

PŮVODNÍ PRÁCE

Příprava a hodnocení dvouvrstevných filmů na bázi kolagenu a karboxymethylcelulosity za účelem terapie ran

Preparation and evaluation of bilayer films based on collagen and carboxymethylcellulose for wound therapy

Kateřina Tenorová • Ruta Masteiková • Nikola Kovárová • Klára Kostelanská • Josef Příkryl • David Vetchý • Jurga Bernatonienė

Došlo 24. října 2019 / Přijato 6. listopadu 2019

Souhrn

Kolagen je nejhojněji zastoupeným proteinem lidského těla a hojně využívaným biomateriálem napříč odvětvími právě díky svým příznivým vlastnostem vyplývajícím z jeho fyziologické blízkosti. Má klíčovou roli v procesu hojení ran i reparace tkání, a proto je využíván v moderních krycích prostředcích na rány v různých formách – ať už samostatně, nebo v kombinaci s jinými materiály. Potencionální využití pro tyto účely nabízí i kolagenové filmy, neboť kolagen je látka s dobrými filmotvornými vlastnostmi, nacházejícími uplatnění v potravinářství. Samotné kolagenové filmy bez další úpravy mají slabší mechanické vlastnosti, což je v případě aplikace na ránu nevyhovující. Z tohoto důvodu je snaha kolagen modifikovat anebo jej kombinovat s jinými materiály. Proto cílem našeho experimentu byla příprava dvouvrstevných filmů z kolagenu v kombinaci s karboxymethylcelulosou (CMC). CMC ve spodní vrstvě měla za cíl zpevnění filmů, snížení spotřeby použitého kolagenu a zajištění vhodných aplikačních vlastností. Organoleptické hodnocení, stanovení pH, nasákavosti i testování mechanických vlastností připravených filmů potvrdilo, že připravené filmy vykazují vyhovující aplikační parametry na ránu.

Klíčová slova: terapie ran • filmové krytí • kolagen • karboxymethylcelulosa

Summary

Collagen is the most abundant protein of the human body and a widely used biomaterial across sectors due to its

favourable properties resulting from its physiological proximity. It plays a key role in the process of wound healing and tissue repair and is therefore used in modern wound dressings in various forms, either alone or in combination with other materials. Collagen films also offer potential applications for these purposes, because collagen has good film-forming properties and is commonly used in the food industry. The collagen films themselves, without further treatment, have weak mechanical properties, which is unsatisfactory when applied to a wound. For this reason, there is an effort to modify or to combine collagen with other materials. Therefore, the aim of our experiment was the preparation of bilayer films from collagen in combination with carboxymethylcellulose (CMC). The CMC in the bottom layer had a goal to strengthen the films, reduce the consumption of used collagen and to ensure suitable application properties. Organoleptic evaluation, pH determination, swelling properties evaluation and testing of the mechanical properties of the prepared films confirmed that the prepared films exhibited satisfactory application parameters for the wound.

Key words: wound therapy • film wound dressing • collagen • carboxymethylcellulose

Úvod

Kolagen v různých formách se stal během posledních let široce využívaným biomateriálem napříč odvětvími^{1–3}. Jedná se o hojně se vyskytující, obnovitelný, biologicky odbouratelný a biokompatibilní materiál s nízkou antigenicitou, cytotoxicitou a dráždivostí^{1, 3–5}. Pro své příznivé vlastnosti, které vyplývají z jeho fyziologické blízkosti nebo dokonce identity aplikovaného kolagenu s tělesným kolagenem, je hojně využíván v potravinářství, chemickém průmyslu, kosmetice, medicíně, farmacii i tkáňovém inženýrství^{1–3}.

Kolagen je nejčastěji zastoupeným proteinem lidského těla, kde tvoří 25–35 % celkové hmotnosti všech bílkovin. Je hlavním nerozpustným strukturálním proteinem pojivových tkání, jako jsou vazy, šlachy, chrupavky, kos-

PharmDr. Kateřina Tenorová (✉) • R. Masteiková • N. Kovárová • J. Příkryl • K. Kostelanská • D. Vetchý
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Farmaceutická fakulta, Ústav technologie léků
Palackého 1/3, 612 42 Brno
e-mail: K.Tenorova@seznam.cz

J. Bernatonienė
Akademie medicíny, Litevská univerzita zdravotnických věd
Farmaceutická fakulta, Katedra technologie léků a sociální farmacie

ti, ale i cévní stěny, rohovky či meziobratlové ploténky^{6,7}). Kolagen představuje hlavní složku extracelulární matrice (ECM) společně s elastinem a kyselinou hyaluronovou a je produkován převážně fibroblasty^{6, 8}). Kolagenová molekula je tvořena třemi polypeptidovými řetězci, jež jsou uspořádány do spirálovité (helikální) struktury tzv. superšroubovice. Každý řetězec je tvořen tisíci aminokyselinami se základní sekvencí Glycin-X-Y. Pozice X a Y pak obsahují ze všech aminokyselin nejčastěji prolin nebo hydroxyprolin^{9–11}). V lidském těle rozlišujeme celkem 29 typů kolagenu, z nichž největší procentuální zastoupení představují kolageny typu I, III, IV, V a VII^{9, 12}). V živém organismu plní kolagen především opěrnou a ochrannou funkci právě pojivové tkáně v souvislosti s jejími mechanickými vlastnostmi, ale zastává také další nezbytné funkce z fyziologického hlediska, z nichž k nejdůležitějším řadíme úlohu kolagenu v procesu hojení ran a reparace tkání^{4, 5, 13}).

Proces hojení rány zahrnuje několik fází, k nimž řadíme hemostázu, fázi zánětlivou, proliferaci (ta zahrnuje proliferaci fibroblastů, angiogenezi a reepitelizaci) a fázi remodelační^{14, 15}). Tato kaskáda nakonec vede k tvorbě jizvy a k remodelaci rány. Kolagen je důležitý ve všech těchto fázích hojení rány, a to vzhledem ke své chemotaktické roli. Přitahuje buňky, jako jsou fibroblasty a keratinocyty do rány, čímž podporuje debridement, angiogenezi a reepitelizaci a tím hojení rány. Z existujících typů kolagenu mají zásadní roli v procesu reparace rány právě kolageny typu I a III¹⁶). U chronických ran bývá hojení rány zpomaleno a zastaveno v některé z těchto fází; v případě fáze zánětlivé je komplikované hojení rány spojeno se zvýšenými hladinami matricových metaloproteináz (MMPs) v ráně. Tyto enzymy hrají důležitou roli při řádném hojení rány, protože odbourávají poškozenou ECM, aby mohly vznikat nové tkáně (tvorba kolagenu). Pokud je však jejich hladina zvýšena, ničí i nově vznikající ECM, což ve svém důsledku vede k zpožděnému a komplikovanému hojení rány. A právě tato komplikace nabízí využití kolagenových krytí na rány, kdy je ráně poskytnut alternativní zdroj kolagenu, který může být degradován MMPs, zatímco nativní kolagen tvořící se v ráně není narušen, tudíž hojení rány probíhá normálním způsobem. Kolagenové krytí slouží tedy jako obětní substrát pro MMPs, čímž chrání kolagen nově vznikající^{8, 16–18}).

Na trhu existuje celá řada dostupných krycích prostředků s kolagenem v různých formách – ať už samostatně, nebo v kombinaci s dalšími materiály. Samozřejmě jsou různé aplikační formy: prášek, pasta, gel i polštářek¹⁶). Potenciál nabízí i využití kolagenu pro tvorbu filmů, neboť se jedná o látku s dobrými filmotvornými vlastnostmi, kterých se již běžně využívá v potravinářství^{19–21}). Nevýhodou jsou však slabé mechanické vlastnosti vzniklých filmů, což je v případě aplikace na ránu nevyhovující a nepříjemné^{22, 23}). Z tohoto důvodu je snaha kombinovat kolagen s dalšími materiály nebo kolagen různě modifikovat^{23, 24}). Proto cílem této práce bylo připravit filmy z kolagenu v kombinaci s karboxymethylcelulosou. CMC ve spodní vrstvě měla za cíl filmy

zpevnit a tím zajistit jejich větší mechanickou odolnost, soudržnost a pružnost z čehož vyplývají vhodné aplikační vlastnosti na ránu.

Pokusná část

Materiál

Pro přípravu filmů byly použity dva druhy kolagenu, a to koňský kolagen ze šlach a bovinní kolagen z kůže, dodané firmou Collado, s.r.o., Brno, Česká republika, ve formě 3% kolagenového gelu. Dále byla použita sodná sůl karboxymethylcelulosity (NaCMC) v podobě netkané textilie se stupněm substituce (DS) 0,398–0,519, kterou dodala firma Holzbecher Medical, s. r. o., barevna a bělidlo Zlič, Česká Skalice, Česká republika. Další látky lékopisné kvality (glycerol 85%, makrogol 300 a ethanol 96%) byly dodány firmou Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Hradec Králové, Česká republika. Pro testování vlastností připravených filmů sloužil lékopisný (ČL 2017) fyziologický tlumivý roztok o pH 7,2 (FTR 7,2). Chemikálie použité k přípravě tohoto roztoku měly lékopisnou kvalitu a byly běžně komerčně dostupné. Čištěná voda lékopisné kvality byla připravena pomocí přístroje Rodem 4.

Metodika

Příprava dvouvrstvých filmů

Dvouvrstvé kombinované filmy na bázi karboxymethylcelulosity a kolagenu byly připraveny metodou odpaření rozpouštědla a to tak, že první vrstvu tvořila karboxymethylcelulosa a druhou kolagen. Jednotlivé filmy se lišily druhem použitého kolagenu (bovinní nebo koňský), změkčovadlem (glycerol 85% nebo makrogol 300) a množstvím odlité disperze CMC v první vrstvě (57 g CMC nebo 45 g CMC). Množství odlité disperze kolagenu ve druhé vrstvě filmu bylo u všech vzorků totožné, a to 45 g. Odlévané množství disperzí CMC na hranatou polystyrenovou misku o rozměrech 12 × 12 cm vycházelo z předchozích zkušeností²⁵), tudíž množství disperze pro odlévání bylo přepočítáno na plochu misky, tj. 144 cm². Typy připravených filmů a jejich složení popisuje tabulka 1.

Vlastní přípravu filmů lze rozdělit na tři samostatné fáze. Nejprve byla připravena disperze textilní karboxymethylcelulosity nastříhané na čtverečky cca 0,5 × 0,5 cm. Ta obsahovala 1 % NaCMC s 2 % daného změkčovadla (makrogol 300 nebo glycerol 85%). Disperze byla doplněna na požadované množství čistou vodou o teplotě 80 °C a byla ponechána k nabobtnání na vodní lázni o teplotě 80 °C po dobu 3 hodin. V další části přípravy se pokračovalo za 24 hodin po vychladnutí disperze na pokojovou teplotu. Dalším krokem byla homogenizace disperze a úprava jejího pH. Disperze byla homogenizována pomocí přístroje Cito-Unguator 2000 (Sophis a.s., Česká republika) nastaveným na program „Gel“. Následovalo okyselení disperze za jejího stálého míchání na hodnotu pH 3 s využitím 5% a 1% roztoku HCl. Po dosažení požadované hodnoty pH byla disperze opět homogenizována na program „Emulze“ a proběhla kontrola

Tab. 1. Označení jednotlivých druhů filmů

Označení vzorku	Druh kolagenu	Změkčovadlo	Množství odlité disperze	
			CMC (g)	kolagen (g)
B-G-45/45	bovinní	glycerol 85%	45	45
B-G-57/45	bovinní	glycerol 85%	57	45
B-M-45/45	bovinní	makrogol 300	45	45
B-M-57/45	bovinní	makrogol 300	57	45
K-G-45/45	koňský	glycerol 85%	45	45
K-G-57/45	koňský	glycerol 85%	57	45
K-M-45/45	koňský	makrogol 300	45	45
K-M-57/45	koňský	makrogol 300	57	45

jejího pH, které bylo popřípadě poupraveno na hodnotu 3. Takto připravená okyselená disperze byla odlévána na hranaté Petriho misky, a to dle typu filmu: buď v množství 57 g, nebo 45 g. Misky byly umístěny do horkovzdušné sušárny s nastavenou teplotou 60 °C, kde se sušily cca 90 minut. Po uplynutí 45 minut se misky otáčely pro zajištění rovnoměrného sušení. Dosoušení vzniklých filmů probíhalo v laboratorních podmínkách. Okraje filmů byly průběžně kontrolovány a zvlhčovány čistou vodou, aby se zabránilo oddělení filmů od misky a jejich poškození. Na usušené karboxymethylcelulosové filmy byla následně nanášena disperze kolagenu s daným změkčovadlem. Tato disperze byla vytvořena naředěním kolagenového gelu na 1% koncentraci s přidáním 1% změkčovadla. K takto vytvořené disperzi bylo přidáno 30 g 96% ethanolu, což umožnilo snadnější odstranění případných bublinek a také rychlejší usušení. Po zhomogenizování disperze pomocí přístroje Cito-Unguator 2000 (Sophis a.s., Česká republika) s využitím programu „Emulze“ následovalo její odlití na připravenou první filmovou vrstvu v Petriho miskách. Dosoušením za pokojové teploty vznikly dvouvrstvé filmy. Řádně vysušené filmy byly v miskách přikryté víčkem, aby nedošlo k jejich přesušení a po organoleptickém hodnocení byly adjustovány do vzduchotěsných plastových obalů. Takto byly filmy uchovávány po celou dobu během jejich hodnocení.

Hodnocení připravených filmů

Organoleptické hodnocení disperzí a připravených filmů

Organoleptická kontrola probíhala během celé přípravy filmů. Kontrolovány byly připravené disperze – jak CMC, tak i kolagenu. Správně připravená homogenní disperze bez viditelných kousků kolagenu či textilní tkaniny a bez přítomnosti bublinek byla základním předpokladem pro přípravu kvalitních filmů. Během organoleptického hodnocení hotových filmů byly hodnoceny následující parametry: křehkost, pevnost, homogenita a schopnost další manipulace s filmem, kam řadíme i změnu tvaru filmu po vysušení. Přesušené filmy, vi-

ditelně oddělené od okrajů misky, popřípadě vykazující velké množství nehomogenní textilie či kolagenu, byly z dalšího hodnocení vyřazeny.

Mikroskopické hodnocení

Mikroskopické hodnocení připravených filmů bylo provedeno na elektronovém mikroskopu Mira 3 (TESCAN Brno, s.r.o., Česká republika), kde byly pořízeny snímky jejich povrchu.

Bobtnavost – stanovení stupně nasákavosti

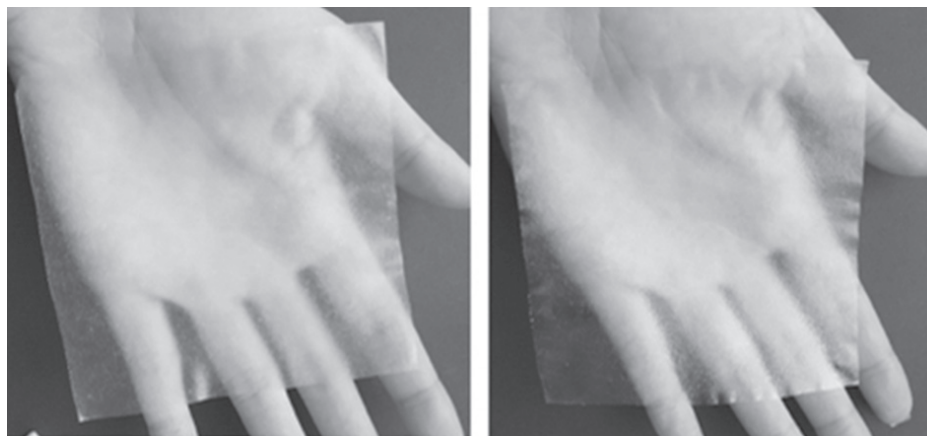
Pro určení stupně nasákavosti byl využit umělý model rány, který imituje exsudující ránu a byl použit již v našich předchozích experimentech²⁶. Model tvoří Petriho miska o průměru dna 10 cm s umístěnou savou houbičkou. Houbička je umístěna po celé ploše misky a směřuje svým hrubým povrchem nahoru. Takto připravený model je následně zalit 20 ml média, což byl v našem případě FRT 7,2. Miska je přikryta víčkem, aby se zabránilo odpařování média. Vzorek filmu o rozměrech 25 × 25 mm byl nejprve zvážen za sucha na analytických vahách a poté aplikován na model rány tím způsobem, aby kolagenová část filmu byla umístěna směrem k ráně. Měření probíhalo ve stanovených časových intervalech 1 hod., 3 hod. a 8 hod., a to tak, že byl vzorek pomocí pinzety oddělen od modelu rány, byla z něj odstraněna přebytečná tekutina otřením o okraj Petriho misky a film byl opět zvážen. Ze získaných hodnot za sucha a za mokra byl pro dané intervaly stanoven stupeň nasákavosti S_n (g/g), a to výpočtem dle následujícího vzorce:

$$S_n = (m_m - m_s)/m_s$$

kde m_m je hmotnost nasáklého vzorku a m_s hmotnost vzorku suchého.

Povrchové pH po navlhčení kapkou vody

Stanovení za pomoci povrchového pH filmů se realizovalo za pomoci pH metru (pH 3210, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Německo) a kontaktní skleněné elektrody (FlaTrode, Hamilton Company, USA). Na dostatečně velký kousek filmu byla kápnuta



Obr. 1. Vzhled připravených filmů – film z bovinního kolagenu (vlevo) a koňského (vpravo)

kapka čerstvě převařené čištěné vody tak, aby se kontaktní elektroda dotýkala filmu celou svojí plochou. Po nasáknutí filmu kapalinou bylo stanoveno jeho pH. Měřilo se jak povrchové pH filmu směrem k ráně (kolagen), tak i pH obrácené (horní vrstva filmu – CMC).

Změny povrchového pH v čase

Hodnocení povrchového pH filmů bylo provedeno na modelu rány a to v časech 1, 3 a 8 hodin. Jako médium sloužil opět FTR 7,2. Čtverečky filmu o rozměrech 25 × 25 mm byly umístěny na model rány. Po uplynutí stanovené doby se film z modelu rány odstranil a umístil na prázdnou Petriho misku, kde bylo změřeno povrchové pH filmu (kolagen) za pomoci kontaktní elektrody.

Mechanické vlastnosti

Hodnocení mechanických vlastností filmů bylo provedeno na přístroji Texture analyzer (Texturometr CT3 4500, Brookfield Engineering Laboratories, USA) pomocí programu TexturePro CT. Každý typ filmu byl hodnocen jak v suchém stavu, tak i po namočení vzorku do FTR 7,2. Z filmů byly nejprve vyraženy vzorky o velikosti 40 × 10 mm za pomoci kovového razidla. Pro testování za vlhka byly tyto vzorky umístěny do Petriho misky s obsahem FTR 7,2, kde byly celé namočené po dobu 3 hodin. Miska byla přikryta víčkem, aby nedocházelo k odpaření média. Před měřením byl každý vzorek okapan otřením o okraj Petriho misky a následovalo měření následujícím způsobem. Vzorek filmu byl upevněn pomocí pinzety do čelistí Texturometru TA-DGA a přitažen závity, aby nevyklouzával v průběhu měření. Po spuštění přístroje se čelisti pohybovaly od sebe, a to rychlostí 2 mm/s, dokud nebyl vzorek filmu přetržen. Jako výsledné parametry měření byly hodnoceny zátěž (g), deformace (mm) a vykonaná práce (mJ), při kterých došlo k přetržení vzorku. Z hodnot zátěže byla vypočítána síla F (N), potřebná k přetržení vzorku, dle následujícího přepočtu:

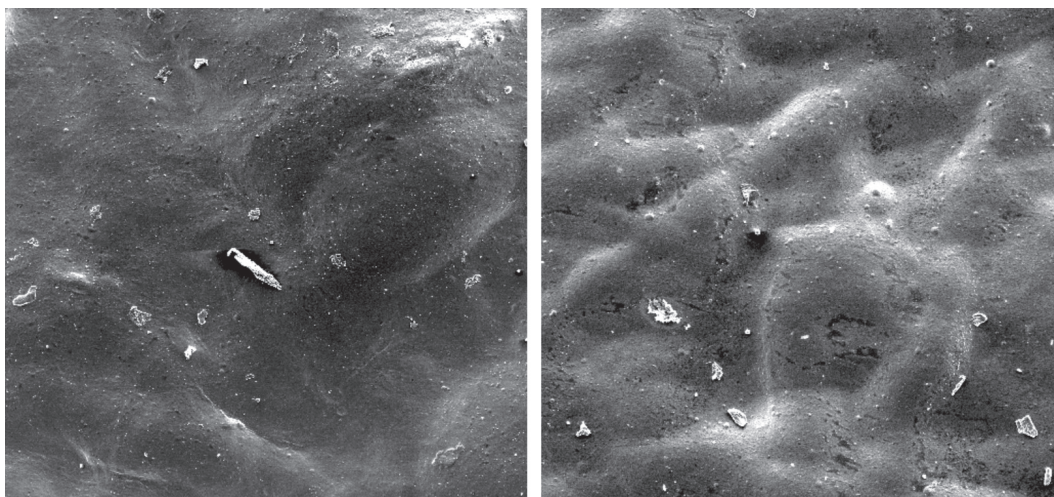
$$F = Z \times g/1000,$$

kde Z je zátěž v gramech a g je tíhové zrychlení 9,81 m/s².

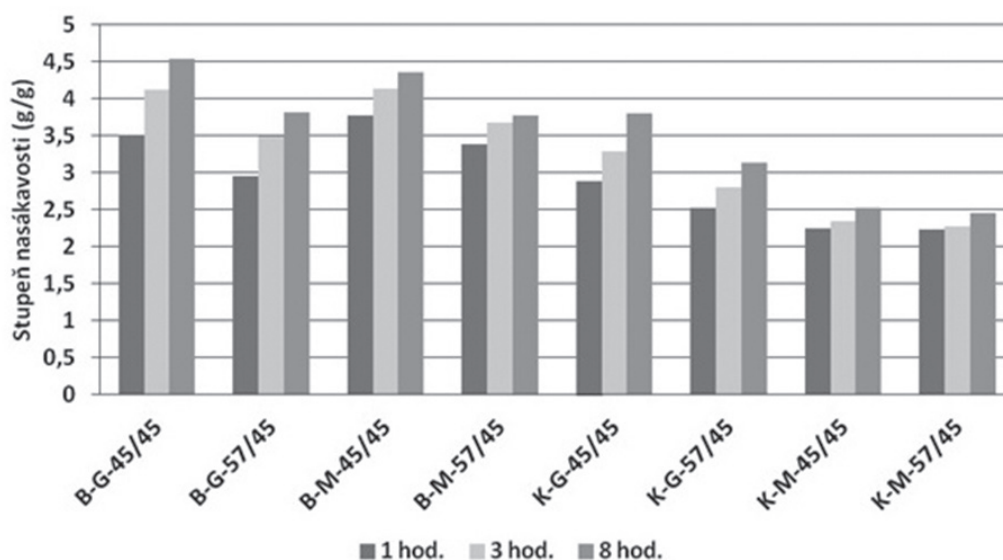
Výsledky a diskuze

Dvouvrstvé filmy z CMC a kolagenu byly připraveny odléváním disperzí jednotlivých vrstev, které byly následně sušeny. Disperze CMC byla ve všech případech bílého zbarvení, homogenní a viskózní. Disperze kolagenu odlišná ve druhé vrstvě vykazovala obdobné vlastnosti. Typ změkčovadla ani v jednom případě nikterak neovlivnil výsledné zbarvení disperze. Připravené filmy byly homogenního vzhledu, seshora matné a na ohmat drsné, zespu hladké a lesklé a dobře se s nimi manipulovalo. Filmy s vyšší gramáží odlišné disperze CMC se jeví na pohmat pevnější. Co se týče druhu použitého kolagenu, filmy z koňského kolagenu byly ve srovnání s kolagenem bovinním křehčí, poddajnější a méně pevné. Vliv na výsledný vzhled a dojem měl i druh použitého změkčovadla – makrogolové filmy působily pevněji, glycerolové filmy byly měkčí a křehčí. Vzhled filmů přibližuje obrázek 1.

Kombinace CMC a kolagenu byla provedena z důvodu zlepšení mechanických vlastností výsledných filmů, a to několika způsoby. Kolagen má sice velmi dobré filmotvorné vlastnosti, avšak vzniklé filmy vykazují poměrně nízkou mechanickou odolnost obzvláště ve vlhkém stavu²⁴). K dosažení vyhovujících aplikačních vlastností by bylo zapotřebí zvýšit tloušťku kolagenové vrstvy, což je však finančně náročné vzhledem k vysoké ceně kolagenu jako suroviny. Z tohoto důvodu je snaha kombinovat ho s jinými materiály za účelem zlepšení jejich pevnosti, pružnosti a odolnosti, což bylo prokázáno v experimentech jiných autorů^{22, 27}), a to i v kombinaci právě s CMC²³). Navíc námi použitá NaCMC v podobě netkané textilie (Hcel[®] NaT) vede sama o sobě ke zpevnění filmů i po navlhčení, protože obsahuje mikrofibrilární vlákna částečně substituované CMC (obr. 2)^{28, 29}). Kromě toho byla disperze NaCMC určena k odlití první vrstvy filmu okyselená, což vede ke vzniku kyselé formy CMC (HCMC), která je ve vodě nerozpustná. Došlo tedy k přeměně části rozpustné NaCMC na nerozpustnou HCMC, která také zlepšuje mechanické vlastnosti filmů především po navlhčení²⁸). Podstatný je však i fakt, že vrstva CMC umožňuje snížit množství použitého kolagenu, takže se jedná i o jistou úsporu materiálu a financí.



Obr. 2. Mikroskopický vzhled filmů při 200násobném přiblížení – film z bovinního kolagenu (vlevo) a koňského (vpravo) – vrchní vrstvu tvoří kolagen, pod ním jsou patrné obrysy mikrofibrilárních vláken částečně substituované CMC ve spodní vrstvě



Obr. 3. Změny nasákavosti krytí v čase 1, 3 a 8 hodin ve FTR 7,2

Stanovení stupně nasákavosti patří k důležitým testům krytí na rány z důvodu určení jejich absorpčních vlastností. Absorpční vlastnosti krytí vyjadřují schopnost krytí pohlcovat exsudát a tím zajistit optimální vlhkost prostředí v ráně, což má zásadní vliv na její správné hojení²⁶⁾. U filmových krytí nelze očekávat vysoké hodnoty nasákavosti, avšak schopnost pohlcovat exsudát, alespoň v průměrné míře je žádoucí i u filmů³⁰⁾. Z grafu na obrázku 3 můžeme vidět, že všechny typy filmů dosahovaly středních hodnot nasákavosti. Obecně lze konstatovat, že filmy z bovinního kolagenu dosahovaly vyšších hodnot nasákavosti než filmy z kolagenu koňského. Vliv na nasákavost má i tloušťka filmů – filmy s nižší gramáží odlité disperze NaCMC v první vrstvě (45/45) mají bez ohledu na druh kolagenu hodnoty nasákavosti vyšší než filmy s gramáží vyšší (57/45). To lze vysvětlit obecně vyšší nasákavostí samotného kolagenu ve srovnání s CMC. Filmy s nižší gramáží (45/45) mají

vyšší poměr kolagenu vůči CMC než filmy s vyšší gramáží (57/45), tudíž je jejich výsledná nasákavost vyšší. Obecně vyšších hodnot nasákavosti dosahovaly filmy s glycerolem.

Moderní krycí prostředky by měly být schopné zajistit v ráně nejenom ideální vlhkost a teplotu pro její správné hojení, ale v neposlední řadě by měly ráně poskytnout optimální pH^{31,32)}. Řádné hojení rány probíhá v mírně kyselém prostředí, což vede k proliferaci fibroblastů, epitelizaci i angioneogenezi, a to bez přítomnosti mikroorganismů. Oproti tomu rány nehojící se jsou charakterizovány zásaditými hodnotami pH, které jsou navíc spojené s výskytem bakteriální infekce³³⁾. Z tohoto důvodu řadíme stanovení pH k jedné z nejdůležitějších zkoušek z hlediska aplikace krytí na ránu, kdy vyžadujeme udržení pH v kyselé oblasti, čili jistou schopnost krytí pH v ráně modulovat.

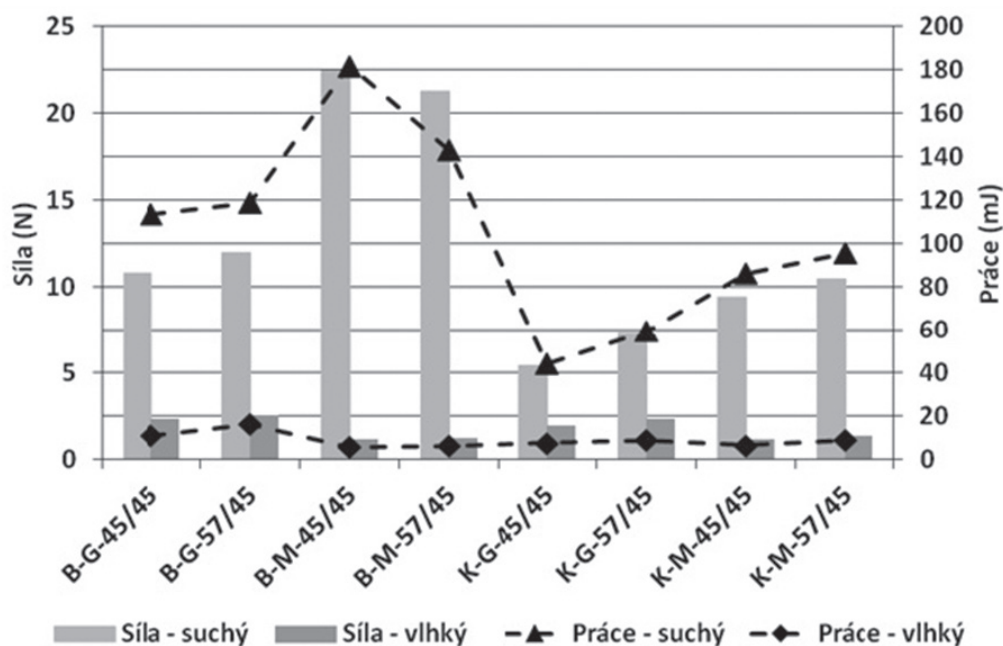
Z tabulek 2 a 3 je patrné, že filmy měly zachovávat hodnoty pH v kyselé oblasti, a to jak v případě hodnocení pH

Tab. 2. pH po navlhčení kapkou vody

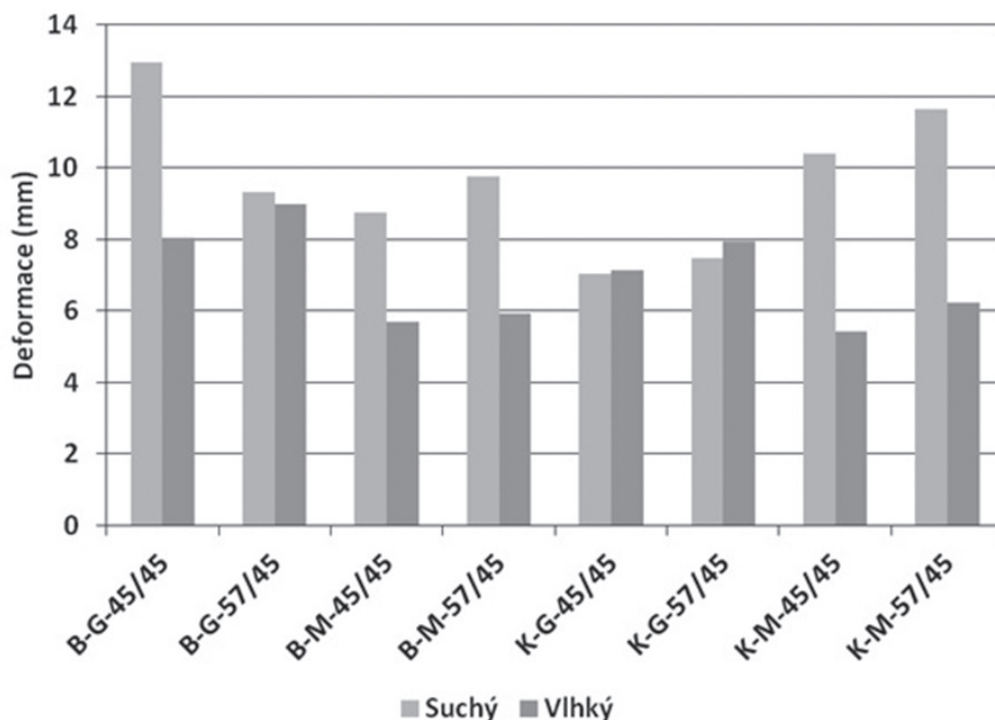
Označení vzorku	pH po navlhčení kapkou vody	
	povrchové pH (kolagen)	obrácené pH (CMC)
B-G-45/45	2,34 ± 0,04	2,70 ± 0,04
B-G-57/45	2,43 ± 0,08	2,66 ± 0,02
B-M-45/45	2,31 ± 0,08	2,45 ± 0,05
B-M-57/45	2,32 ± 0,09	2,62 ± 0,03
K-G-45/45	2,45 ± 0,05	2,57 ± 0,01
K-G-57/45	2,45 ± 0,03	2,64 ± 0,02
K-M-45/45	2,41 ± 0,07	2,67 ± 0,03
K-M-57/45	2,37 ± 0,09	2,73 ± 0,03

Tab. 3. Hodnocení změn povrchového pH v čase

Označení vzorku	Změny povrchového pH v čase		
	1 hod.	3 hod.	8 hod.
B-G-45/45	3,53 ± 0,03	3,65 ± 0,05	3,87 ± 0,09
B-G-57/45	3,68 ± 0,07	3,77 ± 0,04	3,98 ± 0,02
B-M-45/45	3,67 ± 0,12	3,61 ± 0,02	3,80 ± 0,11
B-M-57/45	3,52 ± 0,07	3,54 ± 0,03	3,64 ± 0,04
K-G-45/45	3,83 ± 0,14	3,99 ± 0,14	4,11 ± 0,11
K-G-57/45	3,80 ± 0,08	3,90 ± 0,07	4,07 ± 0,11
K-M-45/45	3,73 ± 0,20	3,69 ± 0,08	3,77 ± 0,07
K-M-57/45	3,76 ± 0,24	3,76 ± 0,04	3,86 ± 0,03



Obr. 4. Porovnání mechanických vlastností filmů v suchém a vlhkém stavu – síla (N) nutná k přetržení vzorku filmu a práce (mJ) při tom vykonaná



Obr. 5. Porovnání hodnot deformací (mm) u filmů v suchém a vlhkém stavu

po navlhčení, tak i u hodnocení změn pH v čase, které více vypovídá o schopnosti krytí udržet pH v kyselé oblasti. Zde docházelo i po 8 hodinách aplikace filmů na model rány s FTR 7,2 jen k mírnému zvýšení hodnot pH, tudíž filmy lze považovat za pH modulující krytí.

Pro praktickou aplikaci filmů na ránu je důležitá jejich mechanická odolnost. Od filmů se očekává schopnost přizpůsobit se ohybům kůže, ale zároveň pevnost, odolnost i příjemnost při aplikaci na kůži³⁴). Mechanickou odolnost charakterizuje nejenom síla potřebná k jejich roztržení a práce při tom vykonaná, ale především hodnoty deformace. Čím jsou hodnoty deformace vyšší, tím je film pružnější a přizpůsobivější. Tyto vlastnosti jsou důležité nejen v suchém stavu, ale především po navlhčení filmů (kontakt s exsudátem rány). I po navlhčení by měl film zůstat soudržný, a to pro své snadné odstranění z rány²⁹). Graf na obrázku 4 porovnává mechanické vlastnosti filmů v suchém i vlhkém stavu, a to sílu nutnou k přetržení vzorku a práci přitom vykonanou. Zde je patrná vyšší mechanická odolnost filmů z bovinního kolagenu než koňského. Filmy s makrogolem mají lepší mechanické vlastnosti i v případě kolagenu koňského. Po navlhčení se u všech filmů jejich mechanická odolnost snížila, v případě filmů z bovinního kolagenu je toto snížení rapidnější než u filmů z kolagenu koňského. Schopnost deformace je znázorněna v grafu na obrázku 5. Ta je u všech filmů v suchém stavu poměrně vysoká. Po navlhčení se u většiny filmů s výjimkou (K-G-45/45 a K-G-57/45) snížila, pozorovat lze ale pozitivní vliv glycerolu na hodnoty deformace ve vlhkém stavu, kde právě v případě dvou zmíněných vzorků dokonce došlo k nárůstu těchto hodnot. Přestože u ostatních vzorků

byly hodnoty deformace ve vlhkém stavu sníženy, můžeme je považovat za dostatečné, což potvrdilo i organoleptické hodnocení při manipulaci s nimi, kdy byla zachována jejich soudržnost a flexibilita.

Závěr

Z uvedeného experimentu a námi získaných výsledků vyplývá, že lze metodou odpaření rozpouštědla připravit dvouvrstvé filmy obsahující CMC a kolagen s vhodnými aplikačními vlastnostmi za účelem terapie ran. Vyhovující vlastnosti měly filmy z obou typů kolagenu i s oběma druhy změkčovadel. Všechny filmy měly dobré organoleptické vlastnosti, byly schopné udržet pH v kyselé oblasti, měly dobré absorpční schopnosti a jejich mechanické vlastnosti odpovídaly požadavkům pro aplikaci na ránu. Kombinace s CMC se z hlediska mechanického zpevnění filmů jeví jako vyhovující. Po porovnání vlastností je však možné konstatovat, že bovinní kolagen je pro tento typ filmů vhodnější, neboť filmy měly vyšší absorpční schopnosti, ale především lepší mechanické vlastnosti.

Práce vznikla za podpory IGA VFU Brno, Česká republika pod číslem (304/2019/FaF).

Střet zájmů: žádný.

Literatura

1. Liu X., Zheng Ch., Luo X., Wang X., Jiang H. Recent advances of collagen-based biomaterials: Multi-hierarchical structure,

- modification and biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C.* 2019; 99, 1509–1522.
2. **Ramshaw J. A. M., Peng Y. Y., Glattauer V., Werkmeister J. A.** Collagens as biomaterials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2009; 20(S1), 3–8.
 3. **Parenteau-Bareil R., Gauvin R., Berthod F.** Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials.* 2010; 3(3), 1863–1887.
 4. **Karsdal M. A., Nielsen S. H., Leeming D. J., Langholm L. L., Nielsen M. J. et al.** The good and the bad collagens of fibrosis – their role in signaling and organ function. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017; 121, 43–56.
 5. **Brett D.** A review of collagen and collagen-based wound dressings. *Wounds* 2008; 20(12), 347–356.
 6. **Sibilla S., Godfrey M., Brewer S., Budh-Raja A., Genovese L.** An overview of the beneficial effects of hydrolysed collagen as a nutraceutical on skin properties: Scientific background and clinical studies. *Open Nutraceuticals J.* 2015; 8(1), 29–42.
 7. **Hashim P., Ridzwan M., Bakar J., Mat Hashim D.** Collagen in food and beverage industries. *Int. Food Res. J.* 2015; 22(1), 1–8.
 8. **Harding K. G., Rangaraj A., Leaper D.** Role of collagen in wound management. *Wounds* 2011; 7(2), 54–60.
 9. **Chattopadhyay S., Raines R. T., Glick G. D.** Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers* 2014; 101(8), 821–833.
 10. **Gelse K., Pöschl E., Aigner T.** Collagens – structure, function and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003; 55(12), 1531–1546.
 11. **Grønlien K. G., Pedersen M. E., Sanden K. W., Høst V., Karlsson J., Tønnesen H. H.** Collagen from Turkey (*Meleagris gallopavo*) tendon: A promising sustainable biomaterial for pharmaceutical use. *Sustainable Chem. Pharm.* 2019; 13, 1–10.
 12. **Gould L. J.** Topical Collagen-Based Biomaterials for Chronic Wounds: Rationale and Clinical Application. *Adv. Wound Care* 2016; 5(1), 19–31.
 13. **Karsdal M.** Biochemistry of collagens, laminins and elastin. 2nd ed. Cambridge: Elsevier 2019.
 14. **Wang P. H., Huang B. S., Horng H. Ch., Yeh Ch. Ch., Chen Y. J.** Wound healing. *Chin. Med. J.* 2018; 81(2), 94–101.
 15. **Morton L. M., Phillips T. J.** Wound healing and treating wounds. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2016; 74(4), 589–605.
 16. **Hochstein A. O., Bhatia A.** Collagen: its role in wound healing. *Podiatry management* 2014; 8, 103–110.
 17. **Fleck C. A., Simman R.** Modern Collagen Wound Dressings: Function and Purpose. *The Journal of the American College of Certified Wound Specialists* 2010; 2(3), 50–54.
 18. **Bohn G., Liden B., Schultz G., Yang Q., Gibson D. J.** Ovine-Based Collagen Matrix Dressing: Next-Generation Collagen Dressing for Wound Care. *Advances in Wound Care* 2016; 5(1), 1–10.
 19. **Chen X., Zhou L., Xu H., et al.** The structure and properties of natural sheep casing and artificial films prepared from natural collagen with various crosslinking treatments. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019; 135, 959–968.
 20. **Yang H., Guo X., Chen X., Shu Z.** Preparation and characterization of collagen food packaging film. *J. Chem. Pharm. Res.* 2014; 6(6), 740–745.
 21. **Gaspar-Pintilieșcu A., Stanciuc A. M., Craciunescu O.** Natural composite dressings based on collagen, gelatin and plant bioactive compounds for wound healing: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019; 138, 854–865.
 22. **Ben Slimane E., Sadok S.** Collagen from Cartilaginous Fish By-Products for a Potential Application in Bioactive Film Composite. *Mar. Drugs* 2018, 16(6), 1–19.
 23. **Ocak B.** Development of the mechanical and barrier properties of collagen hydrolysate/carboxymethyl cellulose films by using SiO₂ nanoparticles. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences* 2019; 25(3), 320–324.
 24. **Telis V., Wolf K., Sobral P.** Characterizations of Collagen Fibers for Biodegradable Films Production. In: 13th World Congress of Food Science & Technology. Les Ulis, France: EDP Sciences 2006.
 25. **Tenorová K., Masteiková R., Kostelanská K., Vetchý D.** Filmové krytí na rány s dexpanthenolem – příprava a hodnocení. *Čes. slov. Farm.* 2019; 68, 27–33.
 26. **Masteiková R., Vinklárková L., Muselík J., Vetchý D., Bernatonienė J., Sopuch T.** Vliv stupně substituce na nasákavost kyselelé formy karboxymethylcelulosity v podobě netkané textilie. *Čes. slov. Farm.* 2013; 62(2), 89–94.
 27. **Wang W., Liu Y., Liu A., Xiao J., Wang K., Zhao Y., Zhang S., Zhang L.** Fabrication of acid-swollen collagen fiber-based composite films: Effect of nano-hydroxyapatite on packaging related properties. *Int. J. Food Prop.* 2016; 20(5), 968–978.
 28. **Vinklárková L., Masteiková R., Foltýnová G., Muselík J., Pavloková S., Bernatonienė J., Vetchý D.** Film wound dressing with local anesthetic based on insoluble carboxymethylcellulose matrix. *J. Appl. Biomed.* 2017; 15(4), 313–320.
 29. **Vinklárková L., Masteiková R., Vetchý D., Doležel P., Bernatonienė J.** Formulation of novel layered sodium carboxymethylcellulose film wound dressings with ibuprofen for alleviating wound pain. *Biomed Res. Int.* 2015; 2015, 1–11.
 30. **Sussman G.** Technology update: Understanding film dressings. *Wounds International* 2010; 1(4), 23–25.
 31. **Dhivyaa S., Padmab V. V., Santhina E.** Wound dressings – a review. *BioMedicine* 2015; 5(4), 24–28.
 32. **Yao K., Bae L., Yew W. P.** Post-operative wound management. *Australian Family Physician.* 2013; 42(12), 867–870.
 33. **Metcalfe D. G., Haalboom M., Bowler P. G., Gamerith C., Sigl E., Heinzele A., Burnet M. W. M.** Elevated wound fluid pH correlates with increased risk of wound infection. *Wound Medicine* 2019; 26(1), 1–5.
 34. **Simi C. K., Abraham T. E.** Biodegradable biocompatible xyloglucan films for various applications. *Colloid. Polym. Sci.* 2010; 288(3), 297–306.