

Charakteristika kolagenů používaných v léčbě kloubních onemocnění

Bc. Luděk Jansa

Diplomová práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav analýzy a chemie potravin
akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Luděk Jansa**
Osobní číslo: **T14580**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Charakterizace kolagenů používaných v léčbě kloubních onemocnění**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Příčiny onemocnění kloubů, léčba, doplňky stravy
2. Typy kolagenu
3. Charakteristika a struktura kolagenu
4. Metabolismus kolagenu a jeho využití
5. Přehled metod používaných pro analýzu kolagenů

II. Praktická část

1. Metodika stanovení kolagenu
2. Analýza vybraných hydrolyzátů
3. Porovnání vzorků

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. **A.BLAŽEJ, M. ADAM, Struktura a vlastnosti vláknitých bílkovin, 1. vydání, 1978 Veda Bratislava**
2. **J. VELÍŠEK, Chemie potravin 1, OSSIS, 1999 Tábor**
3. **J. MUSIL, M. ADAM, V. HOUBA, Vysokomolekulární složky pojiva, 1. vydání, 1966 Knihtisk Praha**
4. **I. DYLEVSKÝ, Funkční anatomie, 1. vydání, 2009 Praha**
5. **K. PAVELKA, Laboratorní vyšetřovací metody v revmatologii, 1. vydání, 1992 Brno**
6. **M. ADAM, Collagen hydrolyzate and its Relationship to joint Health, first edition, 2004 GELITA Health Initiative Germany**

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2016

Termín odevzdání diplomové práce:

29. dubna 2016

Ve Zlíně dne 20. ledna 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



Ing. Jiří Miček, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl jsem seznámen s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 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 práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 27.4.2016

Bc. Luděk Jansa

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

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

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

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

Tato diplomová práce se zabývá charakteristikou kolagenu a jeho rolí v léčbě kloubních onemocnění. Diplomová práce se skládá z části teoretické a praktické.

V teoretické části se práce zaměřuje na onemocnění kloubního aparátu a možnosti léčby, co je to kolagen a jaké existují typy kolagenu. Také se soustředí na metabolismus kolagenu a jeho využití.

Praktická část se zabývá metodikou stanovení kolagenu a použitím kapalinové chromatografie. Práce přináší celistvý pohled na danou problematiku a využívá všech dostupných zdrojů.

Klíčová slova: Kloubní onemocnění, kolagen, hmotnostní spektrometrie, HPLC

ABSTRACT

This thesis deals with the characterization of collagen and its role in the treatment of joint disease. This thesis consists of theoretical and practical.

The theoretical part focuses on diseases of joints and treatment options, what it is collagen and what are the type of collagen. Also focus on the metabolism of collagen and use.

The practical part deals with the methodology for determination of collagen and using liquid chromatography. Work provides a holistic view of the issue and use all available resources.

Keywords: Collagen, articular disease, mass spectrometry, HPLC

Touto cestou bych rád poděkoval vedoucímu mé diplomové práce panu doc. Ing. Miroslavu Fišerovi CSc. za odborné vedení, cenné rady, vstřícnost a čas, který mi věnoval při zpracování této práce.

V neposlední řadě patří poděkování mé manželce, rodině a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

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

Ve Zlíně 27.4.2016

Bc. Luděk Jansa

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| ÚVOD | 10 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 12 |
| 1 ANATOMIE | 13 |
| 1.1 POJIVOVÁ TKÁŇ | 13 |
| 1.1.1 Vazivo | 13 |
| 1.1.2 Chrupavka | 14 |
| 1.1.3 Kloub..... | 14 |
| 2 ONEMOCNĚNÍ KLOUBNÍHO APARÁTU | 16 |
| 2.1 OBECNÉ PŘÍČINY | 16 |
| 2.2 PROBLEMATIKA OSTEOARTRÓZY V SOUČASNÉ MODERNÍ DOBĚ | 18 |
| 2.3 REVMATOIDNÍ ARTRITIDA..... | 22 |
| 2.4 VÝŽIVA PŘI KLOUBNÍCH ONEMOCNĚNÍCH..... | 24 |
| 2.4.1 Bílkoviny | 24 |
| 2.4.2 Tuky..... | 25 |
| 2.4.3 Vitamíny..... | 27 |
| 2.4.4 Minerální látky a stopové prvky | 28 |
| 2.5 MOŽNOSTI LÉČBY KLOUBNÍCH ONEMOCNĚNÍ..... | 29 |
| 2.5.1 Chirurgická léčba | 29 |
| 2.5.2 Lázně..... | 29 |
| 2.5.3 Alternativní léčba | 30 |
| 2.5.4 Léčba kmenovými buňkami | 30 |
| 2.5.5 Fyzioterapie | 31 |
| 2.5.6 Léčba farmaky | 32 |
| 2.6 DOPLŇKY VÝŽIVY | 33 |
| 2.6.1 Glukosamin..... | 33 |
| 2.6.2 Chondroitin sulfát | 33 |
| 2.6.3 Methylsulfonylmethan | 34 |
| 2.6.4 Kolagenní peptidy | 35 |
| 3 KOLAGEN | 36 |
| 3.1 ZÁKLADNÍ FAKTA..... | 36 |
| 3.2 VLASTNOSTI KOLAGENU | 36 |
| 3.2.1 Fyzikálně- chemické vlastnosti | 36 |
| 3.3 STRUKTURA | 38 |
| 3.4 JEDNOTLIVÉ TYPY KOLAGENU..... | 39 |
| 3.4.1 Kolagen typu I | 40 |
| 3.4.2 Kolagen typu II..... | 41 |
| 3.4.3 Kolagen typu III..... | 41 |
| 3.4.4 Kolagen typu IV | 41 |
| 3.4.5 Kolagen typu V..... | 42 |
| 3.4.6 Porovnání kolagenních typů | 42 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.5 | METABOLISMUS KOLAGENU A JEHO VYUŽITÍ | 44 |
| 3.5.1 | Syntéza | 44 |
| 3.5.2 | Agregace | 45 |
| 3.5.3 | Polymerace | 45 |
| 3.5.4 | Maturace | 45 |
| 3.5.5 | Odbourávání | 45 |
| 3.5.6 | Využití metabolismu kolagenu..... | 46 |
| 3.6 | TECHNOLOGIE VÝROBY KOLAGENU | 47 |
| 3.6.1 | Hydrolyzovaný kolagen..... | 47 |
| 3.6.2 | Lyofilizovaný kolagen | 47 |
| 3.6.3 | Mikrokolagen | 48 |
| 4 | MOŽNOSTI ANALÝZY A CHARAKTERIZACE KOLAGENU | 49 |
| 4.1.1 | Vysokoučinná kapalinová chromatografie | 49 |
| - | Mobilní fáze | 52 |
| - | Stacionární fáze..... | 52 |
| - | Vysokotlaká pumpa | 52 |
| - | Dávkování | 52 |
| - | Kolona..... | 53 |
| - | Popis HPLC analýzy | 53 |
| 4.2 | HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE..... | 54 |
| II | PRAKTICKÁ ČÁST..... | 55 |
| 5 | CÍL PRÁCE..... | 56 |
| 5.1 | POUŽITÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY | 57 |
| 5.1.1 | Lambda 25..... | 57 |
| 5.1.2 | UHPLC Systém Dionex Ultimate | 58 |
| 5.2 | PŘEHLED POUŽITÝCH VZORKŮ | 60 |
| 5.2.1 | Příprava vzorků pro analýzu..... | 60 |
| 5.3 | ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ A NASTAVENÍ SPEKTROMETRU PRO METODU ABSORPČNÍ MOLEKULOVÉ SPEKTROMETRIE V UV/VIS OBLASTI | 61 |
| 5.4 | STANOVENÍ HPLC S UV/VIS DETEKČÍ A FLUORIMETRICKOU DETEKČÍ..... | 64 |
| 5.5 | STANOVENÍ NA MS | 77 |
| | ZÁVĚR | 84 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 86 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK..... | 89 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ..... | 90 |
| | SEZNAM TABULEK A GRAFŮ | 92 |
| | SEZNAM PŘÍLOH | 93 |

Úvod

Kloubní onemocnění a celkově onemocnění pohybového aparátu je jednou z nejčastějších příčin pracovní neschopnosti a to v takové míře, že je možné hovořit o fenoménu jedena-dvacátého století.

Je nepopiratelným 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 [23].

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 prevenci vzniku hrají nemalou 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 se zvětšující skupinou, která je těmito nemocemi postižena.

Teoretická část diplomové práce mapuje příčiny kloubních onemocnění, využití doplňků stravy obsahujících kolagen.

Značná část se věnuje kolagenu, jeho vlastnostem, struktuře, metabolismu a využití jednotlivých typů.

Kolagen, je materiál přírodního původu, má velmi slabou schopnost vyvolat imunologické reakce organismu a vysokou biodegradabilitu, jelikož degraduje na tělu vlastní peptidy a aminokyseliny, proto je i využíván v lékařství. Jeho biomedicínské aplikace zahrnují použití v léčbě hypertenze, artritidy, urinárních potíží, ran a popálenin, využívá se v chirurgii a v tkáňovém inženýrství kůže, kostí a jako náhrada chlopní a krevních cév. Jeho použití se neomezuje pouze na medicínu, ale vyskytuje se i v jiných odvětvích, jako je potravinářství, kosmetika a farmacie. Hlavním zdrojem průmyslového kolagenu jsou hovězí kůže a kosti, v posledních letech je vyráběn i z ryb.

Praktická část je zaměřena na metodiku stanovení kolagenu. Plně využívá jak poznatků části teoretické, tak zároveň poznatků získaných během celého průběhu studia.

Cílem bylo charakterizovat kolagenní preparáty na bázi kolagenu pro použití jako doplňky stravy pomocí moderních analytických metod.

Pro separaci jednotlivých složek byla zvolena metoda HPLC a následně byla nasnímána fluorescenční spektra, která byla doplněna jejich analýzou a získání charakteristických parametrů, na základě kterých by bylo možné jednotlivé kolagenní preparáty určit, případně i stanovit.

Celkem bylo zkoumáno sedm vzorků. Provedená měření jsou prezentována i na přiložených obrázcích. V této diplomové práci byly analyzovány vzorky pomocí HPLC metody, která je v dnešní době velmi efektivním nástrojem k analýze. Nedílnou součástí práce byla příprava a kalibrace přístroje a dále pak optimalizace přístroje pro analýzu. Následně byly na přístroji změřeny vzorky a výsledné koncentrace porovnány.

Diplomová práce " Charakteristika kolagenů používaných v léčbě kloubních onemocnění " tak přináší ucelený pohled na kolagen a jeho použití v léčbě kloubních onemocnění. Zabývá se významným zdravotním problémem naší populace (velký počet nemocných s kloubními onemocněními) a přináší komplexní pohled na tuto problematiku.

Můj velký zájem o téma kolagenu a léčivých přípravků s jeho obsahem byl dán především mou pozicí technologa a technika výroby ve firmě, která se zabývá výrobou speciálních přípravků pro výživu a regeneraci kloubů pro humánní a veterinární aplikaci, touto výrobou bych se chtěl v budoucnu dále zabývat.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ANATOMIE

Teoretická část se zaměřuje nejprve na pojivovou tkáň a kloub. Věnuji se zde krátce i kloubním onemocněním, léčbou, prevenci a doplňkům stravy, které při léčbě blahodárně účinkují.

1.1 Pojivová tkáň

Tkáňe jsou soubory buněk, které mají stejný původ, stejný tvar a vykonávají stejnou funkci. Základní vlastností pojivové tkáně je, že obsahuje kromě buněk i základní mezibuněčnou hmotu a fibrily (kolagenní, elastická a retikulární vlákna). [1]

Dělíme ji na : A/ vazivo

B/ chrupavku

C/ kost

1.1.1 Vazivo

Může být řídké, umožňující pohyb jiných tkání vůči okolním orgánům, či tuhé fibrilární ve šlachách a vazech.

Buňky vaziva jsou rozvětvené a spojené cytoplazmatickými výběžky, nazývají se fibrocyty.

Vlákna rozlišujeme kolagenní (pevná) a elastická (pružná).

Podle charakteru dělíme vazivo na: 1) embryonální

2) retikulární (se schopností fagocytózy)

3) tukové buňky

4) kolagenní (obsahující četné kolagenní fibrily)

5) elastické (obsahující převážně elastické fibrily)

1.1.2 Chrupavka

Podle množství a druhu převládajících fibril (kolagenní, elastické) dělíme chrupavky na:

1) hyalinní - sklovité, obsahují kolagenní fibrily (kloubní chrupavka)

2) elastické - pružné, obsahují kolagenní i elastické fibrily (ušní boltec)

3) fibrózní - obsahují četné kolagenní fibrily, které na rozdíl od těch v hyalinní chrupavce nejsou maskovány v základní hmotě (meziobratlové ploténky, spona stydká).

Buňky (chondrocyty) jsou oválné, uloženy v dutinkách mezibuněčné hmoty, nazývané chondromukoid. Chrupavka je bezcévná, bez lymfatických cév a inervace.

1.1.3 Kloub

Kloub (Articulatio) je nejobecnější definicí popsán jako pohyblivé spojení umožňující pohyb kosti. 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 popsána na obrázku č. 1.

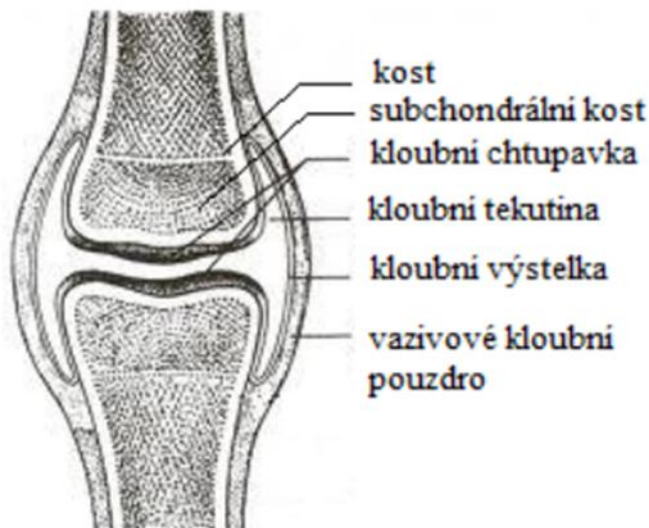
Hlavními částmi jsou kloubní hlavice a kloubní jamka. Jejich tvar je různý a udává velikost i rozsah pohybu v kloubu. Může být například válcovitý, sedlovitý, nepravidelný. Obě části jsou potaženy chrupavčitou vrstvou, pojivovou tkání, která se skládá z buněk a mezibuněč-

né hmoty obsahující vláknitý a amorfni podíl. Amorfni podíl je složen především z proteoglykanů a vody, vláknitý podíl, který je zastoupen ve větším množství, je tvořen především kolageny. 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 vznik bolestivých onemocnění. Pro tuto práci jsou důležité zejména synoviální klouby, které umožňují široký rozsah pohybu. [2]

Buňky se nazývají osteocyty, mají protáhlé buněčné tělo s četnými výběžky probíhajícími v kanálcích základní hmoty, jež obsahuje složku organickou (osein) a anorganickou (soli Ca, P) v poměru 25-40:60-75%. Tento poměr je závislý na stáří jedince, v mládí převládá organická složka (kost pružná a ohebná) a ve stáří anorganická (kost křehká).[1]

Obrázek 1 : Schéma stavby kloubu



2 ONEMOCNĚNÍ KLOUBNÍHO APARÁTU

Onemocnění kloubního aparátu nemusí být vždy bolestivá a jejich léčba není nutně urgentní. V úvahu jsou brány středně těžké stavy, při kterých není prvotním řešením celková endoprotéza. 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. Z hlediska rozsahu práce jsou vybrány pouze některé faktory způsobující vznik onemocnění kloubů a celkově pohybového aparátu.

2.1 Obecné příčiny

Mezi vybrané, obecné příčiny kloubních onemocnění tedy patří následující:

- **Osobní anamnéza** – Pokud je v rodině predispozice ke kloubním onemocněním, zvyšuje se také pravděpodobnost jejich výskytu u následujících generací; [3].
- **Obezita** – Se zvyšující se vahou člověka se také zvyšuje tlak, který je vyvinut na pohybové ústrojí. Z tohoto důvodu mohou být klouby přetěžovány i přes nízkou intenzitu jejich potřeby (aktivní sport);
- **Věk** – Se zvyšujícím se věkem klesá celková obranyschopnost organismu, ten je proto náchylnější k množství onemocnění než organismus mladý. Toto tvrzení však v případě nemoci kloubů platí pouze částečně. Některé nemoci se mohou projevit také u dětí. Nejznámější skupinou jsou ovšem revmata a artrózy, která se v největší míře objevují u seniorů. Trend prodlužování života pak zapříčiňuje také narůst množství těchto nemocí; [3].

Pohlaví – Jednotlivá onemocnění mají různou tendenci napadat muže a ženy. Je prokázáno, že například revmatoidní artritida postihuje mnohem častěji ženy a má u nich tak malignější průběh. Naopak dnou trpí spíše muži; [4]

- **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; [3].

- **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 v opačném případě. Je to dáno tím, že například vitamin 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, vlásečnic, tvorby kolagenu; [5].
- **Abusus alkoholu** – Podobně jako při kouření znamená nadměrná konzumace alkoholu pro lidský organismus zbytečnou přítěž, v jejímž důsledku jsou vyplavovány vitaminy a minerály, které tělo potřebuje ke své výživě a regeneraci. Mezi mnohými zmiňme opět vitamin C, který podporuje tvorbu kolagenu, tolik nezbytného pro zdraví pohybového aparátu (především kloubů, ale také kostí a vazů). Doporučenou denní dávkou je až 1 g; [5].
- **Nadměrný pohyb** – Příkladem nadměrného pohybu budiž aktivní sport. Při příliš častém sportu jsou klouby vystaveny nadměrnému opotřebování, 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; [5].
- **Nedostatečný pohyb** – Při nedostatečném pohybu ochabuje celý pohybový aparát. Při nárazové “akci” pak má tendenci k rychlému přetížení a tím i opotřebování. Jedním z důsledků nedostatečného pohybu je také obezita, popsána již výše.
- **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.

- **Nevyvážená strava** – Strava chudá na bílkoviny a tuky vede ke snížené tvorbě synoviální tekutiny a v důsledku tedy také k opotřebením kloubů. 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 vitaminů a minerálů důležitých nejen pro regeneraci kloubů, ale také kostí, svalů a jiných tkání; [5].
- **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 opotřebovávají klouby horních končetin, zatímco klouby dolních končetin během této doby ochabují. Zatížena jsou také záda, což souvisí se špatným držením těla; [5].
- **Špatné držení těla** – Především při dlouhodobém sezení jsou zatíženy meziobratlové klouby a klouby zad v oblasti kříže. Namáhaná je také krční páteř. V případě nevyhovující, neergonomické židle či křesla jsou zatíženy také klouby kyčelní; [3].
- **Chlad** – Prochladnutí kloubů je častou příčinou revmatologických onemocnění.
- **Porucha imunitního systému** – příkladem jsou autoimunitní onemocnění, kdy organismus sám vytváří látky napadající kloubní tkáň; [6].

2.2 Problematika osteoartrózy v současné moderní době

Problematika kloubních onemocnění v dnešní době nabývá stále více charakteru celosvětové epidemie. Každý pátý trpí těmito bolestmi déle než dvacet let a třetina z nich kvůli nim alespoň jednou přišla o zaměstnání. V naší současné moderní civilizaci se pracovní podmínky

stávají složitějšími a náročnějšími na tělesnou i psychickou výkonnost či zdatnost. Je bohužel tedy smutnou skutečností, že toto nezánetlivé degenerativní onemocnění kloubů se stalo skutečnou civilizační chorobou. Degenerativní změny provázející přirozené stárnutí kloubů dnes nabyly takových rozměrů, že je lékaři řadí mezi vážné choroby, které vyžadují zvláštní pozornost a soustavnou diagnostickou a léčebnou péči. Jestliže ještě před několika desítkami let byla osteoartróza hlavně problémem vyššího věku, dnes již postihuje 15% veškeré populace. Uvádí se 60% výskyt mezi 55. a 64. rokem a až 90% výskyt v období mezi 75. a 84. rokem. [5].

Především je třeba zdůraznit, že nárůst počtu případů osteoartrózy s jistotou můžeme spatřit v poruše životního stylu charakterizované stálým psychickým stresem, nedostatkem vhodného pohybu, nadváhou nebo dlouhodobým jednostranným přetížením pohybového aparátu. A protože se v jiných souvislostech upozorňuje, že právě chybný životní styl, nadváha a nedostatek pohybu mají v zemích západní civilizace charakter epidemie, ukazuje nám to, že osteoartróza je, dá se říci, příznakem této epidemie [5].

V současné době stále ještě neexistuje metoda, která by byla schopna toto postižení zcela úplně vyléčit. Je však řada možností, jak osteoartrózu můžeme výrazně zpomalit nebo alespoň omezit její následky a ulevit pacientovi od jeho potíží. Proto je v dnešní době už jen zcela výjimečně důvodem k trvalé invaliditě nebo upoutání na vozík [7].

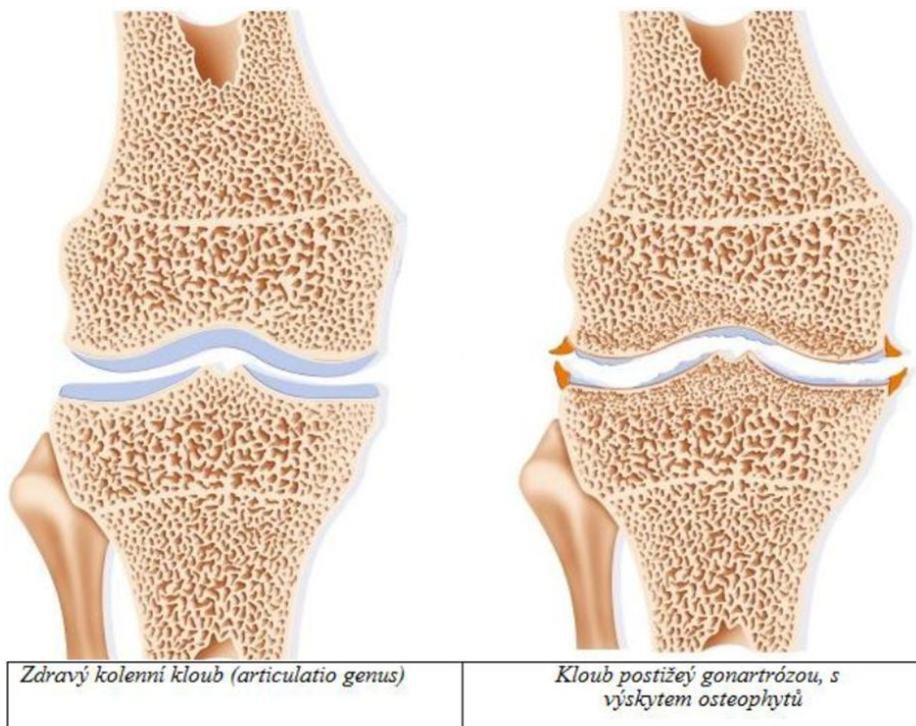
Osteoartróza je jedno z nejčastějších onemocnění, které postihuje klouby. Je udáváno pacienty jako častá příčina bolestí pohybového aparátu, funkčního omezení pohybového aparátu a pracovní neschopnosti. Podle posledních epidemiologických studií postihuje klinicky manifestní osteoartróza až téměř 12% populace. [8]

Jedná se o proces degenerace hyalinní chrupavky. Hyalinní chrupavka je vaskulární elastickou tkání, která se skládá z buněk. Tyto buňky nazýváme chondrocyty a matrix, která je jimi produkována. Podstatou matrix jsou kolagenní fibrily. Onemocnění postihuje zhruba 15% naší populace. Také je bohužel jednou z nejčastějších příčin pracovní neschopnosti a významně se podílí na výšce nákladů na zdravotní péči. Sled událostí při rozvoji artrózy si lze představit asi takto: biochemické změny v chrupavce - anatomické změny – symptomy

- změny funkce. Hlavní biochemickou změnou je úbytek proteoglykanů (makromolekulární struktury, v nichž se na bílkovinný řetězec napojují řetězce opakujících se disacharidových jednotek, nazývaných glykosaminoglykany), změna jejich složení a snazší extraktibilita. Chondrocyty dále nesyntetizují kolagen II., ale typ I., s méně výhodnými mechanickými vlastnostmi. K anatomickým změnám dochází tak, že následkem biochemických změn se chrupavka stává méně odolnou vůči nárokům na ni kladeným. Ztrácí lesk, měkne, na povrchu se objevují fisury. Postupně dochází k její ztrátě, na což subchondrální kost reaguje postupnou sklerotizací a vznikem cyst. Organismus se tomu brání procesem remodelace na kloubních okrajích, tvorbou tzv. osteofytů. [9]

Pacienti trpící osteoartrózou jsou typickými spotřebiteli doplňků stravy kloubní výživy. Lze jim doporučit všechny preparáty uváděné v následující části (doplňky stravy), především kombinaci kolagenu s glukosaminem a chondroitinem a metylsulfonylmetanem (MSM), s podporou užívání kyseliny askorbové. Na následujícím obrázku je porovnán zdravý kloub, s kloubem napadeným osteoartrózou.

Obrázek 2: Schematické srovnání zdravého kolenního kloubu a kloubu postiženého



zdroj: SCIENCE PHOTO LIBRARY
<http://www.sciencephoto.com>
upraveno

2.3 Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida (RA) je chronické, systémové, zánětlivé onemocnění pojivové tkáně, postihující synoviální membránu s následným rozvojem zánětu kloubu a mimokloubními příznaky. Přesná příčina onemocnění není dodnes známa. Vznik autoimunitního onemocnění jako revmatoidní artritidy závisí na interakci mezi genetickým podkladem a řadou environmentálních faktorů. Genetickými faktory je nemoc podložena maximálně z 50 %. Studie zabývající se environmentálními faktory důležitými pro vznik RA identifikovaly četné kandidáty. Tyto zahrnovaly kouření a množství infekčních chorob.[10]

Dalšími rizikovými faktory RA jsou pohlaví, věk a dále pak obezita.

Pohlaví je hlavním rizikovým faktorem. V populaci je postiženo více žen než mužů.

Uvádí se, že až 75 % pacientů jsou ženy. Žena v průběhu života prodělává velké hormonální změny, během nichž se mění především intenzita onemocnění. Více než 70 % nemocných žen s RA má v průběhu těhotenství významnou remisi svého onemocnění. O to horší relaps choroby se objevuje u více než 80 % žen v době 3 měsíců po porodu, resp. po šestinedělí. [11]

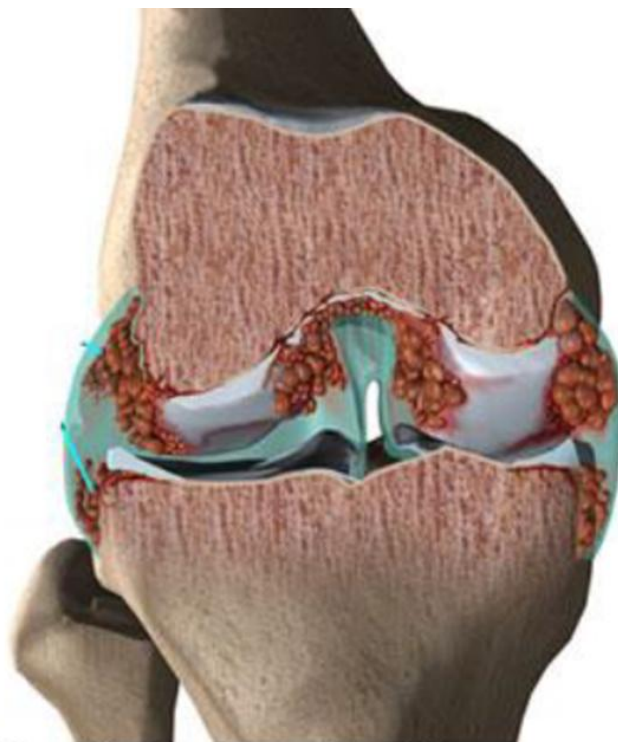
Průběh nemoci je variabilní, trvale progresivní je zaznamenán u přibližně deseti procent případů, kdy klouby nemocných mají výraznou tendenci k destrukci. Existuje také monocyklický průběh, který má relativně dobrou prognózu a jeho remise se omezuje na dobu jednoho roku. Nejčastějším a nejzávažnějším je ovšem typ polycyklický. Celkově onemocnění zkracuje život postiženého až o deset let; [12].

V léčbě dominuje farmakologický postup, který využívá především antirevmatik, chorobu modifikujících léků, glukokortikoidy a biologické léky, které výrazně zvyšují kvalitu života. 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. Také chirurgická léčba vý-

razně zlepšuje stav při tomto onemocnění. Používání kloubní výživy je zatím sice méně běžné, ale je odůvodněné. Platí obdobné zásady jako v případě osteoartrózy; [12]; [3].

V následujícím obrázku je představen kloub napadený revmatoidní artritidou.

Obrázek 3: Kloub postižený revmatoidní artritidou



*Zdroj: Česká revmatologická společnost
<http://attra.registry.cz>*

2.4 Výživa při kloubních onemocněních

Správná výživa hraje při těchto onemocněních nemalou roli, neboť díky ní dochází ke zpomalování artrotických procesů. Tato výživa není nikterak zásadně odlišná od všeobecně platných doporučení pro „zdravou“ výživu. Základem každé stravy musí být příjem energie odpovídající jejímu výdeji. Při nedostatku energie dochází k poruše metabolismu kloubu (změna při tvorbě kloubního mazu) a atrofii svalstva, díky níž dojde k nedostatečné funkci kloubu.

Množství potřebné energie na den závisí na genetických dispozicích, velikosti těla (zejména jeho tukuprosté tělesné hmoty), růstových nárocích a fyzické aktivitě. Pohybuje se v rozmezí mezi 6,7 MJ (ženy, starší lidé bez fyzické aktivity) a 11,8 MJ (dospívající chlapci a fyzicky aktivní muži).[21]

2.4.1 Bílkoviny

Příjem bílkovin je nezbytným zdrojem dusíku, síry a esenciálních aminokyselin, které si organismus neumí sám vytvořit (valín, leucin, isoleucin, lysin, fenylalanin, histidin-děti, methionin, threonin, tryptofan). Dále bílkoviny obsahují i tzv. podmíněně esenciální aminokyseliny, jež jsou esenciálními jen za určitých okolností, např. za patologických stavů, při nezralosti enzymatických systémů (arginin, cystein, glutamová kyselina, glutamin, tyrosin a taurin). Z aminokyseliny methioninu a adenosintrifosfátu (ATP) za pomoci transferázy vzniká S-adenosylmethionin (SAM), důležitý pro syntézu bílkovin, schopnost methylovat různé látky (kreatin, adrenalin) a nezbytný v široké škále metabolických dějů. Po odštěpení methylu vzniká postupně S-adenosylhomocystein, z něj hydrolyzou adenosin a homocystein (rizikový faktor aterosklerózy, aktivuje hemokoagulaci) a dalšími reakcemi vzniká cystein a homoserin, kteří produkují intracelulární antioxidanty. SAM byl zkoumán pro možnou roli v

zabránění zánětu kloubu a vzniku depresí. Mechanismy nejsou zatím zcela známy, ale vědci soudí, že SAM stimuluje produkci proteoglykanů v chrupavce. Teorii antidepressivního působení vysvětlují zvýšením syntézy serotoninu, dopaminu a norepinefrinu.[3]

Ve vztahu k onemocnění pohybového aparátu je vhodné se v této kapitole zmínit o želatině. Želatina je pojivová bílkovina, směs peptidů s vysokým zastoupením hydroxyprolinu, hydroxylyzinu a argininu. Tyto aminokyseliny (AA) společně s L-cystinem a AA obsahující síru jsou důležitou částí výchozího materiálu pro tvorbu kolagenu v chrupavce. Předpokládá se, že vyváženým přísunem těchto AA lze účinně čelit odbourávání chrupavky. I klinické studie tento fakt potvrdily. Dlouhodobý přívod želatiny může zlepšit stabilitu a mechanické zatížení struktur bohatých na bílkovinu.

Preparáty želatiny se získávají kyselou či alkalickou hydrolyzou živočišných kolagenních látek, ale nejúčinnější je hydrolyzát získaný biochemickým postupem s využitím enzymů. Tato forma je nejlépe zpracována trávicím ústrojím a resorbována (např. Geladrink). Kolagen vyskytující se v potravinách se nijak podstatně neliší od kolagenu, který je obsažen ve farmaceutických preparátech a draze prodáván jako podpůrný lék při onemocnění pohybového aparátu. V potravinách je kolagen v masných výrobcích s podílem vepřových kůží a chrupavek (levné uzeniny, huspeniny, tlačanky), lahůdkářských výrobcích (šunka v aspiku), ale také cukrářských produktech (zákusky se želatinou, želatinové bonbony). Je však důležité mít na paměti, že mnoho z těchto potravin má vysoký obsah energie (tuky, jednoduché sacharidy).[20]

2.4.2 Tuky

Tuky (lipidy) jsou stejně jako ostatní makronutrienty nezbytnou složkou stravy a jejich význam spočívá hlavně v tom, že jsou :

- koncentrovaným zdrojem energie

- nezbytné pro funkci buněčných membrán
- rozpouštědla pro vitamíny (A, D, E, K)

- důležitým izolátorem

Hlavní součástí lipidů jsou triacylglyceroly (TAG), jejich trávením a hydrolyzou se uvolňují volné mastné kyseliny, které jsou využívány buňkami jako zdroj energie. Mastné kyseliny se odlišují podle přítomnosti a počtu dvojných vazeb mezi atomy uhlíku.[21]

- nasycené-SMK (bez dvojně vazby, saturevané)- výskyt v živočišném tuku, zvyšují hladiny LDL cholesterolu, což má negativní vliv na zdraví.
- monoenoové-MMK (nenasycené, jedna dvojná vazba)- vyskytují se v olivovém a řepkovém oleji, avokádu a ořechách, snižují LDL cholesterol.
- polyenoové-PMK (nenasycené, >jedna dvojná vazba,)- zde jsou dvě významné řady, n-3 (linolenová) a n-6 (linolová a arachidonová). Poměr polynenasycených mastných kyselin (PMK) má vliv na produkci eikosanoidů (prostaglandiny, tromboxany, leukotrieny), které ovlivňují zánětlivé odpovědi, destičkové funkce a vazomotoriku cévní stěny. Prostaglandiny odvozené z řady n-3 mají vazodilatační, antiagregační a antipermeabilní účinky, na rozdíl od některých eikosanoidů vzniklých z řady n-6, kde např. tromboxan A₂ vykazuje silný účinek proagregační, vazokonstrikční a zvyšuje permeabilitu kapilár. Doporučený poměr n-6:n-3 ve stravě je 4-6:1. Mastné kyseliny řady n-3 se nejčastěji vyskytují v rybím tuku a ořechách, n-6 řada je obsažena v rostlinných olejích a semenech. Kyselina linolová a α -linolenová jsou pro člověka esenciální a při jejich nedostatečném příjmu v potravě dochází ke změnám ve složení lipidů v mnoha tkáních, zvláště v buněčných membránách a k ovlivnění jejich funkcí.

Pravděpodobně může dojít i k poruše růstu a reprodukce, degeneraci a zhoršení funkcí mnoha dalších orgánů.

Vzhledem k výše zmíněným faktům je doporučováno lněné semínko jako možný pomocný doplněk při léčbě revmatoidní artritidy. Obsahuje totiž 35 % tuku a z toho více než polovina je kyselina alfa-linolenová [1], ze které vzniká eikosapentaenová kyselina (EPA) a dokosa-hexaenová kyselina (DHA), které jsou prekurzory protizánětlivých eikosanoidů (působí proti tvorbě tromboxanu A₂, leukotrienu B₄, prostaglandinu E₂, interleukinu 1, tumor

nekrotizujícímu faktoru atd., a zvyšující tvorbu ochranných faktorů jako prostacyklinu 3, leukotrienu B5, interleukinu 2 a dále např. HDL cholesterolu).[14]

Dalším zdrojem kyseliny alfa-linolenové jsou např. vlašské ořechy. Přírodním zdrojem EPA a DHA je rybí olej, dokonce různé studie demonstrovaly výhody olivového oleje u zánětlivých a autoimunitních chorob, jako je např. revmatická artritida.

2.4.3 Vitamíny

- vitamíny rozpustné ve vodě - do této skupiny řadíme komplex vitaminů B (thiamin- B1, riboflavin- B2, pyridoxin- B6, kobalamin- B12, niacin), biotin, kyselinu pantothenovou a listovou a vitamin C.

- vitamíny rozpustné v tucích - mezi lipofilní (liposolubilní) vitaminy patří vitamin A (a provitamin A beta-karoten), vitamin D, E a K.

Skupina s revmatoidní artritidou vykazovala výrazné snížení ranní ztuhlosti, zlepšení problémů při pohybu a snížení bolesti při užívání kyseliny pantothenové. Některé studie prokázaly při zvýšeném užívání vitamínu C snížení revmatických obtíží.[22]

Byl prokázán pozitivní účinek vitamínu D na revmatické onemocnění při dávce téměř 25 µg/den. Zdrojem jsou zejména mořské ryby jako sardinka, sledř, makrela, losos, a dále maso, játra, mléko a máslo. Ve studii, zkoumající vztah vitamínu E a revmatického zánětu, byl zjištěn analgetický účinek, který byl vysvětlen interakcí alfa-tokoferolu a oxidu dusnatého.[22]

2.4.4 Minerální látky a stopové prvky

Minerální látky a stopové prvky jsou pro lidský organizmus velmi důležité, i když jich potřebujeme denně jen velice málo (řádově miligramy či mikrogramy). Jsou nepostradatelné, protože ovlivňují důležité biochemické pochody v těle, podílejí se na výstavbě tělesných tkání, podmiňují stálý osmotický tlak v tělesných tekutinách, regulují, aktivují a kontrolují metabolické pochody a jsou důležité i pro vedení nervových vzruchů. Uplatňují se jako aktivátory nebo součásti hormonů a enzymů. Mnohé minerální látky hrají důležitou úlohu v prevenci civilizačních onemocnění. Organismus si je nedovede sám vytvořit a musí je dostat spolu s potravou a vodou. Minerální látky a stopové prvky se rozdělují podle denní potřeby na mikroelementy (denní potřeba nad 100 mg), mikroelementy (potřeba do 100 mg) a stopové prvky (potřeba v řádu μg).[21]

2.5 Možnosti léčby kloubních onemocnění

Vzhledem k množství druhů nemocí, existuje 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.

2.5.1 Chirurgická léčba

V případě velmi pokročilé nemoci, kdy je bolestivost na nejvyšších stupních škály (např. VAS) a prokazatelné destrukci kloubu, jsou do kloubu chirurgicky zavedeny 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; [5], [23].

2.5.2 Lázně

Lázeňská léčba je vhodná pro ty pacienty, u kterých není nemoc příliš aktivní. Při teplých procedurách může dojít k oživení nemoci. O rozhodnutí léčby zodpovídá lékař, ten také podepisuje rozhodnutí o vhodnosti lázeňské léčby. Pacient většinou absolvuje pobyt v délce měsíc až dva měsíce. Lázně úplně nemoc nevyléčí, ale ve většině případů pacientům pomohou. Prospěšnější je rozdělení léčby na celý den. Při vzniku akutních problémů bývá k dispozici odborná lékařská pomoc; [7].

2.5.3 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, využívající zejména autosugesci a relaxační techniky. Rozšířenou podporou alopatické léčby je také víra, biblický výrok "Věř a víra tvá tě uzdraví" hledá oporu v psychice, víře, či pozitivním myšlení, je tedy možné ji 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; [19].

2.5.4 Léčba kmenovými buňkami

Léčba kmenovými buňkami je nová technologie, kterou se dají léčit poškozené chrupavky a kloubní artrózy. Tato léčba pochází z USA. Metoda se provádí i ambulantně, většinou je nenáročná a můžou jí využívat i starší pacienti. Postup léčby buňkami je založen na odebrání 50 ml vlastní tukové tkáně v lokální anestezii. V 1 ml se nachází až 500 000 kmenových buněk, to je mnohem víc než v kostní dřeni. Z tohoto lipoaspirátu se unikátním postupem izolují buňky stromální vaskulární frakce (SVF) obsahující mesenchymální kmenové buňky. Buňky jsou poté aplikovány do okolí postiženého místa, kde dochází k regeneraci postiženého místa. Léčba SVF není žádná novinka a má dlouholetou a úspěšnou praxi všude ve světě; [24].

Obrázek 4: Kmenová buňka

2.5.5 Fyzioterapie

U naprosté většiny onemocnění pohybové soustavy je vhodná fyzioterapeutická léčba. Mezi doporučované 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; [19]; [12].

2.5.6 Léčba farmaky

Z důvodu časté bolestivosti nemoci, 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 podávány např. nesteroidní antirevmatika. V případě akutního stavu je možná intraartikulární aplikace glukokortikoidů. Při osteoartróze je léčba často podpořena leky skupiny SYSADOA (symptomatic slow acting drugs of osteoarthritis), (vzorce chondroitin sulfátu, glukosamin sulfátu jsou společně s dalšími vybranými vzorci uvedeny jako příloha č. I. této diplomové práce), které obnovují metabolickou rovnováhu v chondrocytech, snižují bolestivost onemocnění a jsou protizánětlivé; [12].

2.6 Doplnky výživy

U doplňků výživy je i přes velký zájem vědců stále mnoho otazníků a nejistot. Obecně se uvádí jejich účinek analgetický, regenerační a protizánětlivý. Mezi suplementa s některým z výše uvedeného působení patří želatina, EPA a DHA (lněné semínko, rybí tuk), GLA (pupalka dvouletá, olej brutnáku lékařského a olej černého rybízu), glukosamin, chondroitin a MSM. Většinou se jedná o kombinaci více účinných složek, která ještě doplněna o vápník, fosfor, hořčík, bor, selen, mangan, vitamin C, vitamin E a biotin. Tato kapitola podrobně pojednává pouze o glukosaminu, chondroitinu a MSM, neboť ty jsou hlavními složkami doplňků výživy při terapii onemocnění pohybového aparátu.

2.6.1 Glukosamin

Glukosamin je aminocukr (aldosamin) syntetizovaný z glukózy a glutaminu. V těle stimuluje tvorbu glycosaminoglykanů a proteoglykanů, dvou stavebních prvků chrupavky. Vyskytuje se ve formě stabilních solí (síranu a chloridu) či jako N-acetylglucosamin. Nejčastěji dostupnou formou je glucosamin sulfát, který se získává z koryšů a měkkýšů a doplněk je bez vedlejších účinků a kontraindikací. Výrobci doporučují nejčastěji užívání 1500 mg glucosaminu denně. Doplnky glukosaminu získaly popularitu jako alternativa k terapii nesteroidními anti-revmatiky a díky možným chondroprotektivním účinkům. Prodejci tvrdí, že glukosamin zmírňuje bolest kloubů, podporuje tvorbu kloubní chrupavky a kloubního mazu. Tento fakt byl potvrzen několika studiemi, ale ke zlepšení došlo spíše u pacientů s mírnými projevy.

2.6.2 Chondroitin sulfát

Chondroitin sulfát je glycosaminoglykan spojující buňky v živočišných tkáních. Je složen z glucuronové kyseliny a N-acetylgalactosaminu. Jeho význam je při stavbě a regulaci tkání. Existuje několik druhů označených písmeny A-E, pro účely této práce je důležité zmínit: A (chondroitin-4-sulfát), který se nachází hlavně v pojivových a epitelových tkáních (tvoří až 40 % chrupavek, dále kosti a pokožku).

C (chondroitin-6-sulfát) je také v pokožce, šlachách a chrupavkách.

Chondroitin jako doplněk se vyrábí z chrupavek krav, vepřů, žraloků a ptáků, neboť chondroitin není jednotnou substancí, jeho složení je v každém doplňku jiné. Bohužel doposud nejsou žádné závazné normy pro složení a správné označení tohoto doplňku. Dle analýz třiceti dvou doplňků bylo pouze pět označených správně a více než polovina obsahovala méně než 40% udávaného množství. [24]

Chondroitin se nejčastěji v doplncích vyskytuje s glucosaminem (studie viz. glucosamin).

Ačkoliv díky popularitě vzniklý test [25] efektu chondroitinu a glukosaminu na onemocnění kloubů neprokázal statisticky významný efekt při užívání doplňků po dobu 6 měsíců (zlepšení jen v podskupině s velkou bolestí) studie na zvířatech ukázaly významné zlepšení sledovaných parametrů. [13]

2.6.3 Methylsulfonylmethan

MSM (methylsulfonylmethan) je přirozeně se vyskytující sirnou sloučeninou odvozenou od dimethylsulfoxidu (DMSO). Objevitelem je Stanley Jacobs z univerzity v Oregonu. DMSO se používá jako mast při artritidě či v kapkách při zánětu močových cest. Několik klinických pokusů z let 1960-1970 ohlásilo analgetický účinek DMSO při orálním užívání u zánětů kloubu, revmatismu a dně. Nevýhodou užívání DMSO preparátu byl zápach a česneková chuť v ústech, což u MSM, jakožto metabolizovaného produktu odpadá. Z potravních zdrojů se MSM dle studie dokumentující jeho přítomnost vyskytuje v mléce, rybách, chřest-u, vojtěšce, řepě, zelí, obilí, cizrně, rajčatech, jablkách, malinách, pivě a čaji. Výrobci doplňků doporučují příjem 500mg až 8000mg denně formou kapslí či tobolek, nejlépe v kombinaci s glucosaminem. [26]

2.6.4 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 proces. Blíže jsou kolagenní peptidy představeny v následující kapitole.

3 KOLAGEN

Kolagen je zodpovědný za pružnost a pevnost chrupavky. V předchozí kapitole bylo popsáno, co způsobuje jeho nedostatek a jak je možné jeho absenci léčit, a kterými látkami potravinových doplňků je vhodné jeho tvorbu a jeho regeneraci podpořit. Tato kapitola se bude zabývat vlastnostmi kolagenu, strukturou a jeho typy.

3.1 Základní fakta

Kolagen je nejčastěji se vyskytující živočišná bílkovina, která je nezbytnou součástí všech pojivových nebo podpůrných tkání. Známe celkem 27 typů kolagenu, v lidských tkáních jich bylo nalezeno 11 typů a rešerše dále pokračuje, neboť kolagen je významnou složkou vnitřního podpůrného mechanismu kostí, chrupavek, šlach, vaziva, kůže, rohovky a dalších tělních orgánů. Také se podílí na stárnutí organismu. Nejhojněji zastoupené typy kolagenu jsou I-V, které jsou také nejvíce prozkoumány. Tato práce se jimi bude zabývat v následující kapitole. Nyní představuji vlastnosti kolagenu.

3.2 Vlastnosti kolagenu

Kolagen je rozšířen v celé říši živých organismů s výjimkou jednobuněčných a patří mezi technicky nejdůležitější vláknité bílkoviny. Je hlavní složkou pojivových tkání, kterým zajišťuje správnou funkci, zejména v souvislosti s jejich mechanickými vlastnostmi. Kolagen představuje až 30% všech bílkovin v těle. Je obnovitelnou surovinou a jeho zdroje jsou téměř neomezené. Proto se hledají nové možnosti jeho zpracování a využití. Pro práci s ním je však nezbytné znát jeho vlastnosti, a tedy v této části diplomové práce jsou popsány jeho základní charakteristiky. [14]

3.2.1 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 kyselé 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 $-COOH$; [22].

Další udávanou 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 ; [22].

Při zahřívání ve vodním prostředí z kolagenu vzniká kolagenní 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; [8].

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; [8].

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); [7].

3.3 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 čtyři struktury -primární, sekundární, terciární a kvarterní. 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; [14].

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.[27] Obsahuje také samotný prolin, který spolu s hydroxyprolinem podmiňuje jeho sterickou rigiditu a odlišnou orientaci polypeptidických řetězců než je tomu v případech bílkovin obsahujících menší množství cyklických aminokyselin. Kolagen obsahuje také značné množství glycinu (330 mol/1000mol 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 hydroxylizin, 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, metionin a cystein. Cystein se v kolagenu I. typu vyskytuje pouze u nejnižších organismů. Metionin má svou funkci především při bromkyanovém štěpení při studiu primární struktury kolagenu; [27].

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.4 Jeden řetězec tvoří přibližně 1000 aminokyselin, celá molekula má potom přibližně trojnásobný aminokyselinový obsah; [28].

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 $C\alpha - N$ a $C\alpha - CO$, vycházející z α uhlíkového atomu; [27]. Základem sekundární struktury kolagenu je levotočivá polypeptidová šroubovice se stoupáním 0,95nm, která je svinutá do pravotočivé struktury superhelixu. (viz obrázek č. X). Jednotlivé peptidy jsou od sebe vzdáleny 0,286 nm a celková délka řetězce je 290nm, což je charakteristický rys právě kolagenu, neboť jinde se vyskytuje pouze u proteinů s podobnou sekvencí aminokyselin; [28].

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; [28].

Kvartérní struktura stanovuje kolagen jako fibrální bílkovinu, jeho struktura je tedy vláknitá. Fibrily jsou dlouhé a pevné a vyskytují se ve všech pojivových tkáních. Jena molekula měří přibližně 300nm. Jednotlivá vlákna je možné dále členit, a to až na mikrofibrily s uspořádáním C -konec a N- konec; [28].

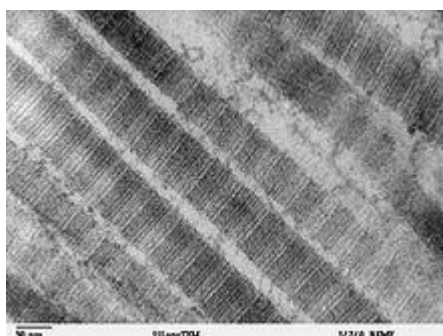
3.4 Jednotlivé typy kolagenu

Struktura jednotlivých typů kolagenů se liší sekvencemi aminokyselin v polypeptidových řetězcích. Tyto rozdíly se odrážejí především ve stupni polymerizace a agregace molekul. Ze sedmadvaceti doposud známých typů kolagenu je v této práci představeno 5 typů kolagenu. Těchto pět typů kolagenu se vyskytuje v lidském organismu a plní v něm nezastupitelné role.

3.4.1 Kolagen typu I

Kolagen prvního typu je v lidských tkáních nejrozšířenější. Představuje přibližně 90 % všech kolagenů v lidském těle. Sestává se 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 hydroxylysin (blíže 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[20]. Kolagen prvního typu je převážně přítomen v kostech, šlachách, pokožce a zubech. Tento typ kolagenu má širokospektrální 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 nulové toxicitě. Ve výzkumu je používán jako podklad pro pěstování tkáňových struktur a je často využíván při výrobě tkáňových náhrad; [29].

Obrázek 5. Kolagenová vlákna typu I



3.4.2 Kolagen typu II

Na rozdíl od kolagenu prvního typu, obsahuje tento typ více hydroxylysinu a postranních řetězců sacharidů. Je složen ze tří polypeptidických $\alpha 1$ řetězců a jeho vlákno je pak 67nm 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 rozmisťují chondrocyty. Staví tedy pro optimální funkci chrupavky nezbytnou arkádovou strukturu. Je převážně nerozpustný (výjimkou je kolagen II embryí) a k jeho izolaci je používáno pepsidové 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; [14]; [29].

3.4.3 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; [14]; [29].

3.4.4 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 $\alpha 2$; [7].

3.4.5 Kolagen typu V

Tento typ kolagenu se nachází hlavně v zevních laminách svalových buněk, adipocytů a gliových buněk, tyto buňky najdeme v lidském těle. Je hodně příbuzný typu IV. [30].

3.4.6 Porovnání kolagenních typů

Existuje mnoho systémů, které třídí kolageny do více než deseti skupin, ale nejvíce převážně na základě rozdílných biochemických parametrů. [27].

Tabulka 1. Porovnání kolagenních typů

| Typ | Řetězec | Charakteristika | Výskyt |
|------------------|---|--|---|
| I. Trimer | $\alpha 1(I), \alpha 2(I)$ $\alpha 1(I)$ | Nejčastější výskyt, vyšší obsah 3- a 4-hydroxyprolinu a 5-hydroxylysinu málo hydroxylysinu | Kosti, šlachy, kůže, zubovina, vazivo, děloha, cévy Nádorové útvary a zanícená ložiska |
| II. | $\alpha 1(II)$ | Častý výskyt, relativně bohatý na hydroxylysin a karbohydráty | Chrupavky, sklivec oka |
| III. | $\alpha 1(III)$ | Bohatý na hydroxylysin obsahující meziřetězcové difulsidické vazby | Kůže, cévy, děloha, retikulín |

| | | | |
|-------|---|--|---------------------------|
| IV. | $\alpha 1(\text{IV}), \alpha 2(\text{IV})$ | Bohatý na hydroxylysin, obsahuje rozsáhlé globulární regiony | Bazální membrány |
| V. | $\alpha 1(\text{V}), \alpha 2(\text{V}), \alpha 3(\text{V})$ | Stejný jako IV. | Spojovací tkáň |
| VI. | $\alpha 1(\text{VI}), \alpha 2(\text{VI}), \alpha 3(\text{VI})$ | mikrofibrily | Spojovací tkáň |
| VII. | | Dlouhé řetězce | Zpevňující fibrily |
| VIII. | $\alpha 1(\text{VIII})$ | Šroubovice zařazená za sebou | Některé endotelické buňky |
| IX. | $\alpha 1(\text{IX}), \alpha 2(\text{IX}), \alpha 3(\text{IX})$ | Vedlejší protein chrupavek, nese glykosaminoglykany | chrupavky |
| X. | $\alpha 1(\text{X})$ | Krátké řetězce | Hypertrofické chrupavky |

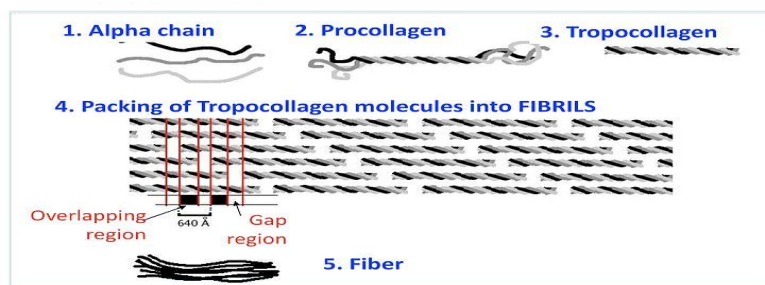
3.5 Metabolismus kolagenu a jeho využití

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, maturace. Následuje odbourávání, jako přirozený vývoj maturace. Jednotlivé fáze jsou představeny níže. Abychom splnili jeho cíl práce a objasnili, proč je kolagen používán při léčbě kloubních onemocnění, následuje také popis využití metabolismu.

3.5.1 Syntéza

První fází je syntéza, při níž je předpokládáno, že polypeptidický řetězec fibrilárních proteinů vzniká podobně jako u globulárních. Tento předpoklad je zatížen vysokou vahou řetězce (získanou díky množství postranních řetězců a aminokyselin). Na syntéze se podílí několik ribozomů, 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 [14].

Obrázek 6. Syntéza kolagenu



3.5.2 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 vazivách, zejména pak α 1-glykoprotein [14].

3.5.3 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 [14].

3.5.4 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 [14].

3.5.5 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 one-

mocněním, 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 [14].

3.5.6 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 [11], 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 [10], [14].

3.6 TECHNOLOGIE VÝROBY KOLAGENU

Při čtení popisu u mnoho výrobků z kolagenu se můžeme dočíst, že jsou různé druhy. Např. hovězí, vepřový, rostlinný, hydrolyzovaný, hydrát, nativní. Tyto pojmy ale nám toho moc neřeknou. Důležité je vědět, že nejdůležitější jednotkou kolagenu je tropokolagen. Tropokolagen je bílkovina bohatá na dvě aminokyseliny: hydroxyprolin a hydroxylyzin. Hydroxyprolin je aminokyselina, která tvoří mezi molekulami příčné vazby. Tyto vazby zvyšují mechanickou pevnost kolagenních vláken. [27]. Níže uvedu pár druhů kolagenu.

3.6.1 Hydrolyzovaný kolagen

Jiným názvem se mu říká želatina. Vzniká následkem termického rozpadu síťových peptidových vazeb kolagenových bílkovin, jejíž délka molekulových řetězců je větší než 100.000 daltonů. Díky tomu poskytuje želatina svou základní vlastnost a tou je schopnost tvořit za určitých podmínek gel. Při tvorbě želatiny není potřeba chránit jemnou kolagenovou strukturu. Suroviny k výrobě želatiny jsou nejdříve poddávány úvodnímu procesu při spoluúčasti silných kyselin či zásad. Proto jsou podmínky získávání hydrolyzátu mnohem drastičtější a umožňují využívat mnohem širší spektrum surovin kolagen obsahujících, tedy např. kostí. Vzhledem k jeho snadné dostupnosti a jeho velkému množství bývá velice levný. [23], [9]

3.6.2 Lyofilizovaný kolagen

Lyofilizace je jednou z metod získávání sušených produktů. Je založena na sublimačním vysoušení, ke kterému dochází v nízké teplotě (pod 0°C) a za velmi sníženého tlaku. Tento proces bývá používán k sušení obzvláště citlivých látek a sloučenin, zejména takových, které jsou citlivé na ohřívání. Při tomto procesu si aktivní látky neničí své cenné složky, jako jsou vitamíny, bílkoviny, enzymy, minerální látky apod. Tento preparát obsahuje minimální množství vody a nepotřebuje být konzervován. Po lyofilizaci lze získaný preparát opět snadno vodou zředit, aniž by došlo ke ztrátě jeho organoleptických a biologických vlastností. Tento druh bývá používán v doplňcích stravy, které jsou určeny k regeneraci pokožky, kostí a chrupavek. [25]

3.6.3 Mikrokolagen

Název mikrokolagen bývá nejčastěji používán pro menší molekuly bílkovin (oligopeptidy), které svým působením molekuly přírodního kolagenu připomínají. Tyto částice dokáží ovlivnit nejen produkci kolagenu, ale i dalších složek škáry. Mikrokolagen je vyráběn v biotechnologických laboratořích a bývá modifikován dodáváním tukových molekul, které zvyšují jeho stabilitu a napomáhají mu snadněji pronikat ochrannými vrstvami pokožky. [25]

4 MOŽNOSTI ANALÝZY A CHARAKTERIZACE KOLAGENU

Značné uplatnění např. při vysokoúčinných separacích aminokyselin, peptidů a bílkovin má dnes kapilární zónová elektroforéza, oblíbená především při kvalitativní analýze. Z metod používaných k charakterizaci kolagenu se nejčastěji využívá elektroforetické stanovení molekulové hmotnosti podjednotek kolagenu metodou PAGE-SDS.

Využit lze i spektrometrii, proměřováním UV-VIS spekter při různých vlnových délkách (200 – 460 nm) je možné vidět slabou absorpenci známých chromoforů tyrosinu a fenylalaninu, protože patří, co do kvantity, mezi méně se vyskytující aminokyseliny v kolagenech. Pozitivní pík okolo 223 nm a negativní pík okolo 204 nm jsou charakteristické znaky pro trojitou helikální strukturu kolagenu. K odhadu sekundární struktury kolagenu lze využít spektra cirkulárního dichroismu nebo pomocí identifikace – NH funkčních skupin, infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací.

Vysokoúčinné separační metody (HPLC) nabízí variabilitu, přesnost a reprodukovatelnost stanovení. Často bývá analyzováno aminokyselinové složení kolagenových vzorků na automatickém analyzátoru aminokyselin, pracujícím na principu ionexové chromatografie s postkolonovou derivatizací ninhydrinem a fotometrickou detekcí. Lze také použít RP HPLC v kombinaci s vodnými mobilními fázemi a detekcí UV-VIS nebo fluorimetrickou.

Velmi cenné je využití hmotnostní spektrometrie, nabízející možnost určování strukturního a prostorového uspořádání molekul. [31]

4.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC se vyvinula z plynové chromatografie v počátcích 70. let. Vysokých účinností se dosahuje použitím stacionárních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Tím se dosahuje účinností řádově desítek tisíc pater na metr kolony. Průtok mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem (jednotky až desítky MPa) – proto také bývá tato metoda někdy nazývána vysokotlaká kapalinová chromatografie. Dávkuje se malá množství vzorku (řádově mikrolitry). K detekci jsou nutné citlivé de-

tektory, které umožňují kontinuální monitorování látek na výstupu z kolony. Signál detektoru se zpracovává počítačem. Z výše uvedeného je zřejmé, že HPLC vyžaduje poměrně náročnou instrumentaci.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) se řadí mezi nejčastěji používané separační metody. Vyniká vysokou účinností, dobrou opakovatelností a robustností. Tato metoda je vhodná pro dělení organických méně těkavých kapalných a tuhých látek, které jsou rozpustné ve vodě, v organických rozpouštědlech nebo zředěných kyselinách. [29]

HPLC je založena na separaci analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází, která je vždy kapalná. Stacionární fáze je zakotvená v chromatografické koloně. Během separace dochází k mnoha typům interakcí. Uplatňují se interakce analytů s mobilní fází, interakce mobilní fáze se stacionární fází a sorpce analytů na stacionární fázi. [30]

Vysokoučinný kapalinový chromatograf pracuje tak, že jsou vzorky dávkovány dávkovacím ventilem do mobilní fáze. Ta unáší jednotlivé složky vzorku na kolonu, kde dochází k opakovanému ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází a k separaci analytů dle fyzikálně-chemických vlastností. Po průchodu separační kolonou jsou analyty v mobilní fázi detekovány v průtokové cele detektoru. Měřenou veličinou je fluorescence, absorbance, index lomu, elektrická vodivost. Výstupem z detektoru je grafický záznam závislosti odezvy detektoru na retenčním čase, tj. chromatogram, na němž se hodnotí plocha nebo výška píku. Kvantitativní analýza se provádí na principu odečtení výsledku z kalibrační křivky. [29]

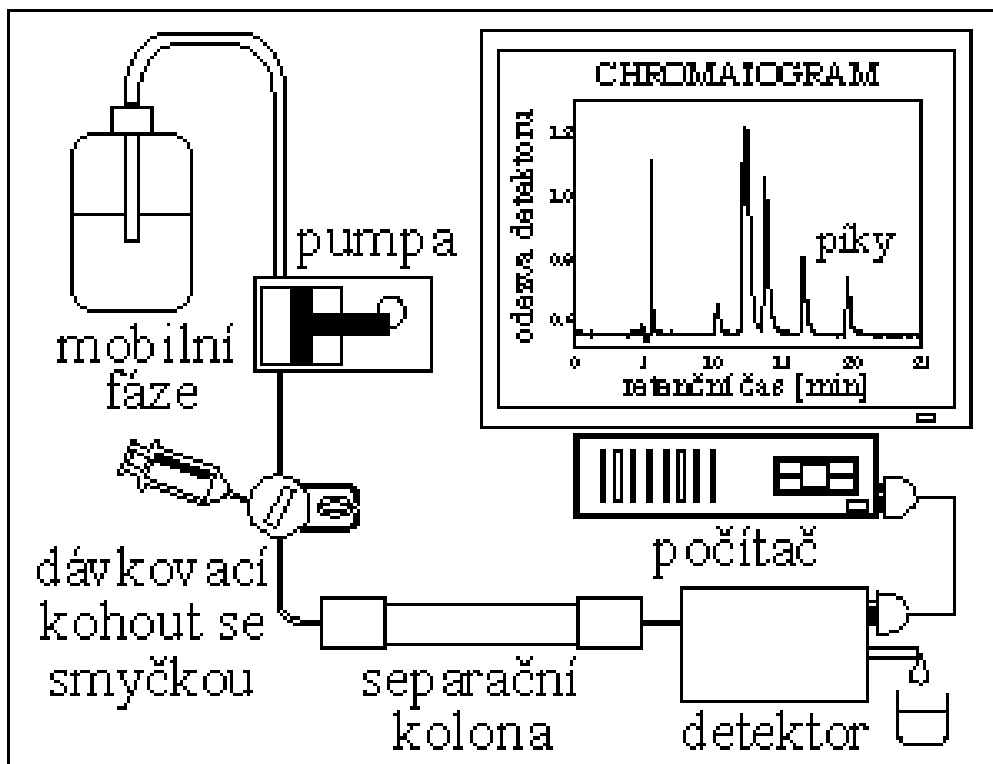
Jako náplň kolon (stacionární fáze) se používají polární nemodifikované adsorbenty (silikagel, méně často oxid hlinitý) nebo náplně s chemicky vázanými stacionárními fázemi na silikagelovém nosiči. Jako mobilní fáze se většinou užívá voda, organická rozpouštědla a jejich směsi.

Je-li stacionární fáze polárnější než mobilní fáze, mluvíme o systémech s normálními fázemi. V opačném případě jde o systém s obrácenými fázemi. [30]

Použití:

- stanovení organických kyselin
- bílkovin
- vitamínů
- léčiv
- různých metabolitů

Obr. 7 Princip chromatografie



- **Mobilní fáze**

Mobilní fázi v RP HPLC může být např. voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufrů a další. Zásobníky jsou skleněné láhve, kterých může být několik s navzájem různými mobilními fázemi, které je možné spolu automaticky mísit v předem zvoleném poměru.

- **Stacionární fáze**

Stacionární fáze je tvořena mikročásticemi silikagelu (3-10 um) na kterých je navázána vlastní stacionární fáze. Vlastní stacionární fáze může být tvořena například nepolárními uhlovodíky (C8 – oktan, C18 – oktadekan), nebo polárnějšími uhlovodíky s funkční skupinou.

- **Vysokotlaká pumpa**

Vysokotlaká bezpulzní pumpa je velmi důležitou součástí HPLC aparatury. Kolony pro HPLC jsou plněny mikročásticemi (viz stacionární fáze), které při průchodu mobilní fáze kladou značný odpor. Z toho důvodu musí být mobilní fáze pod vysokým tlakem (až 40 MPa), aby mohla projít přes kolonu. Dostatečný tlak a konstantní průtok mobilní fáze zajišťuje právě vysokotlaká pumpa.

- **Dávkování**

Vzorek je dávkován do proudu mobilní fáze pomocí dávkovací smyčky nebo pomocí automatického dávkovače.

- Kolona

Zpravidla se jedná o nerezovou trubici o vnitřním průměru okolo 4 mm a délce typicky 5-25 cm, která je naplněna stacionární fází. O schopnosti kolony separovat určité směsi na jednotlivé složky opět rozhoduje zejména typ stacionární fáze zakotvené na silikagelovém nosiči (viz stacionární fáze).

- Detektor

Metoda HPLC využívá tyto typy detektorů: spektrofotometrický detektor (UV-VIS), fluorescenční detektor, hmotnostní spektrometr, refraktometrický detektor a další. Volba detektoru opět závisí na konkrétní aplikaci. Často používaným detektorem je detektor spektrofotometrický (UV-VIS) a fluorescenční. Podmínkou použití těchto detektorů je, aby daný analyt absorboval záření určité vlnové délky (UV-VIS detekce) anebo aby emitoval fluorescenční záření (fluorescenční detekce). Pokud analyt sám o sobě neabsorbuje záření v oblasti UV-VIS nebo neemituje fluorescenční záření, je použití těchto detektorů podmíněno derivatizací vzorku (vzorek je chemickou reakcí převeden na sloučeniny, které mají potřebné vlastnosti - absorpce UV-VIS, fluorescence).

Detektor diodového pole (DAD) umožňuje získat spektrální data látek v průběhu celé analýzy. Průtokovou celou prochází polychromatické světlo, transmitované záření je spektrálně rozkládáno holografickou mřížkou, takže na každou z miniaturních fotodiod umístěných na destičce o délce cca 1 cm dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v průtokové cele detektoru. Použití DAD je podmíněno softwarovým zázemím, které umožňuje např. průběžné hodnocení tzv. "čistoty píků", identifikaci neznámých složek pomocí spektrální knihovny, rychlé stanovení absorpčního maxima látky, kvantifikaci píků s odlišnými spektrálními vlastnostmi v jedné analýze.

- Popis HPLC analýzy

Aparaturou protéká mobilní fáze, která je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlakou pumpu do kolony, z ní do detektoru a dále pak do odpadu. Dávkovačem je do proudu mo-

bilní fáze nadávkován vzorek (řádově několik málo ul). Vzorek je unášen mobilní fází do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány. Signál z detektoru je zaznamenáván pomocí PC a tisknut v podobě chromatogramu. [29,30]

4.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda určování hmotnosti atomů, molekul a molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty. Podstatou této metody je rozdílné chování iontů s různou hmotností v elektromagnetickém poli. Tato metoda má velmi dobrou vypovídací schopnost o struktuře analyzovaných látek, hlavní oblastí jejího analytického využití je zejména stopová analýza organických látek s důrazem na zjištění jejich struktury.

Všechny hmotnostní spektrometry jsou složeny ze stejných základních částí:

- Iontový zdroj
- Hmotnostní analyzátor
- Detektor
- Řídící počítač

Hmotnostní spektrometry pracují v prostředí silného vakua. Iontový zdroj slouží k převedení analyzované látky do ionizovaného stavu, zde dochází k většině fragmentačních reakcí. Hmotnostní analyzátor umožňuje rozdělit v prostoru nebo čase směs iontů o různých hmotnostech. Detektor poskytuje analogový signál úměrný počtu dopadajících iontů. Získaný signál je poté převeden do počítače a následně zpracován do formy hmotnostního spektra. [29,30]

II. Praktická část

5 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo charakterizovat preparáty na bázi kolagenu pro použití jako doplňky stravy pomocí moderních analytických metod.

Pro separaci jednotlivých složek byla zvolena metoda HPLC a následně byla nasnímána fluorescenční spektra, která byla doplněna jejich analýzou a získání charakteristických parametrů na základě, kterých by bylo možné jednotlivé kolagenní preparáty určit případně i stanovit.

Celkem bylo zkoumáno sedm vzorků. Provedená měření jsou prezentována i na přiložených obrázcích. V této diplomové práci byly analyzovány vzorky pomocí HPLC metody, která je v dnešní době velmi efektivním nástrojem k analýze. Nedílnou součástí práce byla příprava a kalibrace přístroje a dále pak optimalizace přístroje pro analýzu. Následně byly na přístroji změřeny vzorky a výsledné koncentrace porovnány.

5.1 Použité přístroje, zařízení a pomůcky

- UV/VIS spektrometr – Lambda 25
- Hmotnostní spektrometr – Amazon III.
- UHPLC systém Dionex Ultimate 3000 s UV/VIS detektorem
- Laboratorní váhy, odměrné baňky, pipety, kádinky

5.1.1 Lambda 25

- Ovládání pomocí softwaru UV WinLab
- Rozsah: 190 nm – 1100 nm
- Šířka pásma: 1 nm (fixní)

UV-VIS spektrofotometr LAMBDA 25 je vhodný pro měření absorpčních spekter v roztocích studovaných látek v libovolných rozpouštědlech.

Přístroje lze využít k záznamu přehledových spekter ve zvolené oblasti, ke studiu chemických reakcí a dějů závislých na čase (kinetická měření), k měření při vybraných vlnótech nebo v inertním prostředí. Lze studovat organické, anorganické a komplexní sloučeniny, produkty chemického průmyslu případně jiných průmyslových odvětví.

Obrázek 8. Lambda 25



5.1.2 UHPLC Systém Dionex Ultimate

Kapalinový chromatograf se skládá z degasseru, dvou ternárních gradientových pump, autosampleru s dávkovací smyčkou, kolonového prostoru, v němž se nachází kolona, na které bude prováděna analýza DAD a fluorescenčního detektoru.

Sestava vysokoúčinné kapalinové chromatografie má tlaky až 620 bar s průtoky až do 10 ml/min v izokratickém i gradientovém režimu. Autosampler s možností termostatování vzorků spolu se samostatným termostatem až 12 kolon je nedílnou součástí standardní výbavy. Moderní SW Chromeleon. Sběr dat rychlostí až 200 Hz pro optimální podporu a rychlou separaci.

Složitý proces chromatografické separace je dán souborem interakcí analytu mezi mobilní fází (rozpuštědlem) a stacionární fází (zjednodušeně náplní kolony). Při průchodu analytu chromatografickou kolonou je analyt unášen mobilní fází, ke které má specifickou afinitu (je v ní rozpustný) a dále interaguje s fází stacionární (přenos hmoty). Kontakt analytu se stacionární fází je zprostředkován „difuzí“. Tu rozlišujeme u chromatografického procesu trojího druhu, difuzi podélnou (pohyb částic analytu v mobilní fází), vířivou (pohyb částic analytu k povrchu částic stacionární fáze a zpět) a difuzi uvnitř pórů částic v různých směrech (transport hmoty analytu do stacionární fáze a zpět).

Obr. 9 UHPLC systém Dionex Ultimate 3000 s UV/VIS detektorem

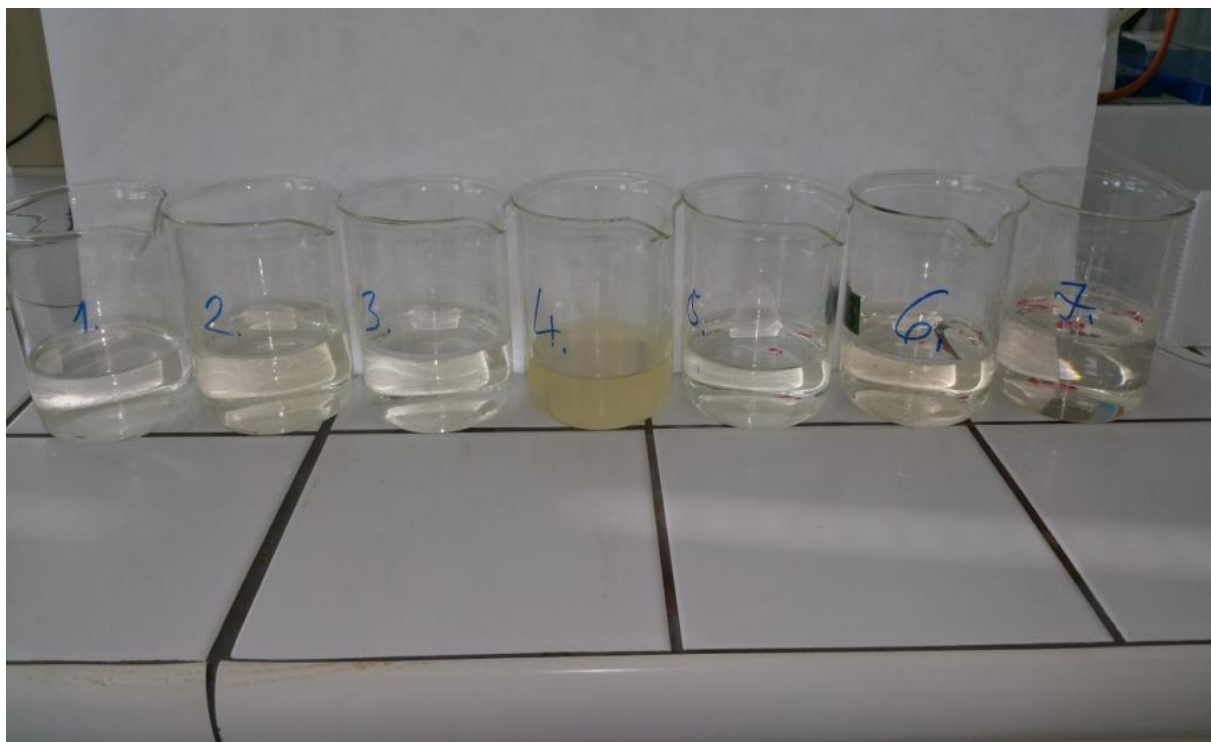


5.2 Přehled použitých vzorků

Jmenný seznam použitých vzorků: Certifikáty k těmto vzorkům jsou umístěny v Příloze I.

- 1. Colpropur D Premium
- 2. Hydro – F
- 3. Gelita Sol
- 4. RouselotASF
- 5. Atogel
- 6. Gelatina 100 Bloom
- 7. Gelatina 80 Bloom

Obr. 10 Rozpuštěné vzorky 1-7 v destilované vodě



5.2.1 Příprava vzorků pro analýzu

Ze sedmi původních práškových vzorků byl z každého odebrán 1 gram vzorku, který byl rozpuštěn ve 200 ml destilované vody z destilačního přístroje PURELAB.

5.3 Zpracování vzorků a nastavení spektrometru pro metodu absorpční molekulové spektrometrie v UV/VIS oblasti

Molekulová absorpční spektrometrie v UV/VIS oblasti je analytická metoda, kterou řadíme mezi elektromagnetické spektroskopické metody. Podstatou je absorpce elektromagnetického záření v intervalu 200 nm – 800 nm (UV – VIS oblast) molekulami vzorků. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů.

Tato metoda vyniká přesností, rychlostí, citlivostí a experimentální nenáročností. Pomocí metody lze identifikovat neznámé látky a stanovit koncentraci známých látek. Je využívána v průtočných celách detektorů různých separačních metod – nejpoužívanější HPLC. Měření je prováděno při vhodné vlnové délce.

Spektrometry se konstruují jako dvoupaprskové nebo jednopaprskové. Základními částmi jsou zdroj světla, monochromátor, měřicí prostor a detektor. Jako zdroj se pro UV oblasti často používají deuteriové výbojky - 190 nm – 400 nm.

Vzorky byly proměřeny na spektrometru Lambda 25. Přístroj je řízen softwarově programem UV WinLab.

Obr. 11 Soupis měřených vzorků

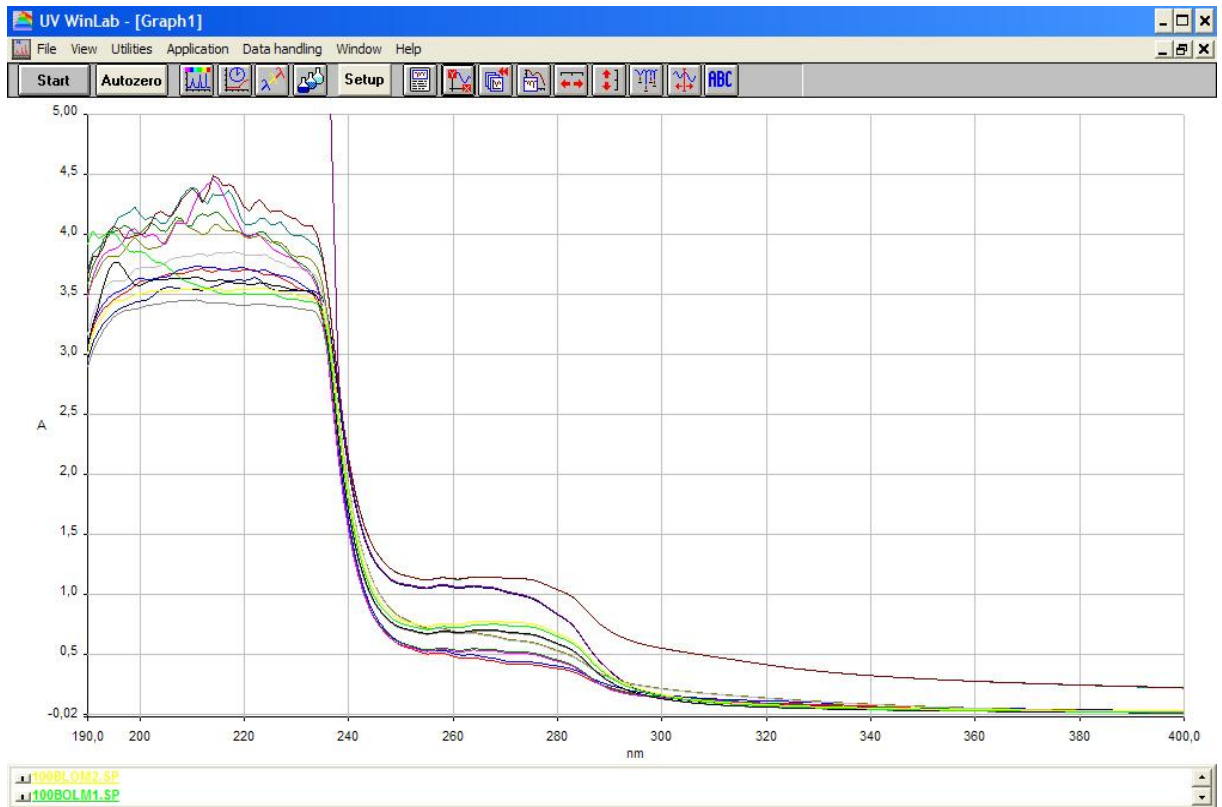
| Injection List | | kolagen | | | | | | | | | | |
|----------------|----------|--------------------------|---------|-------|----------|-------------|-------------------------|-------------------|----------|--------------------------|-------------|--------|
| | | Run Finished | | | | | | | | | | |
| # | UV_VIS_3 | Name | Type | Level | Position | Volume (µl) | Instrument Method | Processing Method | Status | Inject Time | Lock Status | Weight |
| 14 | | Colopcu_1_100 | Unknown | | RA1 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 21:25:19 +0... | | 1.0000 |
| 15 | | Colopcu_2_100 | Unknown | | RA1 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 9:11:22 +01... | | 1.0000 |
| 16 | | Colopcu_2_100 | Unknown | | RA1 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 9:37:16 +01... | | 1.0000 |
| 17 | | Hydro_F_1_100 | Unknown | | RA2 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 10:03:10 +0... | | 1.0000 |
| 18 | | Hydro_F_2_100 | Unknown | | RA2 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 10:29:04 +0... | | 1.0000 |
| 19 | | Gelta_1_100 | Unknown | | RA3 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 10:54:59 +0... | | 1.0000 |
| 20 | | Gelta_2_100 | Unknown | | RA3 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 11:20:51 +0... | | 1.0000 |
| 21 | | Rousekt_1_100 | Unknown | | RA4 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 11:46:45 +0... | | 1.0000 |
| 22 | | Rousekt_2_100 | Unknown | | RA4 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 12:12:39 +0... | | 1.0000 |
| 23 | | Atogel_1_100 | Unknown | | RA5 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 12:36:33 +0... | | 1.0000 |
| 24 | | Atogel_2_100 | Unknown | | RA5 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 13:04:27 +0... | | 1.0000 |
| 25 | | Gelatina 100Blom_1_100 | Unknown | | RA6 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 13:30:20 +0... | | 1.0000 |
| 26 | | Gelatina 100Blom_2_100 | Unknown | | RA6 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 13:56:14 +0... | | 1.0000 |
| 27 | | Gelatina 800Blom_1_100 | Unknown | | RA7 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 14:22:00 +0... | | 1.0000 |
| 28 | | Gelatina 800Blom_2_100 | Unknown | | RA7 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 14:48:02 +0... | | 1.0000 |
| 29 | | Colopcu_190_100_1 | Unknown | | RA1 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 15:31:36 +0... | | 1.0000 |
| 30 | | Colopcu_190_100_2 | Unknown | | RA1 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 15:57:30 +0... | | 1.0000 |
| 31 | | Hydro_F_190_100_1 | Unknown | | RA2 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 16:23:25 +0... | | 1.0000 |
| 32 | | Hydro_F_190_100_2 | Unknown | | RA2 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 16:49:19 +0... | | 1.0000 |
| 33 | | Gelta_190_100_1 | Unknown | | RA3 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 17:15:13 +0... | | 1.0000 |
| 34 | | Gelta_190_100_2 | Unknown | | RA3 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 17:41:09 +0... | | 1.0000 |
| 35 | | Rousekt_190_100_1 | Unknown | | RA4 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 18:07:50 +0... | | 1.0000 |
| 36 | | Rousekt_190_100_2 | Unknown | | RA4 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 18:32:55 +0... | | 1.0000 |
| 37 | | Atogel_190_100_1 | Unknown | | RA5 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 18:58:49 +0... | | 1.0000 |
| 38 | | Atogel_190_100_2 | Unknown | | RA5 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 19:24:42 +0... | | 1.0000 |
| 39 | | Gelatina 100Bl_190_100_1 | Unknown | | RA6 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 19:50:37 +0... | | 1.0000 |
| 40 | | Gelatina 100Bl_190_100_2 | Unknown | | RA6 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 20:16:29 +0... | | 1.0000 |
| 41 | | Gelatina 800Bl_190_100_1 | Unknown | | RA7 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 20:42:33 +0... | | 1.0000 |
| 42 | | Gelatina 800Bl_190_100_1 | Unknown | | RA7 | 10.000 | FLO_kolagen_test_ful... | | Finished | 26.3.2015 21:08:15 +0... | | 1.0000 |

Postup měření

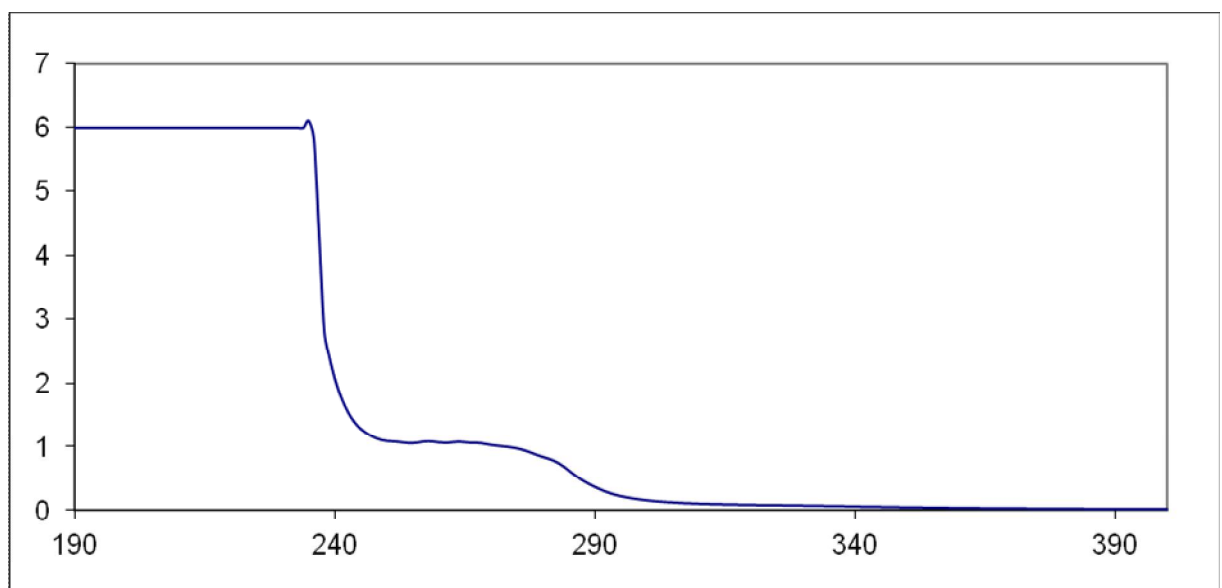
- Zapneme spektrofotometr a ovládací počítač, spustíme program uv winlab a vyčkáme.
- Zvolíme měřicí metodu.
- Modifikace metody – základní nastavení spektrofotometru
- Nastavení rozsahu vlnových délek, absorbance a počtu cyklů
- Nastavení rychlosti skenování – čím menší rychlost, tím kvalitnější záznam, tím delší doba měření.
- Připravíme vzorky.
- Roztoky měříme v křemenných kyvetách
- Spustíme vlastní měření, během měření sledujeme grafický záznam
- Po skončení měření se automaticky uloží binární soubor

Měření absorbance u jednotlivých vzorků bylo skenováno od 190 nm do 400 nm. Vlastní měření proběhlo 2x. Výsledky jsou zpracovány v grafu 1 a 2.

Graf 1. Výsledky



Graf 2 Výsledky



Závěr: Maxima u proměřovaných vzorků se vyskytla v oblasti do 240 nm.

Tyto výsledky dále posloužily k nastavení vlnových délek pro měření na HPLC systému Dionex Ultimate 3000 s UV/VIS.

5.4 Stanovení HPLC s UV/VIS detekcí a fluorimetrickou detekcí

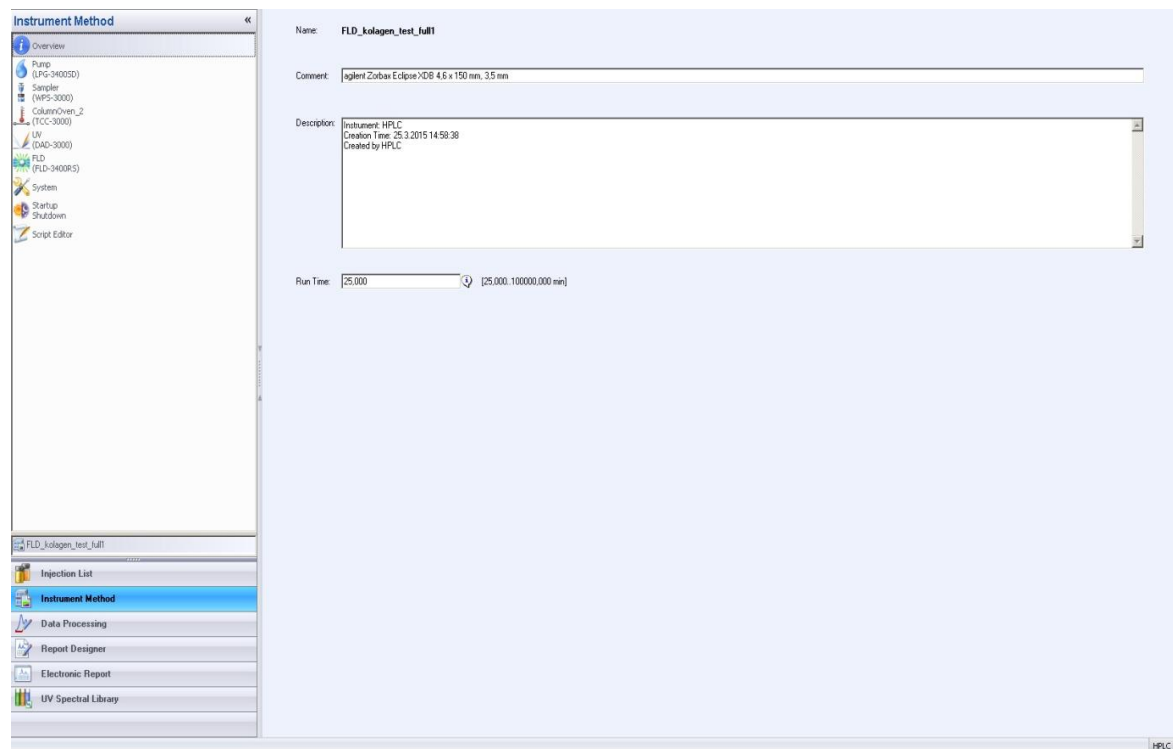
Měřeno na UHPLC Dionex Ultimate 3000, DAD detektor

Metoda:

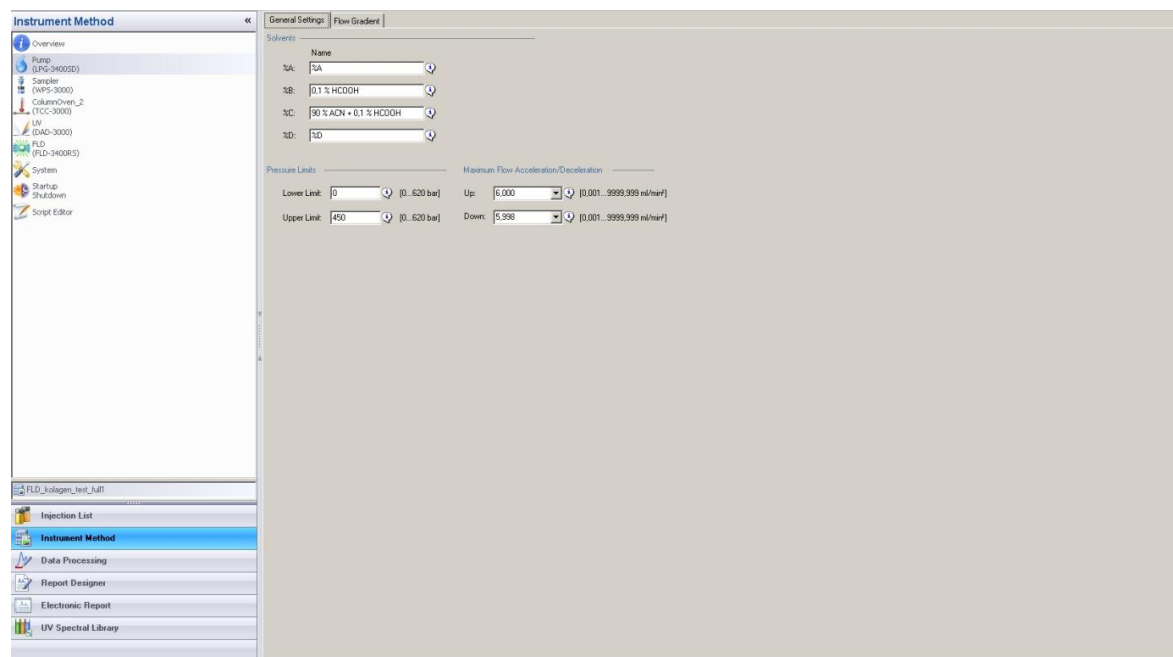
- kolona Zorbax Eclipse XDB-C18; 4,6x150mm, 3,5 μ m
- eluční soustava A – 0,1% kyselina mravenčí
- eluční soustava B-90% acetonitril (ACN) a 0,1% kyselina mravenčí
- izokratická eluce, poměr mobilních fází A:B 80:20
- délka analýzy 25 minut
- průtok 1ml/min
- použité vlnové délky na UV/VIS detektoru 190; 200; 210; 220 nm
- excitační vlnová délka na FLD 200 nm

Základní nastavení je zobrazeno na obr. 12 – 19.

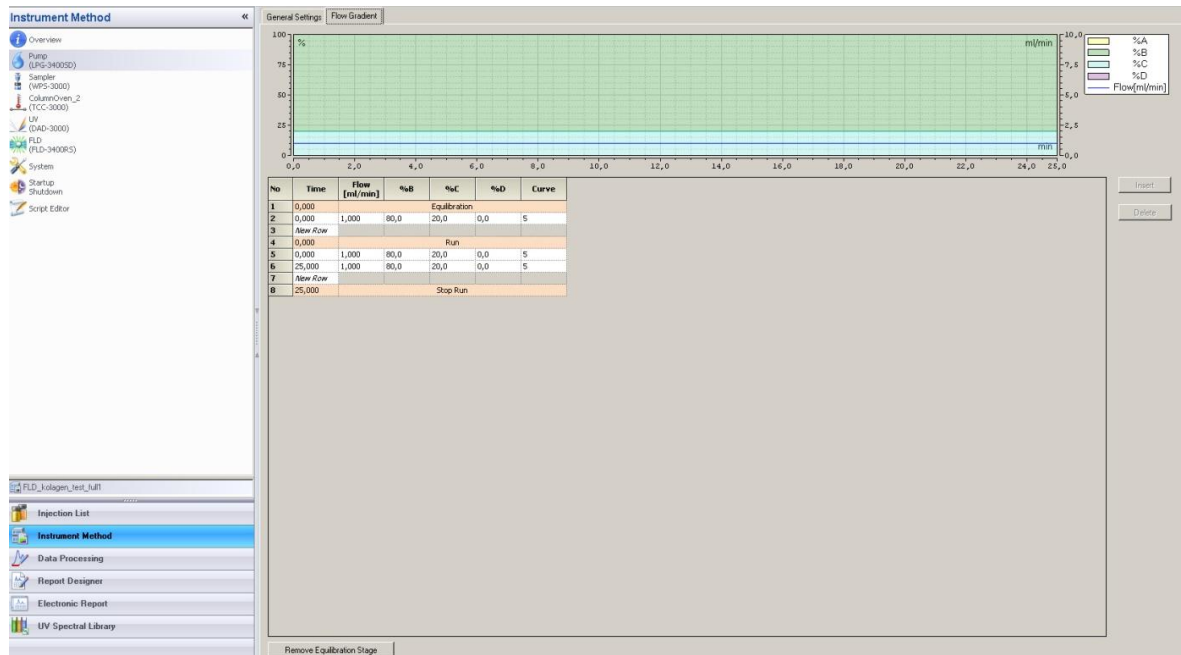
Obr. 12 Nastavení kolony



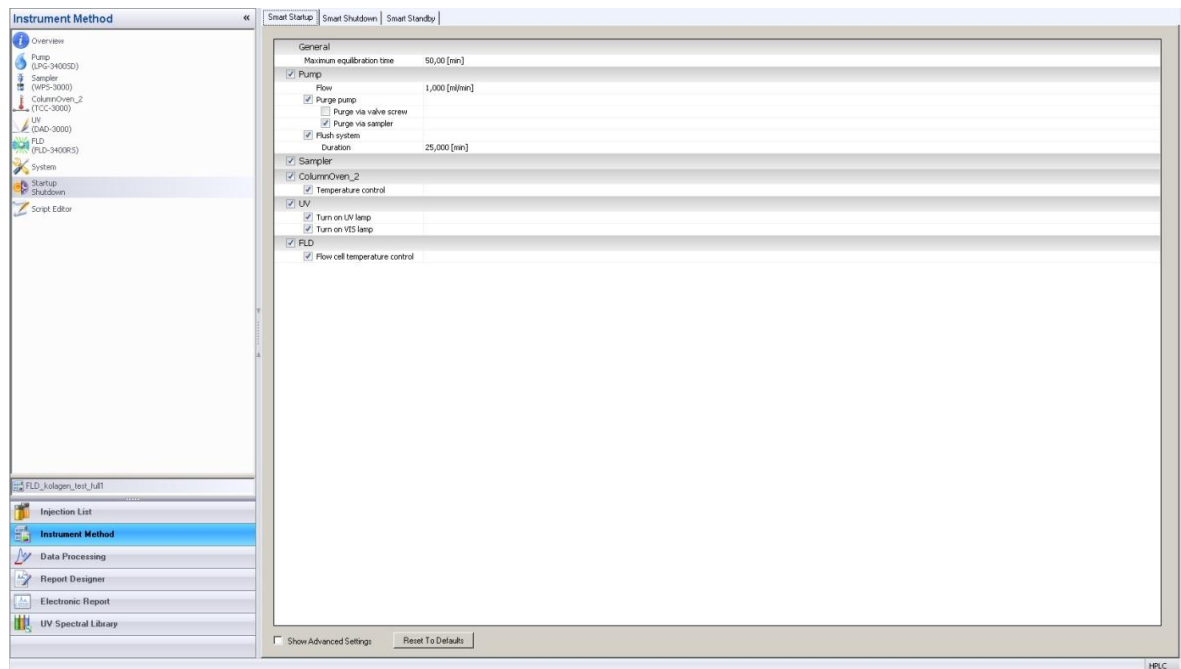
Obr. 13 nastavení průtoků



Obr. 14 Poměr průtoků a nastavení metody



Obr. 15 Nastavení průtoků a času



Obr. 16 Popis metody část 1

| Time | Command | Value | Comment |
|------|-------------------------------------|--------------------------|---------|
| 0 | (Initial Time) | | |
| 1 | FLD_FlowCell_TempCtrl | On | |
| 2 | FLD_FlowCell_ReadyTempDelta | 2,00 [°C] | |
| 3 | FLD_FlowCell_TemperatureNominal | 25,00 [°C] | |
| 4 | FLD_ResponseTime30 | None | |
| 5 | FLD_Field_ScanMode | Emission | |
| 6 | FLD_ScanStartEWavelength | 200,0 [nm] | |
| 7 | FLD_ScanStartEWavelength | 240,0 [nm] | |
| 8 | FLD_ScanStartEWavelength | 800,0 [nm] | |
| 9 | FLD_ScanSensitivity | 5 | |
| 10 | FLD_ScanSpeed | Medium | |
| 11 | FLD_ScanFilterWheel | Open | |
| 12 | FLD_ScanSignalType | Standard | |
| 13 | FLD_ScanPMT | Both | |
| 14 | UV_30FIELD_MinWavelength | 190,0 [nm] | |
| 15 | UV_30FIELD_MaxWavelength | 800,0 [nm] | |
| 16 | UV_30FIELD_Bandwidth | 1 [nm] | |
| 17 | UV_ResponseTime | 1,000 [s] | |
| 18 | UV_Data_Collection_Rate | 5 [Hz] | |
| 19 | ColumnOven_2_TempCtrl | On | |
| 20 | ColumnOven_2_TemperatureNominal | 25,0 [°C] | |
| 21 | ColumnOven_2_TemperatureLowerLimit | 23,0 [°C] | |
| 22 | ColumnOven_2_TemperatureUpperLimit | 27,0 [°C] | |
| 23 | ColumnOven_2_EquilibrationTime | 0,5 [min] | |
| 24 | ColumnOven_2_ReadyTempDelta | 2,0 [°C] | |
| 25 | Sampler_InjectWash | BeforeInj | |
| 26 | Sampler_WashSpeed | 20,000 [µl/s] | |
| 27 | Sampler_WashVolume | 30,000 [µl] | |
| 28 | Sampler_SampleHeight | 2,000 [mm] | |
| 29 | Sampler_WasteSpeed | 32,000 [µl/s] | |
| 30 | Sampler_DispenseDelay | 0,000 [s] | |
| 31 | Sampler_DispenseSpeed | 20,000 [µl/s] | |
| 32 | Sampler_DrawSpeed | 5,000 [µl/s] | |
| 33 | Sampler_DrawDelay | 3,000 [s] | |
| 34 | Sampler_InjectMode | Normal | |
| 35 | Sampler_PumpDevice | "Pump" | |
| 36 | Sampler_SyncWithPump | On | |
| 37 | Sampler_LoopWashFactor | 2,000 | |
| 38 | PumpModule_Pump_%A_Equate | "%A" | |
| 39 | PumpModule_Pump_%B_Equate | "0,1 % HCOOH" | |
| 40 | PumpModule_Pump_%C_Equate | "90 % ACN + 0,1 % HCOOH" | |
| 41 | PumpModule_Pump_%D_Equate | "%A" | |
| 42 | PumpModule_Pump_PressureLowerLimit | 0 [bar] | |
| 43 | PumpModule_Pump_PressureUpperLimit | 450 [bar] | |
| 44 | PumpModule_Pump_MaximumFlowRateUp | 6,000 [ml/min] | |
| 45 | PumpModule_Pump_MaximumFlowRateDown | 5,998 [ml/min] | |

Obr. 17 popis metody část 2

| Time | Command | Value | Comment |
|------|--------------------------------------|---|------------------------|
| 44 | PumpModule_Pump_MaximumFlowRateUp | 6,000 [ml/min] | |
| 45 | PumpModule_Pump_MaximumFlowRateDown | 5,998 [ml/min] | |
| 46 | UV_UV_VIS_1_Wavelength | 190,0 [nm] | |
| 47 | UV_UV_VIS_1_Bandwidth | 4 [nm] | |
| 48 | UV_UV_VIS_1_RefWavelength | Off | |
| 49 | UV_UV_VIS_1_RefBandwidth | 1 [nm] | |
| 50 | UV_UV_VIS_2_Wavelength | 200,0 [nm] | |
| 51 | UV_UV_VIS_2_Bandwidth | 4 [nm] | |
| 52 | UV_UV_VIS_2_RefWavelength | Off | |
| 53 | UV_UV_VIS_2_RefBandwidth | 1 [nm] | |
| 54 | UV_UV_VIS_3_Wavelength | 210,0 [nm] | |
| 55 | UV_UV_VIS_3_Bandwidth | 4 [nm] | |
| 56 | UV_UV_VIS_3_RefWavelength | Off | |
| 57 | UV_UV_VIS_3_RefBandwidth | 1 [nm] | |
| 58 | UV_UV_VIS_4_Wavelength | 220,0 [nm] | |
| 59 | UV_UV_VIS_4_Bandwidth | 4 [nm] | |
| 60 | UV_UV_VIS_4_RefWavelength | Off | |
| 61 | UV_UV_VIS_4_RefBandwidth | 1 [nm] | |
| 62 | UV_30FIELD_RefWavelength | Off | |
| 63 | UV_30FIELD_RefBandwidth | 1 [nm] | |
| 64 | FLD_ScanBehavior | Append | |
| 65 | 0,000 | Equilibration | Duration = 0,000 [min] |
| 66 | PumpModule_Pump_FlowNominal | 1,000 [ml/min] | |
| 67 | PumpModule_Pump_%B_Value | 80,0 [%] | |
| 68 | PumpModule_Pump_%C_Value | 20,0 [%] | |
| 69 | PumpModule_Pump_%D_Value | 0,0 [%] | |
| 70 | PumpModule_Pump_Curve | 5 | |
| 71 | 0,000 | Inject Preparation | |
| 72 | UV_Autozero | | |
| 73 | FLD_Autozero | | |
| 74 | Wait | FLD_Ready And UV_Ready And ColumnOven_2_Ready And Sampler_Ready And PumpModule_Pump_Ready | |
| 75 | 0,000 | Inject | |
| 76 | Sample Inject | | |
| 77 | 0,000 | Start Run | |
| 78 | UV_UV_VIS_1_AcqOn | | |
| 79 | UV_UV_VIS_2_AcqOn | | |
| 80 | UV_UV_VIS_3_AcqOn | | |
| 81 | UV_UV_VIS_4_AcqOn | | |
| 82 | UV_30FIELD_AcqOn | | |
| 83 | UV_Temp_IsmPhosus_AcqOn | | |
| 84 | ColumnOven_2_ColumnOven_2_Temp_AcqOn | | |
| 85 | FLD_FlowCell_AcqOn | | |
| 86 | PumpModule_Pump_Pump_Pressure_AcqOn | | |

Obr. 18 popis metody část 3

| Time | Command | Value | Comment |
|------|---|-------------------------|---|
| 68 | PumpModule.Pump.%B.Value | 20.0 [%] | |
| 69 | PumpModule.Pump.%D.Value | 0.0 [%] | |
| 70 | PumpModule.Pump.Curve | 5 | |
| 71 | Inject Preparation | | |
| 72 | UV_AutoZero | | |
| 73 | FLD_AutoZero | | |
| 74 | Wait | | FLD_Ready And UV_Ready And ColumnOveren_2_Ready And Sampler_Ready And PumpModule.Pump_Ready |
| 75 | Inject | | |
| 76 | Sampler.Inject | | |
| 77 | Start Run | | |
| 78 | UV_UV_VIS_1.AcqOn | | |
| 79 | UV_UV_VIS_2.AcqOn | | |
| 80 | UV_UV_VIS_3.AcqOn | | |
| 81 | UV_UV_VIS_4.AcqOn | | |
| 82 | UV_3DFIELD.AcqOn | | |
| 83 | UV_Temp_Lamphouse.AcqOn | | |
| 84 | ColumnOveren_2.ColumnOveren_2_Temp.AcqOn | | |
| 85 | FLD_FLD_FlowCell.AcqOn | | |
| 86 | PumpModule.Pump.Pump_Pressure.AcqOn | | |
| 87 | FLD_FLField.AcqOn | | |
| 88 | Run | Duration = 25,000 [min] | |
| 89 | PumpModule.Pump.Flow.Nominal | 1,000 [ml/min] | |
| 90 | PumpModule.Pump.%B.Value | 80.0 [%] | |
| 91 | PumpModule.Pump.%C.Value | 20.0 [%] | |
| 92 | PumpModule.Pump.%D.Value | 0.0 [%] | |
| 93 | PumpModule.Pump.Curve | 5 | |
| 94 | | | |
| 95 | PumpModule.Pump.Flow.Nominal | 1,000 [ml/min] | |
| 96 | PumpModule.Pump.%B.Value | 80.0 [%] | |
| 97 | PumpModule.Pump.%C.Value | 20.0 [%] | |
| 98 | PumpModule.Pump.%D.Value | 0.0 [%] | |
| 99 | PumpModule.Pump.Curve | 5 | |
| 100 | Stop Run | | |
| 101 | UV_UV_VIS_1.AcqOff | | |
| 102 | UV_UV_VIS_2.AcqOff | | |
| 103 | UV_UV_VIS_3.AcqOff | | |
| 104 | UV_UV_VIS_4.AcqOff | | |
| 105 | UV_3DFIELD.AcqOff | | |
| 106 | UV_Temp_Lamphouse.AcqOff | | |
| 107 | ColumnOveren_2.ColumnOveren_2_Temp.AcqOff | | |
| 108 | FLD_FLD_FlowCell.AcqOff | | |
| 109 | PumpModule.Pump.Pump_Pressure.AcqOff | | |
| 110 | FLD_FLField.AcqOff | | |
| 111 | End | | |

Obr. 19 Použité vlnové délky

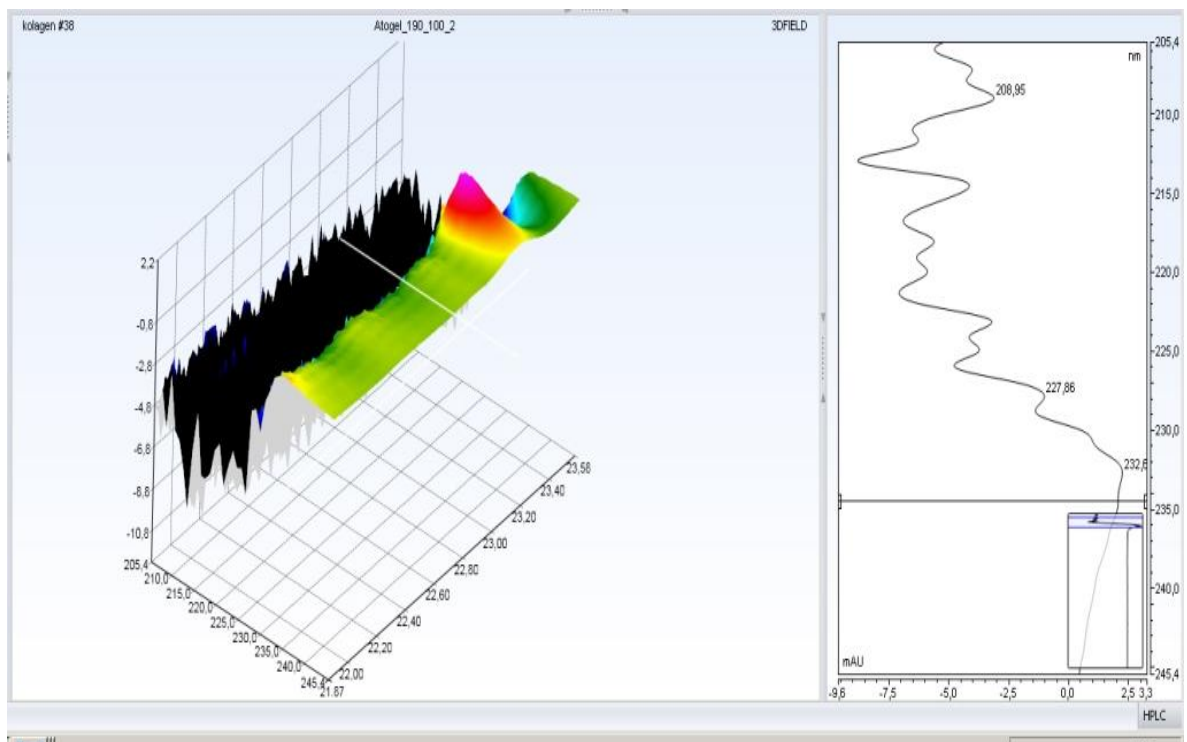
| No | Channel | Wavelength [nm] | Bandwidth [nm] | RelWavelength [nm] | RelBandwidth [nm] |
|----|----------|-----------------|----------------|--------------------|-------------------|
| 1 | UV_VIS_1 | 190.0 | 4 | Off | 1 |
| 2 | UV_VIS_2 | 200.0 | 4 | Off | 1 |
| 3 | UV_VIS_3 | 210.0 | 4 | Off | 1 |
| 4 | UV_VIS_4 | 220.0 | 4 | Off | 1 |
| 5 | 3DFIELD | | | Off | 1 |

| | | |
|-----------------------|-------|-------------------|
| Min. Wavelength: | 190.0 | [190.0, 800.0 nm] |
| Max. Wavelength: | 800.0 | [190.0, 800.0 nm] |
| Peak Width: | 0.100 | [0.002, nm] |
| Bunchwidth: | 1 | [1, 400 nm] |
| Data Collection Rate: | 5 | [1, 100 Hz] |
| Response Time: | 1.000 | [0.000, 20.000 s] |

Na dalších obrázcích jsou záznamy z fluorescenčního detektoru, kde byly použity excitační záření na vlnové délce 200 nm. Záznamy fluorescenčních spekter byly vyhodnoceny vzhledem k charakteristickému maximu a záznamy mohou být dále využity pro kvalitativní porovnávání vzorků.

- Jedná se o výsledky získané analýzou kolagenu
- Na obrázcích jsou schematicky předloženy získané grafické záznamy z měřicí aparatury.
- Výsledky budou zpracovány a použity pro vývoj nových potravinových doplňků stravy.

Obr. 20 Atogel

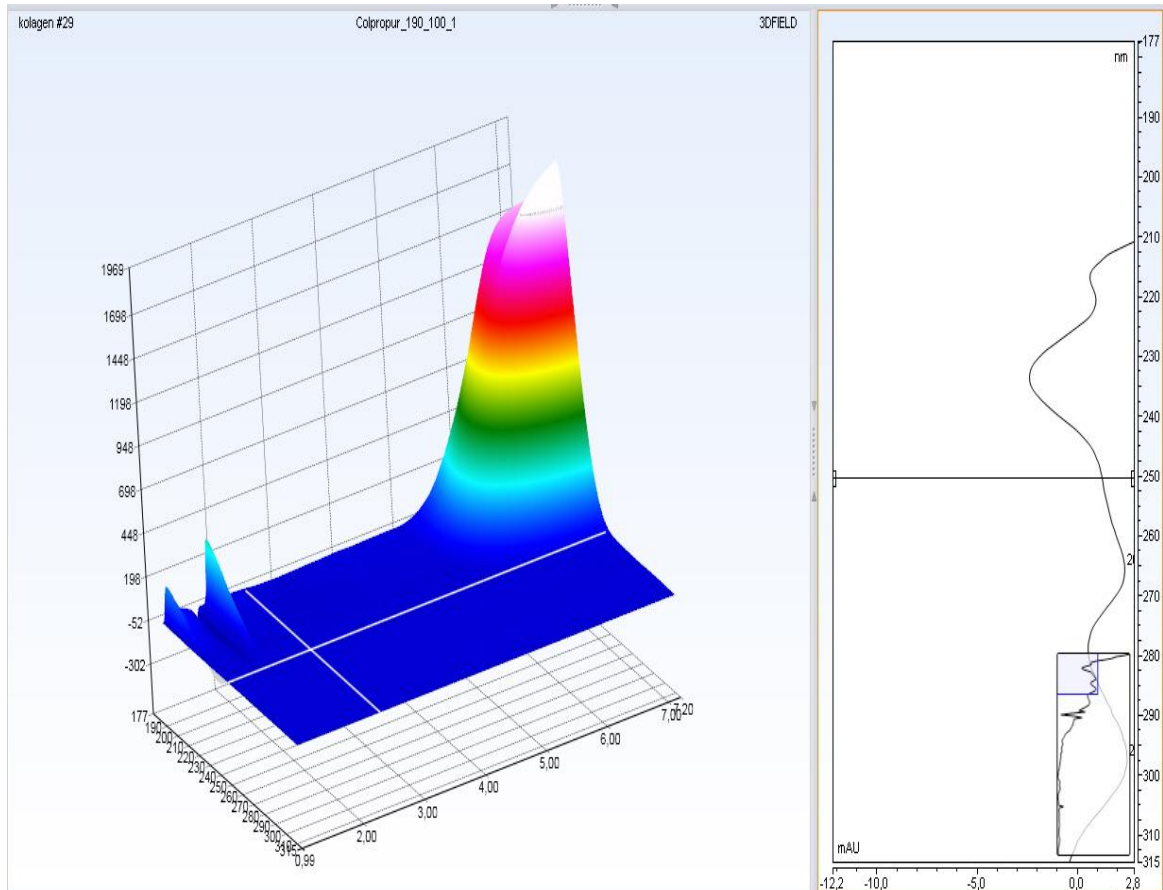


Emise - 234,5 nm

Intensita - 2,4 mAU

Retenční čas - 23,3 min.

Obr. 21 Colpropur D Premium

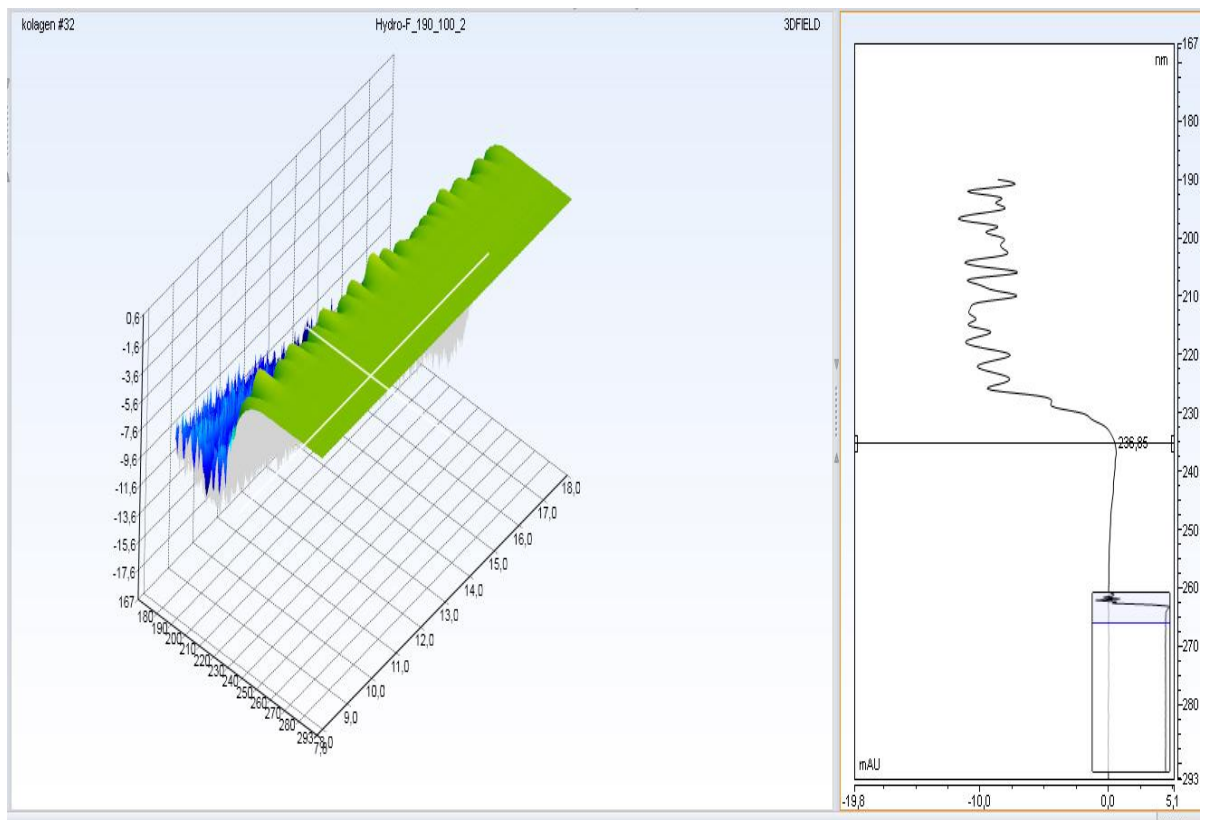


Emise - 250 nm

Intensita - 1,5 mAU

Retenční čas - 2,5 min

Obr. 22 Hydro – F

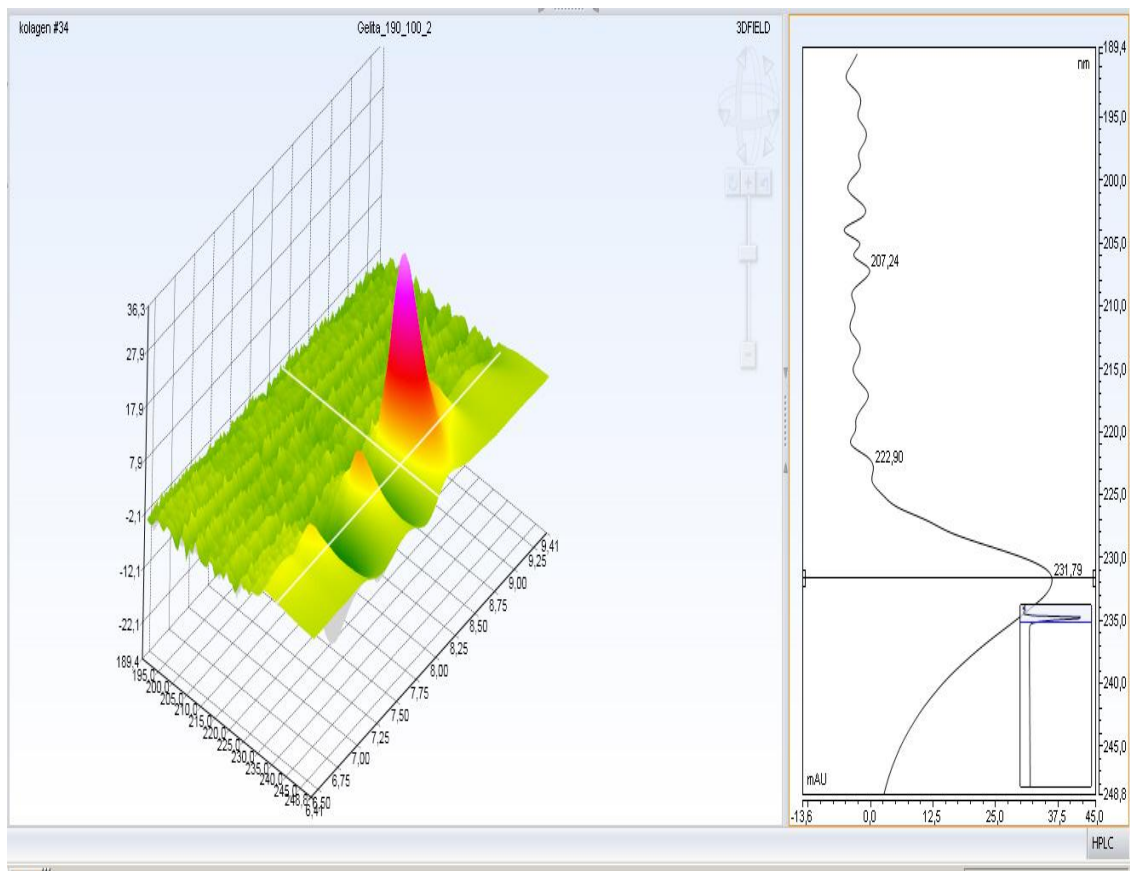


Emise - 236,85 nm

Intensita - 0,2 mAU

Retenční čas - 16,8 min

Obr. 23 Gelita Sol

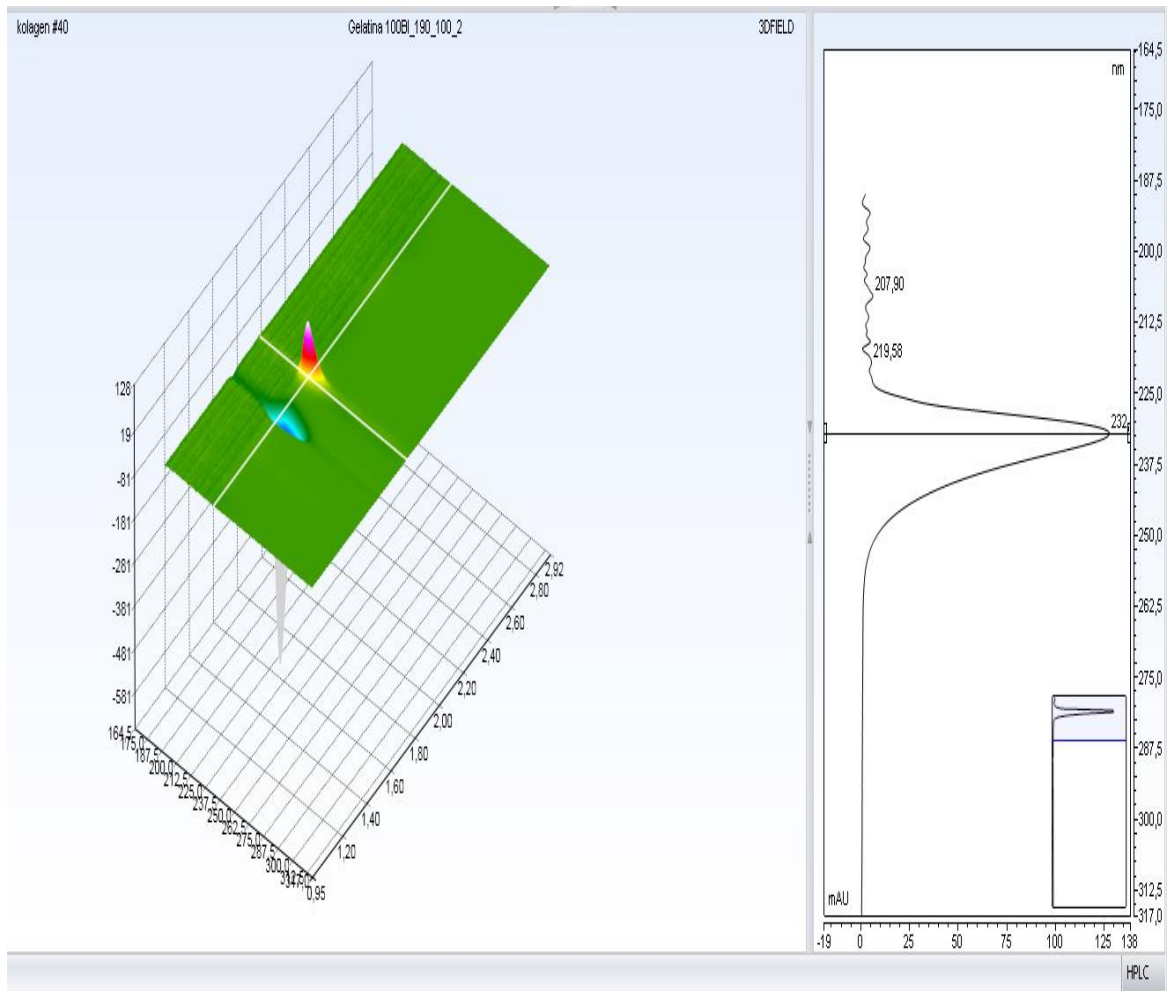


Emise - 231,79 nm

Intensita - 33,5 mAU

Retenční čas - 8,15 min

Obr. 24 Gelatina 100

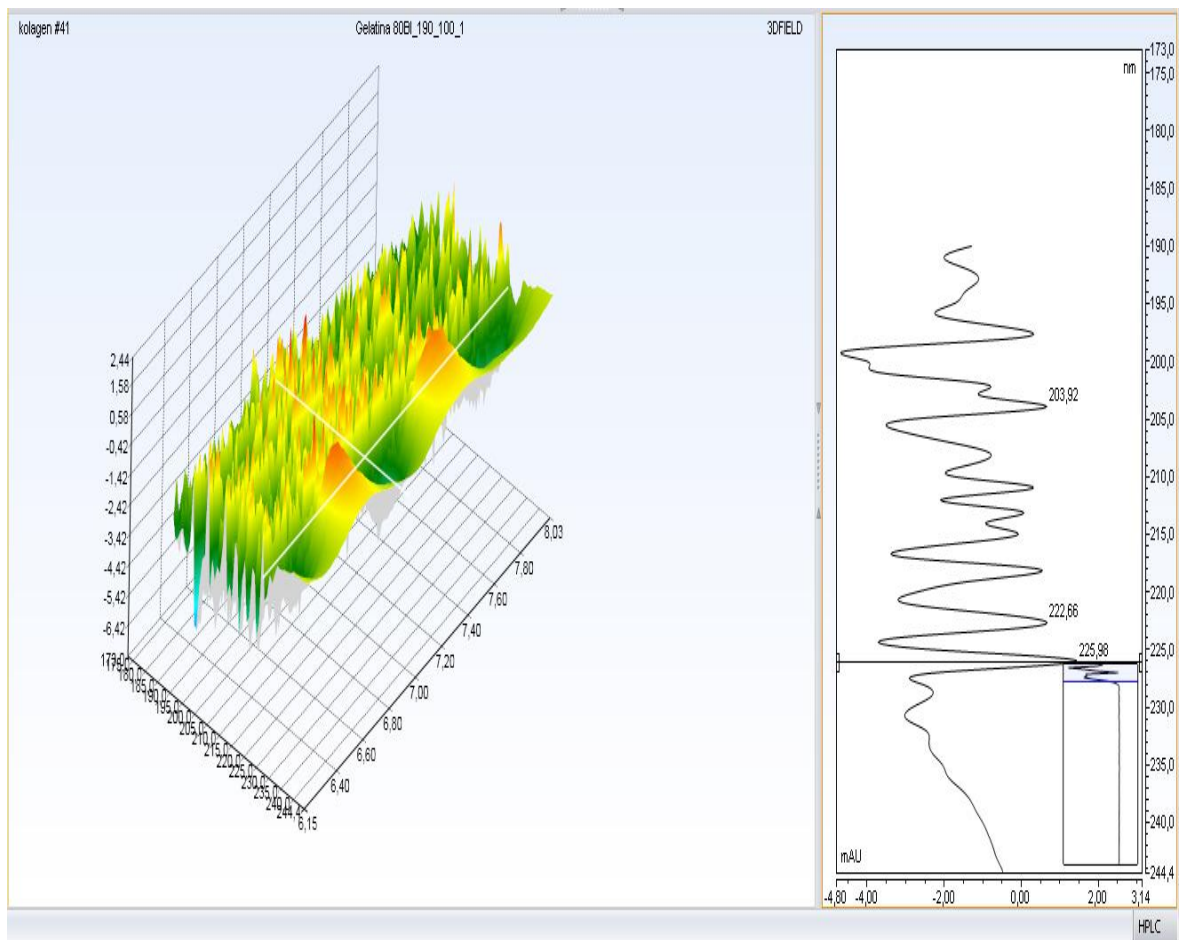


Emise – 232 nm

Intensita - 125 mAU

Retenční čas - 2,92 min

Obr. 25 Gelatina 80 Bloom

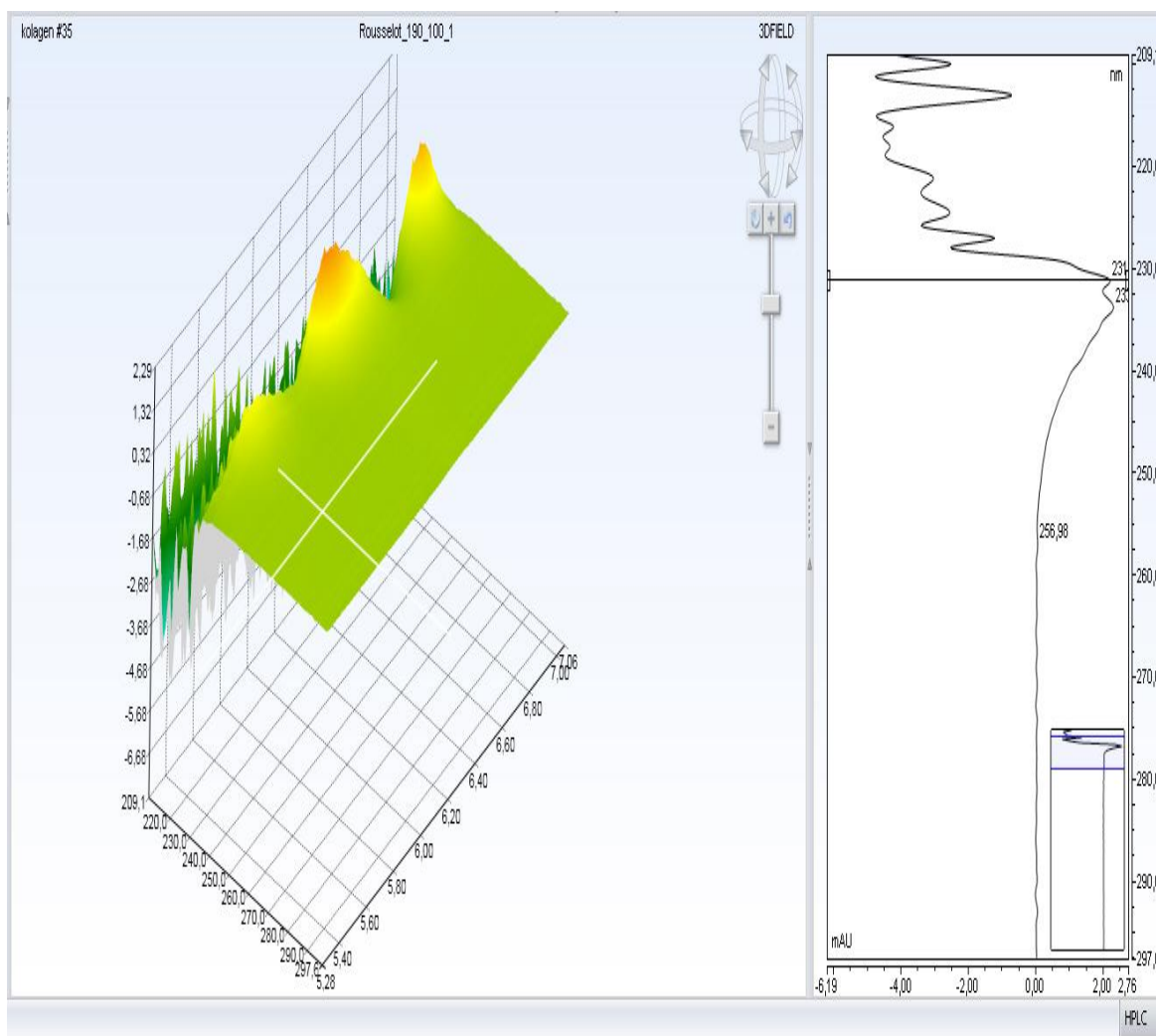


Emise - 225,98nm

Intensita - 1,5 mAU

Retenční čas - 7,62 min.

Obr. 26 RouselotASF



Emise – 231nm

Intensita - 2 mAU

Retenční čas - 6,75 min

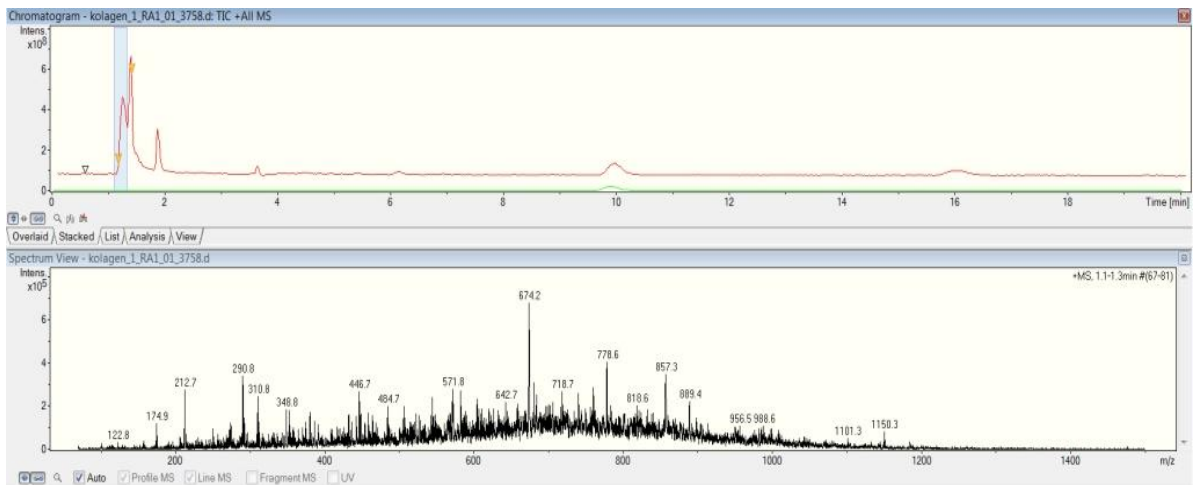
Tabulka 2 Výsledky analýzy

| Označení vzorku | Excitační záření (nm) | Emisní záření (nm) | Intensita (mAU) | Retenční čas (min) |
|---------------------|-----------------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| Atogel | 180 | 234,5 | 2,4 | 23,3 |
| Colpropur D Premium | 180 | 250 | 1,5 | 2,5 |
| Hydro - F | 180 | 236,85 | 0,2 | 16,8 |
| Gelita Sol | 180 | 231,79 | 33,5 | 8,15 |
| Gelatina 100 Bloom | 180 | 232 | 125 | 2,92 |
| Gelatina 80 Bloom | 180 | 225,98 | 1,5 | 7,62 |
| RouselotASF | 180 | 231 | 2 | 6,75 |

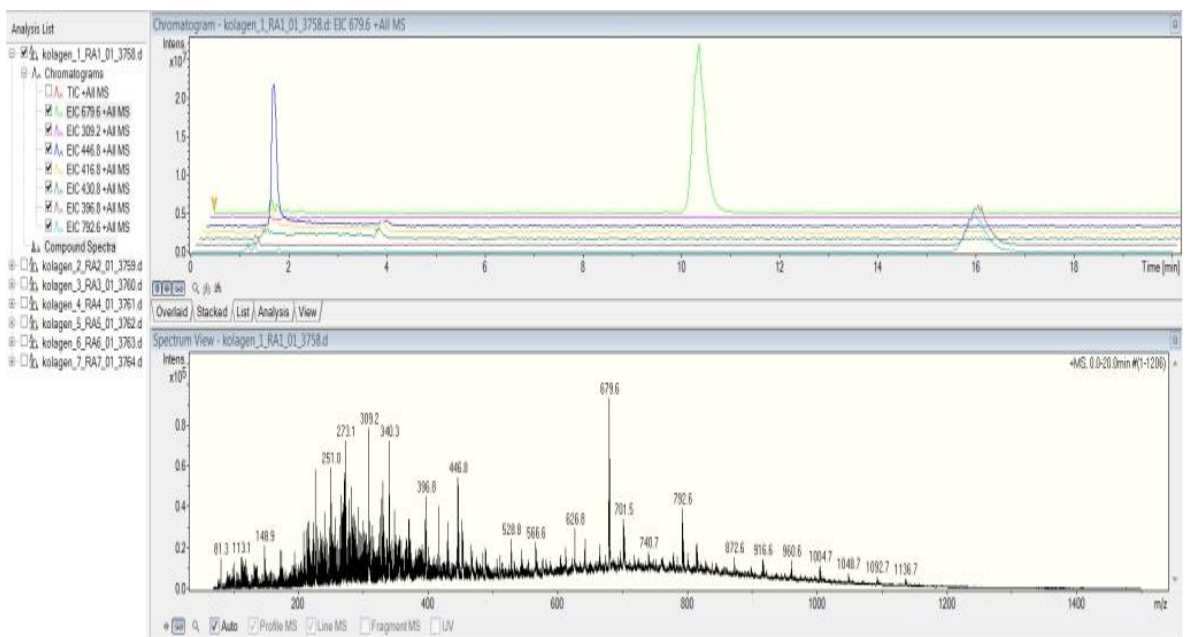
5.5 Stanovení na MS

- MS systém Amazon III – iontová past s ESI ionizací
- Měřeno v módech MS⁺, MS⁻, MS/MS
- Měřeno 1x
- Výsledky měření jsou zpracovány v grafech

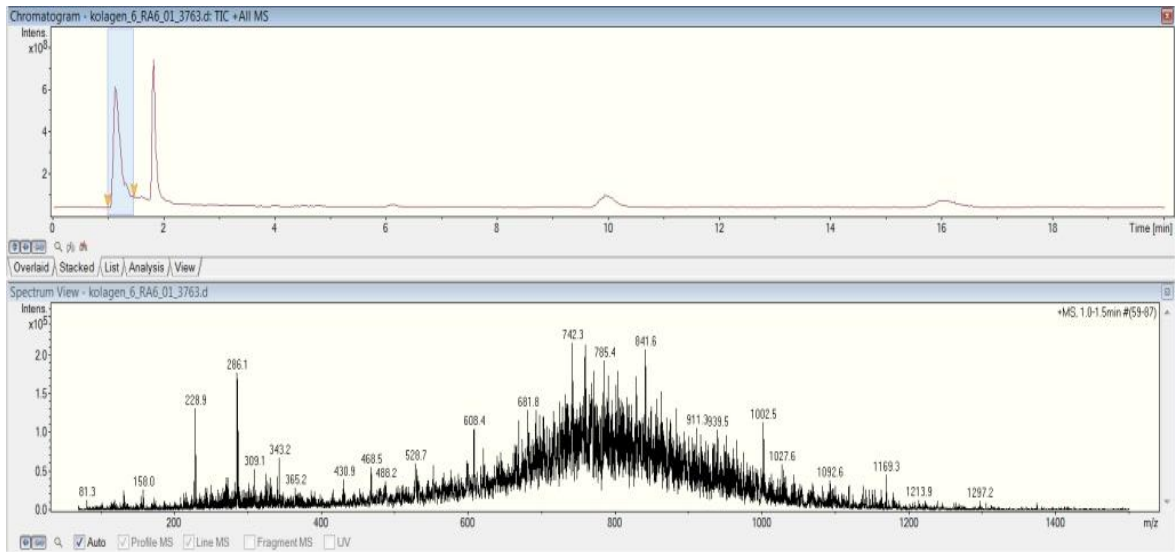
Obr. 27 Atogel - Měřeno v módu MS-/MS⁺



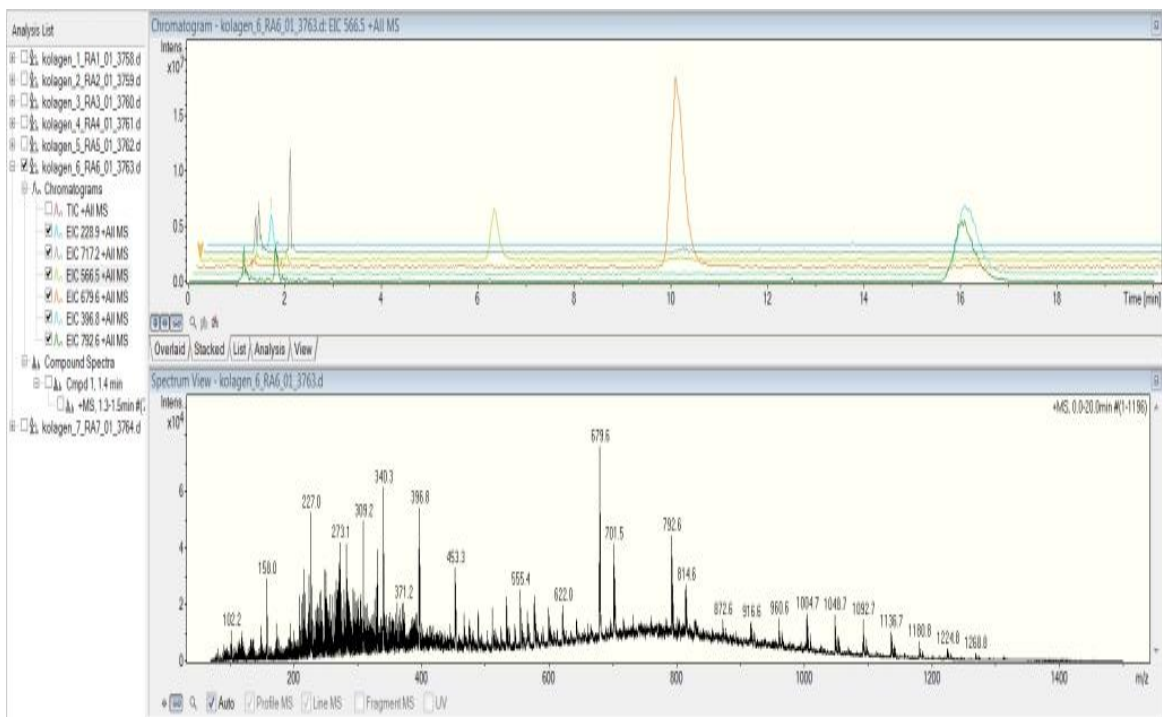
Obr. 28 Atogel - Měřeno v módu MS-/MS⁺ - extrakce hmotnostních iontů M/z 679,6, 309,2, 446,8, 416,8, 430,8, 396,8 a 792,6.



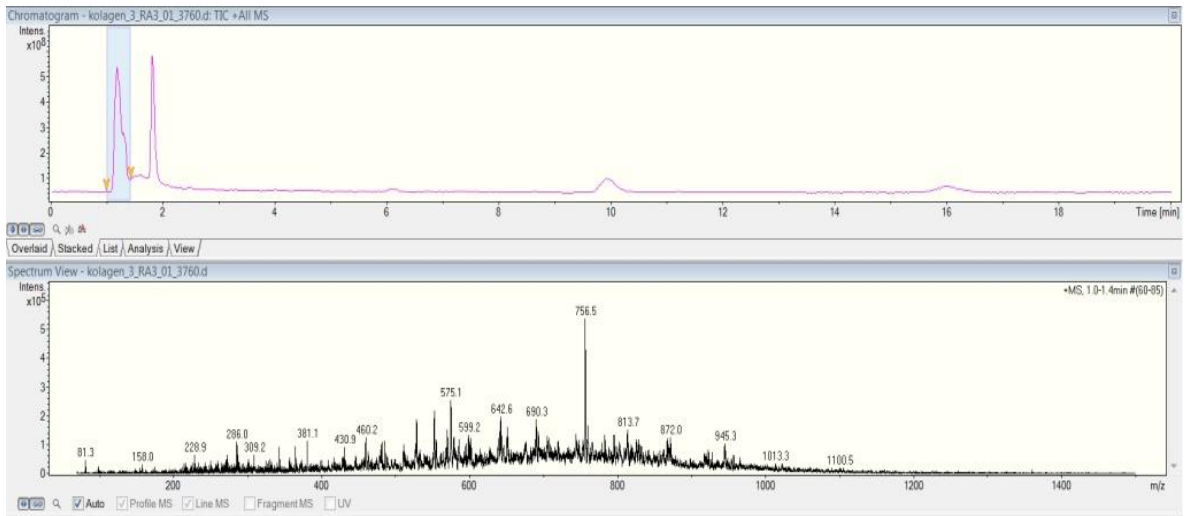
Obr. 29 Colpropur – Měřeno v módu MS+/MS-



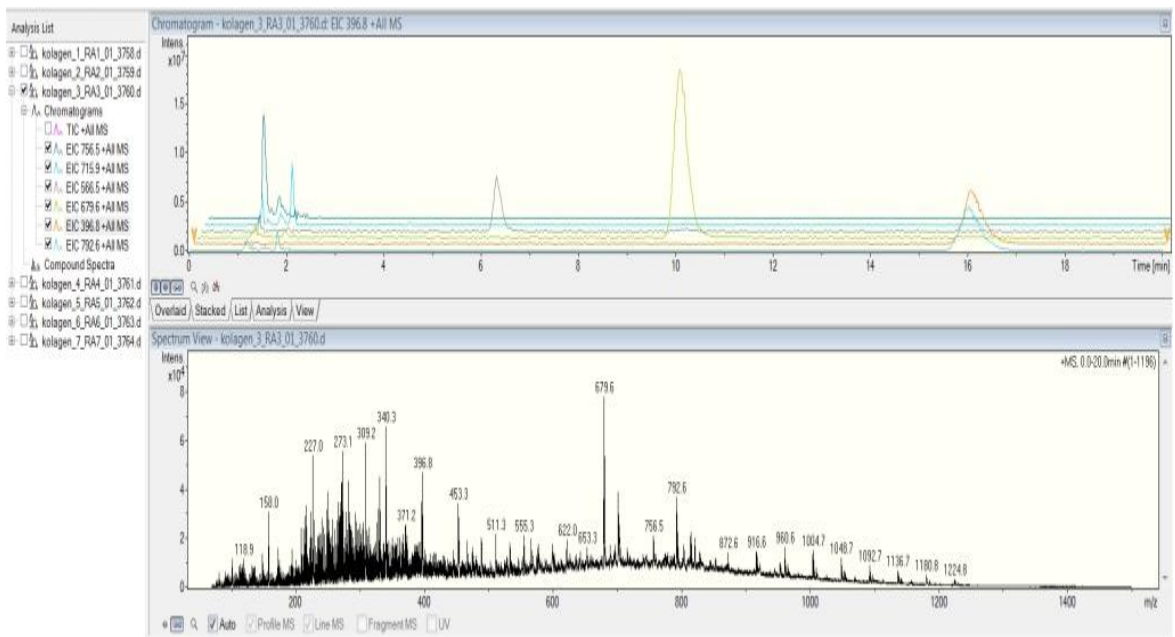
Obr. 30 Colpropur – Měření v módu MS+/MS- - extrakce hmotnostních iontů M/z 228,9, 717,2, 565,5, 679,6, 396,8, 792,6



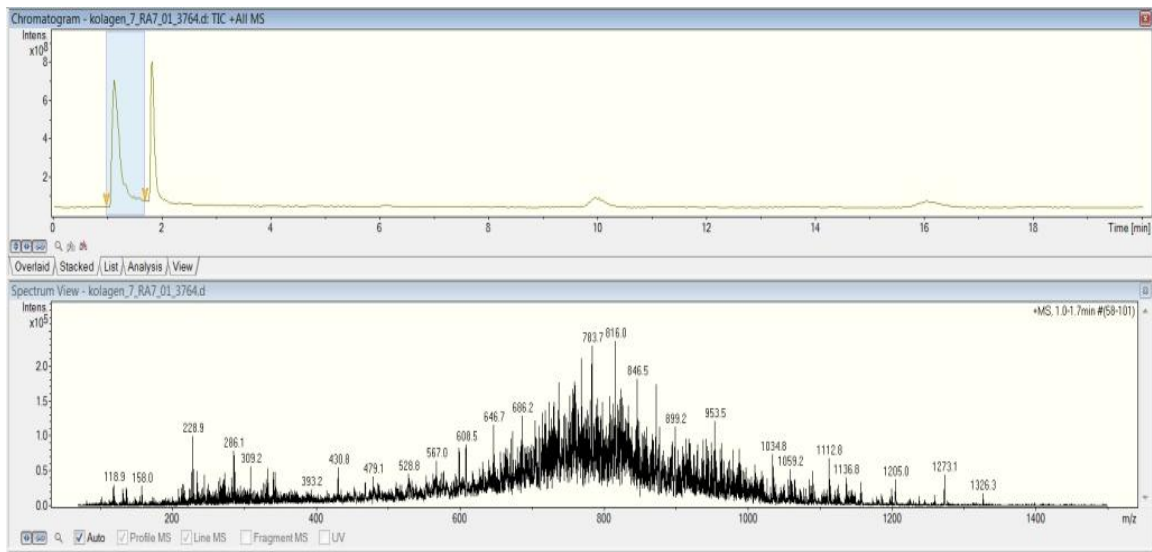
Obr. 31 Gelatina 80 – Měřeno v módu MS+/MS –



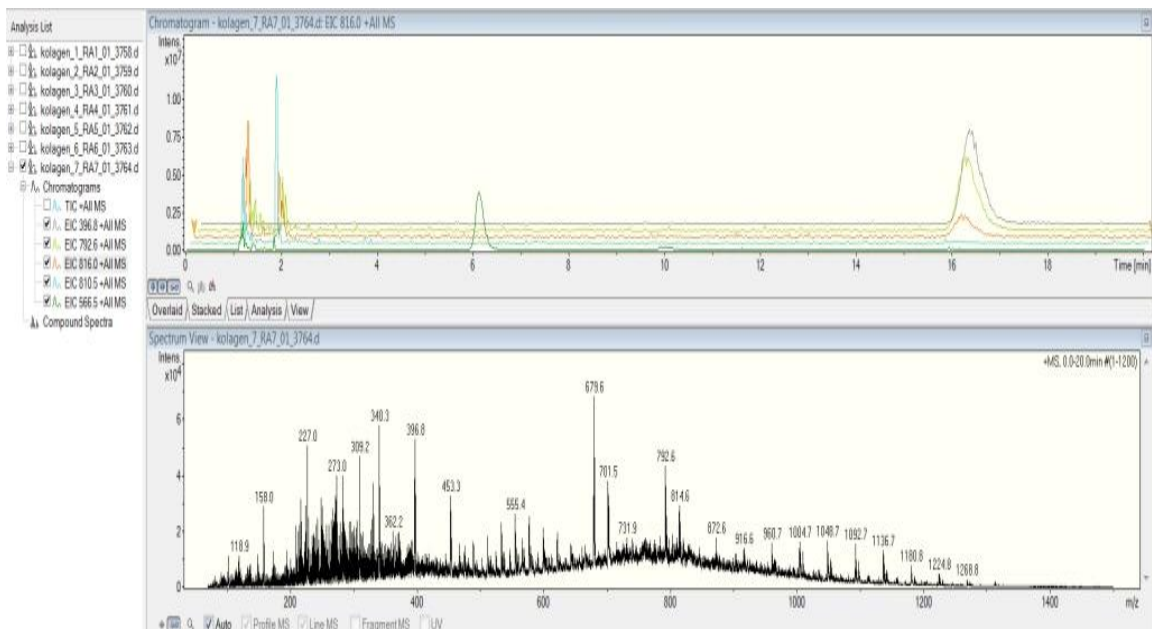
Obr. 32 Gelatina 80 – Měření v módu MS+/MS- - extrakce hmotnostních iontů M/z 756,5, 715,9, 566,5, 679,6, 396,8, 792,6



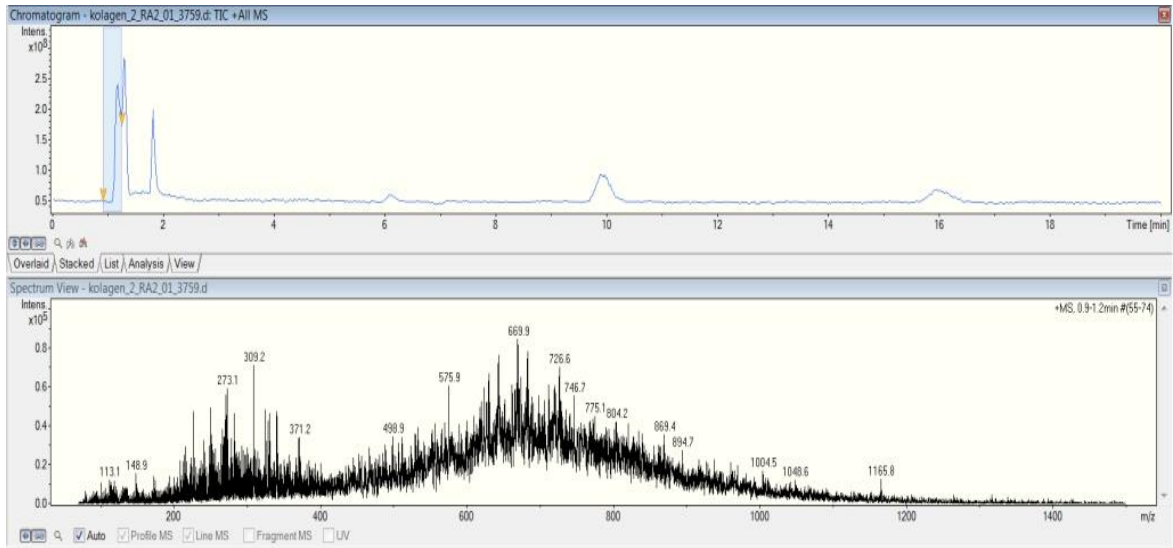
Obr. 33 Gelatina 100 – Měření v módu MS+/MS-



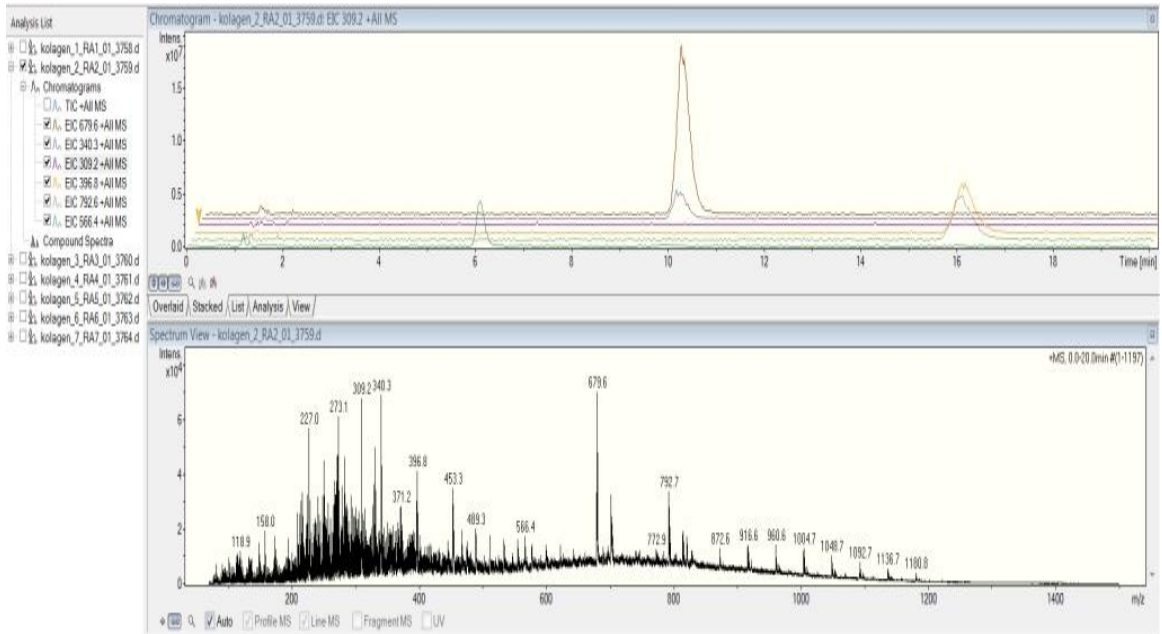
Obr. 34 Gelatina 100 – Měření v módu MS+/MS- - extrakce hmotnostních iontů M/z 396,8. 792,6. 816,0. 810,5. 566,5



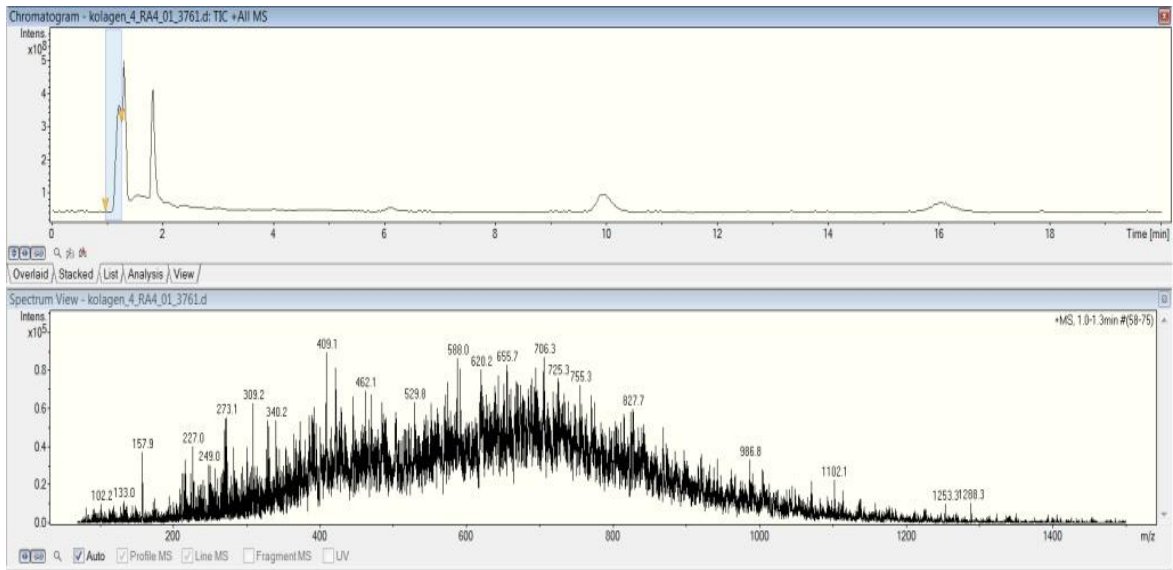
Obr. 35 Gelita – Měřeno v módu MS+/MS-



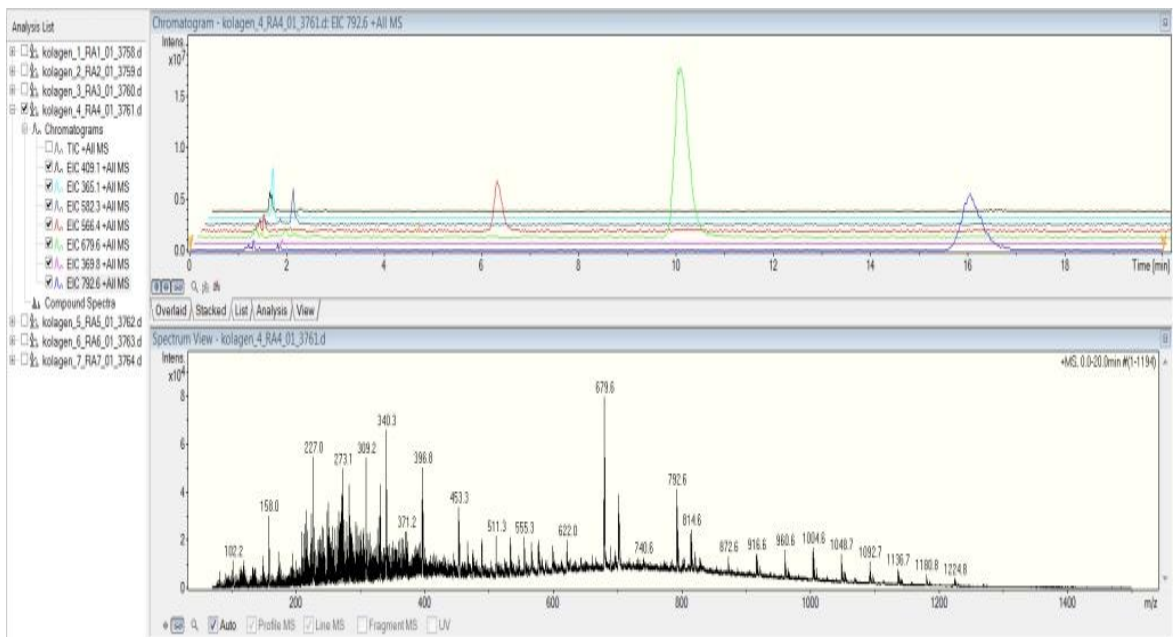
Obr. 36 Gelita – Měření v módu MS+/MS- - extrakce hmotnostních iontů M/z 679,6, 340,3, 309,2, 396,8, 792,6, 566,4



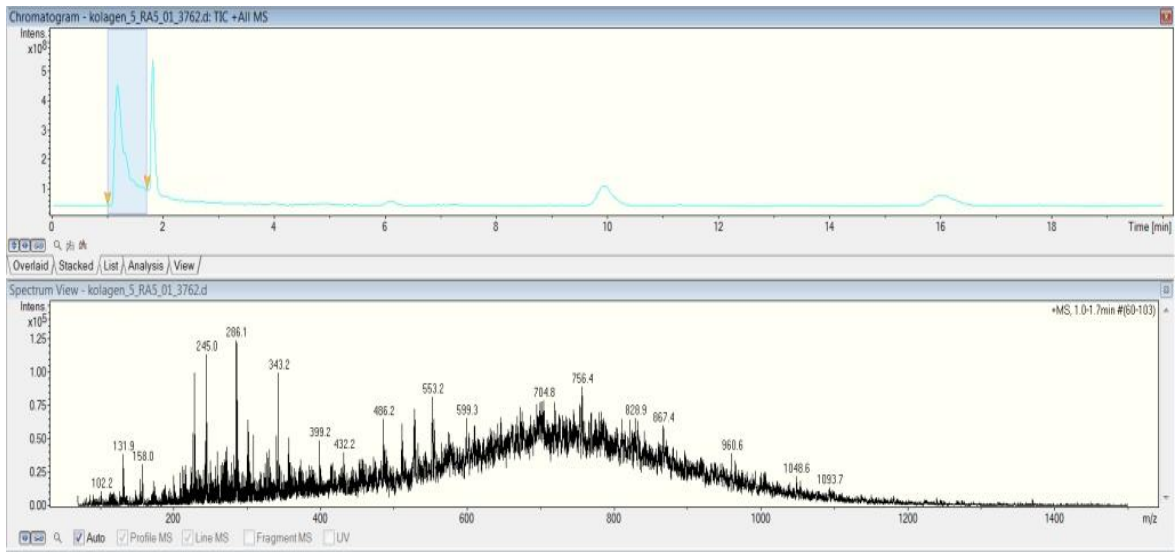
Obr. 37 Hydro - F – Měřeno v módu MS+/MS-



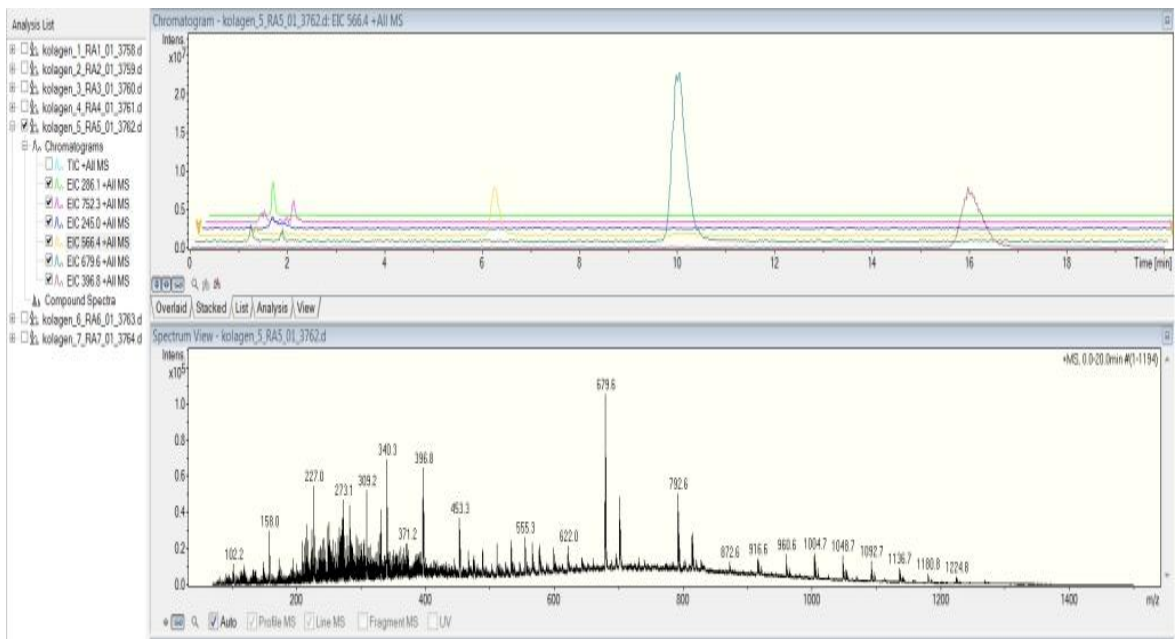
Obr. 38 Hydro – F – Měření v módu MS+/MS- - extrakce hmotnostních iontů M/z 409,1, 365,1, 582,3, 566,4, 679,6, 369,8, 792,6



Obr. 39 Rousselot – Měření v módu MS+/MS-



Obr. 40 Rousselot – Měření v módu MS+/MS- - extrakce hmotnostních iontů M/z 286,1, 752,3, 245,0, 566,4, 679,6, 396,8



ZÁVĚR

V současnosti jsou kloubní onemocnění stále častější příčinou zhoršení kvality života. Úbytek chrupavky je častým projevem těchto onemocnění, v jejímž důsledku, klesá hybnost a funkčnost kloubu a naopak vzniká riziko tvorby zánětů a bolestivosti. Kloubní chrupavky jsou z majoritní části tvořeny kolagenem, proto je možné říci, že je „základním stavebním kamenem“ kloubu.

Námět diplomové práce bere tuto skutečnost v úvahu a vysvětluje vlastnosti, roli a charakterizaci kolagenu v léčbě kloubních onemocnění.

Práce je rozdělena na dvě samostatné části, které se doplňují. První, teoretická, popisuje kloubní onemocnění – osteoartrózu, psoriatickou artritidu a revmatoidní artritidu, a to s cílem poskytnout hlubší pohled do problematiky jejich léčby. Část je také věnována vybraným příčinám onemocnění, z nichž jmenujme například nesprávnou životosprávu, věk či nadměrný pohyb. Na tyto onemocnění poté navazují metody jejich léčby. Přiblíženy jsou jak metody využívající chirurgická řešení, alternativní metody léčby či fyzioterapie a farmak, která jsou pouze zmíněna. Pokud mluvíme o potravinových doplňcích, je nezbytné představit jejich účinné látky a složky, mezi něž řadíme především kolagenní peptidy, vitamín C, chondroitin sulfát, glukosamin sulfát, ale také množství dalších vitamínů a minerálů podporující metabolismus kolagenu v organismu, což je jádrem této diplomové práce. První fázi, ve které je představena struktura a vlastnosti kolagenu, vhodně propracovává část o jednotlivých typech kolagenu I-IV, ty jsou jedny z neznámějších a nejprobádanějších v současné době. Následující je kapitola o metabolismu kolagenu a jeho využití, kde je popsány jednotlivé fáze - syntéza, agregace, polymerace, maturace i odbourávání. Následně jsou zmíněny možnosti výroby kolagenu. Podstatná část je věnována analytickým a charakterizačním metodám používaných k analýze kolagenů. Jde především o molekulovou absorpční spektrometrii v UV/VIS oblasti, hmotnostní spektrometrii a fluorescenční spektrometrii ve spojení se separační metodou HPLC.

Praktická část je pak analýzou vybraných typů kolagenů využívajících se k výrobě běžných potravinových doplňků stravy, které jsou volně dostupné. Praktické ověření teoretických poznatků bylo provedeno na pracovišti Ústavu analýzy a chemie potravin Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně přímým provedením analýzy kolagenních hydrolyzátů pomocí metody HPLC.

Cíle diplomové práce stanovené v úvodu byly tedy splněny, dané téma je natolik zajímavé, že by bylo vhodné v něm pokračovat i nadále, po stránce praktické, například ve výrobě potravinových doplňků stravy, dle dané legislativy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HOLIBKOVÁ, A. LAICHMAN, S. Přehled anatomie člověka. Olomouc: Univerzita Palackého, 2002.
- [2] Revmatoidní artritida (RA.) Projekt ATTRA, Česká revmatologická společnost, Institut biostatistiky a analýz Masarykovy university. Online dostupné z: <http://attra.registry.cz/index.php?pg=diagnozy--revmatoidni-artritida>
- [3] Onemocnění pohybového aparátu. Online dostupné z: <http://nemoci.vitalion.cz/osteoporoza/>
- [4] Humánní produkty firmy Orling s.r.o. Orling-kolagenní přípravky pro výživu a kloubů [online] . 2014. [2014-10-3] Dostupné z: <http://www.oring.cz/cz/humanni-doplanky-stravy/>
- [5] HNÍZDIL, J., ŠAVLÍK, J. Artróza v psychosomatickém přístupu. Praha/Kroměříž: TRITON, 2007. ISBN 80-7254-913-8
- [6] ADEBOWALE, A. - COX, D. - LIANG, Z. et al. Analysis of glucosamine and chondroitin sulfate content in marketed products and the Caco-2 permeability of chondroitin sulfate raw materials. In J Am Nutr Assoc
- [7] POKORNÝ, D. Artróza. Praha: nakl. JAN VAŠUT, 2000. ISBN 80-7236-184-8
- [8] PAVELKA, K., ŠTOLFA, J. Artritidy a artróza v ordinaci praktického lékaře, Praha TRITON, 2007. ISBN 80-7254-913-8
- [9] SOSNA, A. Základy ortopedie. Praha: TRITON, 2001. ISBN 80-7254-202-8
- [10] EDWARDS, C. J. – COOPER, C. Early environmental factors and rheumatoid arthritis. Clinical Experimental Immunology, 2006,
- [11] PAVELKA, K. - ROVENSKÝ, J. Klinická revmatologie, Praha : Galén, 2003. 952s. ISBN 80-7262-174-2

- [12] ADAM, Milan a Miroslav VYKYDAL. ET AL. Pokroky v revmatologii II. první vydání. Praha: Avicenum, 1972. ISBN 08-083-72.
- [13] MULLEROVÁ, D. Zdravá výživa a prevence civilizačních nemocí ve schématech, Praha: TRITON, 2003. 99s. ISBN 80-7254-421-7
- [14] CHAVEZ, M. SAME: S-adenosylmethionine. In Am J Health Syst Pharm. 2000
- [15] STRÁNSKÝ, M. - HRUDKOVÁ, A. - PERLÍN, C. Želatina a artrózy. Výživa a potraviny, 1998
- [16] VELÍŠEK, J. Chemie potravin. 2. vyd. Tábor : OSSIS. 2002, ISBN 80-86659 03-8
- [17] Blažej A., et. al. Štruktura a vlastnosti vláknitých bielkovin. 1. vydání. Bratislava: Veda 1978. ISBN 71- 156- 78
- [18] RAYMAN, M. - CALLAGHAN, A. Nutrition and Arthritis. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. 2006, ISBN 405-24-80
- [19] MCQUEEN, F. Et al. Magnetis resonance imaging in psoriatic arthritis. Arthritis Research & Therapy [online] . 2006
- [20] Osteoporóza – tichá epidémia nového storočia EZO press. Online dostupné z: <http://www.ezopress.sk/2010/01/osteoporoz-a-ticha-epidemia-noveho-storocia/>
- [21] FORSYTH, R. - BRIGDEN, C. - NORTHROP, A. Double blind investigation of the effects of oral supplementation of combined glucosamine hydrochloride (GHCL) and chondroitin sulphate (CS) on stride characteristics of veterán horses. In Equine veterinary journal. Supplement 2006
- [22] CLEGG, DO. - REDA, DJ. - HARRIS, CL. et al. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis, In New Engl J Med. 2006 Feb 23; 354(8) s. 795-808
- [23] Basic figures on the EU / Eurostat European Commission ISBN 1831-9556. Dostupné z: http://epp.eurostat.ec.europa.eu/cache/ITY_OFFPUB/KS-GL-12-001/EN/KS-GL-12-001-EN.

- [24] PAVEKA, Karel., BEČVARĚ, Radim., BOHMOVA., J. et al. Dvojitě slepá randomizovaná, placebem kontrolovaná, multicentrická studie ověřující účinky přípravků Geladrink Forte u pacientů s osteoartrózou kolena. in *Ortopedie: dvouměsíčník pro ortopedy, traumatology a revmatology*. ISSN 1802-1727., ročník 2/2008; 2:25-30
- [25] PEARSON, T. - DAWSON, H. - LACKEY, H. Natural occurring levels of dimethylsulfoxide in selected fruits, vegetables, grains and beverages. In *J Agric Food Chem*. 1981, no. 29, s. 1019–21
- [26] DYLEVSKÝ, I. *Funkční anatomie*. 1- vydání . Praha: Grada 2009. 532 s. ISBN 978-80-247-3240-4.
- [27] KOLEKTIV: *Promítnutí pokroků lékařské vědy do funkčního hodnocení zdravotního stavu a pracovní schopnosti ve vztahu ke zdravotním postižením podle Mezinárodní klasifikace nemocí a s přihlédnutím k Mezinárodní klasifikaci funkčních schopnosti: závěrečná zpráva projektu výzkumu MPSV ČR HR 163/ 07*. 1. vydání. Praha: Ministerstvo práce a sociálních věcí 2008, 215 s. ISBN- 978- 808- 6778- 881.
- [28] Co je to kolagen? Hypso Otrokovice, a.s. [online]. 2010 12 (R138) [cit. 2014-18-3]. Dostupné z: <http://www.hypro.cz/cz-hemostatika.html>
- [29] ŠTULÍK, Karel, et al. *ANALYTICKÉ SEPARAČNÍ METODY*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 2004. 265 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [30] KARLÍČEK, Rolf, et al. *ANALYTICKÁ CHEMIE PRO FARMACEUTY*. Dotisk 2. vydání. Praha : Karolinum, 2005. 282 s. ISBN 80-246-0348-9
- [31] EYRE D.R., KOOP T.J., VAN NESS K.P., Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by highperformance liquid chromatography. *Anal. Biochem*. 1984. 137: 380 -388

Seznam použitých symbolů a zkratk

HPLC Hig-Performace Liquid Chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)

MS Hmotnostní spektrometrie

Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obrázek 1: <i>Schéma stavby kloubu</i> | 15 |
| Obrázek2: <i>Schematické srovnání zdravého kolenního kloubu a kloubu postiženého</i> | 21 |
| Obrázek 3: <i>Kloub postižený revmatoidní artritidou</i> | 23 |
| Obrázek 4: <i>Kmenová buňka</i> | 31 |
| Obrázek 5: <i>Kolagenová vlákna typu I</i> | 40 |
| Obrázek 6: <i>Syntéza kolagenu</i> | 44 |
| Obrázek7: <i>Princip chromatografie</i> | 51 |
| Obrázek 8: <i>Lambda 25</i> | 57 |
| Obrázek 9: <i>UHPLC systém Dionex Ultimate 3000 s UV/VIS detektorem</i> | 59 |
| Obrázek 10: <i>Rozpuštěné vzorky 1-7 v destilované vodě</i> | 60 |
| Obrázek 11: <i>Soupis měřených vzorků</i> | 62 |
| Obrázek 12: <i>Nastavení kolony</i> | 65 |
| Obrázek 13: <i>Nastavení průtoků</i> | 65 |
| Obrázek 14: <i>Poměr průtoků a nastavení metody</i> | 66 |
| Obrázek 15: <i>Nastavení průtoků a času</i> | 66 |
| Obrázek 16: <i>Popis metody část 1</i> | 67 |
| Obrázek 17: <i>Popis metody část 2</i> | 67 |
| Obrázek 18: <i>Popis metody část 3</i> | 68 |
| Obrázek19: <i>Použité vlnové délky</i> | 68 |
| Obrázek 20: <i>Atogel</i> | 69 |
| Obrázek 21: <i>Colpropur D Premium</i> | 70 |
| Obrázek 22: <i>Hydro – F</i> | 71 |
| Obrázek 23: <i>Gelita Sol</i> | 72 |

| | |
|--|----|
| Obrázek 24: <i>Gelatina 100</i> | 73 |
| Obrázek 25: <i>Gelatina 80 Bloom</i> | 74 |
| Obrázek 26: <i>RouselotATS</i> | 75 |
| Obrázek 27: <i>Atogel - Měřeno v módu MS-/MS+</i> | 77 |
| Obrázek 28: <i>Atogel - Měřeno v módu MS-/MS+ - extrakce hmotnostních iontů M/z 679,6, 309,2, 446,8, 416,8, 430,8, 396,8 a 792,6.</i> | 77 |
| Obrázek 29: <i>Colpropur – Měřeno v módu MS+/MS-</i> | 78 |
| Obrázek 30: <i>Colpropur – Měření v módu MS+/MS- - extrakce hmotnostních iontů M/z 228,9, 717,2, 565,5, 679,6, 396,8, 792,6</i> | 78 |
| Obrázek 31: <i>Gelatina 80 – Měřeno v módu MS+/MS –</i> | 79 |
| Obrázek 32: <i>Gelatina 80 – Měření v módu MS+/MS- - extrakce hmotnostních iontů M/z 756,5, 715,9, 566,5, 679,6, 396,8, 792,6</i> | 79 |
| Obrázek 33: <i>Gelatina 100 – Měřeno v módu MS+/MS</i> | 80 |
| Obrázek 34: <i>Gelatina 100 – Měření v módu MS+/MS- - extrakce hmotnostních iontů M/z 396,8, 792,6, 816,0, 810,5, 566,5</i> | 80 |
| Obrázek 35: <i>Gelita – Měřeno v módu MS+/MS-</i> | 81 |
| Obrázek 36: <i>Gelita – Měření v módu MS+/MS- - extrakce hmotnostních iontů M/z 679,6, 340,3, 309,2, 396,8, 792,6, 566,4</i> | 81 |
| Obrázek 37: <i>Hydro - F – Měřeno v módu MS+/MS-</i> | 82 |
| Obrázek 38: <i>Hydro – F – Měření v módu MS+/MS- - extrakce hmotnostních iontů M/z 409,1, 365,1, 582,3, 566,4, 679,6, 369,8, 792,6</i> | 82 |
| Obrázek 39: <i>Rousselot – Měřeno v módu MS+/MS-</i> | 83 |
| Obrázek 40: <i>Rousselot – Měření v módu MS+/MS- - extrakce hmotnostních iontů M/z 286,1, 752,3, 245,0, 566,4, 679,6, 396,8</i> | 83 |

Seznam Tabulek a grafů

| | |
|--|-------|
| <i>Tabulka 1. Porovnání kolagenních typů</i> | 42,43 |
| <i>Tabulka 2 Výsledky analýzy</i> | 76 |
| | |
| <i>Graf 1. Výsledky</i> | 63 |
| <i>Graf 2. Výsledky</i> | 63 |

Seznam Příloh

PŘÍLOHA I – XI

93-105

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Order No.: 177893

Batch No.: 834072

Production Date: 10.04.2012

Expiry time: 5 years

GELITA® SOL M, aggl.

ART. NO.: 211041

Customer:

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 | 5,53 | |
| Viscosity | 20%, 25 °C | 3,00 - 6,00 | 3,54 | mPa.s |
| Dry substance | GME (16h, 105°C) | 91,5 - 96,0 | 93,0 | % |
| Bulk density | GELITA | 270 - 400 | 289 | g/l |
| Peroxides | Ph. Eur./GME | <= 10 | corresponding | mg/kg |
| Ash | USP/GME (550 °C) | <= 2,00 | 0,75 | % |
| 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. Andreas Probst on 03.07.2012

Došlo dne: 16-07-2012

Product release

Quality assurance: Dr. Andreas Probst 03.07.2012
Material management: Gunter Grab 19.06.2012

STDANA-5-01.06.2012/SOMMAG-2011060600/WEBER/177893/03.07.2012 15:09:51
GELITA AG - Uferstraße 7 - D-69412 Eberbach

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).

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)

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Order No.: 177510

Batch No.: 632018

Production Date: 27.03.2012

Expiry time: 5 years

GELITA® EDIBLE GELATINE

80 BLOOM

ART.NO. 111080

30125

Customer:

Usti Nad Orlici, Czech Republic

| Parameter | Test Method | Specification | Test Result | |
|----------------------------|-----------------------------|---------------|---------------|---------|
| Jelly strength | Ph. Eur./GME (6,67%) | 70 - 90 | 79 | g Bloom |
| Viscosity | GME (6,67%, 60° C) | 1,30 - 2,30 | 1,84 | mPa.s |
| Loss on drying | Ph. Eur./GME (16 h, 105 °C) | 9,0 - 13,0 | 12,0 | % |
| pH | 6,67 %, 60 °C | 4,70 - 5,70 | 5,14 | |
| Peroxides | Ph. Eur./GME | <= 10 | corresponding | mg/kg |
| Ash* | USP/GME (550 °C) | < 2,00 | corresponding | % |
| 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 | <= 10 | corresponding | mg/kg |
| 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. Andreas Probst on 05.06.2012

Product release

Quality assurance: Dr. Andreas Probst 05.06.2012
Material management: Michael Stellner 05.06.2012



Certificate Of Analysis

Batch number : 131112A
Product : COLLECTIVE

Production date : 12/11/2013
Expiry date : 12/11/2015

Microbiological Analysis

| | Method | Specification | Results |
|--|-------------------------|---------------|----------|
| Total Plate Count (ufc/g) | Petrifilm | < 10 000 | <10 |
| Enterobacteriaceae (ufc/g) | AFNOR V08-054 | < 10 | <10 |
| Search for Escherichia Coli (in 1 g) | Europ. Pharmac. | absence | Negative |
| Search for Staphylococcus aureus (in 1g) | Europ. Pharmac. | absence | Negative |
| Yeast and Moulds (ufc/g) | AFNOR XP V08-059 | < 100 | <10 |
| Salmonella (in 25g) | mini VIDAS easy SLM bio | absence | negative |

Chemical Analysis on crude product

| | Method | Specification | Results |
|------------------------------------|--------------------------|---------------|---------|
| Kjeldahl Protein (%) | NF V04-407 | ≥ 90 % | 98,90 |
| Moisture (%) | NF V 04-401 | ≤ 10 % | 3,50 |
| pH 10% | internal-standard method | 5,5-7,5 | 6,10 |
| Ash (%) | NF V04-404 | ≤ 7 % | 6,30 |
| Total volatil nitrogen (mg N/100g) | internal | ≤ 250mg/100g | 95,30 |
| Bulk density | internal | 0,35-0,50 | 0,36 |
| Tapped density | internal | 0,45-0,60 | 0,42 |
| Hydroxyproline (% on dry product) | colorimetric | ≥ 6 | 6,70 |

Organoleptic analysis

| | Method | Specification | Results |
|------------|--------------------------|--------------------------------|-----------|
| Appearance | internal standard method | fine powder white to yellow pa | compliant |

- ° BSE/TSE: This product is based on fish raw material only and cannot be affected by BSE/TSE
- ° GMO: This product is not derived from Genetically Modified Organism
- ° IRRADIATION: This product is not irradiated

Comment :

Disclaimer: (Ex. This is to certify that the above material has been tested and did comply with the listed specifications when supplied in the original container, ETC....)

29/11/2013

Approved by

Nadège HOCHART

Page 1 sur 1

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Order No.: 177510

Batch No.: 632018

Production Date: 27.03.2012

Expiry time: 5 years

GELITA® EDIBLE GELATINE
80 BLOOM
ART.NO. 111080

30 x 25

Customer:

Usti Nad Orlici, Czech Republic

| Parameter | Test Method | Specification | Test Result | |
|---------------------------|-----------------------------|---------------|---------------|---------|
| Jelly strength | Ph. Eur./GME (6,67%) | 70 - 90 | 79 | g Bloom |
| Viscosity | GME (6,67%, 60° C) | 1,30 - 2,30 | 1,84 | mPa.s |
| Loss on drying | Ph. Eur./GME (16 h, 105 °C) | 9,0 - 13,0 | 12,0 | % |
| pH | 6,67 %, 60 °C | 4,70 - 5,70 | 5,14 | |
| Peroxides | Ph. Eur./GME | <= 10 | corresponding | mg/kg |
| Ash* | USP/GME (550 °C) | < 2,00 | corresponding | % |
| 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 | <= 10 | corresponding | mg/kg |
| 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. Andreas Probst on 05.06.2012

Product release

Quality assurance: Dr. Andreas Probst 05.06.2012
Material management: Michael Stellner 05.06.2012

STDANA-5-01.06.2012/ASPA03-2012032100/NOFFENBE/177510/05.06.2012 15:54:37
GELITA AG - Uferstraße 7 - D-69412 Eberbach

CSC JÄKLECHEMIE Czech s.r.o.
 Burzovní palác
 Rybná 682/14
 110 00 Praha 1
 Česká republika

CSC  **jäklechemie**
 Czech s. r. o.

Rousselot yfiteae

Analytický certifikát

Zboží: Hydrolizovaný kolagen - Rousselot ASF

Firma:

Datum dodání: 9.5.2012

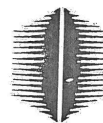
Číslo šarže: 1158239

EXPIRATION: 2/2016
SH: 43g

| TESTS | UNITS | SPECIFICATIONS | VALUES |
|--------------------------------------|-----------|----------------|----------------|
| PHYSICO-CHEMICAL LIMITS | | | |
| Viscosity (20 % - 25° C) | mPa.s | 3.5 - 6.0 | 5.8 |
| pH (45°C, 6.67%) | | 5.0 - 6.5 | 5.0 |
| Loss on drying (105°C, 17 h) | % | ≤ 10 | 7.6 |
| Residue on ignition (550°C) | % | ≤ 2 | Compliant |
| Sulfites(as SO ₂) | ppm | ≤ 10 | Compliant |
| Bulk density | | 0.40 - 0.60 | 0.42 |
| Particle size < 425 µm (40 mesh) | mesh ASTM | ≥ 95% | Compliant |
| < 75 µm (200 mesh) | | ≤ 20% | Compliant |
| HEAVY METALS LIMITS | | | |
| Arsenic (As) | ppm | < 1 | Compliant |
| Lead (Pb) | ppm | < 5 | Compliant |
| Cadmium (Cd) | ppm | < 0.5 | Compliant |
| Mercury (Hg) | ppm | < 0.15 | Compliant |
| Chromium (Cr) | ppm | < 10 | Compliant |
| Copper (Cu) | ppm | < 30 | Compliant |
| Zinc (Zn) | ppm | < 50 | Compliant |
| MICROBIOLOGICAL LIMITS | | | |
| Total bacterial count | CFU/g | < 1000 | < 1000 |
| E.coli | | Absence in 10g | Absence in 10g |
| Salmonella | | Absence in 25g | Absence in 25g |
| Anaerobic sulphite-reducing bacteria | CFU/g | < 10 | < 10 |

chemopharma Vídeň spol. s r.o.

Chemikálie a farmaceutika, Pod Parkem 1441, 543 01 Vrchlabí, DIČ: CZ64827488,
tel./fax: 499 421 723, 499 421 836, tel.: 499 421 832, 499 421 833
e-mail: office@chemopharma.cz, www.chemopharma.com



ANALYZAČNÍ CERTIFIKÁT / certificate of analysis

Kolagenní hydrolyzát / collagene hydrolyzate aglomerovaný/agglomerated

Šarže č./batch no. : FC20120308
Datum výroby/man.date: 8.březen/march 2012
Datum expirace/expiry date: březen/ march 2015

SH = 32,5 g
prášek / síť neč. 60/172

| Parametr /parameter | Testovací metoda/test.methode | Naměřeno/measured |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|
| Vzhled/ appearance | Vizuálně /visuel | Nažloutlý prášek/yellowish powder |
| Identifikace/identification | | Vyhovuje/ positive |
| Obsah látky/ assay | 98% min. 18 hod / 105°C | 98,1 % |
| Vůně/odor | | Neutrální/neutral |
| Objemová hustota/bulk density | 270-400 | Vyhovuje /conforms |
| pH | 4,00-7,00 | 5,90 |
| Popel/ash | NMT 2,0% 1h /550 °C | 0,70 % |
| Staphylococcus | Počet /g CFU/g | Negativní /negative |
| Koliformní/colliform | Počet /g CFU/g | Negativní/negative |
| Salmonella | Počet /g CFU/g | Negativní/negative |
| Anaerobní bakterie/anaer.bacteria | Počet /g CFU/g | Méně než 10 / NMT10,0 |
| Celkový počet částicmikroorganismů Total plate count | Počet / g CFU/g | Méně než 1000/ NMT 1000,0 |
| Olovo / lead mg/kg | NMT 2,0 | Vyhovuje/corresponds |
| Rtuť /Mercury mg/kg | NMT 0,1 | Vyhovuje/corresponds |
| arsen /As mg/kg | NMT 1,0 | Vyhovuje/corresponds |
| Těžké kovy/heavy metals mg/kg | NMT 10,0 | Vyhovuje/corresponds |

Závěr analýzy /conclusion : vyhovuje standardu/ meets standard quality

Chemopharma Vídeň, s.r.o.

chemopharma Vídeň spol. s r.o.

Chemikálie a farmaceutika, Pod Parkem 1441, 543 01 Vrchlabí, DIČ: CZ64827488,
tel./fax: 499 421 723, 499 421 836, tel.: 499 421 832, 499 421 833
e-mail: office@chemopharma.cz, www.chemopharma.com



ANALYZAČNÍ CERTIFIKÁT/ certificate of analysis

Kolagenní hydrolyzát / collagene hydrolyzate aglomerovaný/agglomerated

Šarže č./batch no. : 20150206
Datum výroby/man.date: 6.únor/ february 2015
Datum expirace/expiry date: únor/ february 2018

| Parametr /parameter | Testovací metoda/test.methode | Naměřeno/measured |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|
| Vzhled/ appearance | Vizuálně /visuel | Nažloutlý prášek/yellowish powder |
| Identifikace/identification | | Vyhovuje/ positive |
| Obsah látky/ assay | 98% min. 18 hod / 105°C | 98,3 % |
| Vůně/odor | | Neutrální/neutral |
| Objemová hustota/bulk density | 270-400 | Vyhovuje /conforms |
| pH | 4,00-7,00 | 5,80 |
| Popel/ash | NMT 2,0% 1h /550 °C | 0,90 % |
| Staphylococcus | Počet /g CFU/g | Negativní /negative |
| Koliformní/colliform | Počet /g CFU/g | Negativní/negative |
| Salmonella | Počet /g CFU/g | Negativní/negative |
| Anaerobní bakterie/anaer.bacteria | Počet /g CFU/g | Méně než 10 / NMT10,0 |
| Celkový počet částicmikroorganismů Total plate count | Počet / g CFU/g | Méně než 1000/ NMT 1000,0 |
| Olovo / lead mg/kg | NMT 2,0 | Vyhovuje/corresponds |
| Rtut' /Mercury mg/kg | NMT 0,1 | Vyhovuje/corresponds |
| arsen /As mg/kg | NMT 1,0 | Vyhovuje/corresponds |
| Těžké kovy/heavy metals mg/kg | NMT 10,0 | Vyhovuje/corresponds |



s.r.o.

Zelený pruh 99, 140 02 Praha 4

tel.: +420-241 440 840, 241 091 211 fax: +420-241 442 734, 241 440 959 e-mail: porta@porta.cz www.porta.cz

Product: COLPROPUR D PREMIUM
Description: Edible hydrolysed collagen protein
Batch numbers: 1460008
Addressee: PORTA LTD.
Order Number: sample

CERTIFICATE OF CONFORMITY

Protein S.A. has examined a sample of each batch of the mentioned product and guarantees that complies with the following specifications:

| | |
|------------------|---------------------------------|
| Batch N. | 1460008 |
| Analysis N. | 140801 |
| Date of Analysis | 6.05.14 |
| Production date: | 6.05.14 |
| Best before: | 18 months from production date. |

Chemical Characteristics

| | |
|--|---------|
| Protein (N _x 6.25) (% min.) | 97.0 |
| Protein (N _x 5.85) (% min.) | 91.0 |
| Total Nitrogen (% min.) | 15.5 |
| Moisture (% max.) | 7.0 |
| Salts (%max.) | 2.0 |
| Fat (%max.) | 0.3 |
| pH (10% solution) | 6.0±1.0 |

Physical and Organoleptical Characteristics

| | |
|---------------------------|--------------|
| Solution Appearance (10%) | Transparent |
| Taste and odour | Very neutral |

Food safety guarantees

According to the requirements of Regulation (EC) 853/2004, included Annex III, Section XV concerning edible collagens and Annex I, Chapter 1, point 1.10 of Regulation (EC) 2073/2005. Product elaborated in Protein's production plant, Sanitary Register Number 10-04347/GE.


Celrà, 4th September 2014

Signed: Juan Pedro Alcántara
Chemical Engineer
Chief of Laboratory

| <i>Profil aminokyselin /Amino-acid Typical</i> | <i>g/100g</i> |
|--|---------------|
| <i>Alanine</i> | <i>8.3</i> |
| <i>Arginine</i> | <i>8.5</i> |
| <i>Aspartic acid</i> | <i>5.5</i> |
| <i>Cystine</i> | <i>0</i> |
| <i>Glutamic acid</i> | <i>11.4</i> |
| <i>Glycine</i> | <i>19.8</i> |
| <i>Histidine</i> | <i>1.3</i> |
| <i>Hydroxylysine</i> | <i>0.5</i> |
| <i>Hydroxyproline</i> | <i>11.7</i> |
| <i>Isoleucine</i> | <i>1.5</i> |
| <i>Leucine</i> | <i>3</i> |
| <i>Lysine</i> | <i>3.4</i> |
| <i>Methionine</i> | <i>0.7</i> |
| <i>Phenylalanine</i> | <i>2.1</i> |
| <i>Proline</i> | <i>13.3</i> |
| <i>Serine</i> | <i>3</i> |
| <i>Threonine</i> | <i>1.8</i> |
| <i>Tryptophan</i> | <i>0</i> |

Závěr analýzy /conclusion : vyhovuje standardu/ meets standard quality

Chemopharma Vídeň, s.r.o.

 **Chemopharma Vídeň s.r.o.**
 Pod Parkem 1441, 543 01 Vrchlabí
 tel./fax: 499 421 723, 499 421 836
 DIČ: CZ64827488



Certificate Of Analysis

Batch number : 131112A
Product : COLLECTIVE

Production date : 12/11/2013
Expiry date : 12/11/2015

Microbiological Analysis

| | Method | Specification | Results |
|--|-------------------------|---------------|----------|
| Total Plate Count (ufc/g) | Petrifilm | < 10 000 | <10 |
| Enterobacteriaceae (ufc/g) | AFNOR V08-054 | < 10 | <10 |
| Search for Escherichia Coli (in 1 g) | Europ. Pharmac. | absence | Negative |
| Search for Staphylococcus aureus (in 1g) | Europ. Pharmac. | absence | Negative |
| Yeast and Moulds (ufc/g) | AFNOR XP V08-059 | < 100 | <10 |
| Salmonella (in 25g) | mini VIDAS easy SLM bio | absence | negative |

Chemical Analysis on crude product

| | Method | Specification | Results |
|------------------------------------|--------------------------|---------------|---------|
| Kjeldahl Protein (%) | NF V04-407 | ≥ 90 % | 98,90 |
| Moisture (%) | NF V 04-401 | ≤ 10 % | 3,50 |
| pH 10% | internal-standard method | 5,5-7,5 | 6,10 |
| Ash (%) | NF V04-404 | ≤ 7 % | 6,30 |
| Total volatil nitrogen (mg N/100g) | internal | ≤ 250mg/100g | 95,30 |
| Bulk density | internal | 0,35-0,50 | 0,36 |
| Tapped density | internal | 0,45-0,60 | 0,42 |
| Hydroxyproline (% on dry product) | colorimetric | ≥ 6 | 6,70 |

Organoleptic analysis

| | Method | Specification | Results |
|------------|--------------------------|--------------------------------|-----------|
| Appearance | internal standard method | fine powder white to yellow pa | compliant |

- ° BSE/TSE: This product is based on fish raw material only and cannot be affected by BSE/TSE
- ° GMO: This product is not derived from Genetically Modified Organism
- ° IRRADIATION: This product is not irradiated

Comment :

Disclaimer: (Ex. This is to certify that the above material has been tested and did comply with the listed specifications when supplied in the original container, ETC....)

29/11/2013

Approved by

Nadège HOCHART

Page 1 sur 1

