potom charakterizuje jako izoiontový bod.

### 2.4.2. Botnání

Z fyzikálně chemického hlediska patří kolagen k přechodným koloidním soustavám – gelům. Jejich nejdůležitější vlastností je schopnost botnat. Po ponoření do vody vlákno kolagenu omezeně botná (exotermní proces); přitom dochází ke změně objemu, délky a pružnosti vlákna. Část vody obsažené v nabotnaném kolagenu tvoří tzv. botnací voda, kterou lze mechanickým účinkem odstranit, druhou část tvoří voda hydratační, koloidně vázaná, odstranitelná jen sušením.

Z hlediska mechanismu lze rozlišit botnání osmotické (nábojové) a lyotropní. Při osmotickém botnání proniká voda styčnou plochou mezi pevnou látkou a rozpouštědlem následkem gradientu osmotického tlaku. Ten je dán rozdílem koncentrací všech pohyblivých iontů ve vnitřní fázi (gelu) a ve vnější fázi (roztoku). Po určité době se ustaví rovnováha – tzv. Donnanova membránová rovnováha, kdy botnací tlak je právě vykompenzován pevností makromolekulární sítě<sup>4</sup>. Rozrušení stabilizujících vazeb (působením extrémní hodnoty pH nebo lyotropních činidel) snižuje protitlak pevné fáze proti průniku vody a rovnováha se dosáhne při vyšším stupni nabotnání (lyotropní botnání). Sloučeniny způsobující tento druh botnání mají schopnost štěpit vodíkové vazby a v extrémním případě až rozpouštět kolagen.

### 2.4.3. Denaturace a renaturace

Vlivem některých chemikálií nebo tepelným účinkem ztrácejí bílkoviny své původní nativní vlastnosti – denaturují. Denurací kolagenu vzniká želatina. Orechovič a Spikiter zjistili, že produktem denaturační reakce vodného roztoku tropokolagenu jsou dva štěpy lišící se molekulovou hmotností, a označili je jako komponenty  $\alpha$  a  $\beta$  (viz<sup>10</sup>). Komponentu  $\beta$  lze dále rozštěpit na dvě komponenty  $\alpha$ . Vznikají tedy tři štěpy odpovídající trojitě spirále molekuly kolagenu. Mechanismus denaturace tropokolagenu je dvoustupňový proces. Nejdříve

nastane zborcení trojitě spirály a makromolekula tropokolagenu se stáhne do statistického klubka, v němž jsou jednotlivé řetězce navzájem ještě spojeny. V druhém stupni se tato klubka rozpadávají na tři frakce: frakci  $\alpha$  tvořící jeden polypeptidický řetězec původní spirály, frakci  $\beta$  tvořící dva dosud spojené řetězce a frakci  $\gamma$ , kterou tvoří tři řetězce v nezměněné formě statistického klubka. Zůstane-li denaturovaný roztok tropokolagenu stát delší dobu při nízké teplotě, probíhá zčásti proces renaturace, tj. zpětná rekonstrukce spirálové konfigurace.

### 2.4.4. Hydrotermální stabilita

Při zahřívání kolagenových vláken ve vodě dochází k jejich zkrácení asi o 1/3 vlákna ve směru osy. Tato termická kontrakce je charakterizována teplotou smrštění  $T_s$ . Příčinou smrštění je štěpení intermolekulárních příčných vazeb a rovněž intramolekulárních vazeb (kdy nastává denaturace kolagenu), které udržují trojitě spirály v nativním kolagenovém vlákne v nataženém stavu.  $T_s$  kolagenu se považuje za tání kolagenu v krystalických oblastech. Rovněž lyotropní činidla, štěpící vodíkové vazby, způsobují kontrakci kolagenového vlákna a snižují hodnoty  $T_s$ . K určení stability trojhelikální struktury se využívá obvykle měření teploty  $T_d$ , tj. denaturační teploty přechodu kolagen – želatina (viz odst. 2.4.6), který jako fázová přeměna prvního řádu má kladné a výrazné  $\Delta H$ . Hodnoty obou teplot lze v určitém rozsahu zvýšit zesíťováním kolagenu<sup>11</sup>; tak např. u kolagenu vyčíněného glutaraldehydem jsou nacházeny hodnoty  $T_s$  kolem 70 °C, naproti tomu u nativního kolagenu 37 °C.

### 2.4.5. Hydratace kolagenu

Proteiny obsahují dva typy hydrofilních center schopných vázat vodu elektrostatickými silami a vodíkovými vazbami: 1) polární skupiny přítomné v bočních řetězcích některých AMK zbytků, 2) dusík a kyslík peptidické vazby<sup>12</sup>. Pro udržení fyzikálních vlastností kolagenu je nutná asociace určitého minimálního množství vody, tvořícího přibližně 20 % jeho hmotnosti. V plně hydratovaném stavu kolagenu se uvolňuje pohybové omezení peptidových řetězců profibril, typické pro suchý stav, čímž se vysvětluje elementární funkce vody pro fyzikální vlastnosti proteinu. Vzdálenost mezi sousedními polypeptidovými řetězci suchého kolagenu je 1 nm, hydratací se tato vzdálenost zvyšuje na 1,5 až 1,6 nm.

### 2.4.6. Přeměna na želatinu

Zahříváním kolagenu ve vodném prostředí vzniká želatina. Z hlediska teoretických představ přeměny kolagenu na želatinu rozeznáváme tři pochody: 1) štěpení příčných kovalentních intermolekulárních vazeb na úrovni kvarterní struktury, 2) denaturace na úrovni terciární struktury, 3) hydrolytické štěpení peptidických vazeb polypeptidových řetězců na molekulární úrovni. Zásah do struktury polypeptidového řetězce má charakter degradace, depolymerace a je jevem nežádoucím: čím méně těchto vazeb je rozštěpeno, tím lepší fyzikálně chemické vlastnosti želatina má.

Typickou vlastností želatiny je přechod sol–gel. Gel želatiny jeví tixotropii, zahřátím na určitou teplotu „taje“ a přechází na sol. Je to přeměna inverzní, nikoli však vratná:





Z hlediska složení AMK je možné želatínu považovat za chemicky velmi čistou formu kolagenu. Jsou odstraněny nevláknité bílkoviny, mukopolysacharidy a tuky<sup>13</sup>. U želatiny připravené alkalicky dochází k poklesu koncentrace argininu, tyrosinu a amidicky vázaného dusíku. Kyselě připravená želatina se proto více blíží AMK složení kolagenu.

### 2.5. Roztok kolagenu

Již na počátku století bylo zjištěno, že některé kolageny lze rozpustit ve studeném zředěném roztoku kyseliny octové. Fyzikálně chemické studie rozpustných kolagenů (rozptyl světla, osmometrie, viskozimetrie, dvojlom světla) umožnily blíže charakterizovat tropokolagen<sup>14</sup>. V dostatečně nízké koncentraci existuje rozpustný kolagen ve zředěných roztocích organických kyselin ve formě protáhlých tenkých tyčinek<sup>15</sup> o délce 280 nm, průměru 1,6 nm a relativní molekulové hmotnosti podle různých autorů od 265 000 do 300 000. Později byla popsána další třída rozpustných kolagenů<sup>15-17</sup> získaných extrakcí ve studených, slabě alkalických roztocích solí nebo neutrálních roztocích solí s hypertonicou a fyziologickou iontovou silou. V nativní formě je možné rozpustit jen agregační formy kolagenu, které ještě neobsahují intermolekulární příčné kovalentní vazby<sup>1</sup>. Nerozpustný kolagen z tkání starších jedinců lze rozpustit po předchozí úpravě, při níž se rozštěpí část intermolekulárních příčných vazeb a nastane částečná nebo celková chemická nebo tepelná denaturace. Rozpustnost kolagenu také závisí na stupni zralosti tkáně. Z tkání mladých jedinců je možné rozpustit 10 až 15 % kolagenu; stárnutím vaziva rozpustnost klesá<sup>4</sup>. Poslední výzkumy ukazují, že pro použití kolagenu jako biomateriálu je alkalická úprava účinnější než kyselá, protože pozitivně ovlivňuje termální stabilitu kolagenu a znemožňuje tvorbu fibril při neutrálním pH ve fyziologických podmínkách<sup>18</sup>.

## 3. Degradace

### 3.1. Hydrolytická degradace

Kolagen v roztoku podléhá progresivní hydrolytické degradaci doprovázené ztrátou mnoha fyzikálních vlastností. Rychlost tohoto procesu je závislá na teplotě, pH systému a v menší míře na vnitřním tlaku roztoku a povaze dalších rozpouštědel, které mohou být přítomny. S teplotou rychlost hydrolyzy roste. Při neutrálním pH postupuje degradace pomaleji, s pohybem na obě strany rychlost roste. Kromě hydrolyzy příčných kovalentních, převážně esterových vazeb, probíhá současně štěpení peptidických vazeb v polypeptidovém řetězci. Při alkalické hydrolyze je toto štěpení mírnější; štěpí se sedmákrát méně peptidů než esterových vazeb<sup>4</sup>. Při kyselé hydrolyze je štěpení obou typů vazeb přibližně stejné.

### 3.2. Enzymatická degradace

Některé studie ukázaly, že nativní kolagen je vůči působení běžných proteolytických enzymů odolný, s výjimkou ur-

čitých enzymů bakteriálního nebo hmyzího původu, tzv. kolagenas, které specificky štěpí peptidové řetězce nativního kolagenu<sup>19</sup>. Patří mezi ně např. enzymy izolované z bakterií *Clostridium perfringens* a *Cl. histolyticum*. Jiná situace však nastává při vyšší teplotě, kdy se v roztoku rozpadá sekundární struktura kolagenu. Každý peptidový řetězec je pak schopen zaujmout větší počet konformací s přibližně stejnou energií a nemá stálou orientaci. Tehdy mohou peptidové segmenty přizpůsobit svou orientaci aktivnímu centru enzymu a stát se tak přístupné téměř všem proteolytickým enzymům. Ty přednostně hydrolyzují vazby s aromatickými zbytky, některé, jako trypsin, štěpí peptidové vazby, estery a amidy<sup>19</sup>.

### 3.3. Oxidační štěpení

Oxidační štěpení je složitější než hydrolytická degradace. Studium vlivu oxidačních činidel, jako je např. peroxid vodíku, jodistan sodný, bromnan sodný a železokyanatan sodný, ukázalo, že se jejich reakce s kolagenem navzájem značně liší. Degradace je založena na ataku příslušného činidla na sacharidy obsažené v kolagenu<sup>22</sup>. Štěpení kyselinou jodistou je doprovázeno mírným úbytkem volných aminoskupin (van Slykova analýza) a prudkým poklesem obsahu hexosy. Ztráta aminoskupin odpovídá sníženému obsahu hydroxylysinu v kyselě rozpustném kolagenu.

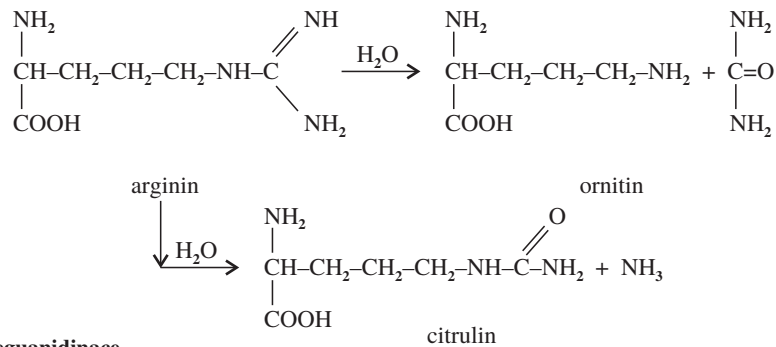
## 4. Chemická modifikace

S výjimkou reakcí thiolových skupin se k modifikaci vlastností a chování kolagenu používá celá řada reakcí, které je možné rozdělit do následujících kategorií: 1) přímá reakce bočních funkčních skupin s monofunkčními reagenty nebo 2) s polyfunkčními reagenty, vedoucí k polymerizaci; 3) oxidační nebo redukční reakce měnící povahu řetězců (rozštěpení peptidických vazeb nebo odbourání sacharidů asociovaných s kolagenem); 4) omezená enzymatická degradace, která nechává strukturu hlavního řetězce neporušenou. Vyjma těch případů, kdy je degradace žádoucí, jsou reakční podmínky voleny tak, aby hydrolytická degradace během chemické modifikace byla minimální.

### 4.1. Reakce s monofunkčními reagenty

#### 4.1.1. Acylace

Úplnou acetylací aminoskupin kolagenu acetanhydridem vzniká vícenásobný *N*-acetylderivát a příslušný počet molekul kyseliny octové<sup>19</sup>. Reakce je doprovázena částečnou (77 %) acetylací hydroxylových skupin. Úplné acylace lze dosáhnout s použitím směsi anhydridu kyseliny octové a ethylacetátu s přídavkem malého množství kyseliny mravenčí jako katalyzátoru. Selektivní *N*- a *O*-acylace je možná pouze jednostranně. Např. při kompletní *N*-acetylaci želatiny acetanhydridem, při pH 9,5–10,5 ve vodném roztoku při 0 °C, se dosahuje pouze 2 % *O*-acetylace<sup>22</sup>. Je nutno pamatovat na skutečnost, že po acylaci na bázi anhydrid kyseliny octové – silná kyselina dochází k degradaci hlavního polymerního řetězce. Další možnou vedlejší reakcí je transesterifikace, která následně způsobuje síťování kolagenu.



Obr. 2. Reakční schéma deguanidinnace

#### 4.1.2. Esterifikace

Ať už se jedná o esterifikaci dimethylsulfátem, bezvodým methanolem, nebo jinými činidly, je teplota smršštění esterifikovaného kolagenu totožná s hodnotami  $T_s$  naměřenými u nativní formy, ale vždy se podstatně mění průběh křivek botnání kolagenu<sup>22</sup>. Esterifikovaný kolagen na rozdíl od nativní formy nevykazuje v oblasti pH 6–9 minimum, ale prochází maximem. V silně kyselém (pH 2) a silně alkalickém (pH 11) oblasti jsou hodnoty  $T_s$  shodné. I přes vysokou schopnost botnat zůstává esterifikovaný kolagen nerozpustný a, jak ukazují měření  $T_s$ , zachovává si svoji strukturní integritu. To naznačuje, že původní intermolekulární síťování není ovlivněno reakčními podmínkami. Vysoký stupeň nabotnění po esterifikaci je částečně přisuzován polyelektrolytovému efektu, jelikož síť kolagenových vláken je převedena na kationtovou formu s hustotou náboje nejméně jeden kationtový boční řetězec na každých 10 aminokyselinových zbytků.

#### 4.1.3. Deaminace

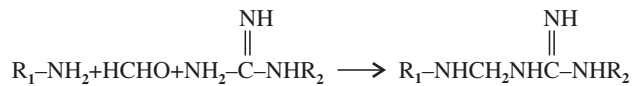
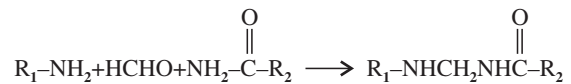
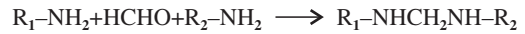
Deaminace vede k přeměně volných aminoskupin na hydroxylové skupiny. Pro dosažení kompletní deaminace se užívá směs obsahující dusitan sodný a ledovou kyselinu octovou<sup>8</sup>. Deaminovaný kolagen si zachovává původní  $T_s$ , ale stejně jako u esterifikace se mění křivky botnání. Kyselé botnání je sníženo v míře odpovídající poklesu kladného náboje sítě. V rozmezí pH 4–7 je objem absorbované vody identický u nativního i deaminovaného kolagenu. Avšak v alkalické oblasti dochází k podstatnému nárůstu objemu rozpouštědla, což je pozoruhodné vzhledem k Donnanově rovnováze a elektrostatickému efektu. Dochází zřejmě k poklesu vnitřní koheze mezi vlákny.

#### 4.1.4. Deguanidinnace

Arginin může být deguanidinován alkáliemi za vzniku ornitinu a močoviny, nebo také citrulinu a amoniaku (obr. 2). Reakce probíhá pomalu a je významná jen v pozdějším stupni alkalické degradace kolagenu<sup>23</sup>.

## 4.2. Reakce vedoucí ke tvorbě síťovaného gelu

Síťovaný kolagen má vyšší modul pružnosti (Youngův modul), větší odolnost vůči působení proteas a nižší stupeň nabotnění než protein nezásíťovaný<sup>24,25</sup>. Jelikož je výhodné,



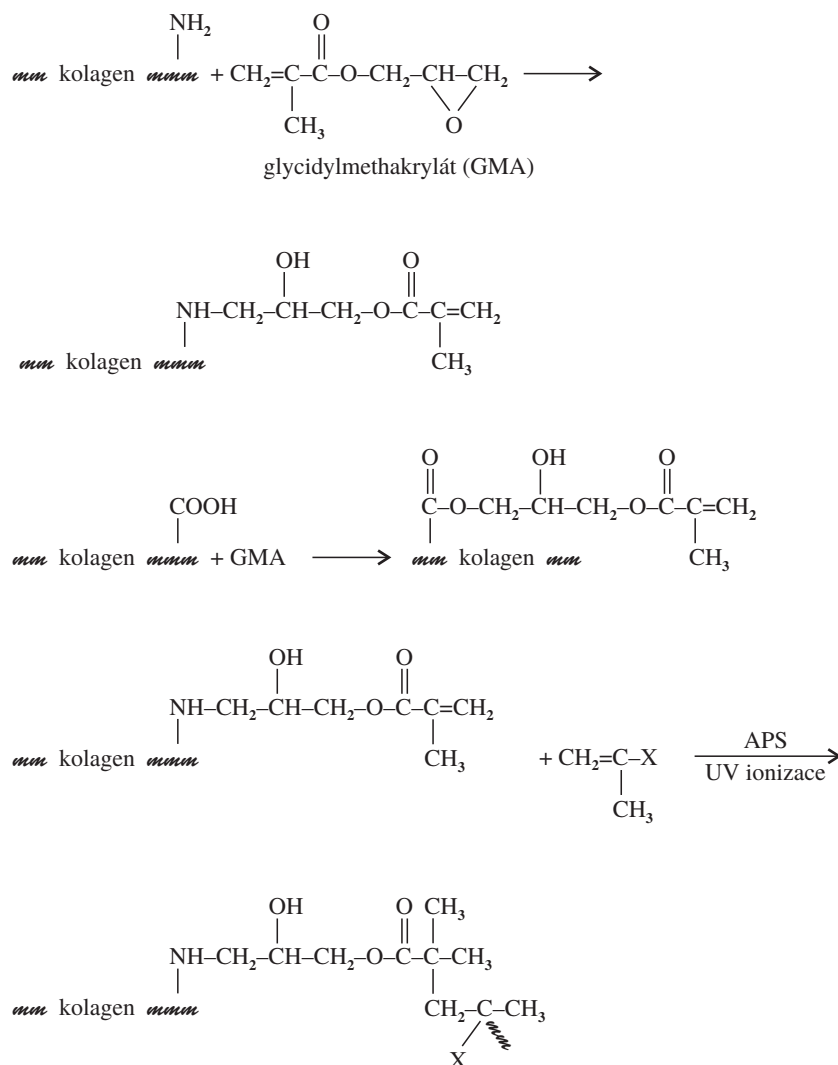
Obr. 3. Aldehydová kondenzace

aby kolagenové preparáty měly co možná nejlepší chemické, fyzikální i materiálové vlastnosti a minimální reaktivitu s vodou, v jejímž prostředí se obvykle nacházejí, jsou síťovací techniky často využívány. Zesíťování kolagenu může být docíleno jednak chemickou úpravou, např. s aldehydy, jako je formaldehyd, akrolein, glutaraldehyd, glyoxal, dále s kyselinami (kyselinou chromovou), oxidačními činidly (jodistany), jednak fyzikálními vlivy, např. gama zářením, UV zářením a jinými<sup>26</sup>.

#### 4.2.1. Aldehydová kondenzace

Schopnost aldehydů stabilizovat a síťovat AMK a proteiny byla potvrzena již v 50. letech na příkladu derivátů aminoskelin připravených reakcí s formaldehydem, které vedly ke vzniku aminomethylol derivátů primárních aminoskupin, s následnou kondenzací se sekundárními aminy, amidy, nebo guanidinovými skupinami za tvorby methylenových můstků<sup>1</sup> (obr. 3).

Síťování je docíleno s mono- i bifunkčními aldehydy, jejich reakce se však značně liší. Dialdehydové škroby a alifatické dialdehydy, jako je glutaraldehyd (GTA), modifikují kolagen tvorbou můstků za vzniku dvojité Schiffovy báze<sup>27,28</sup> ( $R_1-\text{C}=\text{N}=\text{C}-(\text{C})_n-\text{C}=\text{N}-\text{C}-R_2$ ). GTA reaguje přednostně s  $\epsilon$ -aminoskupinami lysinových zbytků řetězců, ale byly získány také reakce s N-koncovými aminoskupinami peptidů, SH skupinami cysteinu a imidazolovými kruhy histidinu<sup>29</sup>. Ze spektrální charakteristiky a relativní molekulové hmotnosti reakčních produktů je patrné, že GTA reaguje s  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> skupinami za tvorby málo stabilního aminu s molární hmotností přibližně 200 g.mol<sup>-1</sup> a absorpcí při 300 nm (cit.<sup>30</sup>). V přítomnosti nadbytku GTA nastává rychlá konverze na vyšemolekulární meziproduct, který silně absorbuje při 265 nm. Stabilita



Obr. 4. Syntéza kopolymeru kolagen-glycidylmethakrylát

vzniklé Schiffovy báze ukazuje, že takto fixovaný kolagen je mnohem více odolný vůči kyselé nebo vysokoteplotní hydrolyze než produkt modifikovaný za stejných podmínek, ale pomocí formaldehydu. Při nízké koncentraci tvoří GTA intramolekulární síťování, při vyšší vznikají dlouhé polymerní řetězce způsobující intermolekulární fixaci.

#### 4.2.2. Oxidace jodistanem

Tato metoda propůjčuje kolagenu požadované biologické a/nebo fyzikální vlastnosti, jako jsou mechanická pevnost, biostabilita, antiimunogenicitu a další, a eliminuje tak nutnost použití GTA jako síťovacího činidla. Hydroxylová skupina vzácnější aminokyseliny vyskytující se v polypeptidových řetězcích kolagenu, 5-hydroxylysinu, může být oxidována jodistanem<sup>31</sup> za vzniku aldehydové skupiny, která reaguje se sousedními aminoskupinami lysinových zbytků a tvoří tak síť. Vznikající iminové skupiny jsou pak redukovány mírným redukčním činidlem, jako je např. hydridoboritan sodný nebo aminoborany.

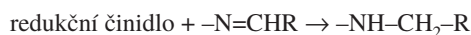
#### 4.3. Reakce se syntetickými polymery – povrchová imobilizace

Jedním z důvodů pro imobilizaci kolagenu na povrchu syntetických polymerních materiálů je zvýšení biokompatibility medicínských implantátů s měkkými tkáněmi a snížení rizika tvorby nádorových útvarů utvářejících se v lidském těle po implantaci polymerních náhrad. Jako příklad slouží potažení porézního polyethylenu (PE) kolagenem vázaným k povrchu chemicky, přes kovalentní vazbu<sup>32</sup>. Plazmatickou úpravou a následným naroubováním kyseliny akrylové byly na povrchu materiálu imobilizován kolagen prostřednictvím amidové vazby vznikající reakcí mezi karboxylovými skupinami a aminoskupinami molekul kolagenu. Tímto způsobem je vrstva kolagenu pevně fixována na modifikovaný povrch polyolefinu, aniž by docházelo k jejímu oddělování v přítomnosti vlhkosti. Množství navázaného kolagenu bylo stanoveno ninhydrinovou metodou, která poskytla hodnotu 1,5  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

Jinou možností ukotvení je modifikace kolagenu roubova-

cí polymerací s akrylovými monomery. Jako příklad může sloužit dvoustupňová výroba kopolymerů kolagenu s glycidylmethakrylátem<sup>2</sup> (obr. 4).

Oxidační metodu pro ukotvení biomolekul k povrchu substrátů vyvinul Keogh<sup>31</sup>. Metoda spočívá v oxidaci 2-aminoalkoholových skupin jednoho materiálu jodistanem za tvorby aldehydových skupin, reagujících v dalším kroku s aminoskupinami druhého materiálu za vzniku iminové vazby, která dále po redukci poskytuje aminová vazebná spojení, schematicky:



Materiálem obsahujícím 2-aminoalkoholovou nebo aminovou skupinu může být biomolekula nebo povrch polyolefinu.  $\text{IO}_4^-$  se používá buď ve formě kyseliny jodisté nebo jejích solí (Na, K a jiné alkalické kovy). V případě oxidace biomolekul je reakce vedena ve vodném pufru při pH 4–9 (6–8 pro pH senzitivní biomolekuly) a teplotě 4–37 °C. Polyolefiny mohou být snadno aminovány plazmochemickou úpravou s  $\text{NH}_3$ .

## 5. Biomedicínské aplikace

Použití kolagenu má svůj původ ve „fyziologické blízkosti“ nebo dokonce identitě aplikovaného kolagenu s tělesným kolagenem „příjemce“, v jeho resorbovatelnosti, která se dá řídit síťovacími reakcemi, a ve vysoké absorpční schopnosti, která je podporovaná značným vnitřním povrchem (několik  $\text{m}^2/\text{cm}^3$ ) a snadno přístupnými reakčními skupinami. Výhodou je, že se dá vyrobit velmi čistý, což platí zejména pro rozpustné kolageny. Ukazuje se, že použití kolagenu má více předností. Jako nespecifický polymer, nacházející se ve stejné formě u různých druhů savců, vykazuje velmi nízkou antigenitu, nevyvolává tvorbu protilátek organismu<sup>2</sup>. Při působení specifických enzymů na molekuly kolagenu se odstraní telopeptidy z konců řetězců a antigenita se potlačí ještě více. Kolagen může být i nosičem léčiv nebo stimulačních látek, které se lokálně dostávají do rány a postupně se během hojení uvolňují<sup>33</sup>. O tuto skupinu biomateriálů je proto v současnosti mimořádný zájem. Nevýhodou systémů na bázi kolagenu je jejich nízká odolnost vůči enzymatické degradaci. Proto je nutné kompozitní systémy stabilizovat, např. přidáním různých typů zhašičů nebo lapačů reaktivních radikálových meziproductů enzymatických reakcí.

Je účelné seřadit množství kolagenových lékařských preparátů nezávisle na výchozím materiálu a výrobním postupu podle druhů a použití (tabulka IV).

Ze stěv stočená šicí vlákna („catgut“) patří již staletí k chirurgickému náčiní. Přes rostoucí význam syntetických šicích vláken, např. na bázi polyamidu, polyesteru nebo polymerů kyseliny mléčné, která nejsou absorbovatelná nebo jsou zpožděně resorbovatelná, fyziologicky jsou absolutně indiferentní a většinou levnější, má catgut své pevné místo na operačním sále. Jeho resorbovatelnost se řídí zesíťováním solemi chromu.

Kolagenové plochy se v medicíně používají buď jako přírodní vláknenné pletivo (kožní štípenky), jako netkané textilie nebo fixované pěny, přičemž cesta k oběma posledně

jmenovaným kategoriím vede buď přes mechanické rozmělnění vláknenného pletiva nebo přes rekonstituci z roztoku. Kožní štípenky, zbavené nekolagenových součástí do značné míry alkalickou, kyselou nebo enzymatickou úpravou, vysušené zmrazením a sterilizované radiačně-chemicky, se používají k zakrytí ran, především popálenin<sup>34</sup>. Rovněž disperze kolagenových vláken formované do membrán se hodí k dočasnému zakrytí rány. V kolagenových membránách mohou být inkorporovány i baktericidní přísady a látky, které podporují růst kostí. Práškový kolagen byl zpracován do spreje, který lze nastříkat na rány jako bandáž. Membrány z atelokolagenu (kolagen enzymaticky zbavený koncových rozvětvených částí molekul, tzv. telopeptidů) se používají nejen na zakrývání ran, ale i k opravě cév, náhradě šlach a pro pěstování buněčných kultur *in vitro*. Obávanému vysušení ran zakrytých kolagenem je možno zabránit mj. kombinací s plastovou fólií, která pokrývá povrch a je prodyšná (např. Goretex nebo Poromeriks). Netkané textilie z kolagenu se užívají pro zastavení krvácení. Hemostyptika na bázi kolagenu dnes patří k základnímu vybavení při hojení operačních ran, patří sem např. výrobky firmy HYPRO, Otrokovice. Resorbovatelnost kolagenu se dá řídit síťujícími reakcemi, např. reakcí s již zmiňovaným glutaraldehydem. Houbovitě resorbovatelné polymery, např. na bázi kyseliny mléčné, je možné plnit atelokolagenem z vepřové kůže a používat jako náhradu pokožky<sup>35</sup>.

I když v současné době stále více převládají syntetické cévní a orgánové protézy, přesto se vždy uvažuje kombinace s rozpustným kolagenem, aby se optimálně redukovala propustnost cév, podnítil růst buněk a zlepšila biokompatibilita protéz s živou tkání. Navrhují se nové látkové kombinace: např. vytlačované teflonové hadice s velkou pórovitostí mohou být opatřeny „vnitřním vyložením“ směsí chitosanu a kolagenu, nebo roubovací polymerace kolagenu na polytereftalátové protézy pomocí kyseliny akrylové<sup>2</sup>. Kolagenová vlákna kombinovaná s fosforečnanem vápenatým se s výhodou používají jako náhrada kostí a zubů<sup>36,37</sup>. Přídavek zydermu (vstříkovaného kolagenu) k fosforečnanu vápenatému podporuje lé-

Tabulka IV  
Kolagenové medicínské preparáty podle druhu a oboru použití

| Výrobky  | Použití   |
|--|---|
| Šicí vlákna – catgut   | chirurgický šicí materiál<br>zakrývání ran/léčení ran                                 |
| Kolagenová vlákna – z roztoků<br>– ze suspenzí<br>– z membrán                                  | zastavování krvácení<br>(hemostatika)<br>náhrada pokožky<br>náhrada cév/vykládání cév |
| Kolagenové plochy<br>přirozená pokožka<br>membrány, bandáže<br>netkané textilie<br>pěny/ houby | orgánové implantáty<br>plniva pro implantáty  |
| Cévy/orgány  | vazivové opravy<br>lepení tkání<br>proliferace buněk                                  |
| Kolagenové prášky, lepidla,<br>pudry a spreje  | péče o pleť   |



čení kostí více než pouhá výplň z hydroxyapatitu. Jako příklad může sloužit kompozitní materiál obsahující hydroxyapatit a atelokolagen, určený na výplně různých kostních defektů<sup>38</sup>, vyvinutý na Chemickotechnologické fakultě STU v Bratislavě pod názvem BIOVAK. Atelokolagen v kompozitu vyvolá rychlejší prorůstání implantátu novou kostí a potlačuje tvorbu fibrózní vrstvy na jejich rozhraní. Další aplikační výhodou takového kompozitu je jeho tvarovatelnost při současném zachování kompaktnosti.

Nejnovejší vývoj léčení ran se týká použití mikrokapslí (fibrilovaný kolagen v podobě koacervátu), upravených roztoky polysacharidů a růstovými buněčnými faktory. Zájem si zasluhuje výroba kolagenových částic v rozsahu mikro- a nanometrů, které jsou „napuštěny“ účinnou látkou a dají se vsťikovat. V chirurgii získává stále větší význam lepení místo šití. K tradičním fibrinovým lepidlům se nyní přidružují kolagenová lepidla, která se připravují reakcí kolagenu s kyselinou antrachinon-1,5-disulfonovou a anhydridem kyseliny glutarové. Značná pozornost je u medicínských aplikací kolagenu věnována také zábraně alergických reakcí. Aktuální je již zmiňované potahování syntetických polymerních náhrad a příprava kontaktních čoček v kombinaci s polyakrylátů<sup>39</sup>.

*Autoři považují za milou povinnost poděkovat za finanční podporu tohoto výzkumu MŠMT ČR (granty VS 96108, CZT 90015, CZ 690019).*

#### LITERATURA

- Blažej A., Deyl Z., Adam M., Galatík A., Michlík I., Smejkal P.: *Štruktúra a vlastnosti vláknitých bielkovín*. VEDA, Bratislava 1978.
- Reich G.: *Leder* 46, 2 (1995).
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D.: *Molecular Biology of the Cell*, 2. vyd., str. 808. Garland Publishing, New York 1989.
- Mládek M.: *Zpracování odpadů kožedělného průmyslu*, str. 33. SNTL, Praha 1971.
- Jackson D. S.: *Biochem. J.* 56, 699 (1954).
- Bella J., Brodsky B., Berman H. M.: *Structure* 3, 893 (1995).
- Nagarajan V., Kamitori S., Okuyama K.: *J. Biochem. (Tokyo)* 125, 310 (1999).
- Vodrážka Z., Krechl J.: *Bioorganická chemie*, str. 38. SNTL, Praha 1991.
- Hörmann H.: *Leder* 11, 173 (1960).
- Morawetz H.: *Chování makromolekul v roztoku*, str. 352. Academia, Praha 1971.
- Anselme K., Petite H., Herbage D.: *Matrix* 12, 264 (1992).
- Gustavson K. H.: *The Chemistry and Reactivity of Collagen*. Academic Press, New York 1956.
- Babel W.: *Chem. Unserer Zeit* 2, 86 (1996).
- Boedtker H., Doty P.: *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4267 (1956).
- Highberger J. H., Gross J., Schmitt F. O.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 37, 286 (1951).
- Gross J., Highberger J. H., Schmitt F. O.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 41, 1 (1955).
- Jackson D. S., Fessler J. F.: *Nature* 176, 169 (1955).
- Hattori S., Adachi E., Ebihara T., Shirai T., Someki I., Irie S.: *J. Biochem. (Tokyo)* 125, 676 (1999).
- Kuzma P., Odorosio G. (National Patent Development Corp.): WO 83/00339; Chem. Abstr. 98, 166936 (1983).
- Nimni M. E., Cheung D. T., Strates B., Kodama M., Sheikh K., v knize: *Collagen* (Nimni M.E., ed.), sv. III. *Biotechnology*, kap. 1. CRC Press, Boca Raton 1988.
- Nimni M. E., Cheung D. T., Strates B., Kodama M., Sheikh K.: *J. Biomed. Mater. Res.* 21, 741 (1987).
- Ramchandran G. N.: *Treatise of Collagen*, sv. I *Chemistry of Collagen*. Academic Press, New York 1967.
- Veis A.: *The Macromolecular Chemistry of Gelatin*. Academic Press, New York 1964.
- Weadock K., Olson R. M., Silver F. H.: *Biomater. Med. Devices. Artif. Organs* 11, 293 (1984).
- Miyata T., Taira T., Noishiki Y., v knize: *Biologically Modified Polymeric Biomaterial Surfaces* (Piskin E., ed.), str. 195. Elsevier Applied Science, London 1992.
- Vizárová K., Bakoš D., Reháková M., Macho V.: *Biomaterials* 15, 1082 (1994).
- Richards F. M., Knowlens J. R.: *J. Mol. Biol.* 14, 231 (1968).
- Monsan P., Puzo G., Mazarquil J.: *Biochimie* 57, 1281 (1975).
- Kirkeby S., Moe D.: *Acta Histochem.* 79, 115 (1986).
- Cheung D. T., Nimni M. E.: *Connec. Tissue Res.* 10, 187 (1982).
- Keogh J. R.: US 5 821 343 (1998).
- Kinoshita Y., Kuzuhara T., Kirigakubo M., Kobayashi M., Shimura K., Ikada Y.: *Biomaterials* 14, 546 (1993).
- Hirasawa S., Fujioka I., Miyata N., Yamashita H.: *Biomater. Res.* 18, 149 (1997).
- Yannas I. V., v knize: *Material Science and Technology: A Comprehensive Treatment* (Williams D. F., ed.), sv. 14 *Medical and Dental Materials*, str. 180. VCH, Weinheim 1992.
- Koide M., Osaki K., Konishi J., Oyamada K., Katakura T., Takahashi A.: *J. Biomed. Mater. Res.* 27, 79 (1993).
- Shoshan S., Yaffe A., v knize: *Collagen* (Nimni M. E., ed.), sv. III *Biotechnology*, kap. 8. CRC Press, Boca Raton 1988.
- Crigger M., Bogle G. C., Garrett S., Gantes B. G.: *J. Periodontal* 67, 403 (1996).
- Bakoš D.: *Quark* 10, 14 (1996).
- Kuzma P., Odorosio G. (National Patent Development Corp.): WO 82/02716; Chem. Abstr. 97, 223005 (1982).

**P. Peterková<sup>a</sup> and L. Lapčík, Jr.<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Physical and Consumer Chemistry, Chemical Faculty, Technical University, Brno*, <sup>b</sup>*Institute of Physics and Materials Engineering, Technological Faculty, Zlin, Technical University at Brno*): **Collagen – Properties, Modifications and Applications**

Chemical modifications for obtaining specific and the most efficient chemical, physical and material properties of the collagen-based matrices were reviewed. Possible chemical reactions of collagen with functional reagents (acylation, esterification, deamination and deguanidination) and polymerization reactions (aldehyde condensation, periodate oxidation) were discussed. Finally, several technological procedures for the surface immobilization of collagen on synthetic polymers were summarized.