

Vlastnosti kolagenu a jeho role v léčbě kloubních onemocnění

Luděk Jansa

Bakalářská práce
2012

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Luděk JANSA**
Osobní číslo: **T09235**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a řízení v gastronomii**

Téma práce: **Vlastnosti kolagenu a jeho role v léčbě kloubních onemocnění**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Příčiny onemocnění kloubů, léčba, doplňky stravy
2. Vlastnosti a struktura kolagenu
3. Typy kolagenu
4. Metabolismus kolagenu a jeho využití

II. Praktická část

1. Metodika stanovení kolagenu
2. Analýza vybraných hydrolyzátů

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

1. M. ADAM, Collagen hydrolysate and its Relationship to joint Health, 1. vydání, 2004 GELITA Health Initiative Germany
2. J. MUSIL, M. ADAM, V. HOUBA, Vysokomolekulární složky pojiva, 1. vydání, 1966 Knihtisk Praha
3. M. E. NIMNI, Collagen volume I, II, III, 1. vydání, 1988 Boca Raton Florida
4. A. BLAŽEJ, M. ADAM, Struktura a vlastnosti vláknitých bílkovin, 1. vydání, 1978 Veda Bratislava
5. J. VELÍŠEK, Chemie potravin 1, OSSIS, 1999 Tábor

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání bakalářské práce: 6. ledna 2012

Termín odevzdání bakalářské práce: 21. května 2012

Ve Zlíně dne 15. února 2012

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Jansa Luděk

Obor: Technologie a řízení v gastronomii

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělčně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Bakalářská práce s názvem „Vlastnosti kolagenu a jeho využití v léčbě kloubních onemocnění“ popisuje příčiny onemocnění kloubů, jejich léčbu a doplňky stravy, které ji podporují. Vysvětluje vlastnosti a strukturu kolagenu a přináší pohled na jednotlivé typy. Představen je metabolismus kolagenu a jeho využití. V praktické části výzkumu je popsána aktuální metodika stanovení kolagenu. Práce přináší celistvý pohled na problematiku a využívá jak nejnovějších zdrojů, tak v oboru dlouhodobě uznávaných informací.

Klíčová slova: Kolagen, kloubní onemocnění

ABSTRACT

The bachelor work named „The Character of Collagen and its Usage in Treatment of Articular Diseases“ describes causes of articular diseases, their treatment and special joint care products, which are it's support. Text explains the character and structure of collagen and brings a view on various types of it. The metabolism of collagen and its usage are presented. In the empiric part, the actual methodology of determination of collagen is discribed. Thesis brings a complex view on the topic and uses on the one side the newest electronic ressources, on the other side well known and long-terms appreciated informations.

Keywords: Collagen, Articular disease

Děkuji svému vedoucímu bakalářské práce, panu doc. Ing. Miroslavu Fišerovi, CSc., za vstřícné konzultace tématu a cenné připomínky k jeho vypracování.

Děkuji také svému zaměstnavateli, firmě Orling, s.r.o., která mi umožnila kombinované studium oboru Technologie a řízení v gastronomii a poskytla přístup k informacím.

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

Ve Zlíně

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 KLOUBNÍ ONEMOCNĚNÍ A MOŽNOSTI JEJICH LÉČBY	13
1.1 PŘÍČINY ONEMOCNĚNÍ KLOUBŮ, LÉČBA, DOPLŇKY STRAVY	13
1.2 KLOUB	13
1.3 ONEMOCNĚNÍ KLOUBNÍHO APARÁTU	14
1.3.1 Osteoartróza	15
1.3.2 Revmatoidní artritida.....	17
1.3.3 Psoriatická artritida	19
1.4 OBECNÉ PŘÍČINY KLOUBNÍCH ONEMOCNĚNÍ.....	20
1.4.1 Vybrané příčiny onemocnění	20
1.5 MOŽNOSTI LÉČBY KLOUBNÍCH ONEMOCNĚNÍ.....	23
1.5.1 Léčba farmaky.....	23
1.5.2 Význam potravinových doplňků při celkové léčbě	24
1.5.3 Fyzioterapie	24
1.5.4 Alternativní léčba	25
1.5.5 Chirurgická léčba	25
1.6 SKUPINA UŽIVATELŮ POTRAVINOVÝCH DOPLŇKŮ	25
1.6.1 Aktivní sportovci.....	26
1.6.2 Preventivní podávání	26
1.6.3 Senioři	26
1.6.4 Pacienti po úrazech a operacích.....	26
1.7 POTRAVINOVÉ DOPLŇKY	27
1.7.1 Účinné složky potravinových doplňků určených k regeneraci kloubní tkáně	27
1.7.1.1 Kolagenní peptidy	27
1.7.1.2 Glukosamin sulfát	27
1.7.1.3 Chondroitin sulfáty.....	28
1.7.1.4 Antioxidanty	28
1.7.1.5 Minerály.....	28
1.7.1.6 Biotin.....	29
1.7.1.7 MSM	29
1.7.1.8 Kadidlovník pilovitý.....	29
1.7.1.9 Tripeptid glycin-histidin-lysin	30
2 KOLAGEN	31
2.1 ZÁKLADNÍ FAKTA	31
2.2 STRUKTURA	31
2.3 VLASTNOSTI KOLAGENU	33
2.4 JEDNOTLIVÉ TYPY KOLAGENU	35
2.4.1 Kolagen typu I	35
2.4.2 Kolagen typu II	36
2.4.3 Kolagen typu III.....	36

2.4.4	Kolagen typu IV.....	36
2.4.5	Srovnání kolagenních typů I-IV.....	37
2.5	METABOLISMUS KOLAGENU A JEHO VYUŽITÍ	37
2.5.1	Syntéza	38
2.5.2	Agregace.....	38
2.5.3	Polymerace	38
2.5.4	Maturace.....	39
2.5.5	Odbourávání	39
2.5.6	Využití metabolismu kolagenu.....	39
3	ZÁVĚR TEORETICKÉ ČÁSTI.....	41
II	PRAKTICKÁ ČÁST.....	43
4	ANALÝZA METOD STANOVOVÁNÍ KOLAGENU	44
4.1	DŮVODY STANOVOVÁNÍ KOLAGENU	44
4.2	SOUČASNÝ STAV ZKOUMÁNÍ.....	45
4.3	METODY STANOVENÍ KOLAGENU	46
4.3.1	Evaluace proteinové kvality masa za použití kolagenu	46
4.3.2	Metoda HPLC pro určení hydroxyprolinu ve vazivových tkáních.....	47
4.3.3	Měření hydroxyprolinu pomocí metody HPLC	48
4.3.4	Rychlá determinace kolagenu v produktech na bázi masa pomocí mikrovlnné hydrolyzy proteinů a HPAEC-PAD analýzy hydroxyprolinu.....	48
4.3.5	Kvantifikace hydroxyprolinu pro potřebu stanovení kolagenu za použití hromadné spektrometrie vícenásobných reakcí.....	49
4.3.6	Kapilární elektroforézní metoda pro determinaci hydroxyprolinu a obsahu kolagenu v masných produktech.....	50
4.3.7	Automatický flow-batch systém determinace hydroxyprolinu v párcích.....	51
4.3.8	Srovnání vybraných metod determinace hydroxyprolinu v mase a masných výrobcích	52
4.4	STANOVENÍ KOLAGENOVÝCH FRAKČÍ POMOCÍ METODY HPLC.....	53
4.4.1	Metoda	54
4.4.2	Výsledky.....	54
4.4.3	Závěr	54
5	ZÁVĚR PRAKTICKÉ ČÁSTI	67
	ZÁVĚR.....	68
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	70
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	74
	SEZNAM OBRÁZKŮ	76
	SEZNAM TABULEK.....	77
	SEZNAM PŘÍLOH	78

ÚVOD

Kloubní onemocnění a celkově onemocnění pohybového aparátu, jsou jednou z nejčastějších příčin pracovní neschopnosti v České republice a to v takové míře, že je možné hovořit o fenoménu jedenadvacátého století.

Je nepopíratelným faktem, že Česká i světová populace stárne. V současné době je polovina obyvatel Evropské Unie (EU) starších 40 let, v roce 2060 bude polovina obyvatel EU starší 48 let. Česká republika bude patřit mezi země s nejrychleji stárnoucí populací [1]. Aktuálním trendem je prodlužování života, ovšem zároveň s tím také narůstá počet chorob a potřeba jejich léčby. Početnou skupinou mezi nimi jsou kloubní onemocnění, při jejichž léčbě a potažmo také prevenci vzniku hrají významnou roli potravinové doplňky obsahující mezi množstvím jiných látek zejména kolagen, jehož popisem a metodikou jeho stanovování se zabývá významná část práce. Senioři jsou tedy stále rozrůstající se skupinou, která je těmito nemocemi sužována.

Nejen senioři však trpí kloubními onemocněními. Velkou skupinu postižených také tvoří aktivní sportovci, kteří při své hypermobilitě zatěžují kloubní aparát intenzivněji než osoby sportující rekreačně. Z důvodu náchylnosti chrupavčitých tkání k opotřebenosti je pak velmi vhodná preventivní výživa. Další rizikovou skupinou jsou také osoby po úrazech, zejména po zlomeninách, kdy při úraze narušená kost má větší předpoklady k tomu, aby byla postižena osteoporózou (řídnutím kostní tkáně), než kost zdravá.

Teoretická část bakalářské práce mapuje poznatky o příčinách kloubních onemocnění, současných trendech v léčbě a v jejich rámci také využití doplňků stravy obsahujících kolagen. Značná část je věnována kolagenu, jeho jednotlivým typům, vlastnostem, metabolismu, struktuře a využití.

Cílem této části práce je popsat příčiny onemocnění kloubů, přiblížit jejich léčbu a složení kloubních preparátů pro výživu a regeneraci kloubů pro humánní aplikaci. Jejich významnou složkou je, jak již bylo řečeno, také kolagen, proto je dalším z cílů práce charakterizovat jeho vlastnosti a strukturu. Z literárních zdrojů jsou využity především studie prof. MUDr.

Milana Adama, DrSc. (1928-2008), uznávaného odborníka v oblasti pojivových tkání. Využity jsou také cizojazyčné prameny, především v podobě aktuálních písemných či elektronických vědeckých publikací.

Praktická část je zaměřena na metodiku stanovení kolagenu. Plně využívá jak poznatků části teoretické, tak zároveň poznatků získaných během celého průběhu studia. Představuje čtyři aktuální metody stanovení kolagenu, jsou také zhodnoceny tendence současného výzkumu, mezi něž patří především rostoucí komplexita a mnohostrannost výzkumů.

Bakalářská práce "Vlastnosti kolagenu a jeho role v léčbě kloubních onemocnění" tak přináší komplexní pohled na kolagen a jeho využití v léčbě kloubních onemocnění. Zabývá se významným zdravotním problémem naší populace (velký počet nemocných s kloubními onemocněními) a přináší komplexní pohled na tuto problematiku nejen z hlediska teoretického, ale také praktického.

Můj hluboký zájem o téma kolagenu a léčivých přípravků s jeho obsahem je dán především mou pozicí technologa a technika výroby ve firmě Orling spol. s r.o., která se zabývá výrobou speciálních přípravků pro výživu a regeneraci kloubů pro humánní a veterinární aplikaci.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KLOUBNÍ ONEMOCNĚNÍ A MOŽNOSTI JEJICH LÉČBY

První kapitola teoretické části se zabývá příčinami onemocnění kloubů, jejich léčbou a nutričními doplňky, které při nich blahodárně působí. Druhá kapitola je zaměřena na kolagen, hlavní účinnou složku potravinových doplňků určených k léčbě kloubních onemocnění. Prostor je věnován jeho vlastnostem, typům, struktuře a metabolismu.

1.1 Příčiny onemocnění kloubů, léčba, doplňky stravy

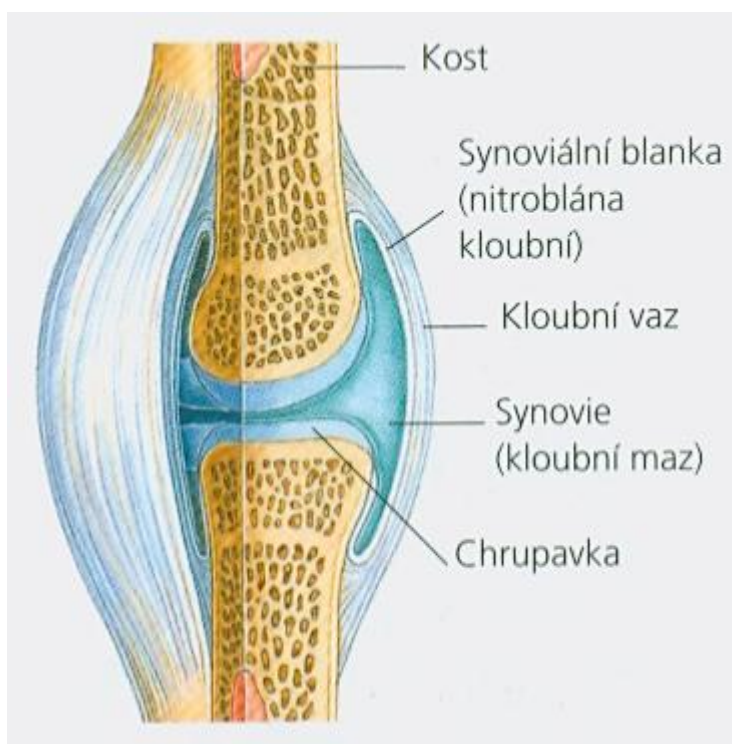
V první kapitole, věnované kloubním onemocněním, jsou vyčteny jednotlivé známé druhy nemocí, které jsou následně charakterizovány. Jsou zde udány jejich známé příčiny a postupy léčby. Zbylou část kapitoly tvoří charakteristika účinných složek doplňků stravy určených k léčbě kloubních onemocnění. Než ovšem přikročíme k samotnému výčtu, krátce definujme základní pojem kapitoly – kloub.

1.2 Kloub

Latinsky *Articulatio*, je nejobecnější definicí popsán jako pohyblivé spojení umožňující pohyb kostí. Jednotlivé kosti jsou spojeny buď pevně jinou pojivovou tkání (např. spojení pánevních kostí chrupavkou), nebo jako tomu je v tomto případě, spojením kloubním, ve kterém se dotýkají dvě (klouby jednoduché) a více (klouby složené) kostí. Stavba kloubu je schematicky znázorněna níže na obrázku č. 1.

Hlavními částmi jsou kloubní hlavice a kloubní jamka. Jejich tvar je různý a udává velikost i rozsah pohybu v kloubu. Může být válcovitý, sedlovitý, nepravidelný apod. Obě části jsou potaženy chrupavčitou vrstvou, pojivovou tkání, která se skládá z buněk a mezibuněčné hmoty obsahující vláknitý a amorfni podíl. Amorfní podíl je složen především z proteoglykanů a vody, vláknitý podíl, který je zastoupen ve větším množství, je tvořen především kolageny. Při opotřebením těchto chrupavek dochází k poškození kolagenních vláken a celkovému úbytku kolagenu, proto je vhodné jej doplňovat speciálními potravinovými doplňky. Chrupavka a hlavice a jsou zasazeny v kloubním pouzdře, které je upnuto na jejich okraji. Hlavní funkcí tohoto pouzdra je produkce synoviální tekutiny, což

je čirá, bezbarvá nebo jen mírně nažloutlá viskózní tekutina, která snižuje tření kloubních ploch a zvyšuje přilnavost jednotlivých částí. Nedostatek synoviální tekutiny vede k nedostatečné výživě a regeneraci kloubu a zapříčiňuje omezenou funkčnost a odolnost kloubů a následně bolestivá onemocnění. Pro tuto práci jsou důležité zejména synoviální klouby, které umožňují široký rozsah pohybu [2].



Obrázek 1: Schéma stavby kloubu [3].

1.3 Onemocnění kloubního aparátu

Onemocnění kloubního aparátu nemusí být vždy bolestivá a jejich léčba není nutně urgentní. Pro potřebu této bakalářské práce jsou v úvahu brány středně těžké stavy, při kterých není prvotním řešením chirurgické řešení náhradou kloubu. Existuje více než 200 druhů kloubních onemocnění, vzhledem k rozsahu práce jsou vybrána ta nejčastější, při jejichž léčbě je vhodné doplňkové užívání potravinových doplňků obsahujících kolagen, přičemž nejznámějšími nemocemi jsou revmatoidní artritida a osteoartróza. Pro doplnění pohledu na kloubní onemocnění je přidána také psoriatická artritida.

1.3.1 Osteoartróza

Osteoartróza (OA – dřívějším názvem i osteoarthritis) je kloubní onemocnění, při kterém dochází k poruše obnovy kloubní chrupavky a v návaznosti na ní, také ke změnám kosti a přilehlých měkkých tkání. Celkově je OA postiženo přibližně 12% populace a její četnost výskytu stoupá s věkem. Postihuje zejména věkovou skupinu nad sedmdesát let (četnost výskytu až 50%) a stává se tak nejčastějším kloubním onemocněním. Nejčastěji postihuje kyčelní a kolenní klouby, projevuje se však také na krku, drobných kloubech ruky, spodních zádech. Častěji jsou nemocí zasaženy ženy (v poměru 2,5:1) u nichž je zaznamenán dramatičtější průběh. Rozlišujeme primární a sekundární OA, každá z nich má jiné příčiny, ale podobný (biologický, patologický či klinický) vývoj [4].

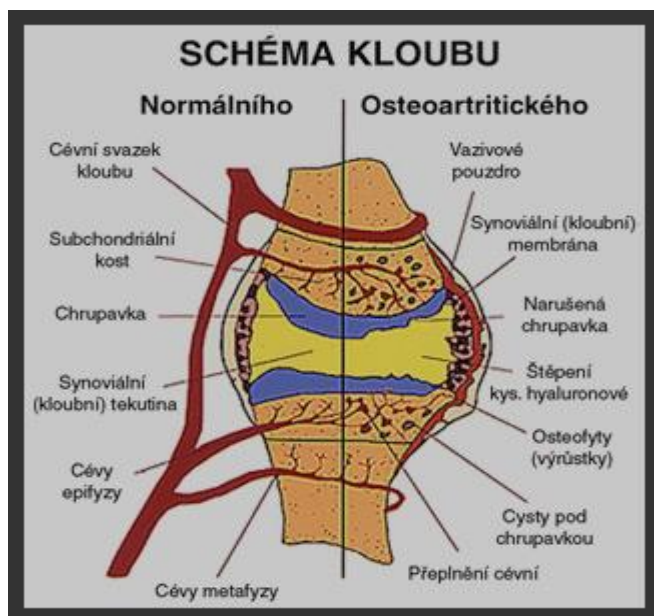
Primární osteoartróza (idiopatická) je heterogenní onemocnění, které je popisováno jako množství vzájemně propojených poruch. Může být lokalizovaná (postižení jednoho až dvou kloubů), nebo generalizovaná (postižení tří a více kloubů) a odvíjí se od poruch chondrocytální aktivity, čili změnami chrupavky následkem dysregulace. Rozvoj onemocnění bývá pozvolný, obvykle trvá až desítky let, proto je při jeho léčbě důležitá prevence a vyživování kloubů (viz níže). Objektivní potíže nemocného jsou následující: námahová bolest kloubu, bolest na začátku pohybu, deformace kloubu, omezení hybnosti, bolestivost na dotek. Tyto a další příznaky, které ponechávám pracím jiného oboru, se neprojevuje, pokud je postižena pouze chrupavka. Změny chrupavky začínají změnou kolagenního typu II v typy I a III (jednotlivé typy kolagenu budou popsány níže), jejímž výsledkem je úbytek základní hmoty chrupavky. Následně onemocnění napadá také kosti pod chrupavkou (tj. subchondrálně) a způsobuje zánět synoviální membrány. Tyto stavy jsou již velmi bolestivé a je proto vhodné jim předcházet zejména adekvátní výživou chrupavky, protože patologie je založena na nerovnovážném procesu obnovy extracelulárního matrix [4].

Sekundární osteoartróza navazuje na patologický kloubní proces, vzniká následkem vrozené vady, vývojové dysbalance, následkem traumatu, popřípadě díky jinému kloubnímu onemocnění (např. krystalická artropatie – dna), či z důvodu mechanického přetížení (např.

sport, jednostranná zátěž kloubů). Její původ tedy není v chrupavce. Erozivní osteoartróza, separovaný typ OA, u které se více projevují záněty, postihuje zejména klouby rukou a je charakterizována přítomností erozí [4].

Léčbu OA je možné rozdělit na nefarmakologickou, ve které je důležitá zejména edukace postiženého, změna životosprávy či fyzioterapie. Farmakologická léčba se opírá zejména o podávání analgetik, antirevmatik a ve zvláště těžkých případech intraartikulární aplikace glukokortikoidů. Dále jsou podávány strukturu modifikující farmaka s obsahem chondroitinu sulfátu a glukosaminu sulfátu. Posledními možnostmi jsou řešení chirurgická, např. zavedení endoprotézy, či transplantace štěpů chrupavky [5].

Pacienti trpící osteoartrózou jsou typickými spotřebiteli doplňků stravy kloubní výživy. Lze jim doporučit preparáty především kombinující kolagen s glukosaminem a chondronitinem a metylsulfonylmetanem (MSM), s podporou užívání kyseliny askorbové [6]. Na následujícím obrázku je porovnán zdravý kloub, s kloubem napadeným osteoartrózou.



Obrázek 1: Srovnání zdravého kolenního kloubu a kloubu postiženého gonartrózou [7]

1.3.2 Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida (RA) je také jedním z rozšířených kloubních autoimunitních onemocnění. Na rozdíl od osteoartrózy ovšem nepostihuje pouze klouby, ale také jiné tělní orgány. RA trpí 0,3 - 1,5% populace všech věkových a rasových skupin, přičemž opět postihuje ve větší míře ženy, u nichž je četnost tohoto onemocnění čtyřikrát vyšší. Pro RA je typický symetrický a erozivní zánět kloubu, který může vyústit v destrukci celého kloubu a tedy i ve vznik deformace, poklesu funkce a stability. V některých případech se pojí také s mimokloubním postižením [4, 8].

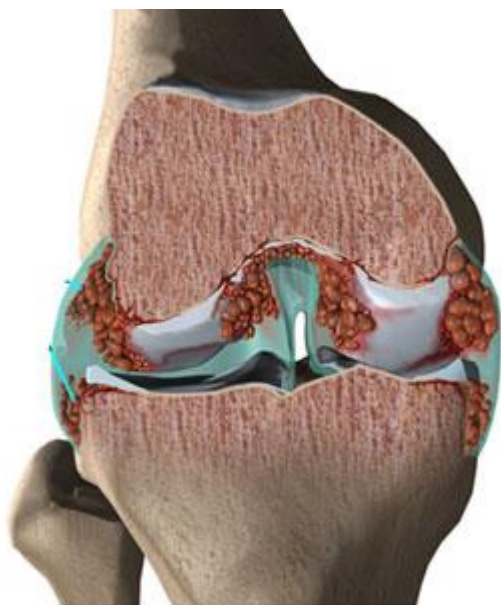
Na rozdíl od osteoartrózy, již řadíme mezi onemocnění degenerativní, patří revmatoidní artritida mezi tzv. autoimunitní onemocnění, kdy dochází k reakci vlastního imunitního systému proti různým tkáním vlastního těla. Zde dochází k tomu, že bílé krvinky (leukocyty) proniknou z krevního řečiště do kloubní dutiny a sehrají zde zřejmě významnou roli při zánětu synoviální membrány. Postupem času zanícená synoviální membrána přeroste v panus – prokrvenou vrstvu granulační tkáně, která těsně přiléhá na kloubní chrupavky. Panus chrupavku a často i pod ní ležící kost rozruší. Jakmile je chrupavka zničena, panus se přemění na vazivovou jizevnatou tkáň, která spojuje kostní konce. Tato jizevnatá tkáň může zkostnatět a konce kostí se spolu spojí, čímž je kloub znehybněn. Mezi základních pět příčin revmatologických onemocnění, mezi něž se revmatoidní artritida řadí, patří zejména věk, neboť, jak již bylo zmíněno, toto onemocnění se projevuje převážně u starších generací. V poslední době však zaznamenáváme nárůst degenerativních kloubních onemocnění také u mladších lidí. Přesná příčina vzniku revmatoidní artritidy není známa. Ke vzniku onemocnění pravděpodobně dochází následkem kombinace mnoha faktorů, jako jsou genetické predispozice, životní styl (např. kouření) a některé faktory okolního prostředí (např. virové infekce) [9].

Průběh nemoci bývá variabilní. Trvale progresivní je zaznamenán u přibližně deseti procent případů, kdy klouby nemocných mají výraznou tendenci k destrukci. Existuje také monocyklický průběh, který má relativně dobrou prognózu a po cyklu nemoci následuje remise na dobu delší jednoho roku. Nejčastějším je typ polycyklický, charakterizovaný

postupnou progresí s epizodami nekompletních remisí. Celkově onemocnění zkracuje život postiženého až o deset let [4].

V léčbě dominuje farmakologický postup, který využívá především antirevmatik, choroby modifikujících léků, glukokortikoidů a biologické léčby, které výrazně zvyšují kvalitu života, ač nemohou vést k definitivnímu vyléčení. Neméně důležitá je ovšem také léčba nefarmakologická, kdy je postižený o své chorobě poučen, je mu upraven režim a je nastolena fyzikální léčba fyzio- a ergoterapeuta, jejímž cílem je maximalizace uchování funkční schopnosti a rozsahu pohybu kloubů. Také chirurgická léčba výrazně zlepšuje stav při tomto onemocnění. Používání kloubní výživy je zatím sice méně běžné, ale je odůvodněné. Platí obdobné zásady jako v případě osteoartrózy [4, 8].

Pro doplnění textu, je na následujícím obrázku představen kloub napadený revmatoidní artritidou.



Obrázek 3: Kloub postižený revmatoidní artritidou [9].

1.3.3 Psoriatická artritida

Psoriatická artritida (PsA) je onemocnění, které postihuje pět až sedm procent populace trpící lupenkou (psoriázou). Je to zánětlivé onemocnění, které se projevuje mimo jiné bolestmi páteře a kloubů, má ovšem méně maligní postup než revmatoidní artritida. Nejčastější věkovou skupinou jsou muži a ženy mezi třiceti a padesáti lety, vzácně, neboť se projevuje obvykle po deseti letech od prvních příznaků lupenky, postihuje také děti. Postihuje jeden a více kloubů a podle závažnosti a pokročilosti se člení do pěti klinických typů [4].

Nejméně závažná je asymetrická PsA (oligoartikulární), která zasahuje pouze jednu polovinu těla a je nejčastější. Symetrická PsA se projevuje na zrcadlových kloubech (klouby naproti sobě) a postihuje častěji ženy než muže. Třetím typem je distální interfalangeální artropatie, při které jsou nejvýraznějšími obtížemi bolesti článků prstů, které jsou nejbližší nehtu. Tato forma postihuje převážně muže. Následuje spondylitida, která způsobuje zánět a bolestivé ztuhnutí kloubních spojení mezi obratli. Vzácná je mutilující artritida, jež je nejzávažnější formou PsA, jejím postupem dochází k destrukci kůstek ruky, především prstů a dochází tak k trvalému poškození [4, 5].

Prozatím neexistuje účinná léčba, pomocí léčby symptomatické však lze zmírnit její příznaky. K symptomatické léčbě je možné doporučit také užívání potravinových doplňků, které vyživují kloubní tkáň a její okolí [4].

Pro ilustraci je zařazen rentgenový snímek ukazováčku pacienta s psoriatickou artritidou.



Obrázek 4: RTG - psoriatická artritida [10].

1.4 Obecné příčiny kloubních onemocnění

V předchozí části jsou popsána vybraná kloubní onemocnění, u každého z nich jsou pak nastíněny jeho příčiny. Obecně ale existuje, jak již bylo řečeno, více než 200 různých nemocí kloubního aparátu a v závislosti na nich se také mění skupiny uživatelů potravinových doplňků zaměřených na výživu a regeneraci kloubů. Z hlediska rozsahu práce jsou vybrány pouze některé faktory způsobující vznik onemocnění kloubů a pohybového aparátu celkově.

1.4.1 Vybrané příčiny onemocnění

Mezi vybrané obecné příčiny kloubních onemocnění patří následující:

- **Osobní anamnéza** – Pokud je v rodině predispozice ke kloubním onemocněním, zvyšuje se také pravděpodobnost jejich výskytu u následujících generací [8].

- **Obezita** – Se zvyšující se váhou člověka se také zvyšuje tlak, který je vyvinut na pohybové ústrojí. Z tohoto důvodu mohou být klouby přetěžovány i přes nízkou intenzitu zátěže, která na klouby působí [8].
- **Věk** – Se zvyšujícím se věkem klesá celková obranyschopnost organismu, ten je proto náchylnější k onemocnění než organismus mladý. Toto tvrzení však v případě nemocí kloubů platí pouze částečně. Některé nemoci se mohou projevit také u dětí. Nejznámější skupinou jsou ovšem artrotické onemocnění, která se v největší míře objevují u seniorů. Trend prodlužování života pak zapříčiňuje také nárůst množství těchto nemocí [8].
- **Pohlaví** – Jednotlivá onemocnění mají různou tendenci napadat muže a ženy. Je prokázáno, že například revmatoidní artritida postihuje mnohem častěji ženy a má u nich také malignější průběh. Naopak dnou trpí spíše muži [8].
- **Úraz** – Každý z úrazů naruší rovnováhu organismu. Vhodným příkladem jsou zlomeniny, které již v důsledku střednědobé indispozice vedou k ochabnutí kosterního svalstva a kloubních úponů na postižené končetině. Důsledky jsou stejné jako v případě faktoru nedostatečného pohybu. Při zlomeninách končetin vždy zvyšujeme zatížení té zrcadlové. Dochází tedy k nerovnoměrnému opotřebování kloubů [8].
- **Jiná nemoc** - Kloubní onemocnění, zejména ta zánětlivá, mohou být vyvolána také přestupem infekce z jiné části těla, např. u chřipkových onemocnění či infekční žloutenky.
- **Kouření** – Při kouření spotřebuje lidské tělo mnohem více vitaminů a minerálů než u nekuřáků. Je to dáno tím, že například vitamín C (kyselina askorbová) a selen částečně zabraňují vstřebávání jedů vdechovaných cigaretami a působí tak jako prevence rakoviny plic. V tomto případě se ale například kyselina askorbová nemůže podílet na zvyšování pevnosti cév, vlasečnic, tvorby kolagenu [11].

- **Abusus alkoholu** – Podobně jako při kouření znamená nadměrná konzumace alkoholu pro lidský organismus zbytečnou přítěž, v jejímž důsledku jsou vyplavovány vitamíny a minerály, které tělo potřebuje ke své výživě a regeneraci. Mezi mnohými zmiňme opět vitamín C, který podporuje tvorbu kolagenu, tolik nezbytného pro zdraví pohybového aparátu (především kloubů, ale také kostí a vazů) [11].
- **Nadměrný pohyb** – Příkladem nadměrného pohybu může být aktivní sport. Při příliš častém sportu jsou klouby vystaveny nadměrnému opotřebenému, které v případě nedostatečné kloubní výživy vede k úbytku chrupavky a následnému poškození synoviální kosti. Nadměrným pohybem jsou zatíženy také vazy, které vyžadují podobnou péči jako klouby [11].
- **Nedostatečný pohyb** – Při nedostatečném pohybu ochabuje celý pohybový aparát. Při nárazové “akci” pak má tendenci k rychlému přetížení a tím i opotřebenému. Jedním z důsledků nedostatečného pohybu je také obezita, popsána již výše [11].
- **Stres** – Dlouhotrvající stres je jedním z příčin autoimunitních poruch. Stres neúměrně zatěžuje a vyčerpává organismus a onemocnění (například revmatoidní artritida) pak napadá nejen klouby, ale také okolní tkáň [11].
- **Nevyvážená strava** – Strava chudá na bílkoviny a tuky vede ke snížené tvorbě synoviální tekutiny a v důsledku tedy také k opotřebenému kloubu. Nadměrné množství bílkovin, ovšem vede v určitém procentu případů ke dně, tedy kloubnímu onemocnění, kdy se důsledkem poruchy metabolismu purinů a pyrimidinů ukládají na synovii krystaly kyseliny močové. Nevyvážená strava také zapříčiňuje nedostatek vitamínů a minerálů důležitých nejen pro regeneraci kloubu, ale také kostí, svalů a jiných tkání [11].
- **Jednostranně zatěžující dlouhodobá pracovní činnost** – Neergonomické vykonávání práce vede opět k nadměrnému zatížení kloubů. Příkladem mohou být rutinní typy práce vykonávané v pásové výrobě, ale také kancelářské práce, kdy se při používání počítače značně opotřebávají klouby horních končetin, zatímco

klouby dolních končetin během této doby ochabují. Zatížená jsou také záda, což souvisí se špatným držením těla [11].

- **Špatné držení těla** – Především při dlouhodobém sezení jsou zatíženy meziobratlové klouby a klouby zad v oblasti kříže. Namáhána je také krční páteř. V případě nevyhovující, neergonomické židle či křesla jsou zatíženy také klouby kyčelní [8].
- **Chlad** – Prochladnutí kloubů může vést ke zhoršení revmatologických onemocnění.
- **Porucha imunitního systému** – příkladem jsou autoimunitní onemocnění, kdy organismus sám vytváří látky napadající kloubní tkáň [4].

1.5 Možnosti léčby kloubních onemocnění

Vzhledem k množství druhů nemocí existuje i množství léčebných postupů. Každý z nich však obsahuje minimálně dvě složky – farmakologickou léčbu a léčbu bez využití léků. U všech onemocnění lze také doporučit užívání potravinových doplňků, které chrupavku a její okolí vyživuje a regeneruje. V mnohých případech nastupuje také alternativní léčba, která je založena na psychickém stavu postiženého a celkovou léčbu doplňuje.

1.5.1 Léčba farmaky

Z důvodu časté bolestivosti nemocí, a to jak v klidovém stavu (např. revma), tak při pohybu (např. artróza) či přenesené bolesti na okolní tkáň (např. psoriatická artritida) jsou postiženým podávána analgetika. V závislosti na povaze onemocnění jsou podávána zejména nesteroidní antirevmatika. V případě akutního stavu je možná intraartikulární aplikace glukokortikoidů. Při osteoartróze je léčba často podpořena léky skupiny SYSADOA (*symptomatic slow acting drugs of osteoarthritis*), které obnovují metabolickou rovnováhu v chondrocytech, snižují bolestivost onemocnění a jsou protizánětlivé [4].

Vzorce chondroitin sulfátu, glukosamin sulfátu jsou společně s dalšími vybranými vzorci uvedeny jako příloha č. I. této bakalářské práce.

1.5.2 Význam potravinových doplňků při celkové léčbě

Nejrychlejší metabolismus bezcévné vazivové tkáně nacházíme v chrupavce, která tedy pro svou aktivitu vyžaduje dostatek živin. Jelikož se jedná o bezcévnou vazivovou tkáň, živiny se ke svému cíli dostávají pouze difusí skrze extracelulární matrix. Pro zachování chrupavky, která se nejrychleji opotřebovává, je rozhodující podíl a kvalita kolagenu. Vzhledem k silně proaktivnímu metabolismu může po doplnění potřebných látek (zejména kolagenních peptidů) docházet v poměrně krátké době k regeneraci poškozených oblastí. Je tedy vhodné do léčby zařadit také potravinové doplňky, které obsahují látky nezbytné pro výstavbu a výživu tkáně. Část z nich je řazena do skupiny SYSADOA (dříve chondroprotektiva), část tvoří vitamíny a minerály, antioxidanty (antihomocysteiny), případně přírodní výtažky, které podporují pružnost kolagenních vláken. Jednotlivé účinné složky potravinových doplňků jsou představeny v následující kapitole [4, 11].

1.5.3 Fyzioterapie

U naprosté většiny onemocnění pohybové soustavy je vhodná fyzioterapeutická léčba. Mezi doporučené cviky patří zejména ty, které posilují kosterní svalstvo a dopomáhají pružnosti kloubních vazů. Důraz je vždy kladen na maximalizaci zachování funkce kloubu a rozsahu jeho pohybu. Důležitá je také úprava životosprávy, která se často váže na úpravu hmotnosti postiženého, neboť jak bylo výše uvedeno, nadváha nadměrně zatěžuje klouby a je tedy překážkou efektivní léčby. Často je nutné také omezení aktivity, ať už na dobu nezbytně nutnou, nebo trvale. Nadměrná aktivita (zejména v případě profesionálních sportovců) rychle opotřebovává klouby. Vhodné je také vzdělávání postiženého a v případě psychických bloků (například z důvodů deformit) také psychologická pomoc [4, 11].

1.5.4 Alternativní léčba

Alternativní léčba se jen velmi zřídka indikuje samostatně, má však podpůrný efekt při léčbě celkové. Jedná se například o psychoterapii, která má ovšem účinky pouze u postižených, kteří se s ní ztotožňují, vyžívající zejména autosugesci a relaxační techniky. Rozšířenou podporou alopatické léčby je také víra, biblický výrok "Věř a víra tvá tě uzdraví" hledá oporu v psychice. Víru, či pozitivní myšlení, je tedy možné označit za určitý druh psychoterapie. Známa je také klimatoterapie, která působí pozitivně například u postižených psoriatickou artritidou. Popřípadě tepelná léčba teplo/chlad, která působí zejména proti bolesti. Existuje také homeopatický přístup k léčbě [11].

1.5.5 Chirurgická léčba

V případě velmi pokročilé nemoci, kdy je bolestivost na nejvyšších stupních a dochází k prokazatelné destrukci kloubu, jsou do kloubu chirurgicky zaváděny například chrupavčité čepy, popřípadě dochází k náhradě poškozeného kloubu endoprotézou. Tato léčba je vždy poslední možností a je praktikována, pouze když selžou předchozí metody. Potravinové doplňky mají i v tomto případě nezastupitelnou roli, neboť podporují regeneraci poškozených tkání [4, 12].

1.6 Skupina uživatelů potravinových doplňků

Skupinu uživatelů potravinových doplňků pro výživu a regeneraci kloubů je možné odvodit již na základě předchozí části textu. Kromě již nemocných kloubními onemocněními ji mohou tvořit aktivní sportovci, senioři a dále lidé s určitou dispozicí ke kloubnímu postižení nebo i lidé zdraví – zde hovoříme o preventivním podávání. Naopak uživatelé z řady dětí nejsou příliš četní, přestože by to bylo účelné, neboť v dětství se v průběhu růstu vytváří kvalita skeletu. Podáme nyní charakteristiku jednotlivých skupin ve vztahu k užívání potravinových doplňků.

1.6.1 Aktivní sportovci

Lidé aktivně věnující se sportu, jak již bylo řečeno, opotřebovávají své klouby mnohem intenzivněji než rekreační sportovci. Z tohoto důvodu potřebují speciální výživu, která klouby ochrání před nadměrným poškozením. Kloubům škodí zejména opakované doskoky a dopady na tvrdou podložku, kdy dochází k mikrotrhlinám v kloubní chrupavce [11].

1.6.2 Preventivní podávání

Lidé s dispozicemi k osteoartróze, jako je především rodinná anamnéza, by měli preventivně již od mládí užívat přípravky určené k ochraně a výživě kloubů obsahující kolagenní peptidy, jejichž účinek zesilují další látky skupiny SYSADOA (chondroitin, glukosamin, kyselina hyaluronová) a dále vitamíny a minerály. Preventivně je také důležité nepřetěžovat klouby, např. udržováním správné hmotnosti [11].

1.6.3 Senioři

Skupina seniorů je hlavním spotřebitelem těchto potravinových doplňků, neboť vzhledem k době opotřebovávání kloubů jsou nejčastěji postiženi zejména osteoartrózou. Organismus s navyšujícím se věkem ztrácí na schopnosti doplňovat do kloubů výživu, proto je vhodné jej podpořit konzumací potravinových doplňků obsahujících kolagenní peptidy a další podpůrné látky skupiny SYSADOA a vitamíny a minerály. U rady případů onemocnění již nelze degenerativní stav zvrátit, užíváním těchto výrobků je ovšem možné zlepšit kvalitu života nemocného [11].

1.6.4 Pacienti po úrazech a operacích

Po chirurgické a farmakologické léčbě bývá v případě úrazů pohybového aparátu ordinována rehabilitace. Již při ní je možné dopomáhat rekonvalescenci kloubů s pomocí potravinových doplňků. Jedná se o fázi dlouhodobou, doléčovací, při které hrají významnou roli symptomatické látky skupiny SYSADOA, ale především kolagenní peptidy, pomocí kterých je obnovována kostní, chrupavčitá i pojivová tkáň [11].

1.7 Potravinové doplňky

V této kapitole uvedeme charakteristiku jednotlivých složek doplňků stravy používaných v léčbě kloubních onemocnění. Popsány budou hlavně účinné látky v nich obsažené, s výjimkou kolagenu, který je popsán v kapitole následující, neboť tvoří jádro celé práce.

1.7.1 Účinné složky potravinových doplňků určených k regeneraci kloubní tkáně

1.7.1.1 Kolagenní peptidy

Kolagenní peptidy jsou hlavní účinnou složkou doplňků stravy, je možné je označit za "stavební kameny" kolagenu. Obsahují vysoké dávky glycinu a prolinu, hydroxyprolinu a hydroxylyzinu, jež jsou nezbytné pro vystavění pevné struktury kolagenních vláken. Kolagenní peptidy zvyšují tvorbu kolagenu a podporují tvorbu chrupavčitých i okolních tkání kloubu a urychlují tak regenerační procesy. Blíže jsou kolagenní peptidy představeny v kapitole struktura kolagenu [11].

1.7.1.2 Glukosamin sulfát

Glukosamin, který je získáván extrakcí z korýšů, je součástí polysacharidů, které v chrupavce udržují vodu a přispívají tak k její pružnosti. Jedná se o látku označovanou jako "kloubní výživa", která příznivě ovlivňuje metabolismus chrupavky a je přirozeně, podobně jako chondroitin sulfáty, navázána na proteoglykany. Sám, či v kombinaci s chondroitinsulfáty, udržuje glukosamin sulfát flexibilitu a pohyblivost kloubu, aktivně vyhledává a pozitivně ovlivňuje poškození chrupavky. Substituuje tedy fyziologický úbytek glukosaminu v chrupavkách a synoviální tekutině. Dalším přínosem je potlačení bolestivých projevů kloubních zánětů, výživa a v jejím důsledku také zvýšení hybnosti kloubů. Je jednou z látek skupiny SYSADOA, po ukončení užívání doporučených denních dávek (1500 mg denně po dobu nejméně 2 měsíců) přetrvává jeho účinek po dobu několika dalších týdnů [11].

1.7.1.3 Chondroitin sulfáty

Chemicky správně chondroitin-4-sulfát a chondroitin-6-sulfát jsou polysacharidy, které spojují buňky v živočišných tkáních (součást mezibuněčné hmoty). Chondroitin sulfát díky svému zápornému náboji zadržuje v chrupavkách vodu a přispívá tak k jejich pružnosti. Nachází se zejména v chrupavkách, kostech a kůži, šlachách glykoproteinech slin, pro výrobu potravinových doplňků je získáván extrakcí z hovězích či vepřových chrupavek. Patří, stejně jako glukosamin sulfát ke skupině SYSADOA a při dlouhodobém užívání doporučené denní dávky (800 až 1 200 mg denně po dobu dvou měsíců) se prokázaly příznivé účinky při artróze kloubu, jeho zánětu a s ním spojené bolestivosti. Společně s glukosamin sulfátem pomáhá udržovat zdraví a pohyblivost kloubu [11].

1.7.1.4 Antioxidanty

Například v podobě selenu snižují tvorbu vlastních látek, které by mohly zhoršovat zánětlivá onemocnění. Antioxidanty ničí volné radikály, které v těle vznikají například působením stresu, aktivním či pasivním kouřením. Chrání buňky a tkáně, a podporují v nich látkovou výměnu. Mezi antioxidanty používané v dostupných přípravcích patří např. výtažky ze zeleného čaje, vitamíny C, E, selen a ostropestřec mariánský. Vitamín E (alfa-tokoferol) a vitamín C (kyselina askorbová) také velmi rychle reagují s volnými radikály. Zejména vitamín C podporuje formaci kolagenních vláken a podporuje hojivé procesy, neboť je kofaktorem enzymů zúčastněných při biosyntéze kolagenu. O zvýšený příjem tohoto nezbytného vitamínu by měli dbát zejména kuřáci, u kterých se spotřeba až ztrojnásobuje. Vitamín E je nezbytný mimo jiné k udržení zdravého stavu kostí, zubů, chrupavek a kožních derivátů. Selen je nezbytný pro zdravou kardiovaskulární funkci a působí proti rychlému stárnutí. Extrakt z ostropestřce přispívá k pročištění organismu [11, 13].

1.7.1.5 Minerály

Nezbytný pro budování struktury kosti je vápník. Přínos jeho přítomnosti ve tkáňových tekutinách spočívá především v mechanismu srážení krve. Napomáhá ale také udržování

chemické rovnováhy v těle a podílí se na kontrakci svalových vláken, čímž ovlivňuje také činnost kloubu. Úzce vázán na vápník je hořčík. Je nezbytný pro zapracování vápníku do kostí. Hořčík je nezbytným prvkem pro činnost hypofýzy, která spouští hlavní obranné mechanismy, které mají zabezpečit mobilizaci energetických zásob, uložených v glykogenu. Biochemická aktivita hořčíku spočívá v aktivaci celé řady enzymů. Podílí se na metabolismu tuků a bílkovin. Také nedostatek manganu brání účinnému zabudování vápníku do kostí. Je kofaktorem enzymu glukosyltransferázy, která ovlivňuje tvorbu glykosaminoglykanů. Při výraznějším, déletrvajícím nedostatku může být tento proces tak silně narušen, že ani zvýšený přívod vápníku v potravě nezajistí odpovídající zlepšení při léčbě osteoporózy. Dalšími důležitými minerály jsou měď, mangan a železo, především jejich organické zdroje. Přičemž měď napomáhá organismu k využívání železa a stavbě pohybového aparátu a kožních derivátů. Využíváný je zejména glukonát měďnatý, kdy je měď v organické vazbě. Doporučená denní dávka je pro zdravého dospělého jedince činí 0,9 mg/den. Důležitost mědi spočívá zejména v její přítomnosti v řadě enzymů [11, 13].

1.7.1.6 Biotin

Také označovaný jako vitamín H, je klíčovou látkou umožňující propojení mezi metabolismem cukrů a tuků. Napomáhá budování vlastních tělesných bílkovin a je tedy opět nezbytný pro zdravou kůži, kosti, zuby a kožní deriváty [11, 13].

1.7.1.7 MSM

Methylsulfonylmethan je vhodné použít zejména v kombinaci s hydrolyzáty kolagenu a glukosaminu. MSM dodává organickou podporu výstavby kolagenu. Zároveň detoxikuje organismus a zvyšuje krevní oběh [11, 13].

1.7.1.8 Kadidlovník pilovitý

Výtažek z *Boswellia serrata* chrání trávicí ústrojí a má pozitivní účinky při mechanismu vyprazdňování. Mimo tento pozitivní efekt je v léčbě kloubních onemocnění účinná zejména kadidlovníková guma, která má analgetické, antiartritické a protizánětlivé účinky. Pro

ověření těchto účinků byla v Indii provedena dvojitě slepá, randomizovaná, placebem kontrolovaná multicentrická studie ověřující účinky, bezpečnost a snášenlivost extraktů *Boswellia serrata* u třiceti pacientů s gonartrózou [12, 14].

1.7.1.9 Tripeptid glycin-histidin-lysin

Ovlivňuje metabolismus chrupavčitých a kostních buněk, podněcuje jejich množení a tedy i vznik nových regeneračních buněk kloubní tkáně [11].

2 KOLAGEN

Kolagen činí chrupavku elastickou, odolnou, funkční. V předchozí kapitole bylo popsáno, co jeho nedostatek v důsledku různých onemocnění způsobuje, jak je možné nepříznivé dopady jeho absence léčit a kterými účinnými látkami potravinových doplňků je vhodné jeho tvorbu a regeneraci podpořit. V této kapitole bude popsána struktura kolagenu a jeho vlastnosti.

2.1 Základní fakta

Kolagen je nejrozšířenějším živočišným fibrilárním proteinem, který se objevuje již v embryonálním stádiu, kdy je zodpovědný především za strukturální vývoj buněk, později přebírá role jiné, především protektivní, díky své elasticitě. Je součástí extracelulární matrix. V lidských tkáních bylo nalezeno více než 11 různých typů kolagenů, celkově u živočichů rozeznáváme 27 kolagenních typů a rešerše neustále pokračuje, neboť kolagen je významnou složkou vnitřního podpůrného mechanismu kostí, chrupavek, šlach, vaziva, kůže, ale také cévních stěn, rohovky a dalších tělních orgánů. Obsahují jej tedy téměř všechny pojivové tkáně. Nejhojněji zastoupené jsou kolageny typů I – V, které jsou také nejvíce prozkoumány. Tato práce se jimi bude zabývat v následující kapitole. Nyní představme strukturu kolagenu [15].

2.2 Struktura

Struktura kolagenu je námětem pro četné výzkumy. Od osmdesátých let jsou u živočichů objevovány stále nové kolagenní struktury. Následující řádky jsou přiblížením stávajících poznatků v této oblasti. V úvahu jsou vzaty čtyři struktury - primární, sekundární, terciární a kvartérní. Pro popis struktury je použit kolagen prvního typu (typ I), a to z důvodu omezeného rozsahu práce a odlišnosti struktur jednotlivých peptidových řetězců. Nicméně struktury dalších typů kolagenů jsou námětem pro budoucí výzkumy, a to sice především praktické, neboť jejich teorie již byla popsána [16].

Primární struktura popisuje sekvenci aminokyselin v peptidovém řetězci, popisuje charakter peptidových vazeb a znázorňuje polohu, počet a charakter vedlejších vazeb. Charakteristickou kyselinou kolagenu je hydroxyprolin, vznikající modifikací prolinu za účasti kyseliny askorbové, který se ve větším množství nachází prakticky pouze v této bílkovině [15]. Obsahuje také samotný prolin, který spolu s hydroxyprolinem podmiňuje jeho sterickou rigiditu (projevuje se jako nemožnost volného otáčení okolo vazby C α -N a ztíženým otáčením okolo vazby C α -CO) a odlišnou orientaci polypeptidických řetězců, než je tomu v případech bílkovin obsahujících menší množství cyklických aminokyselin. Kolagen obsahuje také značné množství glycinu (330 mol/1000 mol aminokyselin), který tvoří poměrně pravidelně každou třetí aminokyselinu v sekvenci řetězců. Toto rozložení umožňuje spojení řetězců do trojitě šroubovice, popsané níže, v rámci sekundární struktury kolagenu. Důležitou látkou v kolagenu je také hydroxylyzin, který je významný především díky své vázanosti na cukerné složky. Charakteristická je také přítomnost tyrozinu, nahromaděného v telopeptidech (terminálních peptidech). V poměrně malém množství jsou zastoupeny leucin a izoleucin, methionin a cystein. Cystein se v kolagenu I. typu vyskytuje pouze u nejnižších organismů. Methionin má svou funkci především při bronkyanovém štěpení při studiu primární struktury kolagenu [15].

Díky studiu primární struktury kolagenu bylo zjištěno, že jsou v něm prostřídány polární a apolární oblasti, přičemž polární oblasti je možné rozdělit na obsahující bazické a kyselé aminokyseliny. V apolárních částech se pravidelně střídají sekvence Gly-Pro-R, přičemž na pozici R je možné dosadit aminokyseliny – například Hyp, Met, Ser, Ala a další. Jeden řetězec tvoří přibližně 1000 aminokyselin, celá molekula má potom přibližně trojnásobný aminokyselinový obsah [16].

Sekundární struktura popisuje prostorové uspořádání, jež je dáno sekvencí aminokyselin a fixováno jejich ne vazebnými interakcemi. Struktura kolagenu je jako u většiny proteinů α -helix pravotočivá. Na rigidním uspořádání polypeptidového řetězce se podílí intramolekulové vodíkové vazby C α - N a C α - CO, vycházející z α uhlíkového atomu [15]. Základem sekundární struktury kolagenu je levotočivá polypeptidová šroubovice se

stoupáním 0,95 nm, která je svinutá do pravotočivé struktury superhelixu. Jednotlivé peptidy jsou od sebe vzdáleny 0,286 nm a celková délka řetězce je 290 nm, což je charakteristický rys právě kolagenu, neboť jinde se vyskytuje pouze u proteinů s podobnou sekvencí aminokyselin [16].

Při výzkumu **terciární struktury** kolagenu je pozornost zaměřena na konformaci polypeptidového řetězce, tedy na jednotlivé prvky sekundární struktury a jejich prostorové uspořádání. Terciární struktura je tvořena třemi navzájem ovíjejícími se levotočivými řetězci tvořícími trojitou pravotočivou šroubovici o průměru 1,4 nm v délce 290 nm. Takto vzniklý provazcovitý útvar se nazývá tropokolagen, který je základní stavební jednotkou kolagenu. Jeho soudržnost je dána sousedícími vodíkovými vazbami, které vznikají, pouze když jsou všechny tři řetězce v těsné blízkosti. Tuto blízkost zajišťuje přítomnost glycinu [16].

Kvartérní struktura stanovuje kolagen jako fibrilární bílkovinu, jeho struktura je tedy vláknitá. Fibrily jsou dlouhé a pevné a vyskytují se ve všech pojivových tkáních. Jedna molekula měří přibližně 300 nm. Jednotlivá vlákna je možné dále členit, a to až na mikrofibrily s uspořádáním C- konec a N- konec [16].

2.3 Vlastnosti kolagenu

Kolagen je pro lidský organismus nepostradatelný, jeho absence v kloubech způsobuje četná onemocnění, jak je pojednáno dříve. Je obnovitelný a jeho zdroje jsou téměř neomezené. Proto je používán při výrobě potravinových doplňků. Současně jsou hledána nová možná využití a to jak v oblasti léčby kloubních onemocnění, tak také v jiných oborech. Pro práci s ním je však nezbytné znát jeho vlastnosti, a tedy v této části bakalářské práce jsou popsány jeho základní charakteristiky.

Fyzikálně-chemické vlastnosti

Podobně jako jiné bílkoviny, má kolagen polyelektrolytický charakter, což znamená, že se náboj molekuly kolagenu mění v závislosti na změně pH. Některé ze skupin jeho postranních řetězců ionizují v zásaditém a některé v kyselém prostředí. V silně zásadité oblasti je náboj molekuly záporný, v silně kyselém je kladný. Izoelektrický bod nacházíme při pH 7. Je to hodnota pH, při které je počet protonů připojený ke skupině $-NH_2$ roven množství protonů odtržených od skupiny $-COOH$ [17].

Další vlastností je stabilita kolagenu v hydrotermálním prostředí. Kolagenní vlákna se ve vodném prostředí zkracují přibližně o jednu třetinu. Důvodem tohoto smrštění je štěpení v intra- a intermolekulárních vazbách. Vazby tohoto typu udržují spirální stavbu v kolagenovém vlákně. Zkrácení způsobuje štěpení vodíkových vazeb, způsobené izotropními činidly. Teplota nezbytná pro tuto reakci se u savců pohybuje od 60 °C do 65 °C [17].

Při zahřívání ve vodním prostředí vzniká z kolagenu želatina. Při teplotě 90 °C jsou přerušeny vazby mezi polypeptidovými řetězci a kolagen pak vytvoří želatinový sol - při ochlazení pak znovu vzniká organizovaná struktura, ovšem s možnými modifikacemi. Dlouhodobým působením teploty dochází k částečné hydrolyze kolagenu - tedy ke změně jeho primární struktury, čili denaturaci. Při zpětném ochlazení želatiny vzniká opět kolagen s více či méně organizovanou strukturou. Tento proces je nazýván renaturací [18].

Kolageny jsou přibližně z 20% tvořeny vodou. Ta je nezbytná proto, aby byly udrženy fyzikální vlastnosti kolagenu. Ve stoprocentně hydratovaném stavu se uvolňují pohybová omezení peptidových řetězců. Proto obsahují kolageny dva druhy hydrofilních center, které tuto hydrataci zajišťují. Prvním z nich jsou peptidické vazby kyslíku a dusíku, druhým jsou polární skupiny v řetězcích některých aminokyselin [18].

Kolagen se z fyzikálně-chemického pohledu řadí mezi gely - koloidní soustavy, u nichž je nejdůležitější vlastností bobtnání. Při ponoření do vodného prostředí kolagenní vlákna omezeně bobtnají. První příčinou je hydratace hydrofilních center (popsaných výše), jedná se o tzv. hydratační vodu, která je odstranitelná pouze sušením. Druhou příčinou je bobtnací voda, tu lze odstranit mechanicky. Sloučeniny, odpovědné za toto bobtnání, mohou mít

schopnost štěpit vodíkové vazby, popřípadě rozpouštět kolagen (při vysoké teplotě ve vodném prostředí) [18].

2.4 Jednotlivé typy kolagenu

Ze sedmadvaceti doposud známých typů kolagenu jsou v této práci představeny pouze čtyři. Tyto čtyři typy kolagenu se vyskytují v lidském organismu a plní v něm nezastupitelné role - především podpůrné. Popis zbylých typů kolagenu svým rozsahem přesahuje rozsah této bakalářské práce. Mohl by představovat námět budoucí diplomové práce. Na konci této kapitoly je uvedena přehledná srovnávací tabulka jednotlivých typů.

2.4.1 Kolagen typu I

Kolagen prvního typu je v lidských tkáních nejrozšířenější. Představuje přibližně 90% všech kolagenů v lidském těle. Sestává z jednotlivých kolagenních vláken dlouhých 1-20 μm , které mají strukturu triple-helixu, který tvoří tři polypeptidické řetězce obsahující ve velké míře aminokyseliny glycin, prolin, hydroxyprolin a hydroxylyzin (popsáno výše). Strukturálně obsahuje dva stejné řetězce aminokyselin značené $\alpha 1$ a jeden řetězec odlišný – $\alpha 2$. Podle jeho rozpustnosti v různých prostředích jej můžeme dělit na Neutral Salt Soluble Collagen (NSC), který je rozpustný pouze v neutrálních solích, Acid Soluble Collagen (ASC), rozpustný v kyselinách a Insoluble Collagen (ISC) který je z části rozpustný při denaturaci a částečně nerozpustný [15]. Kolagen prvního typu je převážně přítomen v kostech, šlachách, pokožce a zubech. Tento typ kolagenu má širokospektré využití, a to nejen v potravinářské výrobě (například při výrobě potravinových doplňků vyživujících kostní tkáň při léčbě osteoporózy) ale také ve výrobě kosmetických přípravků, kdy je obsažen v přípravcích proti stárnutí pokožky. Své místo má také při výrobě chirurgických nití. Je také nosičem léčiv nebo stimulačních látek, především díky svým fyzickým vlastnostem – pružnosti, vstřebatelnosti a toxicitě. Ve výzkumu je používán jako podklad pro pěstování tkáňových struktur a je často využíván při výrobě tkáňových náhrad [20].

2.4.2 Kolagen typu II

Na rozdíl od kolagenu prvního typu, obsahuje tento typ více hydroxylyzinu a postranních řetězců cukrů. Je složen ze tří polypeptidických $\alpha 1$ řetězců a jeho vlákno je pak 67 nm dlouhé. Ze všech ostatních typů kolagenu je nejhojněji zastoupen v extracelulární matrix, kde přispívá k podpůrné funkci. Často je využíván ve tkáňovém inženýrství, zejména proto, že slouží jako „pletivo“, na kterém se uchycují a správně rozmístí chondrocyty. Staví tedy pro optimální funkci chrupavky nezbytnou arkádovou strukturu. Je převážně nerozpustný (výjimkou je kolagen II embryí) a k jeho izolaci je používáno pepsinové štěpení. Kolagen II se nachází v chrupavkách, kde tvoří přibližně 50% celkového objemu, proto je společně s kolagenem typu I z hlediska využitelnosti pro pohybový aparát nejdůležitější [16, 20].

2.4.3 Kolagen typu III

Dříve byl nazýván také retikulín, zejména proto, že jeho fibrily, spojené ve vlákna tvoří retikulární síť, ve kterých jsou více či méně pravidelně uspořádány. Retikulární síť jsou oporou měkkých tkání, proto tento typ kolagenu nalezneme především 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, avšak obsahuje více proteoglykanů a glykoproteinů. Odlišuje jej zejména přítomnost disulfidických můstků na konci -C s vysokým obsahem hydroxyprolinu. Se stárnutím organismu tohoto kolagenního typu v tkáních ubývá, proto jej nalezneme především v mladých tkáních [16, 20].

2.4.4 Kolagen typu IV

Tento typ kolagenu netvoří ani fibrily, ani vlákna, je typem amorfním. Stejně jako předchozí typy je tvořen helikálními strukturami, k nimž jsou však připojeny také oblasti nehelikální, které jeho strukturu narušují. K jeho izolaci je vhodné použít proteolytického štěpení pepsinem. Je nazýván kolagenem bazálních membrán. Řetězce tohoto typu mají následující podoby: dva stejné řetězce $\alpha 1$ a jeden odlišný $\alpha 2$ [15].

2.4.5 Srovnání kolagenních typů I-IV

V následující tabulce jsou přehledně srovnány čtyři výše uvedené typy kolagenu. Tabulka je uváděna s cílem zefektivnit a zpřehlednit udávané informace [15, 16, 20, 21].

Tabulka 1: Srovnání kolagenních typů I-IV

Kolagen	Řetězec molekuly	Struktura	Izolace	Charakt. znaky	Hlavní oblasti výskytu
Kolagen I	$[\alpha 1(I)]_1 [\alpha 2(I)]_2$	Vlákna 67nm	Pepsinová digesce	Nejrozšířenější NSC ASC ISC - druhy rozpustnosti	Kost, kůže, vazy, zuby (dentin)
Kolagen II (retikulín)	$[\alpha 1(II)]_3$	Vlákna 67nm	Pepsinová digesce (embrya)	Více hydroxylyzinu a cukerných postranních řetězců	Chrupavka
Kolagen III	$[\alpha 1(III)]_3$	Vlákna 67nm	Pepsinová digesce	Se stářím ubývá, je nahrazen kolagenem I	Kolagen embryonálního vývoje
Kolagen IV	$[\alpha 1(IV)]_2 [\alpha 2(IV)]_1$	Amorfni	Proteolytické štěpení pepsinem	Netvoří fibrily	Bazální membrány epitelu

2.5 Metabolismus kolagenu a jeho využití

Výstavba kolagenové struktury má několik fází, některé z nich nejsou při biosyntéze obvyklé, což je dáno strukturou molekuly kolagenu. Je možné pozorovat čtyři fáze: syntéza, agregace, polymerace a maturace. Následuje odbourávání, jako přirozený vývoj maturace. Jednotlivé fáze jsou představeny níže. Abychom splnili cíl práce a objasnili, proč

je kolagen používán při léčbě kloubních onemocnění, následuje také popis využití metabolismu kolagenu.

2.5.1 Syntéza

První fází je syntéza, při níž je předpokládáno, že polypeptidický řetězec fibrilárních proteinů vzniká podobně jako u globulárních. Tento předpoklad je zatížen vysokou váhou řetězce (získanou díky množství postranních řetězců a aminokyselin). Na syntéze se podílí několik ribozómů, kdy na jejich povrchu vzniká peptidický řetězec s vysokým obsahem prolinu. Před uvolněním polypeptidického řetězce je na základě pořadí okolních aminokyselin hydroxylován lyzin a prolin. Průběh hydroxylace nezávisí na prostorovém uspořádání α -řetězců, jak prokázal Katchalski v roce 1967, a její porucha se projevuje sníženou stabilizací kolagenní struktury [16].

2.5.2 Agregace

Tuto fázi je možné nazývat také fibrilogeneze, neboť agregací tropokolagenových jednotek vznikají jednotlivá vlákna. Zrychlení této agregace způsobují zejména chondroitin sulfáty a keratansulfát. Zpomalení je naopak způsobeno nízkou koncentrací deoxyribonukleové kyseliny, heparinu a také zvyšováním iontové síly. Pro tvorbu fibril je důležité také pH - v izoelektrické oblasti (pH- 4,6) vznikají velmi rychle, ale jejich struktura je nedokonalá. Při pH 6,5-9,0 dochází k agregaci pomaleji, avšak struktura fibril je již dobře uspořádaná. Další složkou podílející se na fibrilogenezi jsou nekolagenní bílkoviny obsažené ve vazivech, zejména pak α 1-glykoprotein [16].

2.5.3 Polymerace

Kolagenní fibrily jsou pomocí příčných vazeb spojeny do vyšších celků, což má velmi důležitý vliv zejména na mechanické vlastnosti této bílkoviny, ale také na vlastnosti biologické, fyzikálně-chemické a metabolické. Společně se změnou počtu těchto vazeb se mění také jeho bobtnavost a teplota jeho denaturace [16].

2.5.4 Maturace

Maturace neboli zrání či stárnutí, je poslední fází výstavby kolagenu a závisí především na side-to-side vazbách, které při bobtnání dávají vzniknout prostorovému polymeru. Vazby head-to-tail lokalizované na konci molekuly na tuto fázi vliv nemají, ovlivňují však teplotu denaturace molekuly [16].

2.5.5 Odbourávání

V organismu existuje systém schopný intenzivního odbourávání kolagenu, zejména proto, že jeho poločas je poměrně krátký. Jako příklad uveďme nezbytnost rychlé látkové výměny při přestavbě kostí, fyziologických stavech dělohy po porodu a jiné. Snížená funkce odbourávání kolagenu vede ke zvýšenému ukládání pojivové tkáně, což může vést k různým onemocněním, například kolagenní kolitidě či jaterní fibróze. Při této fázi lze identifikovat tři rozdílné reakce na kontakt proteolytických enzymů s kolagenem. Prvním z nich je eliminace telopeptidů štěpením kolagenu skrze specifické procesy zažívacího traktu (např. pepsin, trypsin). Druhým je odštěpný účinek bakteriálních kolagenáz, který je vázaný na sekvenci čtyř aminokyselin se současným požadavkem blokady C a N konce. Třetím proteolytickým enzymem je kolagenáza z ocasu pulce *Rana Catesbiara*, objevená také u člověka, která způsobuje současné štěpení všech třech polypeptidických řetězců. Zvýšená intenzita tohoto štěpení doprovází například revmatické choroby. Odbourávání je velmi důležitou součástí metabolismu kolagenu, jeho zvýšená i snížená funkce však doprovází závažná onemocnění. Detailní mechanismus odbourávání kolagenu a příčiny jeho poruch jsou však z hlediska rozsahu této práce předmětem dalšího zkoumání [16].

2.5.6 Využití metabolismu kolagenu

Právě díky detailní znalosti celkového metabolismu a funkce kolagenu v lidském organismu, dokážeme identifikovat působení jeho nedostatku. Víme, že kolagen má metabolismus poměrně rychlý, proto je také možné jeho obsah rychle doplňovat. Známe také látky, které blokují výstavbu příčných vazeb v kolagenních strukturách. Adam s Vykydalem [12] kladou

důraz zejména na všechny látky, které ovlivňují účinek lyxodiázy a také látky s chelatačním účinkem, EDTA a β -aminopropionitril. Velmi důležitou roli hraje ve fázi syntézy kyselina askorbová (vitamín C), jejíž nedostatek způsobuje výrazný útlum tvorby kolagenu z důvodu blokování hydroxylace prolinu na hydroxyprolin. Tyto a mnoho dalších poznatků jsou nezbytné pro efektivní výrobu potravinových doplňků, které mají za úkol vyživovat a regenerovat, či vystavět synoviální klouby. Potravinové doplňky tohoto typu, popsané již výše, se pak mohou stát doplňky léčby, či prvky prevence, s prokazatelnými účinky při dlouhodobém užívání [11, 16].

3 ZÁVĚR TEORETICKÉ ČÁSTI

Léčba kloubních onemocnění je komplexní disciplínou, která se neopírá pouze o lékařskou péči o nemocného. Ta tvoří samozřejmě podstatnou složku úspěchu, ale může být však výrazně podpořena užíváním potravinových doplňků kloubní výživy, pravidelnou rehabilitací, úpravou životního stylu a podporou pozitivního psychologického stavu nemocného.

V teoretické části této práce jsou po přiblížení základního pojmu práce – kloubu, blíže představena tři kloubní onemocnění, jmenovitě osteoartróza, revmatoidní artritida a psoriatická artritida. S nimi se pojí obecné příčiny kloubních onemocnění, mezi něž řadíme především kouření, věk a nesprávnou životosprávu, ale také stres, nadměrné požívání alkoholu a vlivy osobní anamnézy.

Logicky poté navazují možnosti léčby kloubních onemocnění. Přiblížena je farmakologická léčba, při které jsou v závislosti na onemocnění podávána analgetika, antirevmatika, případně glukokortikoidy a další léčiva. Dále je osvětleno využití potravinových doplňků kloubní výživy při léčbě. Jejich podávání je vhodné především kvůli obsahu množství účinných látek, z nichž vybrané jsou popsány v kapitole pojednávající o potravinových doplncích. Opomenuta ovšem nezůstává ani fyzioterapie, která hraje významnou roli při obnově hybnosti kloubů. Jako čistě podpůrné jsou poté využívány alternativní metody, například klimatoterapie, psychoterapie, relaxace či homeopatický přístup. Pokud je však poškození chrupavky natolik pokročilé, že výše zmíněné metody nejsou schopny účinně ulevit postiženému, nastupuje chirurgická léčba.

Nabízí se otázka, které skupiny populace jsou tedy nejčastějšími uživateli potravinových doplňků. V práci jsou uvedeni pacienti po úrazech a operacích, kteří potřebují podpořit tvorbu kolagenu pro správnou regeneraci postižených oblastí, aktivní sportovci, u nichž dochází k rychlejšímu opotřebování kloubů, senioři – skupina ohrožená artrózami a v neposlední řadě také preventivní podávání doplňků u lidí, kterým záleží na dlouhodobém udržení své kondice. Pro každou skupinu pacientů je vhodné jiné složení přípravku, představeny jsou jednotlivé významné účinné látky v praxi používaných doplňků, jako je

glukosamin sulfát, chondroitin sulfát, biotin, výtažek z *Boswellia Serrata* a samozřejmě kolagenní peptidy.

Tímto se dostáváme k dalšímu oddílu teoretické části, v němž jsou popsány vlastnosti a struktura kolagenu a jeho nejčastější typy (I-IV). Pro přehlednost je zařazena srovnávací tabulka jednotlivých typů, která poukazuje na strukturu daného typu, řetězec molekuly, způsob jeho izolace, charakteristické znaky a hlavní oblasti výskytu v organismu. Následuje popis metabolických fází kolagenu: syntézy, agregace, polymerace a maturace, po níž následuje fáze odbourávání. Dále jsou osvětleny možnosti využití metabolismu kolagenu.

Teoretická část nás pak dovádí k části praktické, ve které jsou analyzovány metody stanovení kolagenu.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 PŘEHLED METOD STANOVOVÁNÍ KOLAGENU

V praktické části, jak již bylo nastíněno výše, docházíme k analýze jednotlivých metod stanovení kolagenu. Stěžejními zdroji přitom byly články publikované anglicky ve vědeckých časopisech zaměřených především na potravinářskou chemii. Články jsou z let 1994 až 2011 a představují tak poměrně reprezentativní „průřez“ rešerší v oblasti stanovení kolagenu.

Úvodem praktické části jsou tedy představeny důvody stanovování kolagenu, současný stav zkoumání a dále jsou analyzovány jednotlivé metody.

4.1 Důvody stanovování kolagenu

Množství kolagenu je vedle jiných faktorů používáno pro stanovení kvality masa. Struktura a obsah čistých bílkovin jsou obecně indikátory jakosti. Pro zjištění obsahu čistých bílkovin je nejčastěji používána Kjeldahlova metoda, kdy je od obsahu celkových bílkovin odečítán obsah kolagenu stanovený přes 4-hydroxyprolin (násoben 8,0).

The US Department of Agriculture's Food Safety and Inspection Services hodnotil množství dat včetně těch, vypovídajících o stravitelnosti masa a masných výrobků v závislosti na obsahu kolagenu. Doporučili použití čistého proteinu (accurate protein), aminokyselin a pojivových tkání v mase jako jednoduchých a praktických indikátorů kvality proteinů. Jejich doporučení se opíralo o dva základní nálezy: Existuje statisticky prokazatelná korelace mezi hodnotami PER (protein efficiency ratio – účinný poměr bílkovin) a obsahem základních aminokyselin v proteinech. A obsah kolagenu je nepřímo úměrný PER hodnotám v dobytčím mase, drůbeži a masných produktech z nich vyrobených. Nárůst procenta kolagenu v mase redukuje absolutní obsah aminokyselin a narušuje jejich rovnováhu, tedy poškozuje kvalitu proteinového systému [22].

Kolagen je při stanovování kvality masa důležitý proto, že se od jiných bílkovin odlišuje svým aminokyselinovým složením, především vysokým obsahem glycinu, hydroxyprolinu a prolinu. Jeho složitá struktura, popsaná výše v teoretické části, se odráží v jeho

vlastnostech. Při zvýšené teplotě (záhřevu) se kolagenní vlákna deformují (zkracují se až na třetinu své původní délky) a stávají se elastickými. Ve vodním prostředí následně bobtná a po porušení příčných vazeb přechází na želatinu (glutin). Vznik želatiny je pro technologii masa velmi podstatný, neboť je příčinou měknutí některých druhů. Tento poznatek je využíván jak při tepelné kulinární úpravě, tak při výrobě masných výrobků. Obsah kolagenu poté napovídá mnohé o kvalitě masa. Pro potřeby výroby potravinových doplňků je kolagen extrahován z hovězích a vepřových chrupavek [15, 23].

4.2 Současný stav zkoumání

V současnosti je známých minimálně sedmadvacet druhů kolagenu, z nichž nejdůležitější, pro svou schopnost vytváření vláken a jejich sítí, jsou kolageny typu I, II, III, IV a V, popsané výše v teoretické části. Společné pro všech dvacet sedm typů je, že mají pravotočivou šroubovici složenou ze tří α -řetězců. Ta může být tvořena třemi stejnými řetězci, případně dvěma a více různými řetězci přítomnými v extracelulární matrix. Rozmanitost jednotlivých typů se následně projevuje především v oblasti výskytu kolagenu (kost, kůže, dentin), jeho funkci a zastoupení ve tkáních. Tendence výzkumu v této oblasti jsou především prohlubování a propojování. Prohlubování výzkumu se děje z toho důvodu, že stále vznikají nové postupy stanovení kolagenu v hydrolyzátech. Dílčím produktem prohlubování je pak objevování nových typů kolagenu. Propojování je vázáno především na rostoucí komplexitu výzkumů, kdy výzkumné práce přestávají být jednooborovými a jsou zaměřeny spíše transversálně (toto tvrzení dokládá také téma této bakalářské práce, pohybující se na pomezí biochemie, potravinářství a částečně farmacie). Multioborové studie rešerše jsou pak výsledkem překotného vývoje, který lze charakterizovat mezinárodním akronymem VUCA World (Volatile, Uncertain, Complex, Ambiguous - nestálý, nejistý, složitý a nejasný) který nutí jednotlivá výrobní i vědecká odvětví ke spolupráci.

4.3 Metody stanovení kolagenu

Představme nyní vybrané metody stanovení kolagenu, popsané v letech 1994 – 2011. Pro lepší přehlednost je analýza metod popsána v následující struktuře: autor metody, rok objevení metody, vědecké pracoviště a celkový popis metody.

4.3.1 Evaluace proteinové kvality masa za použití kolagenu

Autor: S. N. El

Rok vyvinutí metody: 1994

Vědecké pracoviště: Ege University, Izmir, Turecko

Hlavní přínosy metody:

- 1) není zapotřebí žádných vysoce sofistikovaných přístrojů
- 2) časová a finanční nenáročnost
- 3) snadná proveditelnost pro malovýrobce

Popis metody:

Tato studie stanovovala kolagen v hovězím zadním mase a játrech, klobáse z hovězího masa, jehněčím mase, rybě a drůbeži s cílem prokázat, zda je možné použít množství kolagenu pro určení nutriční kvality proteinu.

Všechny vzorky byly před vlastní analýzou homogenizované pomocí Bühlerova 7400 homogenizátoru. Dusík byl stanoven Kjeldahlovou metodou a procento čistého proteinu bylo následně násobeno faktorem 6,25. Obsah hydroxyprolinu byl determinován trojnásobným na hydrolyzovaných vzorcích pomocí Woessnerovy metody z roku 1961. Obsah kolagenu, jako procentuální podíl, byl kalkulován na základě formulace doktora Laser-Reutersward a jeho týmu. Proteinová kvalita vzorků pak byla hodnocena pomocí rovnice vytvořené Leeem: Očekávaný PER = - 0.02290x + 3.1528. Kde x je obsah kolagenu vyjádřený jako procentuální podíl v daném proteinu. Výsledky experimentu potvrdily předpoklady výzkumu – nejvyšší podíly hydroxyprolinu a kolagenu byly stanoveny pro

masný výrobek – klobásu a to sice následovně: 0,664/100g a 40,5% z celkového obsahu proteinů. Ryba obsahovala nejnižší podíl hydroxyprolinu (0,338%) a kuře nejnižší podíl kolagenu (10,3% z proteinů).

Nálezy tohoto výzkumu se celkově shodují s výsledky jiných, starších metod (Lee 1978, Babji 1980) a z toho tedy vyplývá, že obsah kolagenu může být použit pro hodnocení kvality bílkovin [22].

4.3.2 Metoda HPLC pro určení hydroxyprolinu ve vazivových tkáních

Autor: Paul R. Hutson, Mark E. Crawford, Ronald L. Sorkness

Rok vyvinutí metody: 2002

Vědecké pracoviště: UW School of Pharmacy, Madison, Spojené Státy Americké

Hlavní přínosy metody:

- 1) Přesnost, úplnost a citlivost při detekci hydroxyprolinu
- 2) Využití při výzkumu astmatu

Popis metody:

Tato metoda byla vytvořena pro potřebu měření změn množství hydroxyprolinu ve fibrózní plicní tkáni krys, modelů pro výzkum lidského astmatu. Hydroxyprolin je jednou z hlavních aminokyselin tvořících kolagen a jeho monitorováním je tedy možné zjistit obsah kolagenu v plicní tkáni.

Tato metoda, která kombinuje již předchozí výzkumy (Mazzi, Einarsson), tedy derivatizaci a fluorescenční chromatografii, byla již od počátku slibná. Změnou oproti původním výzkumům bylo navýšení NaOH a v jeho důsledku změna pH na 9,5. Metoda HPLC (high-performance liquid chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie) je pro její přesnost, úplnost a citlivost detekce hydroxyprolinu aplikována ve svém původním záměru, prokázala se jako účinná a spolehlivá [24].

4.3.3 Měření hydroxyprolinu pomocí metody HPLC

Autor: F. A. Vázquez-Ortíz, O. E. Morón-Fuenmayor, N. F. González-Méndez

Rok vyvinutí metody: 2005

Vědecké pracoviště: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Mexiko, ve spolupráci s Facultad de Agronomía, La Universidad del Zulia, Macaibo, Venezuela

Hlavní přínosy metody:

- 1) přesnost, pečlivost, retence a selektivita
- 2) vhodná pro celou škálu masných výrobků

Popis metody:

Touto metodou je možné měřit obsah prolinu a hydroxyprolinu v mase a masných výrobcích. Při výzkumu bylo testováno čtrnáct masných výrobků s rozdílným obsahem kolagenu. Metoda je založena na přeměně aminokyselin ve fluorescenční derivát s 7-chloro-4-nitrobenzofurazanem (NBD-Cl), která je následována reverzní chromatografií a fluorescenčním měřením ($\lambda_{ex}=465\text{nm}$, $\lambda_{fl}=535\text{nm}$). Výsledky ukazují dobrou retenci, selektivitu a účinnost. Na základě uskutečněného výzkumu je možné konstatovat, že tato metoda je přesná (94-100%) a správná (0,3-13 % CV). Limit kvantifikace hydroxyprolinu byl stanoven na 0,0027 ng/mL. Výsledky ukazují, že tato metoda byla vhodnou pro kvantifikaci celé řady hydroxyprolinů, které se běžně nacházejí v masných výrobcích [25].

4.3.4 Rychlé stanovení kolagenu v produktech na bázi masa pomocí mikrovlnné hydrolyzy proteinů a HPAEC-PAD analýzy hydroxyprolinu.

Autor: M. C. Messia, T. Di Falco, G. Panfili, E. Marconi

Rok vyvinutí: 2007

Vědecké pracoviště: Università del Molise, Campobasso, Itálie

Hlavní přínosy metody:

- 1) časová úspora: 24h → 20min
- 2) není potřeba derivatizace vzorků před, ani po analýze, není zapotřebí toxických látek
- 3) při chromatografii je možné zároveň hodnotit také jiné aminokyseliny.

Popis metody:

Rychlá mikrovlnná procedura hydrolyzy proteinu byla spárována s High-Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection - vysokoúčinná chromatografie na měničích aniontů s použitím pulsní amperometrické detekce (HPAEC-PAD), aby kvantifikovala aminokyselinu 4-hydroxyprolin v mase a masných produktech. Tento inovativní přístup aplikované determinace kolagenu (4-hydroxyprolin x 8.0) je možné použít jako index kvality masa použitého při přípravě typických masných produktů Itálie (Mortadella di Bologna, Salamini italiani alla cacciatoria) a čerstvých těstovin (tj. testované vzorky při výzkumu). Mikrovlnná hydrolyza vykázala přesnost a správnost podobnou tradiční hydrolyze, přičemž čas byl redukován ze 24 hod. na 20 min. HPAEC-PAD umožnila detekci 4-hydroxyprolinu bez pre- či postderivatizací a použití toxických látek [26].

4.3.5 Kvantifikace hydroxyprolinu pro potřebu stanovení kolagenu za použití hromadné spektrometrie vícenásobných reakcí

Autor: Michelle L. Colgrave, Peter G. Allingham, Alun Jones

Rok vyvinutí metody: 2008

Vědecké pracoviště: CSIRO Division of Livestock Industrie, St. Lucia ve spolupráci s University of New England, Armidale a University of Queensland, Brisbane, Austrálie

Hlavní přínosy metody:

- 1) bez nezbytnosti derivatizace vzorků
- 2) časová nenáročnost – 5min/vzorek

3) aplikovatelná na množství biologických tkání

Popis metody:

Tradiční metodou detekce a kvantifikace kolagenu ve tkáních savců je především chemická derivatizace, která je ale kvůli složení extracelulární matrix problematická. Metodám využívajícím HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) zase chybí citlivost a propojení se schopností separace hydroxyprolinu.

Nedávné pokroky ve chromatografické separaci skrze hydrofilní interaktivní chromatografii byly schopny umožnit oddělenou detekci a kvantifikaci nederivatizovaných isobarických aminokyselin včetně leucinu, isoleucinu a izomerů hydroxyprolinu. Tato vysoce selektivní a citlivá metoda monitorování vícenásobných reakcí pomocí hromadné spektrometrie byla použita pro stanovení kolagenu v ovčím stehenním svalu, je však aplikovatelná i pro řadu jiných tkání. Tato analytická metoda je jednoduchá, rychlá (5 min), vyhovující, precizní (< 17%), přesná (98-100%) a citlivá (4.88 nmol/l) [27].

4.3.6 Metoda kapilární elektroforézy pro stanovení hydroxyprolinu a obsahu kolagenu v masných produktech

Autor: Miguel Angel Mazorra-Manzano, María J. Torres-Llanez, Aarón F. González-Córdova, Belinda Vallejo-Cordoba

Rok vyvinutí metody: 2011

Vědecké pracoviště: Laboratorio de Calidad - Autenticidad y Trazabilidad de los Alimentos, ve spolupráci s Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Mexiko

Hlavní přínosy metody:

- 1) rychlá a přesná metoda
- 2) využitelná při kontrole kvality masných výrobků (legislativa)

3) jasně a přesně stanovuje obsah glycinu, prolinu a hydroxyprolinu v mase / masných výrobcích

Popis metody:

Cílem tohoto výzkumu bylo nalézt vhodnou CE (capillar electrophoresis) metodu pro potřeby determinace pojivových tkání v mase a masných produktech. Jejich úroveň je důležitá nejen z pohledu nutriční hodnoty, ale také z hlediska legislativního. CE metoda by tedy mohla být užívána regulačními orgány pro ujištění se o maximální kontrole přidaných produktů do masa.

Před samotnou elektroforézou byla provedena kyselinová hydrolyza a aminokyselinová derivatizace vzorků za účasti fluorescaminu. Příprava vzorků se ukázala být velmi významným faktorem. Roli hraje především pH vzorku, neboť derivatizace s fluorescaminem vyžaduje alkalické prostředí. Nalezená metoda CE pak jasně stanovuje obsah glycinu, prolinu a hydroxyprolinu v mase a masných výrobcích, detekuje tedy zároveň také obsah kolagenu.

Tato nová CE metoda pro obsah hydroxyprolinu a kolagenu je precizní a přesná a je v dobré korelaci s oficiální kolometrickou metodou. Je využitelná jak v biologii, či medicíně, tak v potravinářství [28].

4.3.7 Automatický flow-batch systém na stanovení hydroxyprolinu v párcích

Autor: J. A. Belloni, M. S. Di Nezio, M. F. Pistonesi, M. E. Centurión

Rok vyvinutí metody: 2011

Vědecké pracoviště: Universidad Nacional del Sur, Buenos Aires, Argentina

Hlavní přínosy metody:

- 1) využití více komor najednou
- 2) jednoduchost, relativní časová a finanční nenáročnost
- 3) minimální podíl lidského přičinění

Popis metody:

Výsledkem tohoto zkoumání je návrh automatické metody detekce hydroxyprolinu v různých druzích komerčně prodávaných párků. Pro tento účel byl navrhnout flow-batch systém, který zahrnuje dva kroky – hydrolýzu vzorků a determinaci analytu. Metoda představuje lineární řadu mezi 0,60 a 3,60 mg/ml¹. Zaznamenána byla relativně standardní odchylka, a to 1,68% ($n = 6$, 1.20 mg ml⁻¹). A detekční limit byl stanoven na 0.12 mg ml⁻¹.

Tato metoda vyžaduje 16 hod. hydrolýzy. Ta byla zkrácena na 15 min. díky prostředí tlakové hydrolyzační komory a použití halogenových lamp. Flow-batch systém je jednoduchý a umožňuje využít obou komor - hydrolyzační a detekční, najednou. Dosažené výsledky jsou ve shodě s referenčními metodami AOAC [29]. Je možné konstatovat, že se jedná o velmi dobrou alternativu pro kontrolu kvality masných produktů.

Tato inovativní automatická metoda je jednoduchá, časově relativně nenáročná, levná, vyžaduje minimum reakčního činidla a minimum lidského přičinění [30].

4.3.8 Srovnání vybraných metod stanovení hydroxyprolinu v mase a masných výrobcích

Následující tabulka zpřehledňuje výše uvedené metody detekce hydroxyprolinu a na jeho základě stanovení kolagenu v mase a masných výrobcích.

Tabulka 2: Srovnání vybraných metod determinace hydroxyprolinu v mase a masných výrobcích

METODA	ZEMĚ	ROK	ČASOVÁ NÁROČNOST	MATERIÁLNÍ NÁROČNOST	ZKOUM VZORKY	HLAVNÍ PŘÍNOS
Stanovení kolagenu Kjeldahlovou metodou	Turecko	1994	Předpříprava vzorků	Nenáročná	Maso, masné výrobky	Snadno dostupná pro malovýrobce

HPLC v kombinaci s fluorescenční chromatografií	USA	2002	Předpříprava vzorků	Derivatizace fluorescenční chromatografie	Plicní tkáň laboratorních krys	Vysoká citlivost, přesnost, úplnost analýzy
HPLC	Mexiko & Venezuela	2005	Náročná	náročná	Čtrnáct druhů masných výrobků	Přesnost, pečlivost, retence, selektivita
Mikrovláňná analýza & HPAEC-PAD	Itálie	2007	20min/vzorek	Chromatografie	Maso, masné výrobky, těstoviny	Možnost zároveň stanovovat také jiné AMK
Hromadná spektrometrie vícenásobných reakcí	Austrálie	2008	5min/vzorek	Chromatografie	Ovčí stehenní sval	Časová nenáročnost, citlivost, přesnost
Kapilární elektroforéza	Mexiko	2011	Příprava vzorků	Náročná	Maso, masné výrobky	Využití při legislativní kontrole
Automatický flow-batch systém	Argentina	2011	Nenáročná	Nenáročná	Masné výrobky (párky)	Minimální podíl lidského činitele

4.4 Stanovení kolagenových frakcí pomocí metody HPLC

Ověřit výše prezentované poznatky z literatury bylo cílem praktické části práce. Bylo provedeno testování kolagenového hydrolyzátu a identifikace různých molekul kolagenu ve směsi pomocí jedné z výše prezentovaných metod přímo v praktické aplikaci na pracovišti Ústavu analýzy a chemie potravin Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Konkrétně byla použita metoda HPLC, prezentována v přehledných pracích [25, 31].

4.4.1 Metoda

Testování bylo provedeno na modelovém vzorku kolagenového hydrolyzátu firmy Gelita. Parametry testované směsi jsou popsány v Příloze č. III.

Při laboratorním zkoumání byly použity níže uvedené aparatury s následujícími parametry testování a reagenty:

HPLC systém Dionex Ultimate 3000 s UV/VIS detektorem; kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.6 x150mm; 3.5 μ m; eluční soustava A - 0.1% kyselina mravenčí; eluční soustava B - 90% acetonitril [ACN] a 0.1% kyselina mravenčí; mobilní fáze A:B; 80:20, doba analýzy 25 minut, průtok 1 ml/min; 50% redukce průtoku do MS. UV/VIS detektor 210,0; 217,0; 220,0 a 250 nm.

MS systém Amazon III – iontová past s ESI ionizací, měřeno v módech MS⁺; MS⁻ a MS/MS.

Základy metodiky a její praktická aplikace jsou diskutovány v zahraničních pramenech [32, 33].

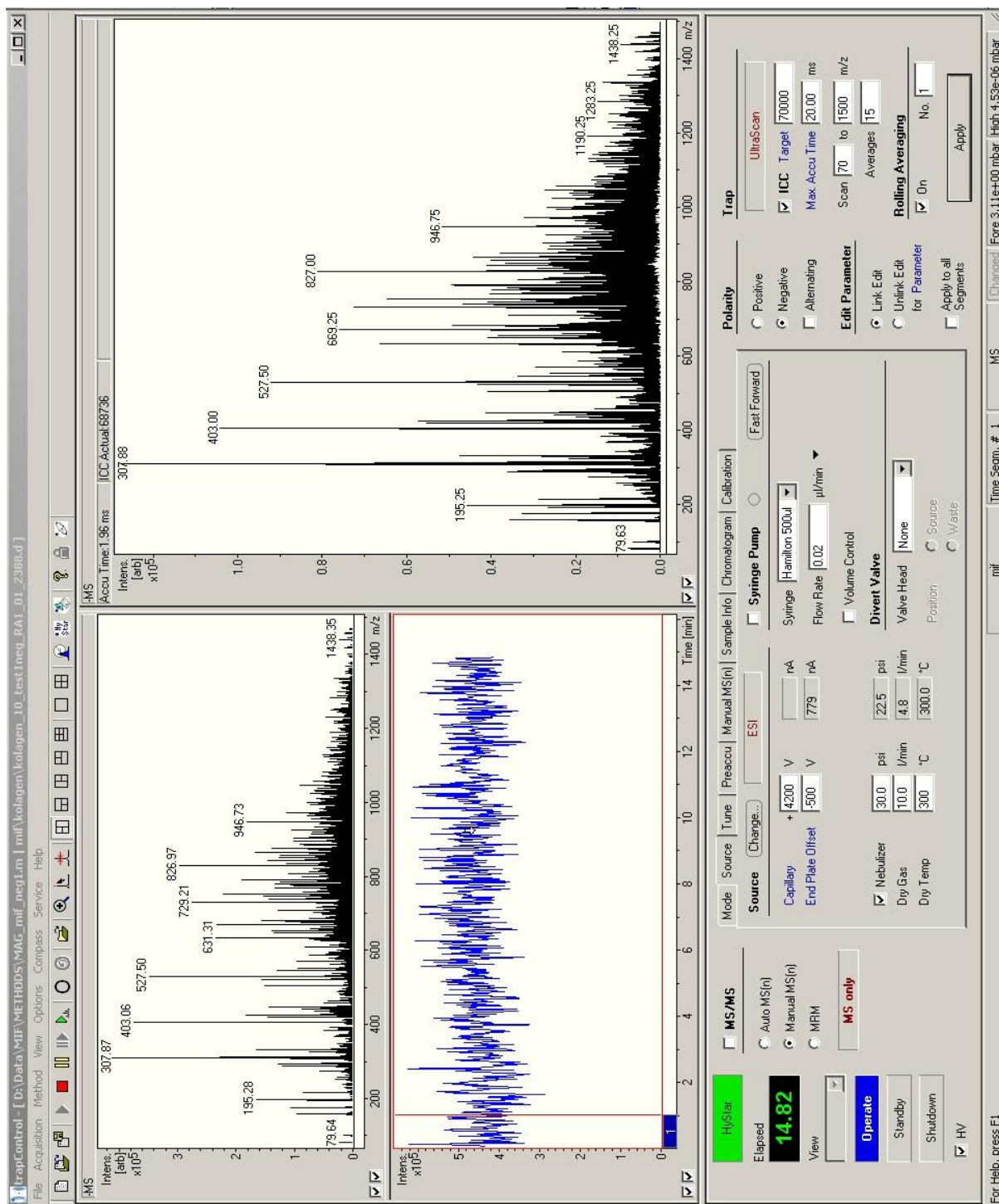
4.4.2 Výsledky

Provedená měření jsou prezentována na přiložených obrázcích. Jedná se o výsledky získané analýzou kolagenu ve všech třech módech s následným hmotnostně spektrometrickým hodnocením. Na obrázcích jsou schematicky předloženy získané grafické záznamy z měřících aparatur.

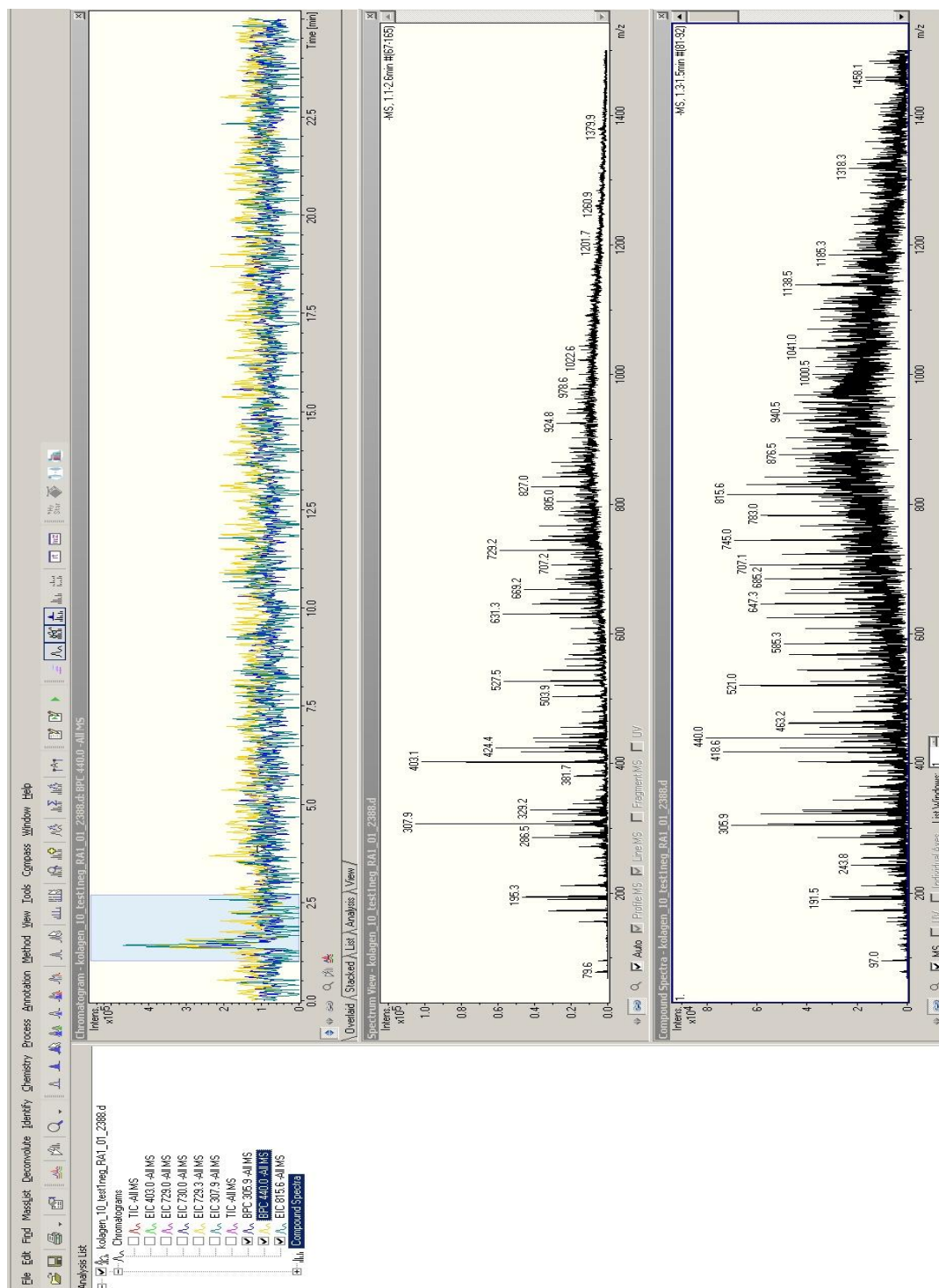
4.4.3 Závěr

Pomocí popsaného měření lze detekovat jednotlivé frakce kolagenních molekul různých molekulových hmotností. Je třeba uvést, že provedená měření lze dalšími postupy a analýzami dále prohlubovat s cílem zjištění přesného složení a struktury aminokyselin, kde našim hlavním zájmem jsou prolin a hydroxyprolin, jakožto dominantní a nejdůležitější

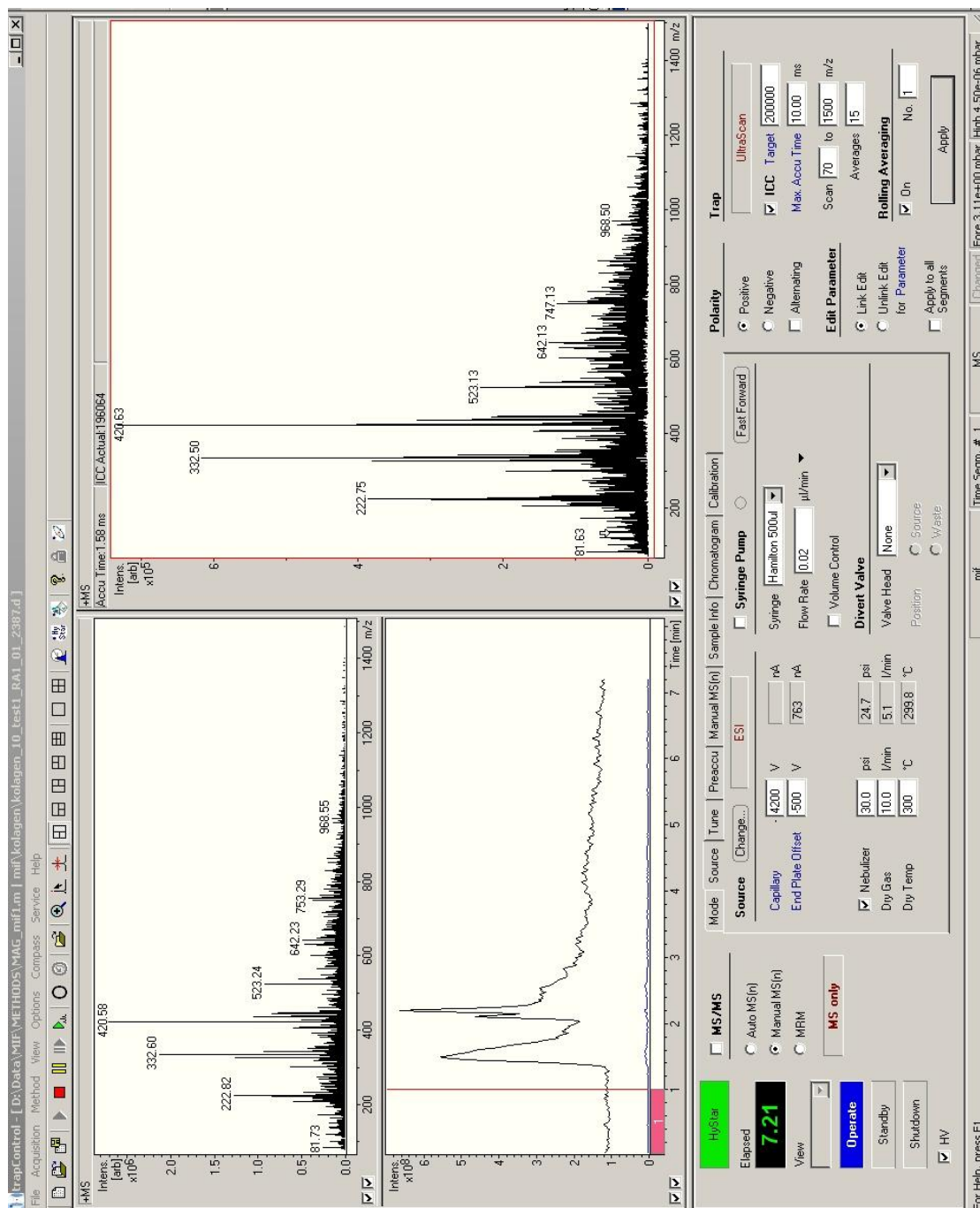
součástí molekul kolagenu. Tyto další testy přesahují rámec bakalářské práce a mohou být prohloubeny další studií v rámci diplomové práce.



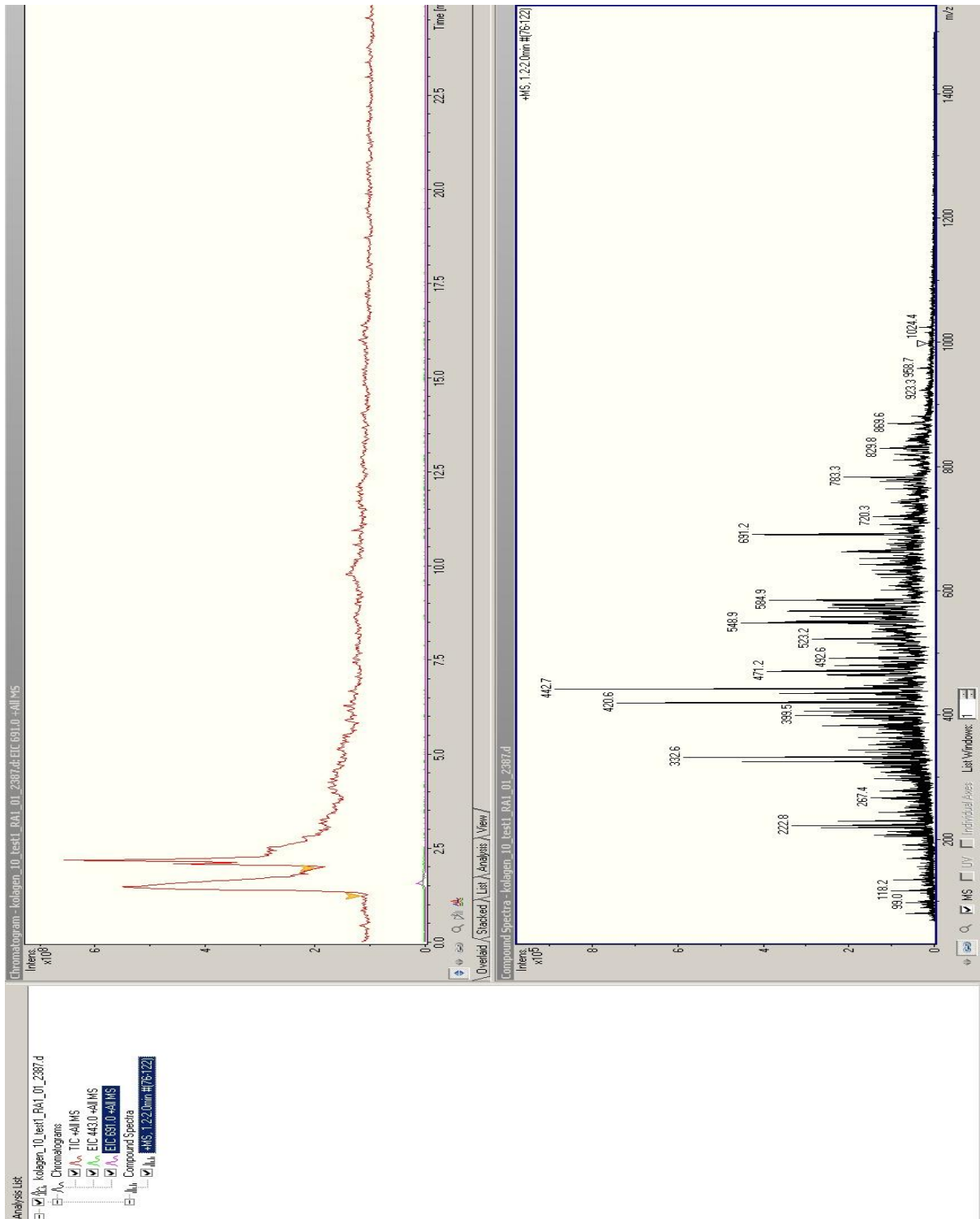
Obrázek 5: Měření v módu MS -



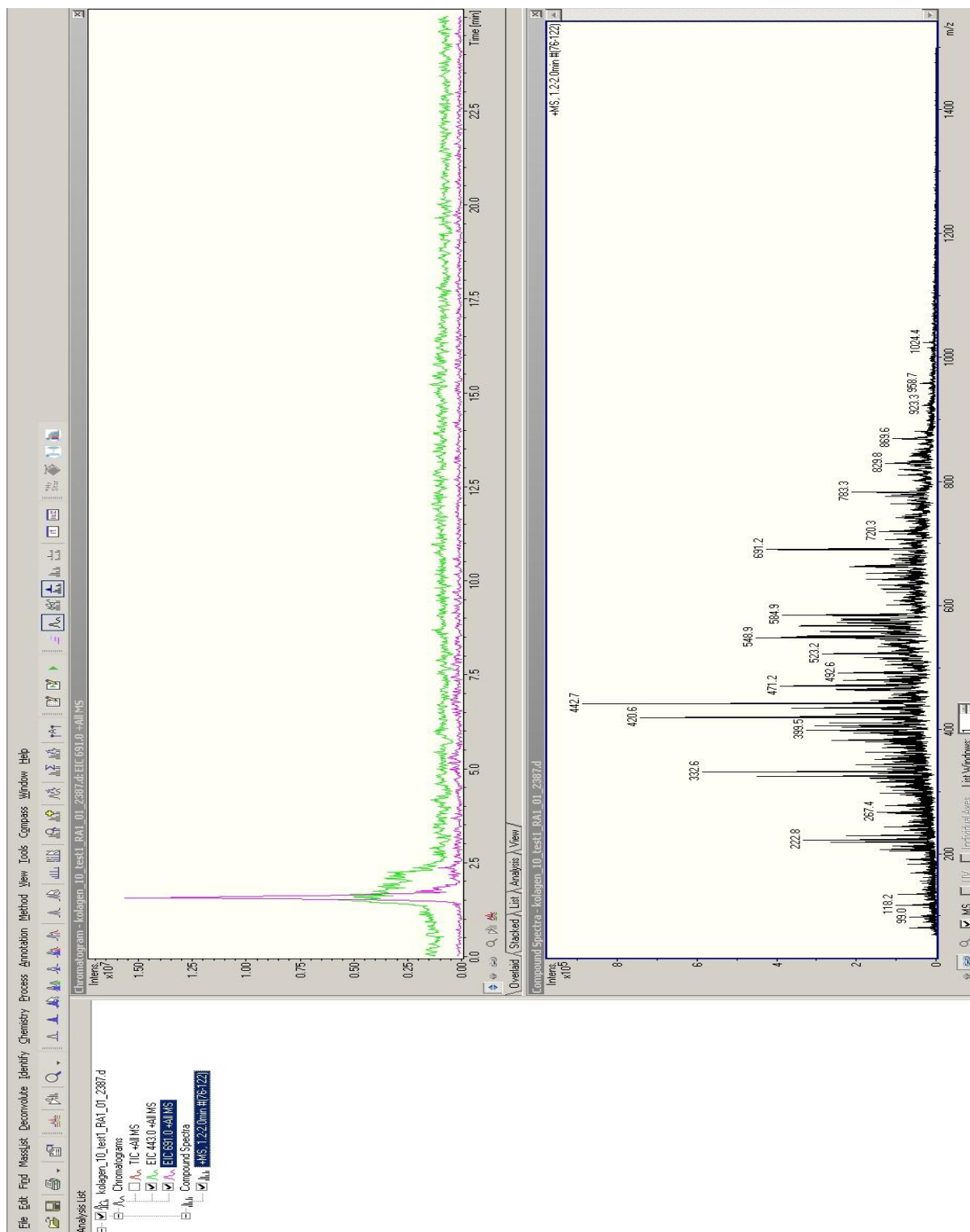
Obrázek 6: Měření v módu MS -



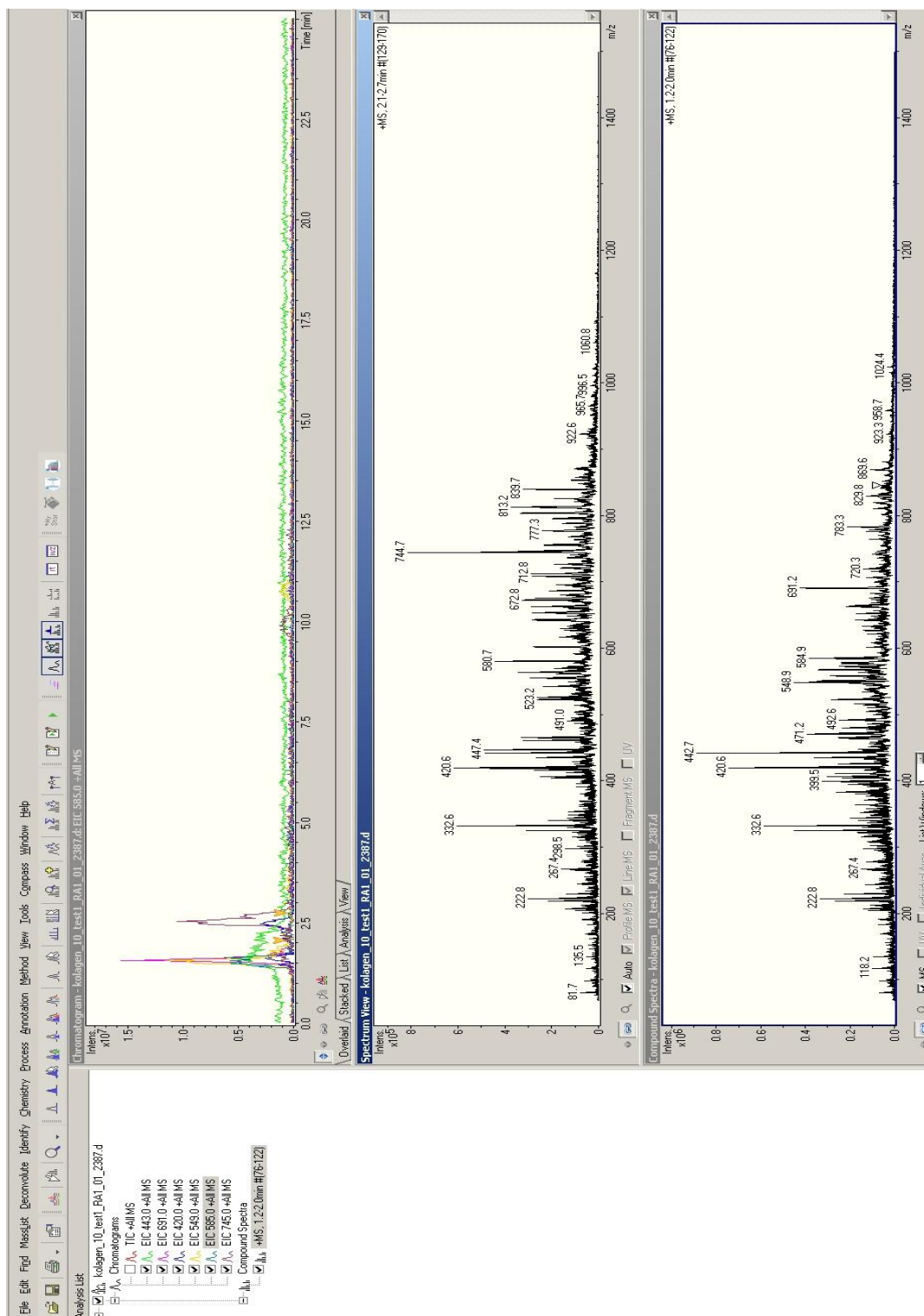
Obrázek 7: Měření v módu MS +



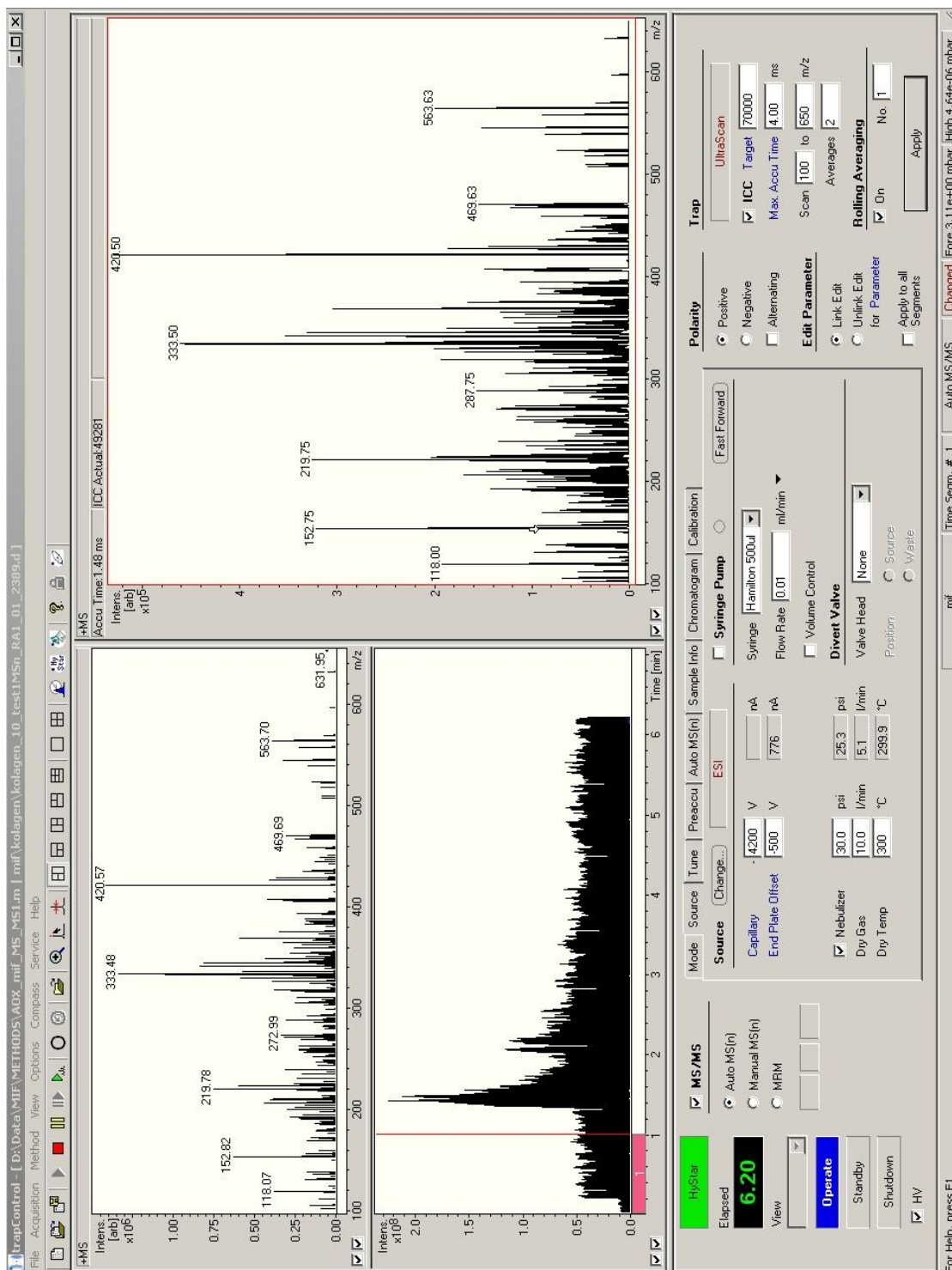
Obrázek 8: Měření v módu MS +



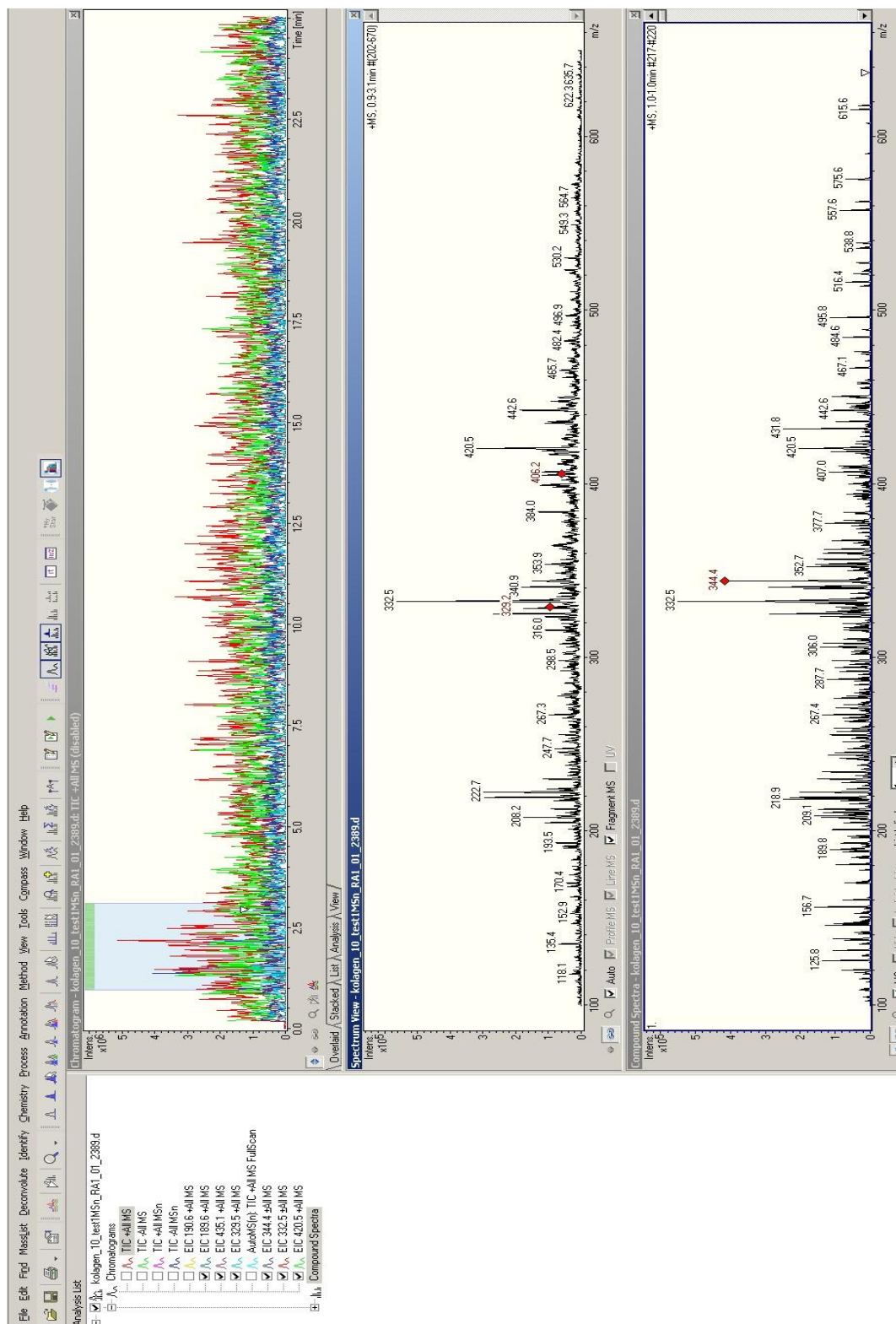
Obrázek 9: Měření v módu MS +- EIC – extrakce hmotnostního iontu M/z 443.0



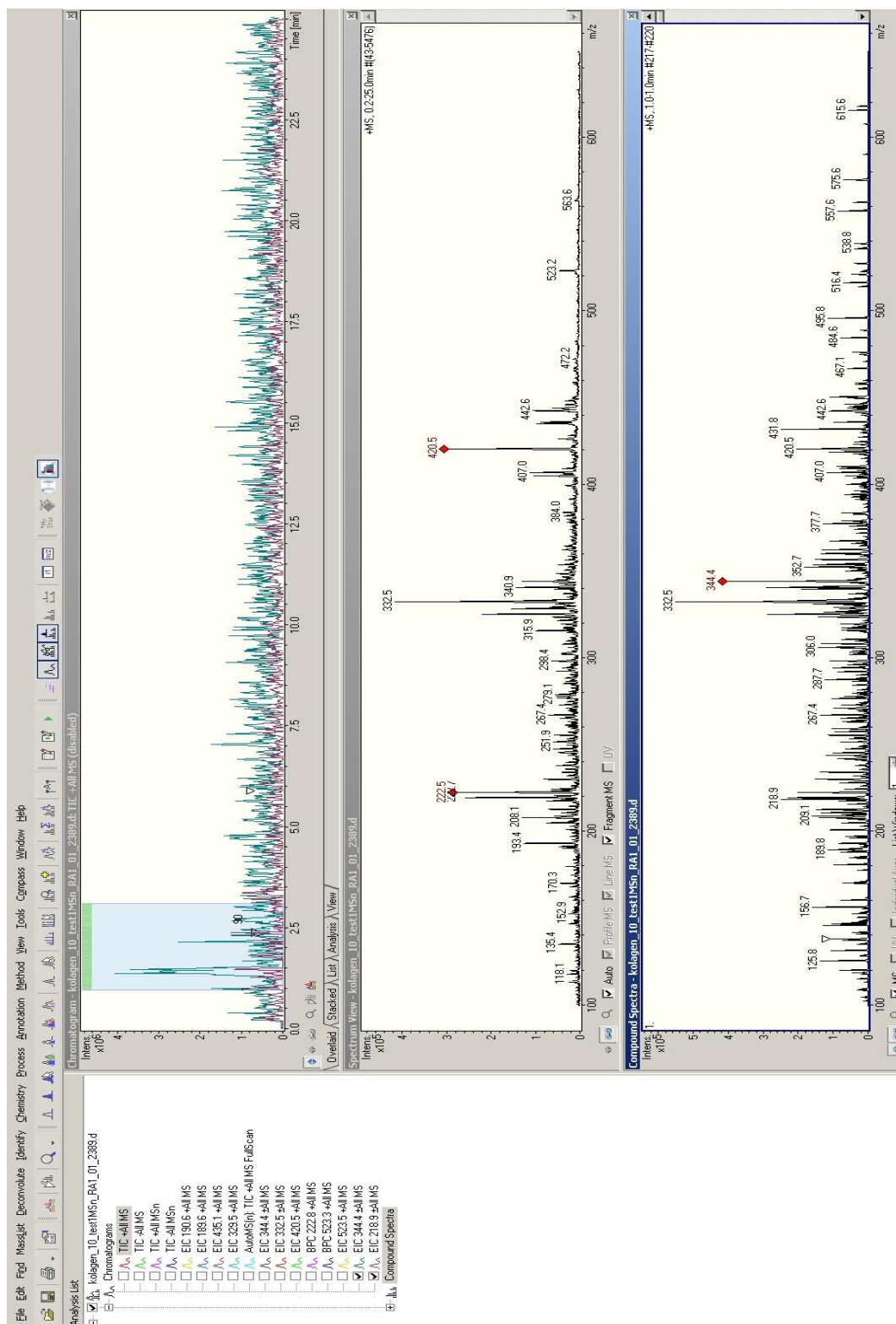
Obrázek 10: Měření v módu MS +- extrakce hmotnostních iontů M/z 443,0; 691,0; 420,0; 549,0; 565,0 a 745,0



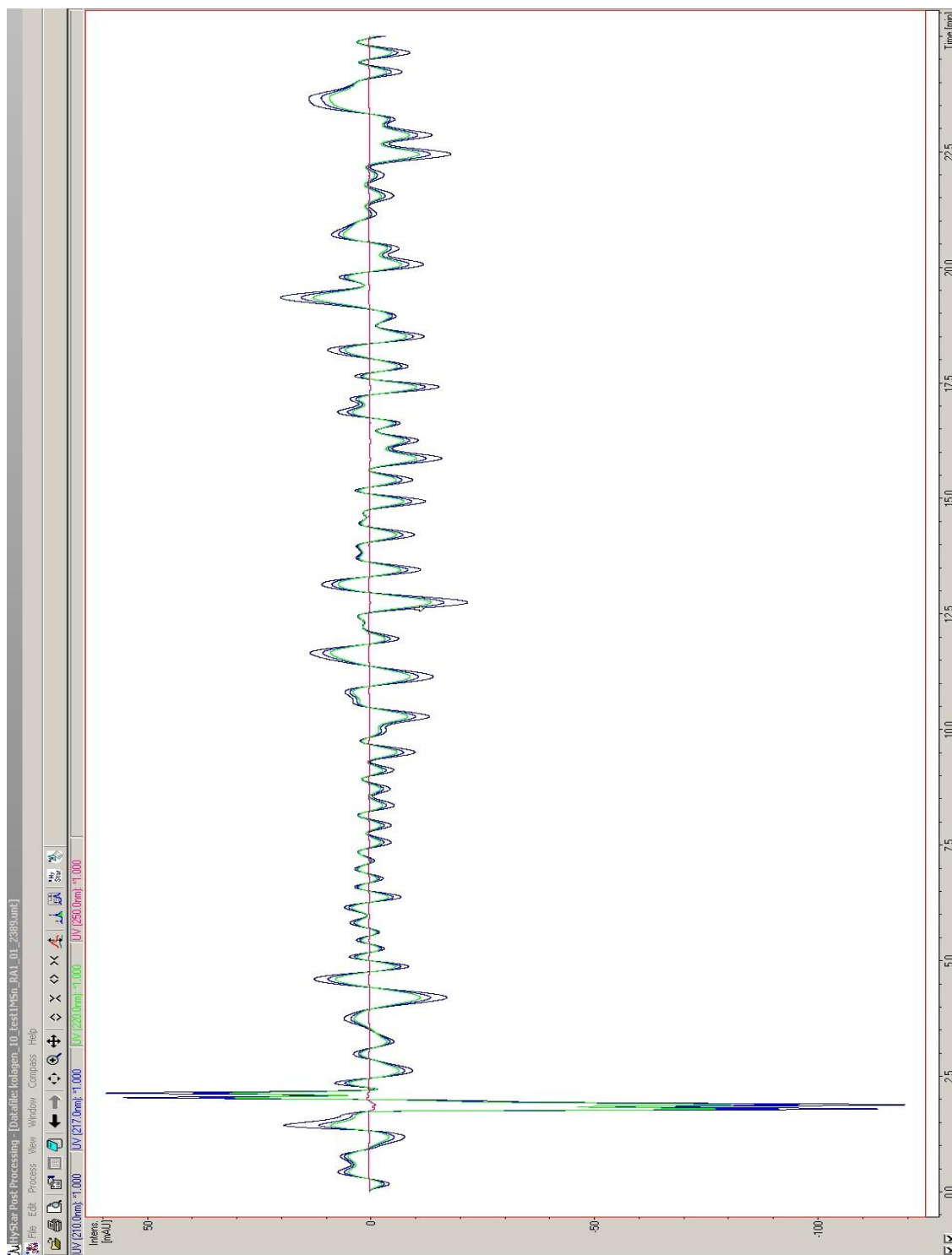
Obrázek 11: Měření v módu MS / MS



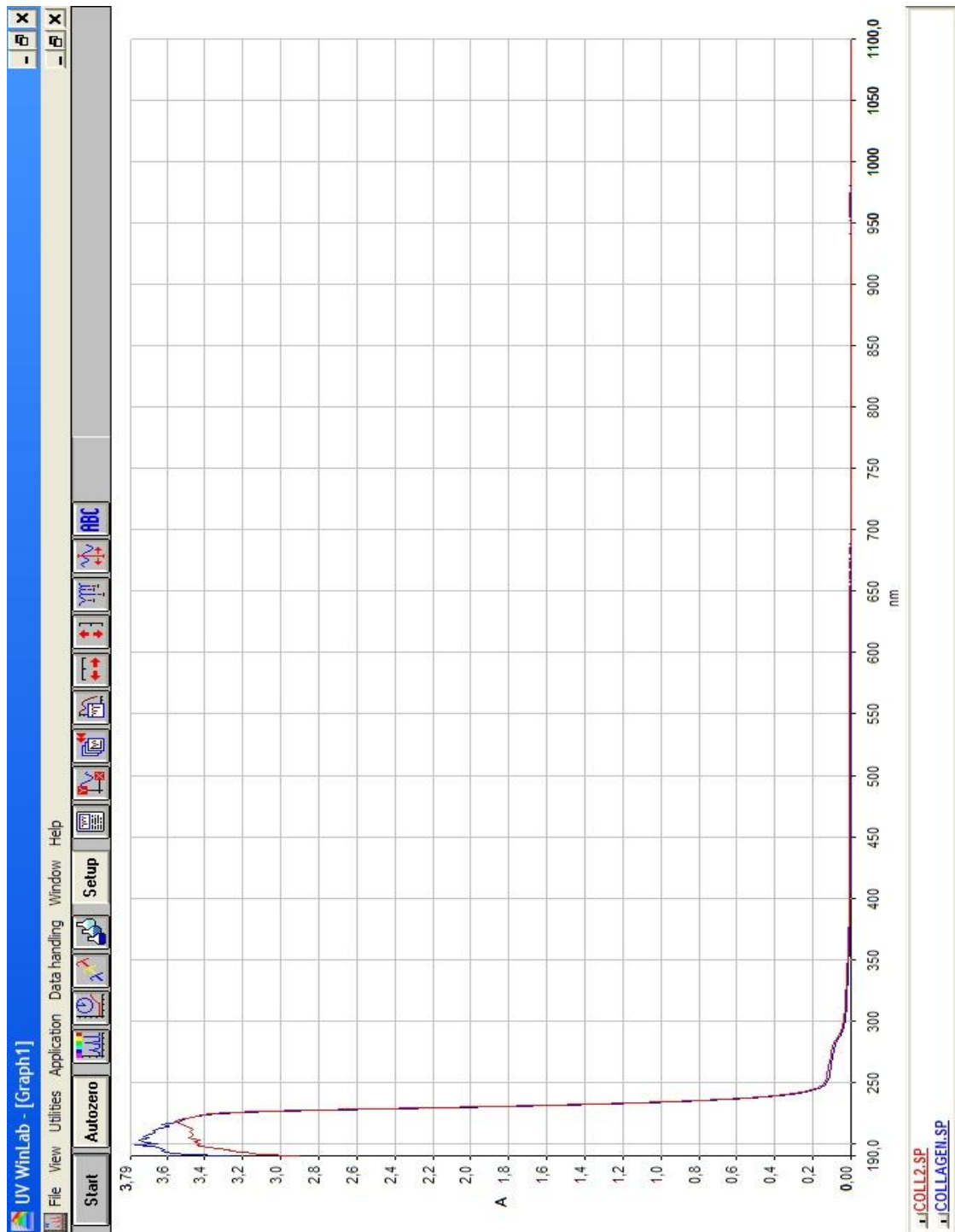
Obrázek 12: Měření v módu MS / MS- – extrakce vybraných hmotnostních iontů



Obrázek 13: Měření v módu MS / MS – extrakce vybraných hmotnostních iontů



Obrázek 14: HPLC s UV/VIS detekcí



Obrázek 15: UV / VIS spektrum vzorku hydrolyzátu

5 ZÁVĚR PRAKTICKÉ ČÁSTI

Praktická část se opírá především o cizojazyčné odborné články z vědeckých časopisů. Pro potřebu této bakalářské práce bylo zpracováno sedm článků, z let 1994, 2002, 2005, 2007, 2008 a 2011. Časová diverzita je doplněna diverzitou lokalizace výzkumů, zastoupena jsou výzkumná centra z Argentiny, Austrálie, Itálie, Mexika, Turecka, USA a Venezuely. Praktická část díky analýzám těchto výzkumů tedy přináší relativně celistvý pohled na problematiku stanovení kolagenu v mase a masných výrobcích skrze metody determinace hydroxyprolinu.

Potřeba stanovování kolagenu v mase a masných výrobcích je dána vlastnostmi kolagenu, popsány v teoretické části, z nichž je vhodné jmenovat především přeměnu kolagenních vláken na glycin (želatinu) při dostatečném záhřevu. U savců je tato teplota stanovena na 65°C a více. Obsah kolagenu v mase je potom indikátorem jeho jakosti, neboť jeho vysoký obsah redukuje absolutní obsah aminokyselin ve tkáni a narušuje jejich rovnováhu, což znamená, že poškozuje kvalitu proteinového systému.

Současný výzkum rozpoznává nejméně sedmadvacet druhů kolagenů, z nichž nejznámější, nejčtetnější a nejprobádanější jsou typy I, II, III, IV a V, které vytváří vlákna a vláknité sítě. Výzkum se v současnosti koncentruje na propojování jednooborových poznatků s příbuznými oblastmi. Vznikají transversální studie, které propojují již známé teorie a dodávají jim tak novou perspektivu a význam. Tato tendence je dána především nástupem znalostí ekonomiky, ve které narůstá komplexnost jednotlivých prací a je tedy nutné ji podpořit adekvátním výzkumem.

Praktická část tedy podle tohoto principu vhodně doplňuje část teoretickou, která pojednává o kloubních onemocněních a roli potravinových doplňků při jejich léčbě, zatímco praktická část je zaměřena na analýzy masa a masných výrobků.

Prakticky je demonstrována metoda HPLC přímým sledováním analýzy kolagenního hydrolyzátu a získané výsledky jsou ukázány na obrázcích.

ZÁVĚR

Kloubní onemocnění jsou v současnosti stále častější příčinou poklesu kvality života. Častým projevem těchto onemocnění je úbytek chrupavky, v jejímž důsledku klesá funkčnost a hybnost kloubu a naopak vzrůstá riziko tvorby zánětů a doprovázející bolestivosti. Kloubní chrupavky jsou z velké části tvořeny kolagenem, o němž je možné se vyjádřit, že je „základním stavebním kamenem“ kloubu.

Námět bakalářské práce proto bere tuto skutečnost v úvahu a osvětluje vlastnosti a roli kolagenu v léčbě kloubních onemocnění.

Práce je rozdělena na dvě poměrně samostatné, nicméně doplňující se části. První, teoretická, popisuje tři vybraná kloubní onemocnění – osteoartrózu, psoriatickou artritidu a revmatoidní artritidu, a to sice s cílem poskytnout bližší vhled do problematiky jejich léčby. Popsány jsou také vybrané příčiny onemocnění, z nichž jmenujme například nadměrný pohyb, nesprávnou životosprávu či věk. Na část o příčinách rozpadu těchto onemocnění poté navazují metody jejich léčby. Přiblíženy jsou jak metody využívající farmak, tak fyzioterapie či alternativní metody léčby a chirurgická řešení, která jsou pouze zmíněna, neboť přesahují oborové zaměření práce. Důraz je kladen na možnosti využití potravinových doplňků obsahujících kolagenní peptidy při celkové léčbě. Již z výčtu skupin uživatelů těchto doplňků stravy je zřejmé, že jejich role je nezastupitelná a celkovému zdraví organismu prospěšná. Jmenujme tedy nejčastější skupiny uživatelů, kterými jsou: aktivní sportovci, jejichž kloubní chrupavky jsou konzumovány rychleji díky hypermobilitě, senioři, kteří tvoří pravděpodobně nejpočetnější skupinu (kloubní onemocnění jsou často nazývány nemocemi stáří), další skupinou jsou rekonvalescenti po úrazech a operacích a v neposlední řadě je časté také preventivní podávání – tedy u spotřebitelů, kteří se starají o své zdraví a zamezují zdravotním problémům ještě před jejich samotným vznikem. Pokud již mluvíme o potravinových doplňcích, je nezbytné představit jejich účinné látky a složky, mezi něž řadíme především kolagenní peptidy, chondroitin sulfát, glukosamin sulfát, ale také množství vitamínů a minerálů podporující metabolismus kolagenu a celkové zdraví organismu. Významnou kapitolou je ta, pojednávající o kolagenu. Je jádrem této bakalářské

práce a proto také tvoří její nejobsáhlejší část. První fázi, ve které jsou představeny vlastnosti a struktura kolagenu, vhodně propracovává část o jednotlivých typech kolagenu I, II, III, a IV, které jsou jedny z nejznámějších a nejprobádanějších kolagenních typů současnosti. Následně je přiblížen metabolismus kolagenu a jeho využití, postupně jsou zpracovány všechny fáze - syntéza, agregace, polymerace, maturace i odbourávání. Následně jsou popsány možnosti využití metabolismu kolagenu.

Praktická část je pak analýzou sedmi vybraných metod stanovení hydroxyprolinu v mase a masných výrobcích. Pro tuto část byly vybrány články z vědeckých časopisů z let 1994 až 2011, ze tří kontinentů.

Praktické ověření teoretických poznatků bylo provedeno na pracovišti Ústavu analýzy a chemie potravin Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně přímým provedením analýzy kolagenního hydrolyzátu pomocí metody HPLC.

Cíle bakalářské práce stanovené v jejím úvodu byly tedy splněny, nicméně téma je natolik rozsáhlé a komplexní, že by bylo přínosné v něm pokračovat i nadále, jak po stránce teoretické tak i praktické, například v perspektivě budoucí magisterské práce.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Basic figures on the EU. Spring 2012. *Eurostat Compact Guides* [online]. 2012 [cit. 2012-05-10]. Dostupné z:
http://epp.eurostat.ec.europa.eu/cache/ITY_OFFPUB/KS-GL-12-001/EN/KS-GL-12-001-EN.PDF
2. DYLEVSKÝ, I. *Funkční anatomie*. 1. vydání. Praha: Grada 2009. 532 s. ISBN 978-80-247-3240-4.
3. BERNACÍKOVÁ, M., KALICOVÁ, M., BERÁNKOVÁ, L. Základní složky pohybového systému. *Základy sportovní kinesiologie. Fakulta sportovních studií Masarykovy university* [online]. 2012 [cit. 2012-05-10]. Dostupné z:
http://is.muni.cz/do/1451/e-learning/kineziologie/elportal/pages/zakladni_slozky.html.
4. KOLEKTIV: *Promítnutí pokroků lékařské vědy do funkčního hodnocení zdravotního stavu a pracovní schopnosti ve vztahu k zdravotním postižením podle Mezinárodní klasifikace nemocí a s přihlédnutím k Mezinárodní klasifikaci funkčních schopností: závěrečná zpráva projektu výzkumu MPSV ČR HR 163/07*. 1. vydání. Praha: Ministerstvo práce a sociálních věcí 2008, 215 s. ISBN 978-808-6878-881.
5. MCQUEEN, F. et al. Magnetic resonance imaging in psoriatic arthritis. *Arthritis Research & Therapy* [online]. 2006, **8** (207) [cit. 2012-05-10]. Dostupné z: <http://arthritis-research.com/content/8/2/207>
6. PAVELKA, K., BEČVÁŘ, R., BÖHMOVÁ, J. et al. Dvojitě slepá, randomizovaná, placebem kontrolovaná, multicentrická studie ověřující účinky přípravků Geladrink Forte u pacientů s osteoartrózou kolena. *Ortopedie: dvouměsíčník pro ortopedy, traumatology a revmatology*. 2008, **2** (2): s. 25-30.
7. Čo je to artróza ? *Nosecco Group a.s.* [online]. 2012 [cit. 2012-05-10]. Dostupné z: http://www.hyalutidin.nosecco.sk/artroza_hc.php.
8. Zánětlivé onemocnění kloubů. *Národní informační centrum pro mládež. NICM* [online]. Jun 29, 2010 [cit. 2012-04-28].

- Dostupné z: <http://www.nicm.cz/zanetlive-onemocneni-kloubu>.
9. Revmatoidní artritida (RA). *Projekt ATTRA, Česká revmatologická společnost, Institut biostatistiky a analýz Masarykovy university* [online]. 2007 [cit. 2012-05-10]. Dostupné z: <http://attra.registry.cz/index.php?pg=diagnozy--revmatoidni-artritida>.
 10. ŠTOLFA, J. Psoriatická artritida. *Postgraduální medicína. ZDN.cz.* [online]. Jan 2, 2012 [cit. 2012-05-10]. Dostupné z: <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/psoriaticka-artritida-462926>
 11. Humánní produkty firmy Orling, s.r.o. *Orling – kolagenní přípravky pro výživu a regeneraci kloubů* [online]. 2012 [cit. 2012-05-10]. Dostupné z: <http://www.orling.cz/cz/humanni-produkty/>
 12. ADAM, M., VYKYDAL, M. et al. *Pokroky v revmatologii II.* 1. vydání. Praha: Avicenum 1972. 356 s. ISBN 08-083-72.
 13. Výživa. *Institut Galenus* [online]. 2012 [cit. 2012-05-10]. Dostupné z: <http://galenus.cz/vyziva.php>
 14. *Boswellia serrata* extract side effects, benefits, herbal supplement review, research studies, potencies, use for inflammation and joint health problems such as arthritis, osteoarthritis and other medical conditions. *Boswellia serrata* [online]. 2012 [cit. 2012-05-10]. Dostupné z: <http://www.boswelliaserrata.net/>.
 15. NIMNI, ME, OLSEN, BR, KANG, AH et al. *Collagen, vol. I - III.* Boca Raton, FL: CRC Press 1988 - 1992. ISBN 08-493-4600-2.
 16. BLAŽEJ, A. et al. *Štruktúra a vlastnosti vláknitých bielkovín.* 1. vydání. Bratislava: Veda 1978. 453 s. ISBN 71-156-78.
 17. VELÍŠEK, J. *Chemie potravin I.* 1. vydání. Tábor: Osis 1999. 328 s. ISBN 80-902-3912-9.
 18. MUSIL, J., ADAM, M., HOUBA, V. *Vysokomolekulární složky pojiva.* 1. vydání. Praha: Academia 1996. 407 s. ISBN 21-050-66.
 19. CALAMIA, V., RUIZ-ROMERO, C., ROCHA, B., FERNÁNDEZ-PUENTE, P.,

- MATEOS, J., MONTELL, E., VERGÉS, J., BLANCO, FJ. Pharmacoproteomic study of the effects of chondroitin and glucosamine sulfate on human articular chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy* [online]. 2010, **12** (R138) [cit. 2012-05-10].
Dostupné z: <http://arthritis-research.com/content/12/4/R138>.
20. Co je to kolagen? *Hypro Otrokovice, a.s.* [online]. 2012 [cit. 2012-05-10].
Dostupné z: <http://www.hypro.cz/hyRubrIn.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0>
21. TEPPNER, M., ADAM, M. et al. *Collagen hydrolysate and its relationship to joint health: A scientific compendium*. 1. ed. Berlin: Neunplus 1 2004. 120 s. ISBN 39-360-3314-5.
22. EL, SN. Evaluating protein quality of meats using collagen content. *Food Chemistry*. 1995, **53** (2): s. 209-210.
23. Kolagen. *VUP, a.s.* [online]. 2012 [cit. 2012-05-10]. Dostupné z: <http://www.vup.cz/kolagen.php?language=1>.
24. HUTSON, PR., CRAWFORD, ME, SORKNESS, RL. Liquid chromatographic determination of hydroxyproline in tissue samples. *Journal of Chromatography B*. 2003, **791** (1-2): s. 427–430.
25. VÁZQUEZ-ORTÍZ, FA, MORÓN-FUENMAYOR, OE, GONZÁLEZ-MÉNDEZ, NF, CENTURIÓN, ME. Hydroxyproline Measurement by HPLC: Improved Method of Total Collagen Determination in Meat Samples. *Journal of Liquid Chromatography*. 2005, **27** (17): s. 2771-2780.
26. MESSIA, MC., DI FALCO, T., PANFILI, G., MARCONI, E. Rapid determination of collagen in meat-based foods by microwave hydrolysis of proteins and HPAEC-PAD analysis of 4-hydroxyproline. *Meat Science*. 2008, **80** (2): s. 401-409.
27. COLGRAVE, ML, ALLINGHAM, PG, JONES, A. Hydroxyproline quantification for the estimation of collagen in tissue using multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2008, **1212** (1-2): s. 150-153.
28. MAZORRA-MANZANO, MA, TORRES-LLANEZ, MJ, GONZÁLEZ-CÓRDOVA, AF, VALLEJO-CORDOBA, B. A Capillary Electrophoresis Method

- for the Determination of Hydroxyproline as a Collagen Content Index in Meat Products. *Food Analytical Methods*. 2012, **5** (3): s. 464-470.
29. AOAC International. *The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence* [online]. 2011 [cit. 2012-05-10]. Dostupné z: <http://www.aoac.org/>.
30. BELLONI, JA, DI NEZIO, MS, PISTONESI, MF, CENTURIÓN, ME. Automatic flow-batch system for the sample treatment and determination of hydroxyproline in sausages. *Talanta*. 2012, **89** (3): s. 526-530.
31. MIKULÍKOVÁ, K., ECKHARDT, A., PATARIDIS, S., MIKŠÍK, I. Study of posttranslational non-enzymatic modifications of collagen using capillary electrophoresis / mass spectrometry and high performance liquid chromatography / mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1155** (2007): s. 125 – 133.
32. GIINEYTS, E., BOREL, O., CHAPURLAT, R., GARNERO, P. Quantification of immature and mature collagen crosslinks by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry in connective tissues. *Journal of Chromatography B*. 2010, **878** (2010): s. 1449 – 1454.
33. ZHANG, G., SUN, A., LI, W., LIU, T. Mass spectrometric analysis of enzymatic digestion of denatured collagen for identification of collagen type. *Journal of Chromatography A*. 2006, **1114** (2006): s. 274 – 277.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Ala	Alanin
AOAC	AOAC International (Association of Analytical Communities)
ASC	Acid Soluble Collagen
CE	Capillar electrophoresis (kapilární elektroforéza)
CV	Relativní směrodatná odchylka (variační koeficient)
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
Gly	Glycin
HPAEC-PAD	High-Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (vysokoúčinná chromatografie na měničích aniontů s použitím pulsní amperometrické detekce)
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
Hyp	Hydroxyprolin
ISC	Insoluble Collagen
Met	Methionin
NBD-CI	7-chloro-4-nitrobenzofurazan
NSC	Neutral Salt Soluble Collagen
PER	Protein Efficiency Ratio (účinný poměr bílkovin)
Pro	Prolin
Ser	Serin
SYSADOA	Symptomatic slow acting drugs of osteoarthritis

VUCA World Volatile, Uncertain, Complex, Ambiguous (nestálý, nejistý, složitý a nejasný)

SEZNAM OBRÁZKŮ

OBRÁZEK 1: SCHÉMA STAVBY KLOUBU.....	12
OBRÁZEK 2: SCHEMATICKÉ SROVNÁNÍ ZDRAVÉHO KOLENNÍHO KLOUBU A KLOUBU POSTIŽENÉHO GONARTRÓZOU.....	15
OBRÁZEK 3: KLOUB POSTIŽENÝ REVMATOIDNÍ ARTRITIDOU.....	17
OBRÁZEK 4: RTG - PSORIATICKÁ ARTRITIDA.....	18
OBRÁZEK 5: MĚŘENÍ V MÓDU MS –.....	55
OBRÁZEK 6: MĚŘENÍ V MÓDU MS –.....	56
OBRÁZEK 7: MĚŘENÍ V MÓDU MS +.....	57
OBRÁZEK 8: MĚŘENÍ V MÓDU MS +.....	58
OBRÁZEK 9: MĚŘENÍ V MÓDU MS +.....	59
OBRÁZEK 10: MĚŘENÍ V MÓDU MS +.....	60
OBRÁZEK 11: MĚŘENÍ V MÓDU MS / MS.....	61
OBRÁZEK 12: MĚŘENÍ V MÓDU MS / MS	62
OBRÁZEK 13: MĚŘENÍ V MÓDU MS / MS	63
OBRÁZEK 14: HPLC	64
OBRÁZEK 15: UV / VIS DETEKCE	65

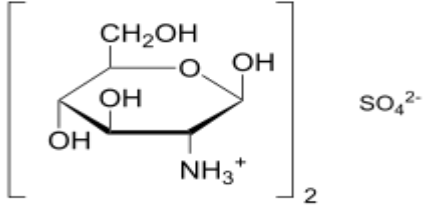
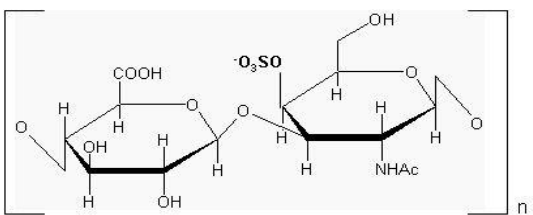
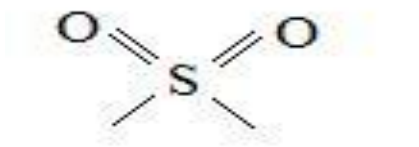
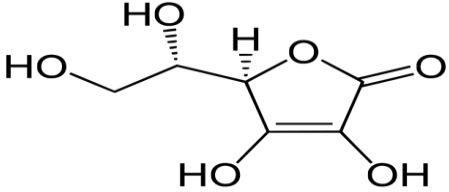
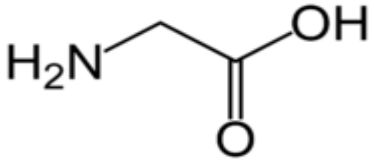
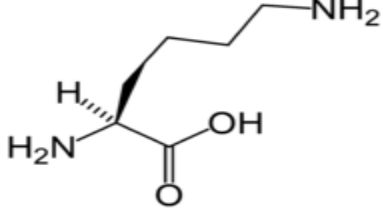
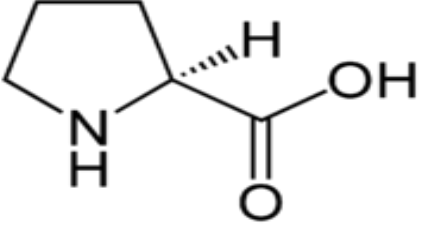
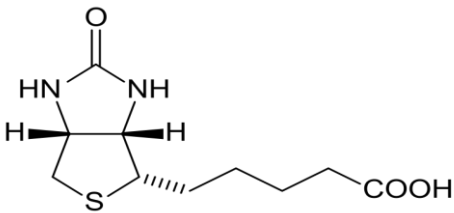
SEZNAM TABULEK

TABULKA 1: SROVNÁNÍ KOLAGENNÍCH TYPŮ I-IV.....	36
TABULKA 2: SROVNÁNÍ VYBRANÝCH METOD DETERMINACE HYDROXYPROLINU V MASE A MASNÝCH VÝROBCÍCH.....	50

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: VYBRANÉ CHEMICKÉ VZORCE	67
PŘÍLOHA P II: AMINOKYSELINOVÉ SLOŽENÍ VYBRANÝCH TYPŮ KOLAGENU	68
PŘÍLOHA P III: PRODUKTOVÁ DATA KOLAGENOVÉHO HYDROLYZÁTU GELITA SOL M AGGL.....	70

PŘÍLOHA P I: VYBRANÉ CHEMICKÉ VZORCE

<p style="text-align: center;">Glukosamin sulfát</p>	<p style="text-align: center;">Chondroitin-4-sulfát</p>
	
<p style="text-align: center;">MSM</p>	<p style="text-align: center;">Kyselina askorbová</p>
	
<p style="text-align: center;">Glycin</p>	<p style="text-align: center;">Lysin</p>
	
<p style="text-align: center;">Prolin</p>	<p style="text-align: center;">Biotin</p>
	

**PŘÍLOHA P II: AMINOKYSELINOVÉ SLOŽENÍ VYBRANÝCH
TYPŮ KOLAGENU**

AMK	Typ I		Typ II	Typ III	Typ IV	Typ V	
	Alfa 1	Alfa 2				A	B
3-Hyp	1,00	0,00	2,00	0,00	11,00	2,50	2,90
4-Hyp	96,00	86,00	99,00	125,00	130,00	109,00	109,00
Asp	46,00	44,00	42,00	42,00	51,00	51,00	50,00
Thr	20,00	20,00	20,00	13,00	23,00	26,00	19,00
Ser	42,00	43,00	27,00	39,00	37,00	31,00	26,00
Glu	74,00	66,00	89,00	71,00	84,00	84,00	91,00
Pro	129,00	113,00	121,00	107,00	61,00	97,00	118,00
Gly	330,00	336,00	333,00	350,00	310,00	319,00	322,00
Ala	112,00	102,00	100,00	96,00	33,00	52,00	46,00
Val	20,00	32,00	18,00	14,00	29,00	27,00	18,00
Gys 1	0,00	0,00	0,00	2,00	8,00	0,00	0,00
Met	8,00	6,00	9,00	8,00	10,00	11,00	8,00
Ile	6,00	16,00	9,00	13,00	30,00	16,00	19,00
Leu	18,00	32,00	26,00	22,00	54,00	35,00	39,00

Tyr	2,00	2,00	1,00	3,00	6,00	18,00	2,10
Xhe	12,00	10,00	13,00	8,00	27,00	14,00	12,00
Hyl	4,30	8,00	20,00	30,00	10,00	18,00	20,00
Lys	30,00	22,00	2,00	6,00	10,00	11,00	7,30
Arg	49,00	51,00	51,00	46,00	33,00	68,00	50,00

PŘÍLOHA P III: PRODUKTOVÁ DATA KOLAGENOVÉHO HYDROLYZÁTU GELITA SOL M AGGL.

PRODUCT DATA

GELITA[®] Sol M aggl.

Art. No. 211041

Description: Pure hydrolysate derived from bone collagen with typical, but low taste and odour.
The average molecular weight is approx. 3,000 g/mol.
GELITA[®] Sol M aggl. is suitable for protein enrichment in food.
The product is in compliance with regulation (EC) No. 852/2004 on the hygiene of foodstuffs and with regulation (EC) No. 853/2004, laying down specific hygiene rules for food of animal origin.

Appearance: Light coloured, agglomerated powder
Solubility: Excellently soluble in cold and warm water

Chemical and Physical Data

Protein content of dry substances	minimum 96 %
Dry substances (105 °C, 16 h)	91 - 96%
Ash (550 °C)	≤ 2 %
pH (20 %, room temperature)	5.0 - 6.4
Viscosity (20 %, 25 °C)	3 - 5 mPa s

Test Method

Kjeldahl (Nx5.55)
GME
USP/GME
Potentiometer
GELITA method

Microbiological Data

Total bacterial count	< 1000/g	Ph. Eur.
E.coli	negative/10 g	Ph. Eur.
Anaerobic sulphite-reducing bacteria	< 10/g	AFNOR NF V59-106
Salmonella	negative/25 g	EN ISO 6579

Shelf Life

Under dry and odourless conditions GELITA[®] Sol M aggl. can be stored for 5 years without loss of quality.

Packages

Multi-ply REPA paper bags with PE-liner containing 20 kg net.

This information is based on our present state of knowledge and is intended to provide general information on our products and their uses. It should not therefore be construed as guaranteeing specific properties of the products described or their suitability for a particular application. Any existing industrial property rights must be observed. The quality of our products is guaranteed under our General Conditions of Sale, and our quality assurance system in accordance with DIN ISO 9001 (EN 29001).

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Order no.: 173143

Batch No.: 834001

Production Date: 21.11.2011

Expiry time: 5 years

GELITA® SOL M, aggl.
ART. NO.: 211041

Customer: Orling spol. s r.o. - Katerina Duskova Usti Nad Orlici, Czech Republic

Parameter	Test Method	Specification	Test Result	
Protein content dry sub.*	Kjeldahl	>= 96,00	corresponding	%
pH	20%, RT	5,00 - 6,40	5,54	
Viscosity	20%, 25 °C	3,00 - 6,00	3,43	mPa.s
Dry substance	GME (16h, 105°C)	91,5 - 96,0	92,9	%
Bulk density	GELITA	270 - 400	290	g/l
Peroxides	Ph. Eur./GME	<= 10	corresponding	mg/kg
Ash	USP/GME (550 °C)	<= 2,00	0,91	%
Arsenic*	ICP-OES	< 1,0	corresponding	mg/kg
Cadmium*	ICP-OES	< 0,5	corresponding	mg/kg
Chromium*	ICP-OES	< 10,0	corresponding	mg/kg
Copper*	ICP-OES	< 30,0	corresponding	mg/kg
Mercury*	AAS	< 0,15	corresponding	mg/kg
Lead*	ICP-OES	< 5,0	corresponding	mg/kg
Zinc*	ICP-OES	< 50,0	corresponding	mg/kg
Sulphur dioxide*	Ph. Eur./GME	< 50	corresponding	mg/kg
Average molecular weight*	GPC collag. weight markers	2000 - 4000	corresponding	
Total Aerob.Microb.Count	Ph. Eur./USP	< 1000	corresponding	cfu/ g
Sulfite re. anaer. spores	AFNOR-NF-V59-106	< 10	corresponding	cfu/ g
Escherichia coli	Ph. Eur./USP mod.	0	negative	/ 10 g
Salmonella	ISO 6579	0	negative	/ 25 g

* The parameter is monitored according to an internal quality programme

This certificate was made electronically and therefore it is valid without a signature
signed: Dr. Bernhard Iberl on 17.01.2012

Product release
Quality assurance: Dr. Bernhard Iberl 17.01.2012
Material management: Gunter Grab 17.01.2012

ORLING s.r.o.

Došlo dne: 30 -01- 2012

STDNA-5-26.07.2010/SOMMAG-2011060600/HAGENDOR/173143/17.01.2012 10:02:14
GELITA AG - Uferstraße 7 - D-69412 Eberbach

TECHNICAL INFORMATION

GELITA[®] Sol M

Amino Acid Composition

	mol %	g/100 g Protein
Alanine	11.3	8.7
Arginine	4.7	8.1
Aspartic acid	4.6	6.0
Glutamic acid	7.8	11.1
Glycine	33.0	20.6
Histidine	0.4	0.6
Hydroxylysine	0.7	1.0
Hydroxyproline	9.3	11.4
Isoleucine	1.3	1.6
Leucine	2.6	3.3
Lysine	2.8	3.9
Methionine	0.4	0.6
Phenylalanine	1.3	2.1
Proline	12.6	13.3
Serine	3.2	3.1
Threonine	1.6	1.8
Tyrosine	0.1	0.3
Valine	2.2	2.4

The amino acid analysis was determined after acid hydrolysis of the protein (24 hours, 110 °C, 5.7 n HCl) , solving in Li-citrate buffer (pH 2.20) according to the test method of Spackman, Stein und Moore. The amino acids were identified by using the amino analysis detector „ALPHA PLUS“, Pharmacia. (German Wool Research Institute, D – Aachen, 2003)

