

Kombinované sieťovanie kolagénu

Bc. Paulína Rentková

Diplomová práca
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Paulína RENTKOVÁ**
Osobní číslo: **T13384**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Kombinované síťování kolagenu**

Zásady pro vypracování:

1. Popište způsoby síťování bílkovin.
2. Prostudujte podmínky a mechanismy síťování bílkovin (kolagenu) dialdehydem škrobu a dalším vybraným síťovadlem.
3. V praktické části se zaměřte na síťování kolagenní hmoty kombinací vybraných síťovadel, studujte vliv technologických podmínek při síťování na vlastnosti filmů.
4. Stupeň zesíťování vyhodnoťte vhodnými metodami (teplota smrštění, bobtnací testy, infračervená spektroskopie).
5. Zpracujte výsledky s využitím statistických technik, proveďte diskusi a zhodnoťte přínos práce.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Vědecké články z databází Web of Science, ScienceDirect a další; databáse elektronických knih (např. Knovel).

Blažej, A. et al. Technologie kůže a kožešin. Praha: SNTL, 1984.

Meissner, B., Zilvar, V. Fyzika polymerů: Struktura a vlastnosti polymerních materiálů. Praha: SNTL, 1987.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Pavel Mokrejš, Ph.D.

Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání diplomové práce:

16. ledna 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

15. května 2015

Ve Zlíně dne 2. března 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: RENTKOVÁ PAULIŇA


Obor: INŽENÝRSVÍ POLYMERŮ

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ 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 § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 13.4.2015



.....

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 nevdělečně 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). Odpírá-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

Cieľom tejto práce je overiť, akým spôsobom ovplyvňuje kombinácia siet'ovadiel dialdehyd škrobu a glutaraldehyd, a tiež kolagén-elastínové hydrolyzáty parametre filmu. Sledovanými parametrami u vytvorených kolagénových filmov sú teplota zmrštenia, botnacie skúšky, analýza metódou infračervenej spektroskopie s Fouriérovou transformáciou, a obsah sušiny. Pri riešení tejto práce sú použité faktorové pokusy a využíva sa sekvenčné dávkovanie siet'ovadiel do hmoty. Pripravuje sa k vzájomnému porovnaniu tiež kolagénny film bez siet'ovadla a film zosiet'ovaný len siet'ovacím činidlom glutaraldehyd. Uskutočňované sú experimenty typu 3^2 s centrálnym experimentom, a snahou je nahradiť siet'ovacie činidlo glutaraldehyd činidlom vhodným pre potravinárske použitie, z dôvodu zdravotného rizika, ktoré toto siet'ovadlo predstavuje pre ľudský organizmus.

Kľúčové slová: kolagén, dialdehyd škrobu, glutaraldehyd, kolagén-elastínové hydrolyzáty, siet'ovanie, filmy

ABSTRACT

The aim of this work is to verify, in which way cross linkers (dialdehyde starch and glutaraldehyde) and also collagen-elastin hydrolysates affect parameters of film. These following parameters were monitored: the shrinkage temperature, the swelling tests and dry basis content. Moreover the films were analyzed using FTIR spectroscopy. For the solution of this work factorial attempts and sequential dosing of cross linkers into the substance was used. Collagen film without any cross linker and a film, in which glutaraldehyde was used as a cross linker were prepared as referential ones. The experiments of type 3^2 with central experiment were realized, where the main goal was to replace the cross linking agent glutaraldehyde by other agents suitable for food applications. The reason is the health risk, which the cross linker glutaraldehyde represents.

Keywords: collagen, dialdehyde starch, glutaraldehyde, collagen-elastin hydrolysates, cross linking, films

Moje veľké poďakovanie patrí doc. Ing. Pavlovi Mokrejšovi, Ph.D za pomoc a množstvo venovaného času pri spracovávaní diplomovej práce, za vecné pripomienky a podnety. Taktiež za pomoc a ochotu chcem poďakovať pani laborantke Miroslavě Žaludkové.

Prehlasujem, že odovzdaná verzia diplomovej práce a verzia elektronická nahraná do IS/STAG sú totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČASŤ	11
1 SIEŤOVANIE BIELKOVÍN.....	12
1.1 SPÔSOBY SIEŤOVANIA	12
1.2 SIEŤOVACIE ČINIDLÁ	13
2 CHEMICKÉ SIEŤOVANIE KOLAGÉNU	14
2.1 SIEŤOVADLÁ POUŽÍVANÉ V MEDICÍNSKYCH A POTRAVINÁRSKYCH APLIKÁCIÁCH.....	14
2.2 EPOXIDOVÉ ZLÚČENINY.....	17
2.3 KARBODIIMIDY.....	18
2.4 KYSELINA SEBAKOVÁ.....	18
2.5 KOLAGÉN-ELASTÍNOVÉ HYDROLYZÁTY.....	20
2.5.1 Príprava čistého elastínu.....	20
2.5.2 Hydrolyzovaný elastín.....	21
2.6 DIALDEHYD ŠKROBU	22
3 INÉ SPÔSOBY SIEŤOVANIA KOLAGÉNU.....	24
3.1 FYZIKÁLNE SIEŤOVANIE	24
3.2 ENZÝMOVÉ SIEŤOVANIE	24
4 CHARAKTERIZÁCIA STUPŇA ZOSIEŤOVANIA BIELKOVINOVÉHO SUBSTRÁTU	25
4.1 BOBTNACIE TESTY	25
4.2 TEPLOTA ZMRŠTENIA.....	25
4.3 INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIA S FOURIÉROVOU TRANSFORMÁCIOU	25
4.4 TERMOANALYTICKÉ METÓDY	27
4.5 OBSAH VOENÝCH AMINOSKUPÍN.....	27
5 CIELE PRÁCE.....	28
II PRAKTICKÁ ČASŤ	29
6 MATERIÁLY A METÓDY	30
6.1 MATERIÁLY.....	30
6.2 METÓDY HODNOTENIA	30
6.3 ORGANIZÁCIA EXPERIMENTOV	33
7 SIEŤOVANIE KOLAGÉNEHO GELU KOMBINÁCIOU DIALDEHYDU ŠKROBU A GLUTARALDEHYDU	34
7.1 PLÁN EXPERIMENTOV	34

7.2	PRÍPRAVA FILMOV	34
7.3	VÝSLEDKY A DISKUSIE	36
7.3.1	Teploty zmrštenia filmov	36
7.3.2	Bobtnacie skúšky filmov	41
7.3.3	FTIR	49
7.4	ZHODNOTENIE VÝSLEDKOV	50
8	SIEŤOVANIE KOLAGÉNEHO GELU POMOCOU LABORATÓRNE PRIPRAVENÉHO DIALDEHYDU ŠKROBU A KOMERČNÉHO DIALDEHYDU ŠKROBU	51
8.1	PLÁN EXPERIMENTOV	51
8.2	PRÍPRAVA FILMOV	51
8.3	VÝSLEDKY A DISKUSIE	52
8.3.1	Teploty zmrštenia filmov	53
8.3.2	Bobtnacie testy filmov.....	57
8.3.3	Mechanické skúšky	62
8.3.4	FTIR	67
8.4	POROVNANIE VÝSLEDKOV SIEŤOVANIA OBIDVOMA TYPMI DAS.....	68
9	OVERENIE REAKCIÍ KOLAGÉNEHO GELU S HYDROLYZÁTOM KOLAGÉN-ELASTÍNOVÉHO TYPU	69
9.1	PLÁN EXPERIMENTOV	69
9.2	PRÍPRAVA FILMOV	69
9.3	VÝSLEDKY A DISKUSIE	70
9.3.1	Teploty zmrštenia filmov	70
9.3.2	Bobtnacie testy	74
9.3.3	Mechanické testy.....	78
9.3.4	FTIR	83
9.4	ZHODNOTENIE INTERAKCIÍ KOLAGÉNEHO GELU S KOLAGÉN-ELASTÍNOVÝMI HYDROLYZÁTMI.....	84
	ZÁVER	85
	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	87
	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK	95
	ZOZNAM OBRÁZKOV	96
	ZOZNAM TABULIEK	100

ÚVOD

Kolagén a jeho rôzne typy sú najvýznamnejšou skupinou proteínov, pretože predstavujú hlavné proteínové komponenty všetkých spojivových tkanív, ako sú koža, šľachy, väzy a chrupavky. Na kolagén kvôli jeho životnej roli v tkanivách sa dlho pozeralo ako na zložku majúcu potenciál ako základ pre biomateriály na použitie v mnohých oblastiach, predovšetkým tej medicínskej. Z objavenia veľkej rozmanitosti v kolagénnych typoch vyplynulo, že kolagén hrá oveľa viac než len štrukturálnu rolu v tkanivách. Toto lepšie pochopenie bunkovej a molekulárnej biológie kolagénu predstavuje širokú škálu nových možností pre biomateriály na báze kolagénu. Genetické inžinierstvo môže byť využité k vytvoreniu bud' nových kolagénnych materiálov alebo pochopeniu ďalších biologických faktorov, ktoré by spolu s kolagénom boli použité pri vzniku kompozitných materiálov.

Sieťovanie proteínov je jednou z najdôležitejších krokov pri príprave biomateriálov na báze kolagénu. Produktom ako sú scaffoldy či obalové materiály zabezpečuje zvýšené mechanické vlastnosti a enzýmovú rezistentnosť. Z dostupných možností sieťovania, a to bud' chemickou, fyzikálnou alebo enzymatickou cestou sa chemické sieťovanie javí ako najvšestrannejšie.

Aldehydy ako formaldehyd a glutaraldehyd sú v posledných rokoch najviac využívanými sieťovacími činidlami. Z nich stále napoužívanejším a najviac skúmaným sieťovacím činidlom je glutaraldehyd. Nevýhodou sieťovania chemickou cestou ale ostáva výskyt toxických zvyškov v biomateriáli, ktoré môžu spôsobovať potenciálne riziko v ľudskom organizme. Náhrada glutaraldehydu iným sieťovacím činidlom predstavuje preto riešený problém v praktickej časti diplomovej práce.

V literatúre je zmienených množstvo látok, ktoré sa používajú na sieťovanie biomateriálov, medzi inými aj kolagén-elastínové hydrolyzáty. Časť práce je preto venovaná skúmaniu interakcií medzi hydrolyzátmi tohto typu a kolagénom. Štúdium daných sieťovacích činidiel ako potenciálnej náhrady glutaraldehydu je vykonávané s cieľom získať kolagénny materiál s najlepšimi vlastnosťami pre danú aplikáciu.

I. TEORETICKÁ ČASŤ

1 SIEŤOVANIE BIELKOVÍN

Sieťovanie je proces chemického spojenia dvoch alebo viacerých molekúl kovalentnou väzbou. Modifikácia zahŕňa pripojenie alebo štiepenie chemických skupín, čím sa získa zmena rozpustnosti alebo inej vlastnosti pôvodnej molekuly. Pre celý súbor sieťovacích a modifikačných metód proteínov a ďalších biomolekúl je v biologickom výskume často používaný názov "biokonjugácia" alebo "biokonjugačná" technológia. Pretože štruktúra proteínu určuje jeho biologickú aktivitu, charakterizácia štruktúry proteínov zostáva dôležitou oblasťou výskumu. Proteíny sú relatívne jednoduché molekuly na manipuláciu, a sieťovanie proteínov a metódy chemickej modifikácie sa používajú pre určenie úlohy jednotlivých postranných reťazcov aminokyselín na fyzikálne, chemické a biologické vlastnosti proteínov. Napriek zložitosti štruktúry proteínov, vrátane zloženia s 20 rôznych aminokyselín, iba malý počet funkčných skupín proteínov predstavuje cieľ pre praktické metódy sieťovania. V skutočnosti existujú len štyri chemické skupiny, ktoré sú dôležité pre drvivú väčšinu procesov sieťovania a techník chemickej modifikácie:

- Primárne amíny (-NH₂): táto skupina existuje na N-konci každého polypeptidového reťazca a v postrannom reťazci lyzínu (Lys, K).
- Karboxylová skupina (-COOH): skupina na C-konci každého polypeptidového reťazca a v postranných reťazcoch kyseliny asparágovej (Asp, D) a kyseliny glutámovej (Glu, E).
- Sulfhydrylové skupiny (SH): skupiny nachádzajúce sa v postrannom reťazci cysteínu (Cys, C). Často v rámci sekundárnej alebo terciárnej štruktúry bielkoviny sú cysteíny spojené medzi svojimi postrannými reťazcami prostredníctvom disulfidových väzieb (-S-S-).
- Aldehydová skupina (-CHO): tieto aldehydové skupiny môžu byť vytvorené oxidáciou sacharidickej skupiny v glykoproteínoch.

Sieťovanie bielkovín sa používa na mnohé účely, medzi ktoré patrí napríklad stabilizácia terciárnej a kvartérnej štruktúry bielkovín na účely ich analýzy alebo imobilizácia protilátok alebo iných bielkovín pre účely testovania.

1.1 Spôsoby sieťovania

Biomateriály na báze živočíšnych bielkovín môžu byť sieťované s cieľom posilniť ich mechanické vlastnosti a enzymatickú odolnosť. Princíp reakcie sieťovania sa opiera o modifi-

káciu amidických a karboxylových skupín v rámci molekuly kolagénu, aby vznikla kovalentná väzba. Bolo vyvinutých niekoľko metód pre sieťovanie bielkovín. Tieto polymerizačné techniky sú rozdelené do troch typov: fyzikálne, chemické a enzymatické sieťovanie.

1.2 Sieťovacie činidlá

Sieťovacie činidlá sú buď homo- alebo hetero-dvojfunkčné činidlá s identickými alebo neidentickými reaktívnymi skupinami, ktoré umožňujú vytvorenie inter ako aj intra molekulárne zosieťovania. Homo-bifunkčné činidlá, špecificky reagujúce s primárnymi amino skupinami (tj. ϵ -aminoskupiny lyzínu) sa používajú vo veľkej miere, pretože sú rozpustné vo vodnom roztoku a môžu tvoriť stabilné inter a intra podjednotkové kovalentné väzby. Glutaraldehyd (GA), známe sieťovacie činidlo, býva použitý v celej rade aplikácií, kde je dôležité zachovanie štrukturálnej tuhosti proteínu. Homo-dvojfunkčné imidoestery, sú obzvlášť užitočné pri určovaní vzdialeností medzi spojenými zvyškami na povrchoch susedných podjednotiek v oligomérnych proteínoch. Medzi imidoestery patria napríklad dimethyl adipimidát (DMA), dimethyl suberimidát (DMS) a dimethyl pimelimidát (DMP). DMA a DMS sa používali na overenie kvartérnej štruktúry mnohých oligomérnych enzýmov (52). Sieťovacie činidlá sú vyberané na základe ich chemickej reaktivity (tj. špecificita pre určité funkčné skupiny), a iných chemických vlastností, ktoré umožňujú ich použitie v rôznych aplikáciách, sú to konkrétne:

- chemická špecifickosť, vrátane toho, či činidlo má rovnaké alebo rôzne reaktívne skupiny na každom konci (tj. má homobifunkčnú alebo heterobifunkčnú štruktúru?)
- rozpustnosť vo vode a permeabilita bunkovej membrány (tj. možno očakávať preniknutie činidla do buniek a/alebo zosieťovanie hydrofóbných proteínov v membránach?)
- spontánne reaktívne alebo foto-reaktívne skupiny (tj. bude reagovať činidlo, akonáhle je pridané do vzorky, alebo, môžu byť aktivované jeho reakcie v určitom čase) (13)

2 CHEMICKÉ SIEŤOVANIE KOLAGÉNU

Kolagén je hlavnou bielkovinou spojivových tkanív a hlavnou zložkou pokožky. Kolagén sa hojne používa ako biomateriál pre regeneráciu tkanív a implantácie (2).

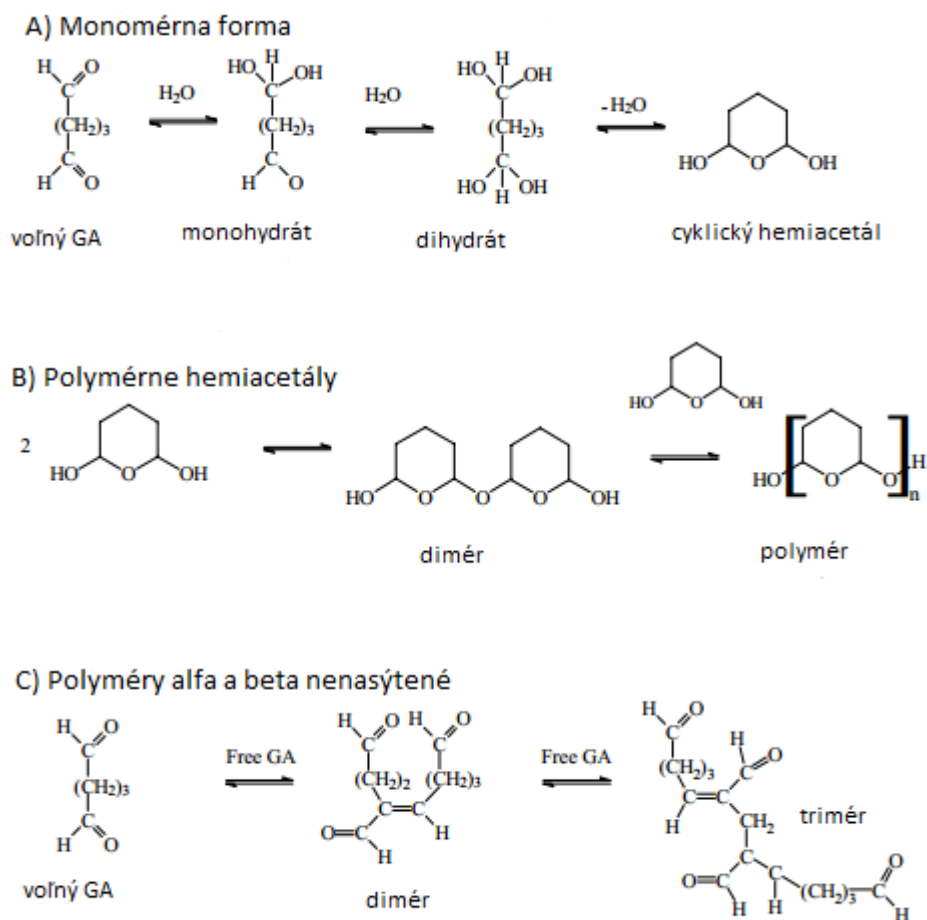
Chemické metódy používané na sieťovanie biomateriálov na báze kolagénu sú všestrannejšie. Používanie aldehydov ako sú formaldehyd a GA bolo značne rozšírené v posledných rokoch. GA je najviac používaná a študovaná chemická látka slúžiaca na sieťovanie biomateriálov na báze kolagénu (17-20). Ďalšia trieda chemických látok používaných na zvýšenie mechanickej a enzymatickej rezistencie kolagénnych scaffoldov sú karbodiimidy (21-24). Skupina izokyanátov, najmä hexametylén diizokyanáty sa tiež používa na sieťovanie kolagénnych biomateriálov (25,26). Genipin, chemické sieťovadlo odvodené z rastlinného zdroja, vykazuje zaujímavý potenciál nahradenia GA vďaka svojej nízkej toxicite (27, 28). Avšak všetky tieto chemické stabilizačné techniky zanechávajú potenciálne toxické zvyšky v biomateriáloch na báze kolagénu (29, 30). Alternatívou ku sieťovaniu kovalentnou väzbou je podporovať tvorbu iónových väzieb medzi kolagénovými molekulami. To je možné dosiahnuť použitím polykatiónových molekúl, ako je chitozan, ktorý vytvára iónové väzby medzi jeho početnými aminoskupinami a karboxylovými skupinami kolagénu. Tieto väzby sú dostatočne silné na to, aby stabilizovali štruktúru biomateriálu a vytvárali silnú mechanickú pevnosť (31, 32). Hlavnou výhodou tejto metódy je príprava biomateriálu v jednom kroku, kedy sa chitozan mieša s kolagénom pred lyofilizáciou a nie je nutná potreba ďalších vymývacích krokov, pretože chitozan nie je toxický (33).

2.1 Sieťovadlá používané v medicínskych a potravinárskych aplikáciách

GA

Najviac používané chemické činidlo využívané pri sieťovaní kolagénových tkanív je GA, ktorý poskytuje materiály s najvyšším stupňom zosieťovania v porovnaní s ďalšími známymi metódami sieťovania, ako je napríklad použitie formaldehydu, epoxy zlúčenín, cyanamidu alebo acyl azidovej metódy. Reakcie prebiehajúce počas sieťovania bielkovín s GA boli intenzívne skúmané, ale reakčný mechanizmus je veľmi komplexný a stále nie je ešte úplne pochopený (67). Vodné roztoky GA obsahujú zmes voľných molekúl aldehydu a mono- a dihydrátov GA, monoméne a polymérne hemiacetály (Obr. 1). Z dôvodu jedno-

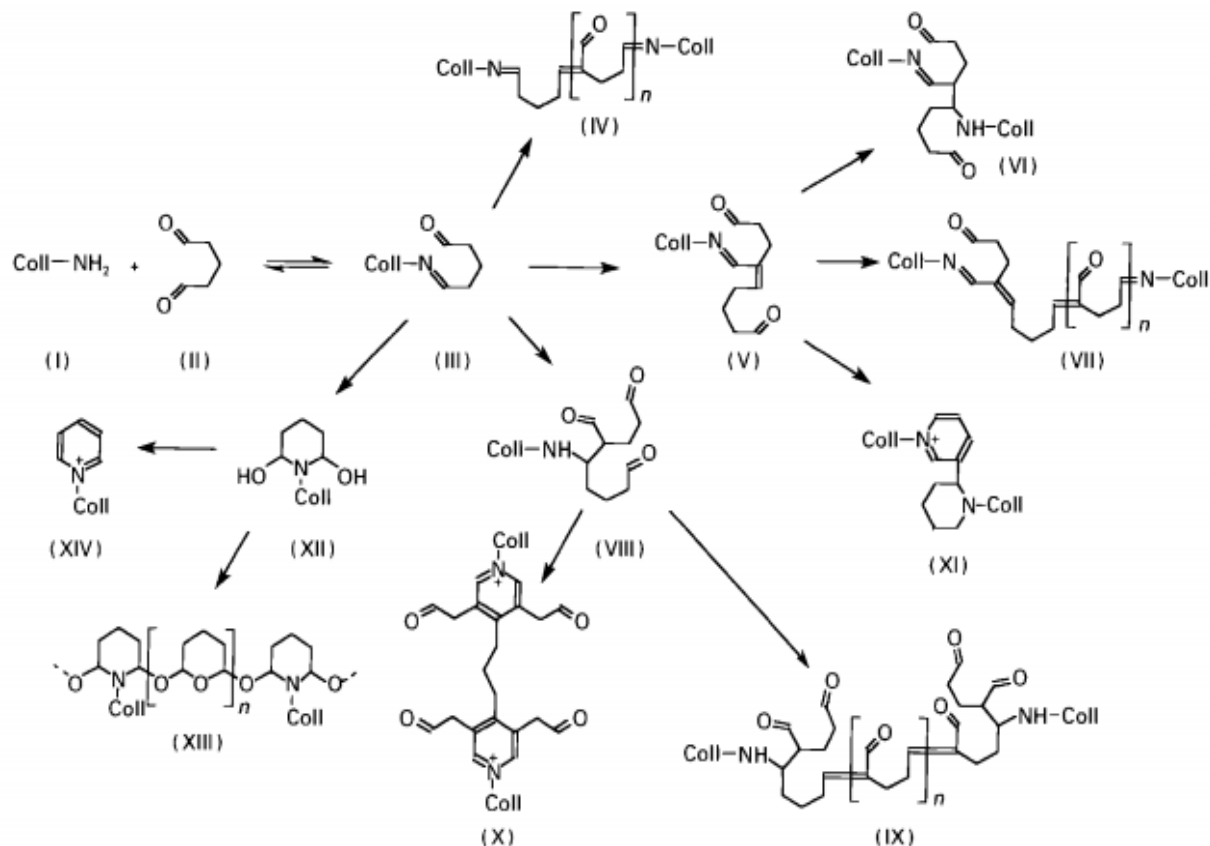
duchosti hydratácie a cyklizácie je koncentrácia voľných, monomérnych aldehydov v koncentrovaných, komerčných roztokoch obyčajne nízka. Avšak bolo pozorované, že koncentrácia monomérneho GA by mohla vzrásť procesom destilácie. Navyše sa odhaduje, že obsah polymérneho glutaraldehydu v reakčnom roztoku je pomerne nízky. GA roztoky môžu obsahovať rôzne produkty vyplývajúce z aldolovej kondenzácie počas skladovania, a popísané boli tiež cyklické GA oligoméry majúce trioxanovú štruktúru (68).



Obr. 1 Možná štruktúra GA vo vodných roztokoch (66)

Bolo tiež študované vytváranie Schiffových báz (-N=CH-) počas sieťovania kolagénu získaného z ovčích koží s GA, ich stabilita a reaktivita. Všetky dostupné voľné amino skupiny reagovali s aldehydovou skupinou GA, pričom vytvorili Schiffove báze behom piatich minút od začiatku reakcie za daných podmienok (0,5 % GA). Predtým, než boli vytvorené priečne väzby, boli pôvodne prítomné hydrolyzovateľné Schiffove báze, ktoré sa stabilizovali ďalšou reakciou s molekulou GA. Zvýšenie teploty zmrštenia z 56 °C nesieťovaného kolagénu na 78 °C kolagénu sieťovaného GA bolo dosiahnuté po 1 hodine. Bolo zistené, že

po 24 hodinách sieťovania priemerne pripadne na jednu reaktívnu amino skupinu tri molekuly GA. Nebolo pozorované žiadne zvýšenie pevnosti v ťahu materiálov, čo môže byť výsledkom tvorenia väzieb skôr v rámci vlákien než medzi vláknami (53).



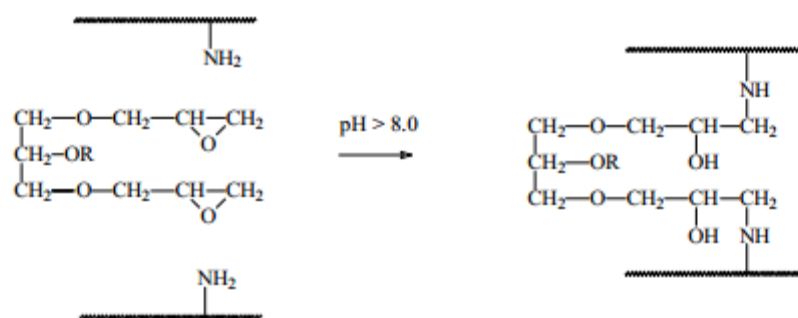
Obr. 2 Tvorenie Shiffových báz, ich stabilita a reaktivita počas sieťovania. Vzťah medzi stupňom zosieťovania a počtom voľných amino skupín prítomných v polypeptidovom reťazci (53)

GA je bežne používané sieťovacie činidlo na výrobu biomateriálov na báze kolagénu (54-57). V sieťovaní môže byť zahrnutých mnoho rôznych reakčných ciest ako ukazuje Obr. 2. Problémy, ktoré nastávajú pri popisovaní priebehu sieťovania a neľahká charakterizácia vytvorených produktov zabraňuje kompletnému objasneniu reakčného mechanizmu. Navyše, bolo naznačené, že v dôsledku použitia roztoku GA technickej čistoty je ťažké porovnávať výsledky získané rôznymi výskumnými skupinami (58). Všeobecne sa predpokladá, že sieťovanie kolagénu pomocou GA (Obr. 2) sa odohráva prostredníctvom aldehydických skupín GA (II) s ϵ -amino skupinami lyzínu alebo hydroxylyzínu (I) (59-61). Táto reakcia vedie k vytvoreniu prechodných Shiffových báz (III). Cheung et. al. naznačujú, že Shiffové bázy sú stabilné za určitých podmienok sieťovania a sieťovanie zahŕňa vytváranie

GA polymérov v dôsledku reakcie aldolovej kondenzácie (57, 61). Navyše, tvorba α - β nenasýtených prechodných Shiffových báz (V) nasledovaná adíciou amino skupiny kolagénu s nenasýtenou skupinou vedie k vytvoreniu sieťovania (V, VI). Ďalej, tvorba sieťovania je možná reakciou amino skupín s voľnými aldehydickými skupinami alebo voľnými aldehydickými skupinami, ktoré zostávajú po aldolovej kondenzácii (V, VII). Iní tvrdia, že Shiffove bázy sú medziprodukty, ktoré ďalej reagujú počas sieťovania (62-64). Vytvára sa sekundárny amín (VIII) a po aldolovej kondenzácii a následnej reakcii s amino skupinami kolagénu je možné vytváranie alifatických sieťovaní (IX). Ďalej, po reakcii VIII s ďalšou molekulou GA a uzavretím kruhu, môže byť vytvorený šesť-členný dihydropiridín (9, 11). Oxidácia dihydropiridínového typu priečných väzieb kyslíkom prítomným v sieťovaom roztoku môže mať za následok tvorbu substituovaného kvartérneho piridínového typu priečných väzieb (X) (65).

2.2 Epoxidové zlúčeniny

Epoxidové zlúčeniny boli značne používané v poslednej dekáde na stabilizáciu materiálov na báze kolagénu. Všeobecne sú aplikovateľné zmesi bi- a trifunkčných glycidyl éterov na základe glycerolu. Navyše môže byť použitá široká škála sieťujúcich činidiel obsahujúcich multifunkčné epoxidy. Prevažne sa vyskytuje reakcia s amino skupinami hydroxylyzínu, ako ukazuje Obr. 3 (66). Navyše, epoxidové zlúčeniny môžu reagovať so sekundárnymi amino skupinami histidínu. Ďalej, vyskytujú sa reakcie s karboxylovými skupinami kyseliny aspartámovej a glutámovej a tým sa zvyšuje mnohostrannosť sieťovania. Vo všeobecnosti sú materiály sieťované v zásaditom roztoku ($\text{pH} > 8,0$) obsahujúcom relatívne vysoké koncentrácie epoxidových zlúčenín pohybujúcich sa medzi 1 až 5 wt%. Bola získaná nižšia teplota zmrštenia v porovnaní s materiálmi sieťovanými GA, ale in-vitro stabilita sieťovaného materiálu bola rovnaká (66).



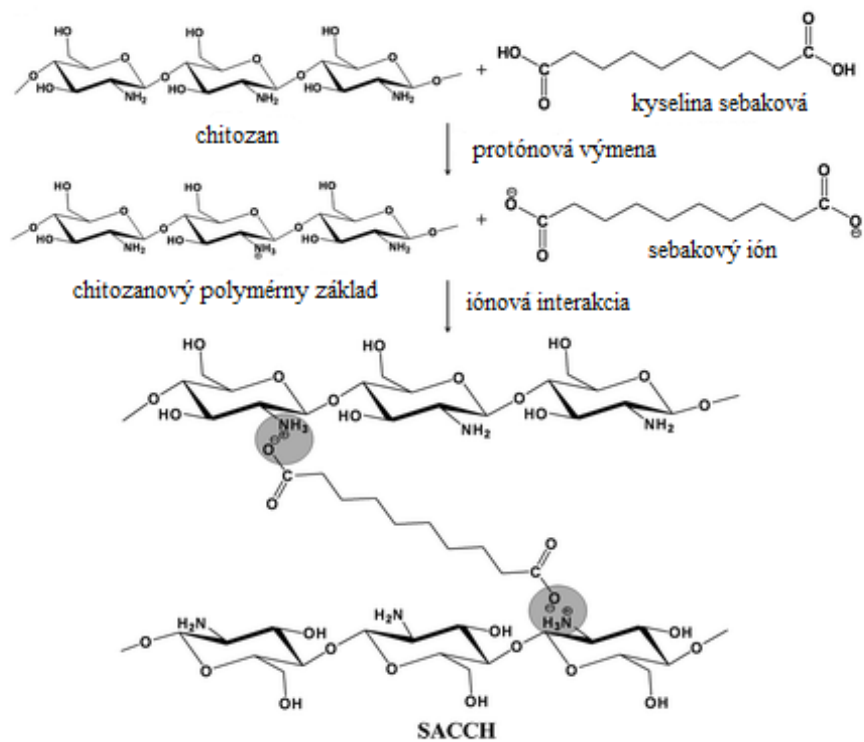
Obr. 3 Schématické znázornenie sieťujúcej reakcie epoxidovej zlúčeniny s kolagénom (66)

2.3 Karbodiimidy

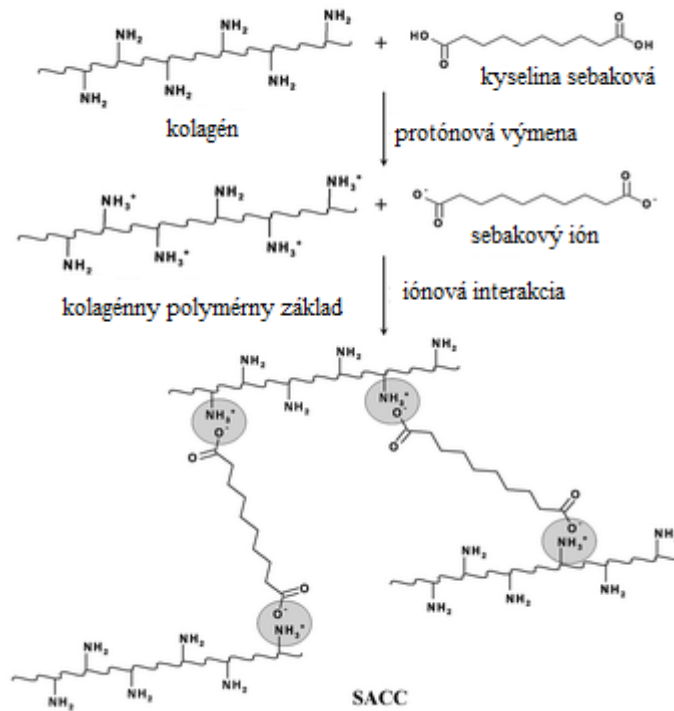
Sieťovanie pomocou karbodiimidového činidla je metóda, pri ktorej sa vytvárajú priečne väzby medzi karboxylovou skupinou a amino skupinami, bez toho, aby bolo toto činidlo samo začlenené. Na sieťovanie kolagénu je často používaný vo vode rozpustný 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)karbodiimid (EDC).

2.4 Kyselina sebaková

Pri príprave akéhokoľvek scaffoldu sa za účelom rýchlejšieho procesu vyžaduje, aby sa základná zložka/polymer nachádzal v rozpustnej forme. Preto v prípade chitozanu a kolagénu, boli pre rozpúšťanie použité obyčajne kyselina octová a kyselina mravčia (77). Zmena protónov medzi -COOH skupinami kyseliny a voľnými -NH₂ skupinami chitozanu a kolagénu mohla byť dôvodom pre rozpúšťanie v zmienených kyselinách. Z toho dôvodu sa predpokladalo, že ako kyselina octová tak aj kyselina sebaková je schopná dodať protóny pre rozpustenie chitozanu alebo kolagénu typu I. Navyše, podobne ako pri interakcii chitozanu s tripolyfosfátom sodným, môže kyselina sebaková reagovať s obidvoma prírodnými polymérmi prostredníctvom iónových interakcií. Kvôli zmienenej protónovej interakcii sa chitozan a kolagén typu I rozpúšťajú v prítomnosti sebakovej kyseliny vo vode. Nasledujúca schéma chemických reakcií pre lepšie porozumenie znázorňuje povahu protónovej zmeny medzi sebakovou kyselinou s chitozanom a s kolagénom.



Obr. 4 Možný reakčný mechanizmus medzi chitózom a kyselinou sebakovou



Obr. 5 Možná reakcia medzi kolagénom a kyselinou sebakovou (79)

Kvôli vyššie zmieneným interakciám, boli obidva prírodné polymery úplne rozpustené vo vode v prítomnosti kyseliny sebakovej (78).

2.5 Kolagén-elastínové hydrolyzáty

Proteín elastín je hlavnou štruktúrnou zložkou tých tkanív u stavovcov, ktoré vyžadujú rýchle rozšírenie a kompletne navrátenie do pôvodného stavu (napríklad aorta). Je iba malou súčasťou ďalších spojivových tkanív (napríklad pľúc, kože, šliach a voľných spojivových tkanív). Aj napriek jeho nízkemu obsahu v pľúcach a koži, hrá nepostrádateľnú rolu v zachovaní elasticity a ťahovej sily v týchto tkanivách. V súvislosti s abnormalitami elastínu je spojených množstvo kožných chorôb (75). Kolagén a elastín sú vynikajúce materiály pre bio-medicínske aplikácie. Elastín je vysoko chemicky stabilná (nerozpustná) štruktúrna bielkovina, a preto sú pre bio-medicínske aplikácie vhodnejšie elastínové hydrolyzáty. Pokiaľ je materiál pre praktické aplikácie vyrobený iba na báze elastínových hydrolyzátov, je vysoko elastický, ale na druhú stranu má horšie mechanické vlastnosti. Vhodnou cestou pre bio-materiály sa javí kombinácia kolagénu a elastínového hydrolyzátu (83, 84). Sionkowska A a kol. zmieňujú, že elastínový hydrolyzát je dobré sieťovadlo pre kolagén (85).

2.5.1 Príprava čistého elastínu

Čistenie je dôležité pri štúdiu vplyvu extracelulárneho elastínu vo vláknitej forme (obsahujúceho jeho prirodzené sieťujúce časti ako (iso)dezmozín) bez včlenenia artefaktov do systému zapríčineného nečistotami. V aplikovanom výskume, ako je používanie elastínu v biomateriáloch a tkanivovom inžinierstve, môžu byť čisté nedotknuté vlákna použité pri príprave bioscaffoldov a tým docielené vyhnutie sa nechceným imunologickým reakciám na kontaminácie a umožnenie štúdií odpovedí organizmu na jeden jediný komponent: elastín. V skutočnosti môže byť elastín rozpustený iba po hydrolýze určitých peptidových väzieb. Táto nerozpustnosť je často využívaná pri izolácii elastínu z tkanív. Už dlho sa ako zdroj nerozpustného elastínu používa hovädzí a konský *ligamentum nuchae*, pretože veľký percentuálny podiel jeho sušiny tvorí elastín. Lansing a kol. izolovali elastín z tejto časti použitím 0,1M NaOH pri 95 °C po dobu 45 minút. Rasmussen a kol. použili čistiacu procedúru založenú na využití autoklávy pri 120 °C po dobu 5 hodín. John a Thomas získali elastín z aorty a pľúcnych tkanív oveľa miernejšou procedúrou využitím extrakčných kro-

kov s NaCl, organických rozpúšťadiel, kolagenázy a trypsínu. Elastín bol tiež izolovaný z ďalších tkanív ako aorta, pľúca a koža. Výhoda čistého elastínu je tá, že môže byť formovaný do rôznych tvarov. Čistý elastín umožňuje vytvorenie veľmi dobre vymedzených scaffoldov, napríklad scaffoldy zložené z elastínu a kolagénu. Nevýhodu prídavku elastínu je zníženie celkovej pevnosti a tuhosti scaffoldov. Určitý typ kolagénu sa zdá byť nevyhnutný pre získanie súvislého scaffoldu. Vlastnosti scaffoldov môžu byť kontrolované množstvom rozličných parametrov, ako je napríklad pomer kolagénu a elastínu, rozsah chemického zosieťovania a včlenenie ďalších komponent, ako glykozamínoglykany a rastové faktory (72).

2.5.2 Hydrolyzovaný elastín

Hydrolyzovaný elastín (známy tiež ako rozpustný elastín alebo elastínové peptidy) je takisto používaný v biomateriáloch. Najčastejšie metódy na prípravu rozpustného elastínu sú úprava s 0,25M kyseliny etándiovej pri teplote 100 °C a 1M KOH v 80% roztoku etanolu pri 37 °C. Proteolytické enzýmy schopné degradácie elastínových vlákien, zahŕňajúce elastázy serínového typu z leukocytov a niekoľko metallo-elastáz z monocytov tiež vedú k príprave rozpustného elastínu. Výnimočne je používaný pepsín v 0,5M kyseline octovej pri teplote 37 °C a 0,5M HCl pri 80 °C. Všetky tieto metódy sú založené na hydrolýze niekoľkých peptidových väzieb nerozpustného elastínu (72).

Prípravu kolagénnych scaffoldov na báze kolagénu (respektive želatiny) s prídavkom elastínu a sieťovaných carbodiimidom popisuje tiež Grover a kol. (74). Sledoval sa vplyv prídavku kolagénu typu I, respektíve želatiny na jednej strane a elastínu na strane druhej na vlastnosti scaffoldov (morfológia, mechanické vlastnosti, bobtnanie, degradácia, adhézia na bunky). Scaffoldy založené na želatine majú nižšiu tuhosť a rýchlejšie degradujú, v porovnaní so scaffoldami na báze kolagénu. Autori zmieňujú tiež reakcie samotnej želatiny či kolagénu s rozpustným elastínom. Grover a kol. vyvodzujú domnienku, že nerozpustný elastín (rozdrtенý na prášok, vlákna dlhé $\approx 100 \mu$) lepšie reaguje s kolagénom, než rozpustný elastín. Naopak, pri reakciách s želatinou je vhodnejšie použiť rozpustný elastín (73). Rovnaký predpoklad interakcií uvádza tiež Byju a kol. (74).

2.6 Dialdehyd škrobu

V súčasnej dobe vzrástol veľký záujem o vyvíjanie materiálov vyrobených z prírodných polysacharidov, ktoré nezaťažujú životné prostredie. Škrob získaný z mnohých druhov plodín je jedným zo sľubných surovín pre prípravu biodegradabilných materiálov. Ako multi-hydroxylový polymér, obsahuje škrob množstvo intermolekulových a intramolekulových hydrogékových väzieb a vyskytuje sa v granulovanej štruktúre s približne 15-45 % krystalinity. Dialdehyd škrobu (DAS) je používaný ako sieťovacie činidlo, ktorý je vyrábaný kontrolovaným oxidatívnym rozrušovaním C-2 a C-3 väzieb anhydroglukózových jednotiek pôvodného škrobu (80).

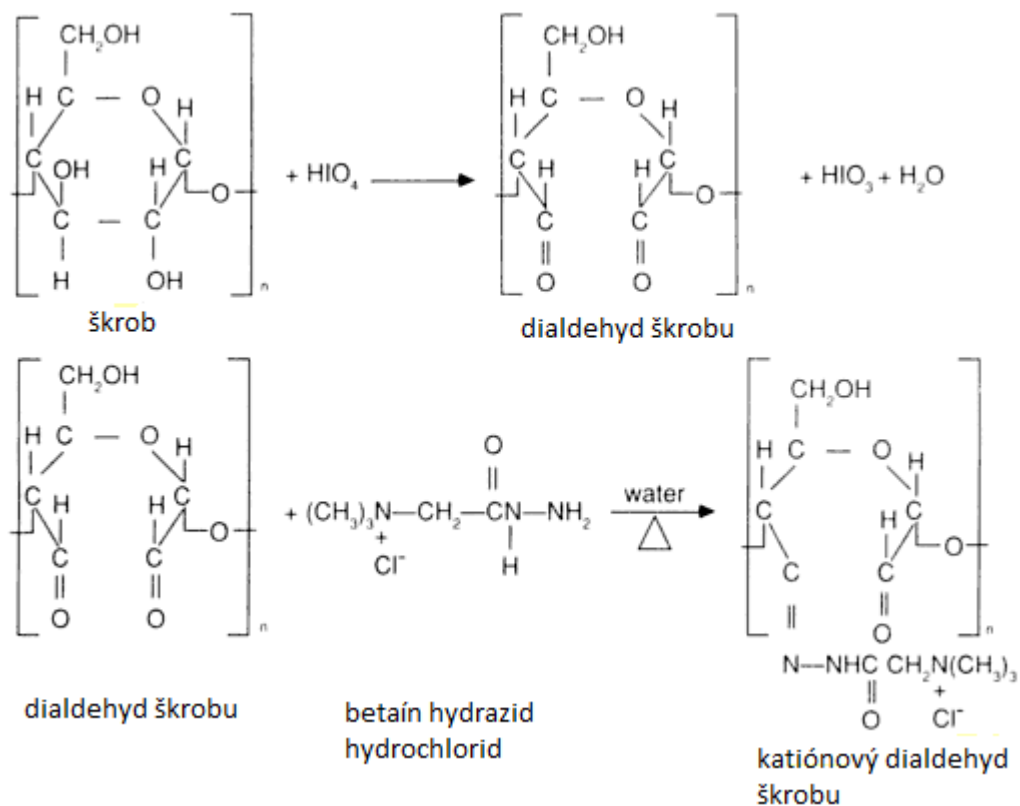
Aldehydy ako formaldehyd, GA a glyoxal podporujú inter- a intramolekulárne sieťovanie v proteínoch. Avšak kvôli vlastnej toxicite týchto aldehydov je ich použitie v zlepšovaní fyzikálnych vlastností proteínových filmov limitované. Naproti tomu DAS vykázal nízku toxicitu pri použití na krysách a to pľúcnou, orálnou aj dermálnou cestou. Gennadios a kol. informovali, že DAS by mohol byť použitý ako sieťovacie činidlo pre polymerizáciu vaječného bielka počas prípravy filmu. V ich štúdií boli filmy z vaječného bielka pripravené tepelnou metódou s alkalickou úpravou s tým, že DAS bol pridaný po upravení pH na 11,25 a následným zahriatím na teplotu 40 °C po dobu 20 minút. Ukázalo sa, že DAS zapríčiňuje tvorbu sieťovacích väzieb v proteíne vaječného bielka, a to úmerne s jeho zvyšujúcim sa množstvom (81).

Syntéza dialdehydu škrobu

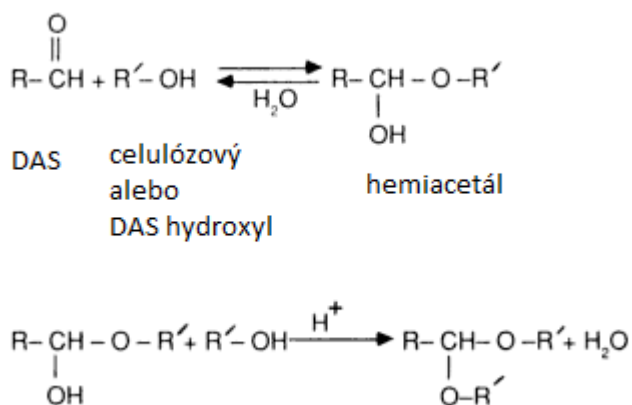
Jiguo a kol. pri syntéze dialdehydu škrobu postupovali tak, že jodistan sodný (0,7 mol/l) bol upravený na pH = 4,0 použitím kyseliny sírovej. Následne sa pridal zemiakový škrob za energického mechanického miešania. Molárne pomery medzi jodistanom sodným a škrobom boli postupne 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 0,9 a 1,1. Reakcia sa určiavala pri teplote 37 °C po dobu 4 hodín. Vzniknutá riedka kaša bola prefiltrovaná a produkt premytý destilovanou vodou. Za účelom odstránenia vody bol potom použitý bezvodý etanol. Prášok sa sušil pri teplote 50 °C 8 hodín. Týmto postupom sa získali rôzne druhy DAS s odlišnými obsahmi aldehydických skupín (80).

Na Obr. 6 je znázornená schéma prípravy a modifikácie dialdehydu škrobu. Využitie dialdehydu škrobu ako sieťujúceho činidla je rovnako aj v papierenskom priemysle, kde sa

sieťovaním celulóзовých hydroxylov získava väčšia pevnosť papiera. Mechanizmus takejto sieťujúcej reakcie je znázornený na Obr. 7.



Obr. 6 Príprava dialdehydu škrobu a jeho modifikácia v katiónový produkt



Obr. 7 Sieťujúca reakcia dialdehydu škrobu (82)

3 INÉ SPÔSOBY SIEŤOVANIA KOLAGÉNU

3.1 Fyzikálne sieťovanie

Fyzikálne sieťovanie spočíva v ožiarení ultrafialovými lúčmi (UV) alebo použitia tepelných zdrojov, čím dôjde k polymerizácii v kolagéne. UV žiarenie a dehydrotermálna technika (DHT) vykazujú podobné výsledky pri použití za účelom sieťovania kolagénnych biomateriálov. Obe techniky spôsobujú zvýšenie pevnosti v ťahu a fragmentáciu v molekulárnej štruktúre kolagénu (14). Avšak UV ožarovanie je viac časovo efektívnejšie v porovnaní s dehydrotermálnou technikou, pretože trvá len 15 minút, zatiaľčo pri DHT je to 3 až 5 dní. Kolagénne biomateriály sieťované pomocou UV žiarenia predstavujú tiež vhodnejšie materiály vzhľadom k zvýšeniu enzymatickej rezistencii (15). Okrem toho, UV ožarovanie bolo v poslednej dobe optimalizované za účelom zníženia fragmentácie kolagénu použitím glukózy v sieťovacom procese (16). Avšak, UV žiarenie je účinné iba pre tenké a/alebo transparentné biomateriály, čo dovoľuje UV žiareniu prejsť ich štruktúrou (17-20).

Ako fyzikálne sieťovanie môže byť použité gama žiarenie (3, 4). Avšak energia gama žiarenia môže poškodiť prirodzenú štruktúru proteínu. V porovnaní s UV žiarením je UV žiarenie menej škodlivé pre proteín než gama žiarenie, ale UV svetlo môže tiež poškodiť štruktúru proteínu (5-7). Chemické sieťovanie môže dávať vysoko zosieťovaný materiál vo veľmi krátkom čase (8).

3.2 Enzýmové sieťovanie

Enzýmové sieťovacie činidlá, ako je napríklad transglutamináza, môžu byť použité pre zvýšenie pevnosti v ťahu a enzymatickej rezistencie biomateriálov na báze kolagénu (34-36).

Hlavnou výhodou využívania biologickej polymerizačnej techniky je to, že žiadne chemické zvyšky alebo vedľajšie produkty nezostávajú v štruktúre biomateriálu, a preto sa eliminuje riziko vyvolania cytotoxického účinku. Tiež môže byť pridaný nadbytok biomolekúl k roztoku kolagénu pre výrobu biomateriálov na báze kolagénu. Tieto biomolekuly, hlavne elastín a chitozan sa pridávajú s potenciálom zvýšiť mechanickú pevnosť (37-43).

4 CHARAKTERIZÁCIA STUPŇA ZOSIEŤOVANIA BIELKOVINOVÉHO SUBSTRÁTU

4.1 Bobtnacie testy

Bobtnacie testy sa vykonávajú inkubovaním suchých vzoriek v destilovanej vode či v inom vhodnom prostredí (pufry). Zbobtnalé vzorky sú následne vytiahnuté, prebytočná voda vysušená papierom a zistená hmotnosť vzoriek. Na základe rozdielu hmotností je vypočítaný bobtnací pomer ako:

$$SR = (m_s - m_d) / m_d$$

kde: m_s - hmotnosť nabobtnalej vzorky, m_d - hmotnosť suchej vzorky (69)

4.2 Teplota zmrštenia

Kombinovaným vplyvom teploty a vody dochádza k tomu, že sa usporiadaná štruktúra kolagénu mení na neusporiadanú. Dochádza k uvoľneniu vodíkových mostíkov medzi jednotlivými reťazcami v trojitej závitnici kolagénu a molekuly kolagénu sa zmršťujú približne na jednu tretinu svojej dĺžky. Teplota zmrštenia je teda makroskopickým prejavom denaturácie a poskytuje tak základnú predstavu nielen o stupni poškodenia, ale aj napríklad o spôsobe činenia (vnesením priečnych väzieb do štruktúry kolagénu behom činenia sa zvýši teplota zmrštenia z 65-70 °C až na 75-80 °C pri triesločinených a až na 95-105 °C pri chromočinených usniach). Stárnutím kolagénových materiálov dochádza ku znižovaniu ich teplôt zmrštenia. Teploty zmrštenia okolo 40 °C vykazujú veľmi degradované historické usne (76). Vykonanie skúšky stanovuje norma ČSN EN ISO 3380 Usne – fyzikálne a mechanické skúšky – Stanovenie teploty zmrštenia do 100 °C.

4.3 Infračervená spektrometria s Fouriérovou transformáciou

Infračervená spektroskopia patrí do skupiny nedeštruktívnych analytických metód, kedy skúmaná vzorka nie je analýzou nijako poškodená, a napriek tomu poskytuje informáciu o svojom zložení. Získané hodnoty vibračných energií súvisia s pevnosťou chemických väzieb a tiež s molekulovou geometriou a hmotnosťami jadier, teda s molekulovou štruktúrou. Tieto skutočnosti predurčujú infračervenú spektroskopiu ako vynikajúcu experimentálnu techniku, ktorá vedľa kvantitatívnej a kvalitatívnej analýzy hrá dôležitú rolu pri

výskume molekulovej dynamiky, chemických vlastností molekúl, vplyvu prostredia na študované molekuly a mnoho iných oblastí (70, 71).

Merané závislosti

Infračervené spektrum látky predstavuje závislosť prepustnosti (transmitancie) T , absorpcie A , prípadne reflektancie R na vlnočte (cm^{-1}) či na vlnovej dĺžke (λ , μm).

Takéto spektrum má z hľadiska kvalitatívnej analýzy látok dve významné vlastnosti:

1. Vo svojich detailoch je charakteristické pre jednotlivé látky natoľko, že prakticky neexistujú dve zlúčeniny, ktoré by mali úplne zhodné IČ-spektrum. Pomocou IČ spektra môžeme definovať danú látku pri využití knižníc spektier.
2. Na druhej strane sa jednotlivé funkčné skupiny prejavujú v spektre podobne, a tak je možné rozborom infračerveného spektra zistiť prítomnosť istých funkčných skupín v molekule a tiež vylúčiť výskyt iných funkčných skupín.

Pre identifikáciu funkčných skupín v molekule sú potrebné tabuľky vlnočtov charakteristických vibrácií. V tabuľkách sú pre každú funkčnú skupinu na základe empirickej skúsenosti uvedené intervaly vlnočtov, v ktorých sa daná funkčná skupina musí prejavovať absorpciou, a ďalej tiež relatívna intenzita príslušného absorpčného pásu. Šírka intervalu vlnočtov je závislá na ovplyvnení vibrácie danej funkčnej skupiny zvyškom molekuly. Niektoré skupiny sú charakterizované niekoľkými absorpčnými pásmi, iné pásmom jediným. Ak má byť daná funkčná skupina v molekule preukázaná, musia byť nájdené všetky absorpčné pásy, ktoré ju charakterizujú, a mali by korešpondovať aj intenzity jednotlivých absorpčných pásov (v prípade intenzít je nutné rešpektovať pomer intenzít, ich absolútna hodnota je totiž závislá na zastúpení skupín v molekule). Naopak z neprítomnosti pásov v určitých oblastiach je možné prítomnosť niektorých funkčných skupín alebo väzieb vylúčiť.

Pri meraní na infračervenom spektrometri môžeme kvalitu spektra, a teda tiež informácie, ktoré nám toto spektrum poskytne, veľmi významne ovplyvniť ako vonkajšími podmienkami, za ktorých spektrum meriame, tak aj nastavenými parametrami prístroja. Pri nevhodne upravenej vzorke alebo chybnom nastavení prístroja môže byť výsledné spektrum úplne znehodnotený výskytom deformovaných pásov a artefaktov (70, 71).

4.4 Termoanalytické metódy

TG (Thermogravimetry), DTG (Differential thermogravimetry), DTA (Differential thermal analysis) sú používanými metódami na skúmanie tepelnej degradácie v statickej vzduchovej atmosfére materiálov na báze kolagénu (ako sú napríklad materiály z rôznych druhov kolagénu, súčasné vyrábané pergameny a usne, a historické usne) (86). Metódy tepelnej analýzy (DSC (Differential scanning kalorimetry), TG, DTMA (Dynamic mechanical thermal analysis) a termomikroskopia sú používané iba posledných 15 rokov v skúmaní usní, pergamenu a papiera. Vývoj analytických metód okrem iného zlepšuje proces identifikácie historických predmetov vyrobených z kolagénnych materiálov (87-93).

DSC

DSC meranie kolagénových materiálov môže byť vykonávané buď na vzduchu alebo vo vode. Proces denaturácie sa odohráva pri nižšej teplote vo vode než vo vzduchu. Pomocou DSC kalorimetra sa zisťuje tepelný tok vs. teplota. Pre každú vzorku sú zaznamenané dve DSC krivky, a to krivka odpovedajúca denaturácii vo vzduchu (s vodou absorbovanou vzorkou zo vzduchu) a ďalšia krivka odpovedajúca denaturácii vo vode. Zahrievanie vzorky je vykonávané v cylindricky tvarovanom platinovom kelímku a α - Al_2O_3 je použitý ako referenčný materiál (86).

4.5 Obsah voľných aminoskupín

Obsah primárnych amino skupín zosieťovaných a nezosieťovaných vzoriek, vyjadrený ako počet voľných amino skupín prítomných na 1000 aminokyselín ($n/1000$) sa určuje použitím 2,4,6-trinitrobenzénsulfónovej kyseliny (94). K vzorke o hmotnosti 2-4 mg sa pridáva postupne 1,0 ml 4% (w/v) roztoku NaHCO_3 a 1,0 ml čerstvo pripraveného 0,5% (w/v) roztoku 2,4,6-trinitrobenzénsulfónovej kyseliny v destilovanej vode. Po reakcii trvajúcej 2 h sa pridá 3,0 ml 6 M HCl a teplota vzrastie na 60 °C. Rozpustenie vzorky je dosiahnuté v priebehu 90 minút. Výsledný roztok je zriedený pomocou 5,0 ml destilovanej vody a je zmeraná absorbanca meraná pri 345 nm. Kontrolná vzorka sa pripravuje aplikovaním rovnakej procedúry s rozdielom, že HCl sa pridá pred pridaním 2,4,6-trinitrobenzénsulfónovej kyseliny. Obsah voľných aminoskupín je vypočítaný použitím molárneho absorpčného koeficientu $14.600^{-1} \text{ mol.cm}^{-1}$ pre trinitrofenyllyzín (95). Extrakcia hydrolyzovaného roztoku vzorky pomocou dietyléteru neovplyvňuje meranie absorbancie a preto je vynechávaná.

5 CIELE PRÁCE

K sieťovaniu sa bežne používa ako sieťovacie činidlo glutaraldehyd pre svoje veľmi dobré sieťovacie vlastnosti. Avšak sa táto chemická látka zároveň javí ako potenciálne toxická pre ľudský organizmus. Snahou bolo teda nahradenie čo najväčšieho množstva glutaraldehydu iným sieťovacím činidlom.

Praktická časť diplomovej práce bola rozdelená do troch častí. Cieľom práce bolo overiť, akým spôsobom ovplyvňujú testované sieťovadlá parametre filmov a tiež overiť, či dochádza k nejakým interakciám medzi kolagénym gelom a použitým hydrolyzátom.

V prvej časti bol ako sieťovadlo použitý dialdehyd škrobu získaný od komerčného dodávateľa v kombinácii s glutaraldehydom.

V druhej časti diplomovej práce bolo cieľom porovnať sieťujúci účinok komerčného dialdehydu škrobu s dialdehydom škrobu pripraveným v laboratórnych podmienkach. Dôvodom je skutočnosť, že cena komerčne dostupného dialdehydu škrobu je vysoká, a preto bol výskumnou skupinou KAŘT FAI v Zlíně pripravený dialdehyd škrobu v laboratórnych podmienkach za nižšie náklady.

V tretej praktickej časti diplomovej práce bol použitý hydrolyzát kolagén-elastínového typu. Cieľom bolo overiť, ako hydrolyzát interaguje s kolagénym gelom.

II. PRAKTICKÁ ČASŤ

6 MATERIÁLY A METÓDY

6.1 Materiály

- hodinové sklíčko, oceľový valček, plastová fólia, PMMA doštičky, uzatvárateľný plastový sáčok, pipeta 1 ml, kadička 5 ml, nožnice, pravítko, pinzeta, malé sitko
- predvážky (KERN 440-47), analytické váhy (KERN 770), magnetické miešadlo s ohrevom, chladnička (ThompsonCALEX), sušiareň (memmert), aparátúra na test teploty zmrštenia (IKA[®] RCT basic, aparátúra na test bobtnania (IKA[®] C-MAG HS7, FTIR spektrometer (FTIR[™] rady Genesis, ATI Mattson), hrúbkomer (SOMET), pH meter (MultiCal[®]), fotoaparát (Cannon)
- destilovaná voda, 3% roztok HCl

Kolagénny gel. Kolagénny gel pripravený zo zamše hovädzieho dobytku. Dodávateľ: VUP Medical, Brno, Č.R. Bielkovinový gel sa skladoval v chladničke pri 6 ± 1 °C. Charakteristika: 7,0 % obsah sušiny, obsah popola 1,0 %.

Komerčný dialdehyd škrobu (DAS-KOM). Dodávateľ: Monomer Polymer and Dajac Laboratories, Inc., PA, U.S.A. Charakteristika: CAS No. 9047-50-1, Mr 118,3 Da, biely prášok.

Laboratórne pripravený dialdehyd škrobu (DAS-KOL). Dialdehyd škrobu pripravený zo zemiakového škrobu anodickou oxidáciou. Dodávateľ: KAŘT, FAI ve Zlíně.

Kolagén-elastínový hydrolyzát. Práškový kolagén-elastínový hydrolyzát (svetlo žltej farby) vyrobený z hovedzích väzovic. Dodávateľ: NANJING MSN Chemical Co., Ltd., JiangSu, Č.L.R. Charakteristika: obsah bielkovín 92,5 %, obsah vlhkosti 3,5%, obsah popola 4,0 %.

6.2 Metódy hodnotenia

Boli použité nasledujúce metódy:

- a) stanovenie teploty zmrštenia (koželužská metóda vo vode)
- b) bobtnacie testy vo vode
- c) stanovenie sušiny a hrúbky filmu
- d) FTIR

e) mechanické testy

Stanovenie teploty zmrštenia

Skúška bola robená 2-krát pre každý smer (pozdĺžny a priečny). K sledovaniu teploty zmrštenia bola zostavená aparátúra skladajúca sa z topnej dosky, kadičky a skúmavky naplnenej destilovanou vodou a závesu pre vzorku. Miešanie kvapaliny v kadičke bolo zaistované malým miešadlom.

Z filmu bola vystrihnutá vzorka o rozmeroch 50x5 mm. Na obidvoch stranách sa 5 mm od konca vytvorili prepichnutím otvory pre zavesenie vzorky na háčiku a uchytenie závažička. Zostava uchytená do aparátúry na vodnom kúpeli o izbovej teplote tak, aby vzorka bola úplne ponorená v kvapaline, bola ponechaná 4 minúty bez zahrievania. Vodný kúpeľ bol zapnutý na maximálnu teplotu a zahrievalo sa od izbovej teploty rýchlosťou 3,3-4,2 °C/min. Bolo sledované, či sa vzorka preťahuje a o koľko. Potom sa sledovalo, kedy sa vzorka začala zmršťovať. Ako teplota zmrštenia bola zaznamenávaná teplota, pri ktorej sa vzorka zmrstila o 0,5-1 mm svojej dĺžky. Skúška bola ukončená v prípade pretrhnutia vzorky, pri odtrhnutí závažička, alebo pri dosiahnutí teploty 80 °C. Pri výpočtoch dĺžky zmrštenia predstavoval jeden dielik na skúmavke 0,67 mm.

Bobtnacie testy vo vode

Cieľom týchto testov bolo získať prehľad o chovaní pripravených filmov vo vode pri dvoch vybraných teplotách (26 a 80 °C). Bobtnacie testy prebiehali 1 hodinu a v stanovených časových intervaloch sa zisťovala hmotnosť vzorky a zmena jej rozmerov.

Vzorka o rozmeroch 20x20 mm bola zvážená na analytických váhach. Potom bola vložená do vytemperovaného vodného kúpeľa a inkubovaná 1 hodinu. V priebehu inkubácie sa vzorka 5x vytiahla, položila na malé sitko a nechala 1 minútu odkvapkať. Vzorka bola potom zvážená a zmerali sa jej rozmery. Nasledovala ďalšia inkubácia vzorky.

Stupeň zbobtnania (SZ) bol vyjadrovaný ako násobok prírastku hmotnosti vzorky – podľa vzorca:

$$SZ = m_N/m_S \text{ (násobok)}$$

kde: m_Nhmotnosť nabobtnalej vzorky (g)

m_Shmotnosť suchej vzorky (g)

Zmena plochy vzorky (ZP) (%) bola počítaná podľa vzorca:

$$ZP = (P_N/P_S * 100) - 100$$

kde: P_Nplocha nabobtnalej vzorky (mm^2)

P_Splocha suchej vzorky (mm^2)

Stanovenie sušiny a hrúbky filmu

Obsah sušiny vo filme bol stanovovaný 1-krát pre daný experiment. Hrúbka filmu bola meraná v nepoškodených častiach filmu. Bola meraná na piatich miestach a následne vypočítaný priemer.

FTIR

Skúška bola vykonávaná na prístroji ATI Mattson spektrometer FTIR, meraním na pozadí vzduchu. Bol použitý detektor štandardný pyroelektrický s tantaličnanom lítnym. K meraniu vzorek sa používal horizontálny ATR s držiakom inštalovaným do priestoru a prizmatická cela na kvapaliny. Meralo sa pri rozsahu $600\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ pri rozlíšení prístroja 4.0 s počtom skenov 64. Každý film bol zmeraný 2x, v pozdĺžnom a v priečnom smere a výsledky boli vyhodnocované v programe WinFirst.

Mechanické testy

Z mechanických vlastností filmov sa stanovovala ťahová sila pri pretrhnutí a pomerné predĺženie pri pretrhnutí. Používal sa skúšobný stroj Instron Mini 55 (Instron, Norwood, MA, U.S.A.). Metodika testovania bola prevzatá zo skúšobných predpisov podnikových laboratórií koželužien TOMA Otrokovice (dr. Vaculík, 1993). Z filmov sa vystrihli skúšobné telesá $140 \times 15\text{ mm}$, ktoré sa upli do čelustí stroja (vzdialenosť čelustí 50 mm). Rýchlosť posunu čelustí 50 mm/min . Každé stanovenie bolo vykonané 3x; výsledky sú prezentované ako aritmetický priemer so smerodatnou odchýlkou.

Pomocou rezačky boli vyrezané skúšobné vzorky s rozmermi uvedenými v príslušnej norme. Vzorky boli vytvrdené v sušiarňi a následne namočené v kadičke naplnenej vodou. Potom boli vzorky vložené medzi dva filtračné papiere, prikryté závažím a zaťažkané závažím. Po vytiahnutí bola vzorka ihneď upnutá medzi čeluste trhacieho stroja. Skúšobné

vzorky boli podrobené skúške ťahom a vyhodnotené ich deštrukčné a deformačné vlastnosti.

6.3 Organizácia experimentov

Experimenty sieťovania kolagénneho gelu boli typu 3^2 a 2^2 , s premennými, ktoré predstavovali množstvo daného sieťovacieho činidla vzťahnuté na kolagénnu sušinu v gele, a dobu zrenia kolagénneho gelu. Pripravený bol vždy centrálny experiment, film bez sieťovadla a film sieťovaný 2% roztokom GA.

7 SIEŤOVANIE KOLAGÉNEHO GELU KOMBINÁCIOU DIALDEHYDU ŠKROBU A GLUTARALDEHYDU

Pri týchto experimentoch bol použitý komerčný dialdehyd škrobu (označenie DAS-KOM).

7.1 Plán experimentov

Experimenty sieťovania kolagénneho gelu pomocou DAS-KOM a GA boli typu 3^2 , s centrálnym experimentom, s týmito premennými:

Faktor A: množstvo DAS-KOM: 1 – 3 – 5 % (vzťahnuté na kolagénnu sušinu v hmote)

Faktor B: množstvo GA: 0,4 – 1,0 – 1,6 % (vzťahnuté na kolagénnu sušinu v hmote)

Faktor C: doba 2. stupňa zrenia kolagénneho gelu: 0 – 4 – 8 hod.

Rozpúšťanie DAS-KOM

Roztok bol pripravený vždy čertsvý, pred zamiešaním do hmoty. Pri dolnom limite bolo navážené odpovedajúce množstvo DAS-KOM, pridaných 2,0 ml 3% roztoku HCl a miešané pri 80 °C do rozpustenia. Pri strednom a hornom limite bolo navážené odpovedajúce množstvo DAS-KOM, pridané 3,0 ml 3% roztoku HCl a miešané pri 80 °C do rozpustenia. Roztok bol potom pridávaný rovnomerne ku kolagénnemu gelu až po vychladnutí na izbovú teplotu.

Rozpúšťanie GA

Roztok bol pripravený vždy čerstvý, pred zamiešaním do hmoty. Bolo navážené dané množstvo GA, ku ktorému sa pridalo 2,5 ml destilovanej vody. Vzniknutý roztok bol krátko rozmiešaný a pridaný rovnomerne ku kolagénnemu gelu.

7.2 Príprava filmov

Kolagénny gel bol dôkladne uzavretý uchovávaný v chladničke, s gelom sa pracovalo ihneď po vytiahnutí. Bolo odobraných $50 \pm 0,1$ g kolagénneho gelu, z ktorého bola vytvarovaná placka. Podľa faktoru A (tj. 1, 3 alebo 5 %) k nej bolo pridané množstvo DAS-KOM. Roztok bol rovnomerne rozliaty na placku a 10 minút dôkladne miešaný ručne tak, aby sa roztok rovnomerne dostal do celého obsahu. Gel bol po zamiešaní vytvarovaný do guľôčky, hermeticky uzavrený do PE sáčku, uložený do chladničky pri 6 ± 1 °C a ponechaný zrieť

48 hodín (1. stupeň zrenia). Po uplynulom čase bol z gelu opäť vytvarovaná placka a k nej pridaný GA v množstve podľa faktoru B (tj. 0,4, 1,0 alebo 1,6 %). Roztok bol rovnomerne rozliaty na placku a 10 minút dôkladne miešaný ručne tak, aby sa roztok rovnomerne dostal do celého obsahu. Gel bola po zamiešaní vytvarovaný do guľôčky, hermeticky uzavrený do PE sáčku, uložený do chladničky pri 6 ± 1 °C a ponechaný zrieť podľa faktoru C (tj. 0, 4 alebo 8 hodín). Po uplynulom čase bol gel rozprestretý na plastovú doštičku, z hornej strany prikrytá PE sáčkom a vyváľaný rovnomerne oceľovým valčekom. Doštička s filmom bola potom umiestnená do sušiarne pri zapnutom ventilátore a sušila sa v troch stupňoch, 12 minút pri každej teplote 40, 60 a 80 °C pri rýchlosti ohrevu $\Delta T = 4$ °C/min. Doštička s vysušeným filmom bola vytiahnutá zo sušiarne, odfotená a odlepený film sa uzavrel do uzatvárateľných PE, pripravený k jednotlivým skúškam.

Príprava filmu bez siet'ovadla

Kolagénny gel bol dôkladne uzavretý uchovávaný v chladničke, s gelom sa pracovalo ihneď po vytiahnutí. Bolo odobraných $50\pm 0,1$ g kolagénneho gelu, z ktorého bola vytvarovaná placka. Gel bol rozprestretý na plastovú doštičku, z hornej strany prikrytá PE sáčkom a vyváľaná rovnomerne oceľovým valčekom. Doštička s filmom bola potom umiestnená do sušiarne pri zapnutom ventilátore a sušila sa v troch stupňoch, 12 minút pri každej teplote 40, 60 a 80 °C pri rýchlosti ohrevu $\Delta T = 4$ °C/min. Doštička s vysušeným filmom bola vytiahnutá zo sušiarne, odfotená, a film sa potom odlepený uzavrel do uzatvárateľných PE, pripravený k jednotlivým skúškam.

Príprava filmu s 2,0 % GA

Kolagénny gel bol dôkladne uzavretý uchovávaný v chladničke, s gelom sa pracovalo ihneď po vytiahnutí. Bolo odobraných $50\pm 0,1$ g kolagénneho gelu, z ktorého bola vytvarovaná placka. Z gelu bola vytvarovaná placka a k nej pridaný GA v množstve podľa faktoru B (tj. 0,4, 1,0 alebo 1,6 %). Roztok bol rovnomerne rozliaty na placku a 10 minút dôkladne miešaný ručne tak, aby sa roztok rovnomerne dostal do celého obsahu. Gel bol rozprestretý na plastovú doštičku, z hornej strany prikrytá PE sáčkom a vyváľaná rovnomerne oceľovým valčekom. Doštička s filmom bola potom umiestnená do sušiarne pri zapnutom ventilátore a sušila sa v troch stupňoch, 12 minút pri každej teplote 40, 60 a 80 °C pri rýchlosti ohrevu $\Delta T = 4$ °C/min. Doštička s vysušeným filmom bola vytiahnutá zo sušiarne, odfote-

ná, a film sa potom odlepený uzavrel do uzatvárateľných PE, pripravený k jednotlivým skúškam.

7.3 Výsledky a diskusie

Exp. č.	Faktor A: množstvo DAS-KOM (%)	Faktor B: množstvo GA (%)	Faktor C: doba 2. stupňa zrenia kolagénnej hmoty (h)	Obsah sušiny (%)	Hrúbka filmu (mm)	T _g (°C)	
						pozdlžny smer	priečny smer
Film bez sieťovadla				88,00	0,065±0,005	49,5	48,0
1	1	0,4	0	95,13	0,055±0,005	53,0	51,8
2	1	0,4	8	94,10	0,04±0,005	53,8	53,6
3	1	1,6	0	88,40	0,035±0,005	54,0	52,3
4	1	1,6	8	89,27	0,045±0,005	52,3	52,8
5	5	0,4	0	94,28	0,03±0,005	54,1	52,0
6	5	0,4	8	95,47	0,06±0,005	56,1	55,0
7	5	1,6	0	94,55	0,04±0,005	53,6	54,5
8	5	1,6	8	95,24	0,05±0,005	54,8	54,8
9	3	1,0	4	95,56	0,05±0,005	54,0	53,0
Film s 2,0 % GA				94,80	0,05±0,005	52,2	52,1

Tab. 1 Charakterizácia filmov sieťovaných komerčným dialdehydom škrobu, filmu bez sieťovadla a filmu s 2,0 % GA

7.3.1 Teploty zmrštenia filmov

Teplota zmrštenia a bobtnacie skúšky sa stanovovali do 1 týždňa po ich vyrobení, avšak po dvojdňovom odležaní. Teplota zmrštenia filmov bola stanovovaná pri vzorkách vystrihnutých v pozdlžnom smere (smer váľania filmu) a v priečnom smere (kolmo na smer váľania filmu).

Exp.č.	Predĺženie (-)/zmrštenie (+) filmu v pozdĺžnom smere				Predĺženie (-)/zmrštenie (+) filmu v priečnom smere			
	T ₀ (mm)	T _Z - T _S (mm)	T _S - T (mm)	T - 80 °C (mm)	T ₀ (mm)	T _Z - T _S (mm)	T _S - T (mm)	T - 80 °C (mm)
1	0	-0,5	+14,0 (T = 72,5 °C)	0	0	0	+8,0 (T = 79,7 °C)	0
2	0	0	+14,5		0	0	+5,0	
3	0	0	+18,5		0	0	+7,5 (T = 77,8 °C)	0
4	0	0	+15,0		0	0	+7,0	
5	0	0	+14,5 (T = 78,9 °C)	0	0	0	+8,0	
6	0	0	+9,5		0	0	+10,5	
7	0	0	+13,0		0	0	+9,5 (T = 77,5 °C)	0
8	0	0	+13,5 (T = 76,4 °C)	0	0	0	+8,5	
9	0	0	+13,0		0	0	+6,5 (T = 76,4 °C)	0
Film bez sieťovadla	-1,8	0	+15,5 (T = 77,4 °C)	0	-4,0	0	+2,0 (T = 72,0 °C)	0
Film s 2,0 % GA	0	0	+14,0	0	0	0	+7,0 (T = 70,0 °C)	0

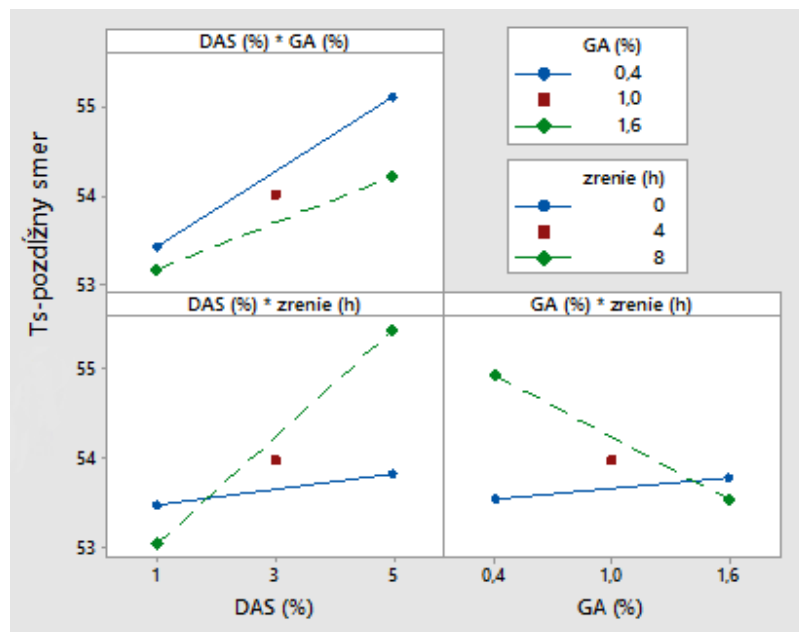
T_Z – teplota, pri ktorej sa systém začal zahrievať
T_S – teplota, pri ktorej sa film začal zmršťovať
T – teplota ukončenia zmršťovania filmu
T₀ - 4 min bez záhrevu pri izbovej teplote

Tab. 2 Zmeny filmov sieťovaných DAS-KOM a GA v priečnom a pozdĺžnom smere pri stanovení T_S

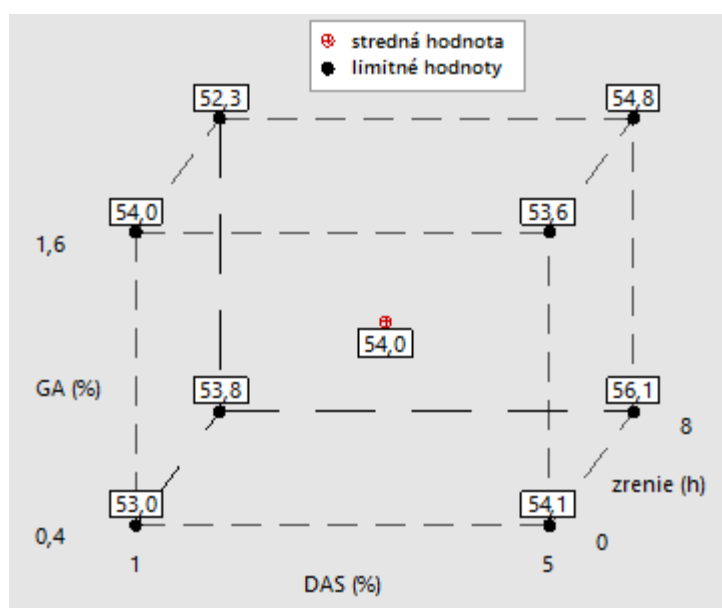
Štatistické vyhodnotenie

Regresná rovnica pre T_S filmov v pozdĺžnom smere má tvar:

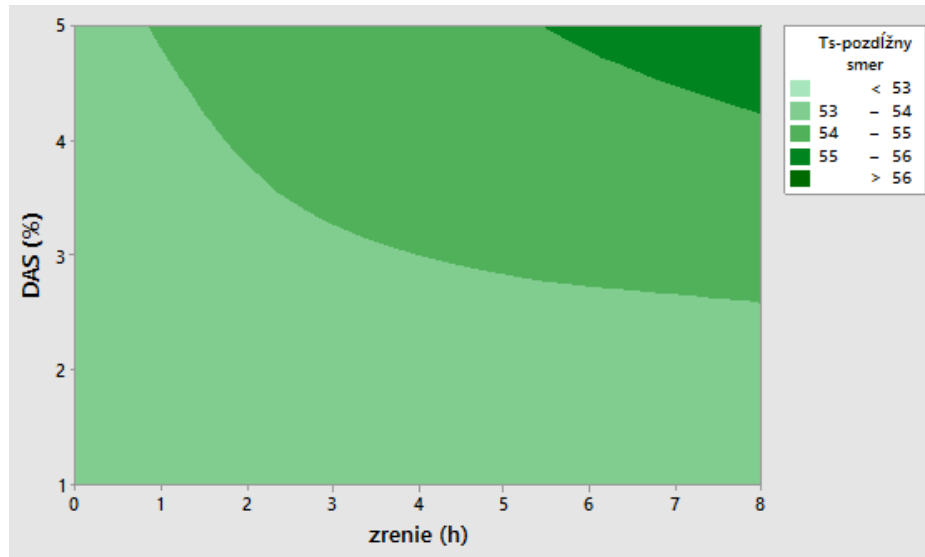
$$y = 52,27 + 0,4000 A + 1,146 B + 0,1844 C - 0,3125 AB + 0,01979 AC - 0,3047 B + 0,04427 ABC$$



Obr. 8 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na Ts v pozdĺžnom smere filmov sieťovaných DAS-KOM+GA



Obr. 9 Vplyv jednotlivých faktorov na Ts v pozdĺžnom smere filmov sieťovaných DAS-KOM+GA v kubickom zobrazení

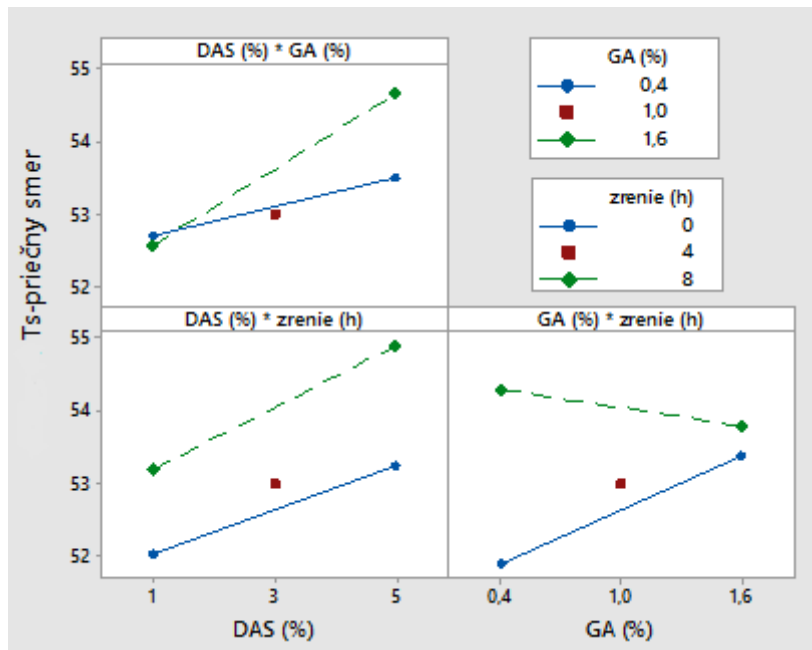


Obr. 10 Vplyv množstva DAS-KOM a zrenia na Ts v pozdĺžnom smere filmov sieťovaných DAS-KOM+GA

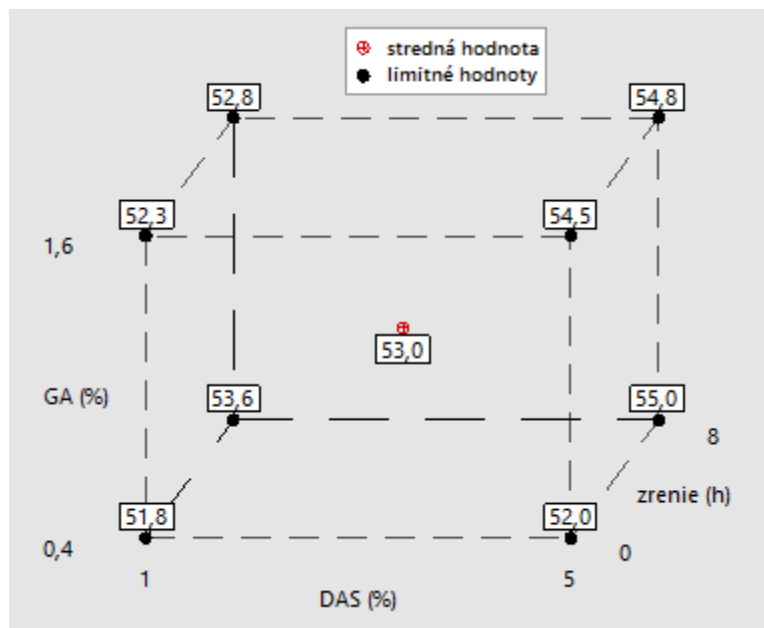
Z výsledkov vplyvu jednotlivých faktorov na Ts v pozdĺžnom smere vyplýva, že pri minimálnom množstve GA sa so zvyšujúcim množstvom DAS-KOM výrazne zvyšuje Ts v pozdĺžnom smere. Pri maximálnom množstve GA je tento trend rovnaký, avšak menej výrazný. Najväčší vzrast Ts v pozdĺžnom smere je vidieť pri maximálnom počte hodín zrenia so zvyšujúcim sa množstvom DAS-KOM. Pri 0 hodinovom zrení sa Ts so zvyšujúcim sa prídavkom DAS-KOM zvyšuje minimálne. Takisto so zvyšujúcim sa prídavkom GA pri 0 hodinovom zrení sa Ts zvyšuje minimálne, avšak pri maximálnom počte hodín zrenia dochádza naopak ku výraznému znižovaniu Ts. Najvyššej teploty Ts je dosiahnuté pri maximálnom počte hodín zrenia, maximálnom množstve DAS-KOM a minimálnom množstve GA. Najväčší vplyv na Ts majú faktory množstvo DAS-KOM a zrenie. So zvyšujúcim sa počtom hodín zrenia so súčasným zvyšujúcim sa prídavkom DAS-KOM stúpa Ts v pozdĺžnom smere.

Regresná rovnica pre Ts filmov v priečnom smere má tvar:

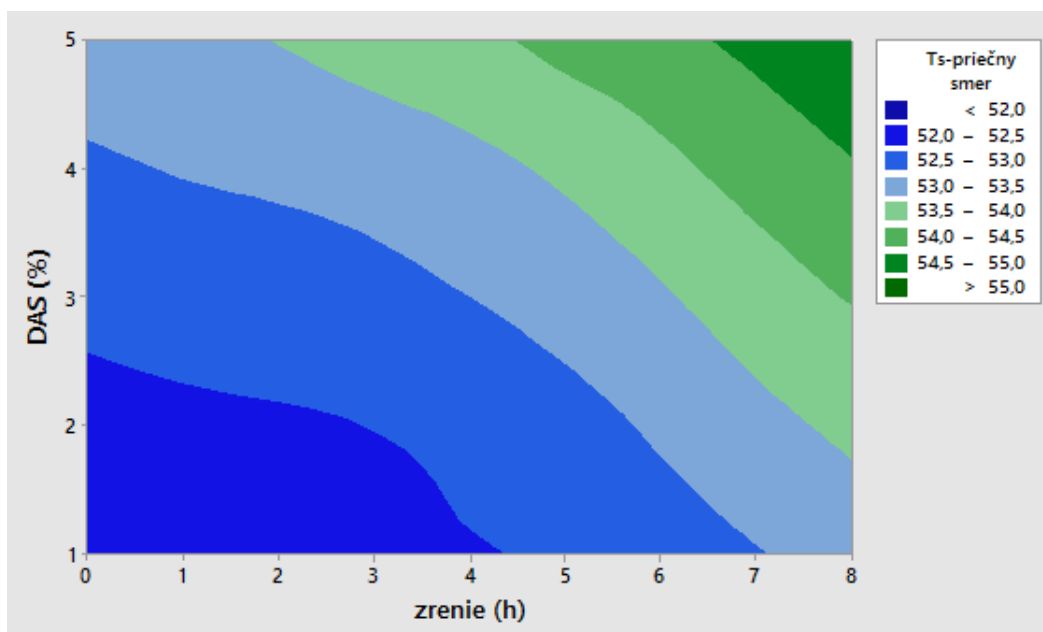
$$y = 51,75 - 0,1167 A - 0,000000 B + 0,2271 C + 0,4167 AB + 0,05208 AC - 0,09896 BC - 0,03646 ABC$$



Obr. 11 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na Ts v priečnom smere filmov sieťovaných DAS-KOM+GA



Obr. 12 Vplyv jednotlivých faktorov na Ts v priečnom smere filmov sieťovaných DAS-KOM+GA v kubickom zobrazení



Obr. 13 Vplyv množstva DAS-KOM a zrenia na Ts v priechnom smere filmov sieťovaných DAS-KOM+GA

Ts v priechnom smere sa výrazne zvyšuje so zvyšujúcim sa množstvom DAS-KOM pri maximálnom množstve GA. Pri minimálnom množstve GA sa takisto zvyšuje, ale menej výrazne. So zvyšujúcim sa prídavkom DAS-KOM dochádza k výraznému zvyšovaniu Ts v priechnom smere pri minimálnom ako aj pri maximálnom počte hodín zrenia. Pri maximálnom počte hodín zrenia sa ale dosahuje vyšších hodnôt Ts v priechnom smere. S postupným prídavkom GA sa pri maximálnom zrení znižuje Ts v priechnom smere a zvyšuje sa naopak pri 0 hodinovom zrení. Tak, ako v prípade Ts v pozdĺžnom smere, tak aj v prípade Ts v priechnom smere je najvyššia hodnota dosiahnutá pri maximálnom počte hodín zrenia, maximálnom prídavku DAS-KOM a minimálnom prídavku GA. Takisto na Ts v priechnom smere majú najväčší vplyv prídavok DAS-KOM a zrenie. Ts rastie so zvyšujúcim sa množstvom DAS-KOM a počtom hodín zrenia.

7.3.2 Bobtnacie skúšky filmov

Výsledky bobtnacích skúšok filmov bez sieťovadla a filmov č. 1-4 sú súhrnne uvedené v nasledujúcej tabuľke.

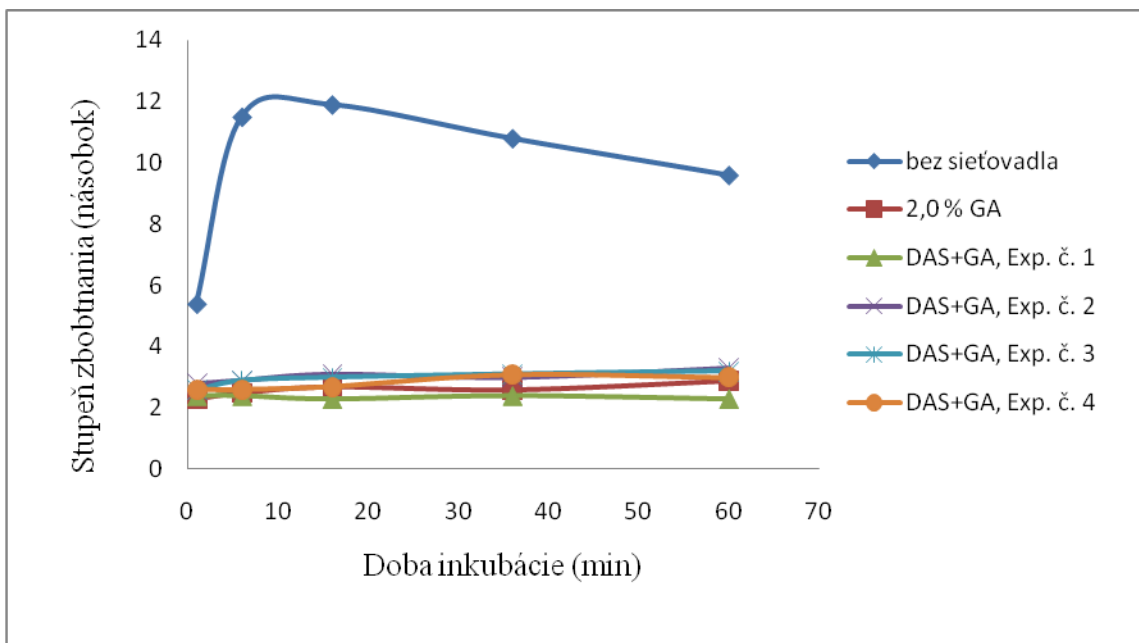
Exp. č.	Doba inkubácie (min)	Test pri 26 °C		Test pri 80 °C	
		Stupeň zbobtnania (násobok)	Zmena plochy (%)	Stupeň zbobtnania (násobok)	Zmena plochy (%)
Bez siet'ovadla	1	5,4	5,0	6,2	- 10,0
	6	11,5	20,8	11,9	- 10,8
	16	11,9	20,8	11,3	- 47,0
	36	10,8	20,8	6,2	- 66,0
	60	9,6	20,8	4,8	- 47,5
Pri 80 °C sa film ihneď zvinul do ruličky, od 6 min. inkubácie bol mierne zvlhčený, mliečne sfarbený, od 16 min. bol takmer rovný, na konci sa rozpadal, pri 26 °C sa film nemenil					
1	1	2,4	0	2,4	- 65,0
	6	2,4	0	3,1	- 58,8
	16	2,3	0	3,1	- 60,0
	36	2,4	0	4,1	- 56,0
	60	2,3	0	3,2	- 58,8
Pri 80 °C sa film mierne zvinul, bol nažltlý, potom sa skrútil, od 16 min. inkubácie bol mierne skrútený, pri 26 °C sa film nemenil					
2	1	2,8	0	2,7	- 62,5
	6	2,9	0	3,9	- 53,3
	16	3,1	0	4,3	- 49,0
	36	3,0	0	4,1	- 53,3
	60	3,3	0	3,7	- 55,0
Pri 80 °C sa film ihneď zvinul do ruličky, potom bol mierne zvlhčený, nažltlý, od 16 min. inkubácie bol zvlhčený, mliečne sfarbený, pri 26 °C sa film nemenil					
3	1	2,6	0	2,5	- 58,8
	6	2,9	0	2,9	- 58,8
	16	3,0	0	3,0	- 58,8
	36	3,1	0	2,9	- 62,5
	60	3,2	5	3,3	- 53,3
Pri 80 °C sa film mierne skrútil, od 36 min. inkubácie bol skrútený, nažltlý, pri 26 °C sa film nemenil					
4	1	2,6	0	2,8	- 58,8
	6	2,6	0	3,1	- 61,5
	16	2,7	0	3,2	- 61,5
	36	3,1	0	3,5	- 56,0
	60	3,0	0	3,5	- 58,8
Pri 80 °C sa film mierne zvlhčil, bol nažltlý, pri 26 °C sa film nemenil					

Tab. 3 Výsledky bobtnacích skúšok filmu bez siet'ovadla a filmov č. 1-4

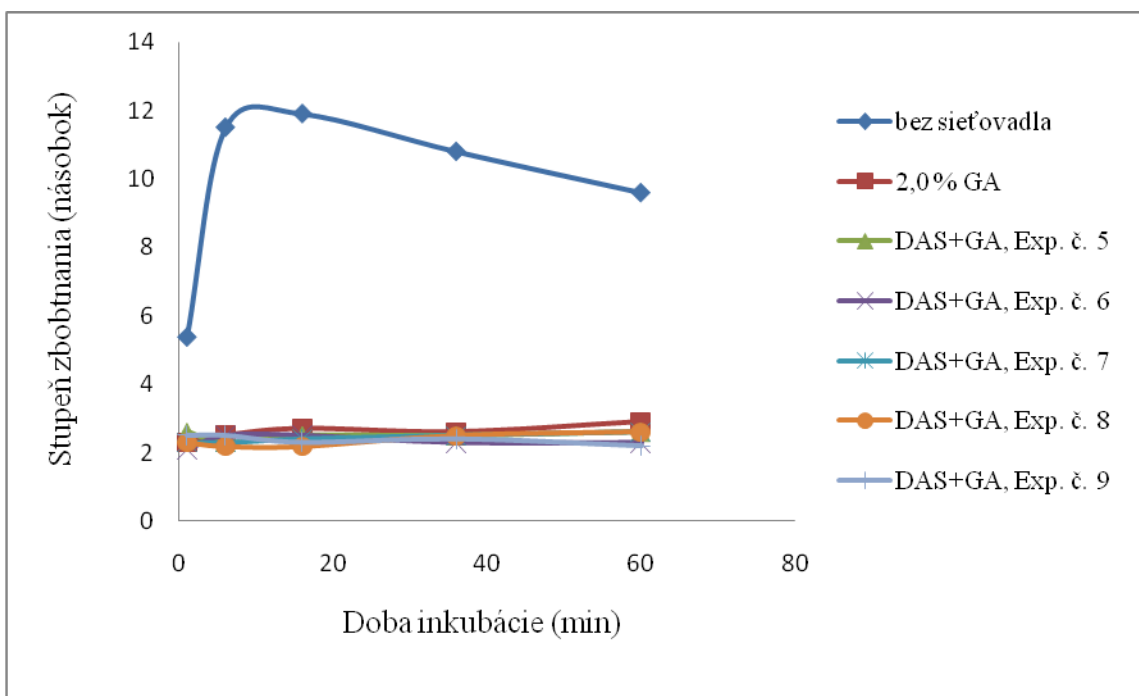
Výsledky bobtnacích skúšok filmu s 2,0 % GA a filmov č. 5-9 sú súhrnne uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Exp. č.	Doba inkubácie (min)	Test pri 26 °C		Test pri 80 °C	
		Stupeň zbobtnania (násobok)	Zmena plochy (%)	Stupeň zbobtnania (násobok)	Zmena plochy (%)
5	1	2,6	0	2,7	- 65,0
	6	2,3	0	3,0	- 56,0
	16	2,5	0	3,1	- 58,8
	36	2,5	0	3,5	- 56,0
	60	2,6	0	3,4	- 60,0
Pri 80 °C sa film ihneď zmrštil, potom zostal mierne skrútený, pri 26 °C sa film nemenil					
6	1	2,1	0	2,4	- 36,3
	6	2,5	0	3,5	- 23,5
	16	2,5	0	3,7	- 23,5
	36	2,3	0	3,4	- 25,0
	60	2,3	0	3,4	- 37,0
Pri 80 °C sa film ihneď zvinul do ruličky, bol zvinutý po celú dobu inkubácie, bol sfarbený do tmavo žltá, pri 26 °C sa film mierne zvinul					
7	1	2,3	0	2,4	-55,0
	6	2,3	0	2,8	-55,0
	16	2,4	0	2,9	-55,0
	36	2,5	0	3,1	-55,0
	60	2,6	0	3,2	-55,0
Pri 80 °C sa film mierne zvlnil, pri 26 °C sa film nemenil					
8	1	2,3	0	2,2	-55,0
	6	2,2	0	2,3	-55,0
	16	2,2	0	2,7	-55,0
	36	2,5	0	2,9	-55,0
	60	2,6	0	2,5	-55,0
Pri 80 °C sa film ihneď zvinul, potom zostal mierne skrivený, pri 26 °C sa film nemenil					
9	1	2,5	0	2,6	-52,0
	6	2,5	0	2,6	-55,0
	16	2,3	0	2,8	-52,0
	36	2,4	0	2,6	-55,0
	60	2,2	0	2,8	-52,0
Pri 80 °C sa film ihneď zvinul do ruličky, potom zostal zvinutý, pri 26 °C sa film nemenil					
GA	1	2,3	0	2,4	- 61,5
	6	2,5	0	2,7	- 61,5
	16	2,7	0	2,9	- 61,5
	36	2,6	0	3,3	- 58,8
	60	2,9	0	3,5	- 58,8
Pri 80 °C sa film ihneď zmrštil, potom zostal iba mierne zvlnený, pri 26 °C sa film nemenil					

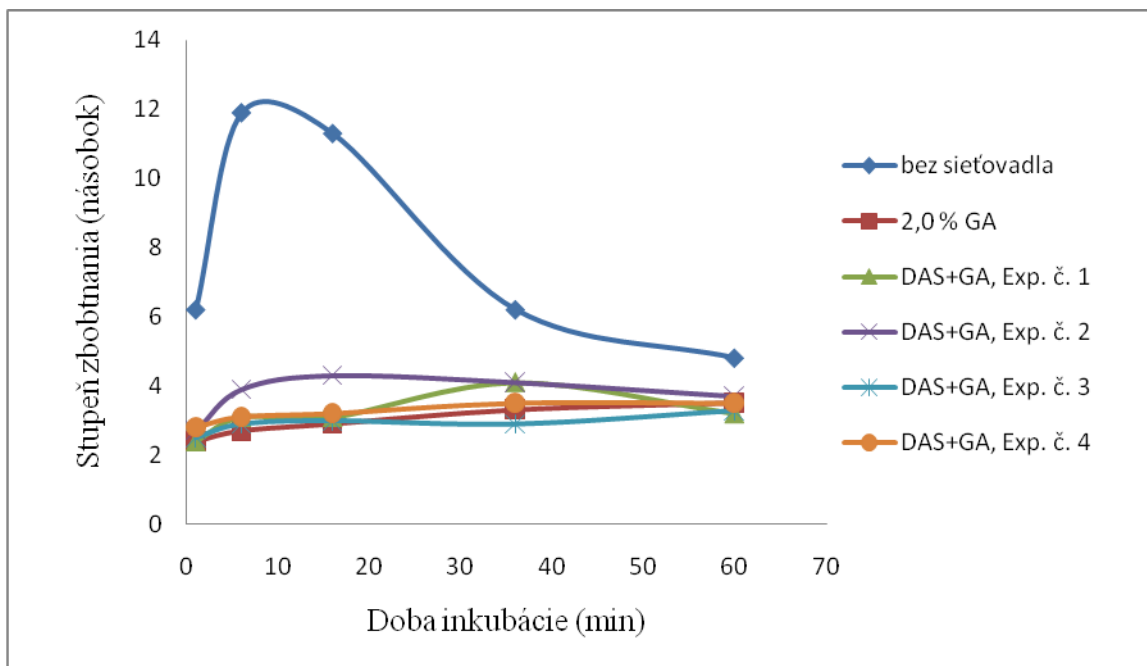
Tab. 4 Výsledky bobtnacích skúšok filmov č. 5-9 a filmu s GA



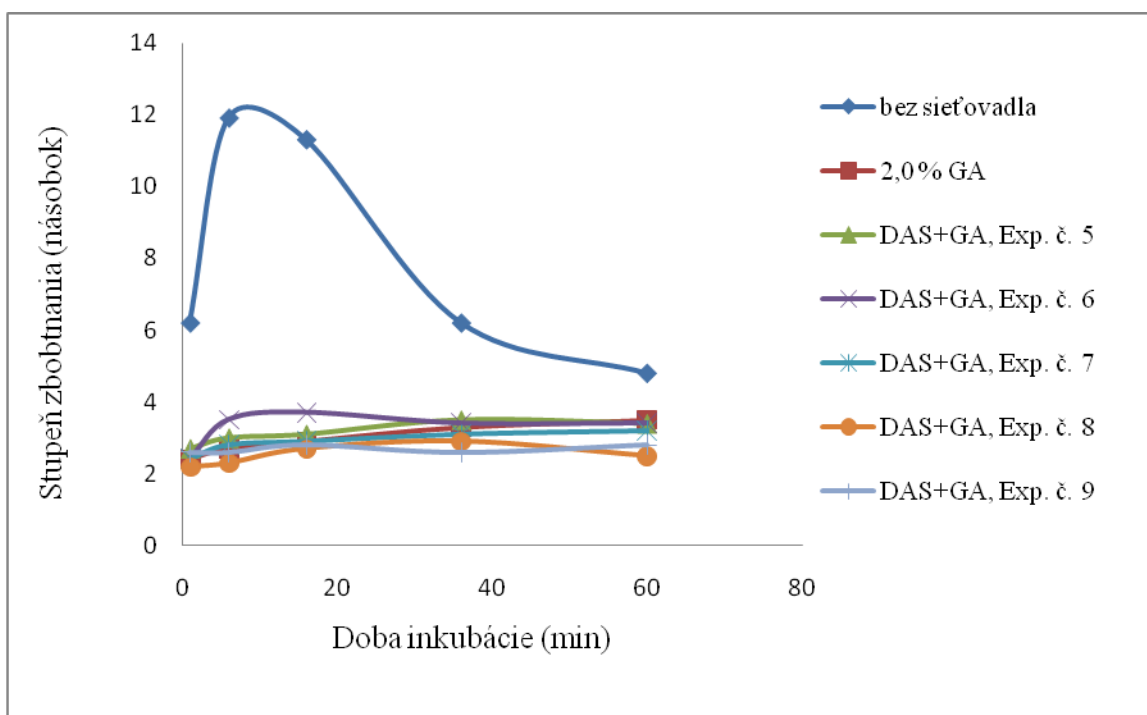
Obr. 14 Stupeň zbobtnania filmov č. 1-4 pri 26 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)



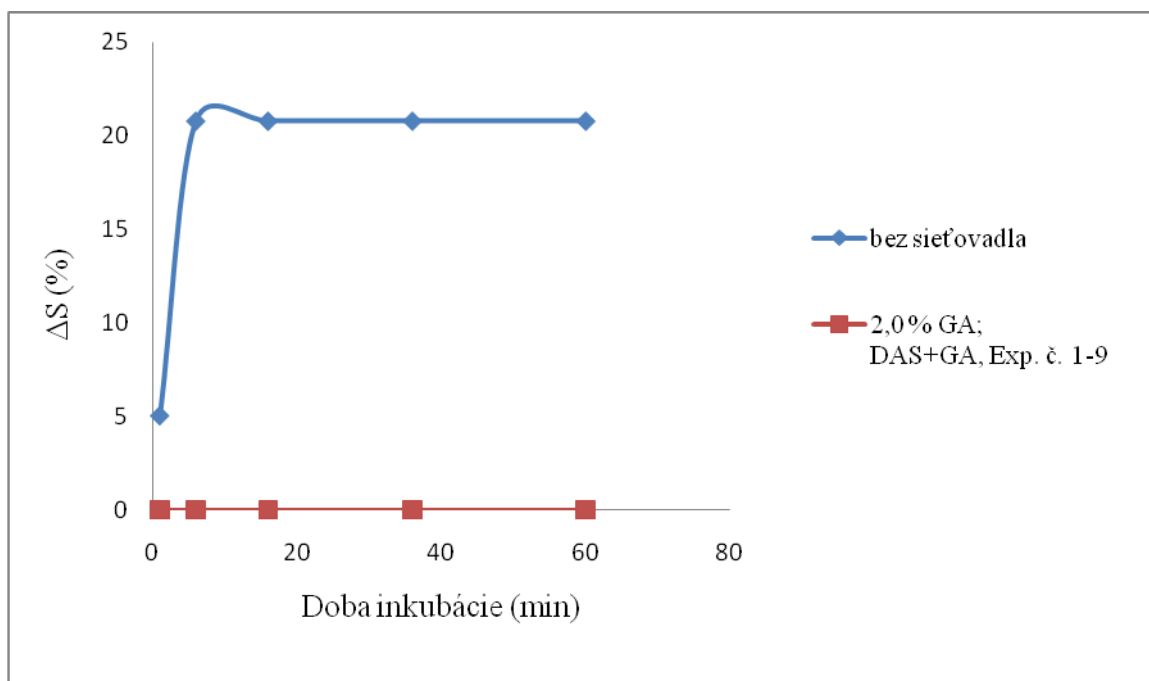
Obr. 15 Stupeň zbobtnania filmov č. 5 a 6 pri 26 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)



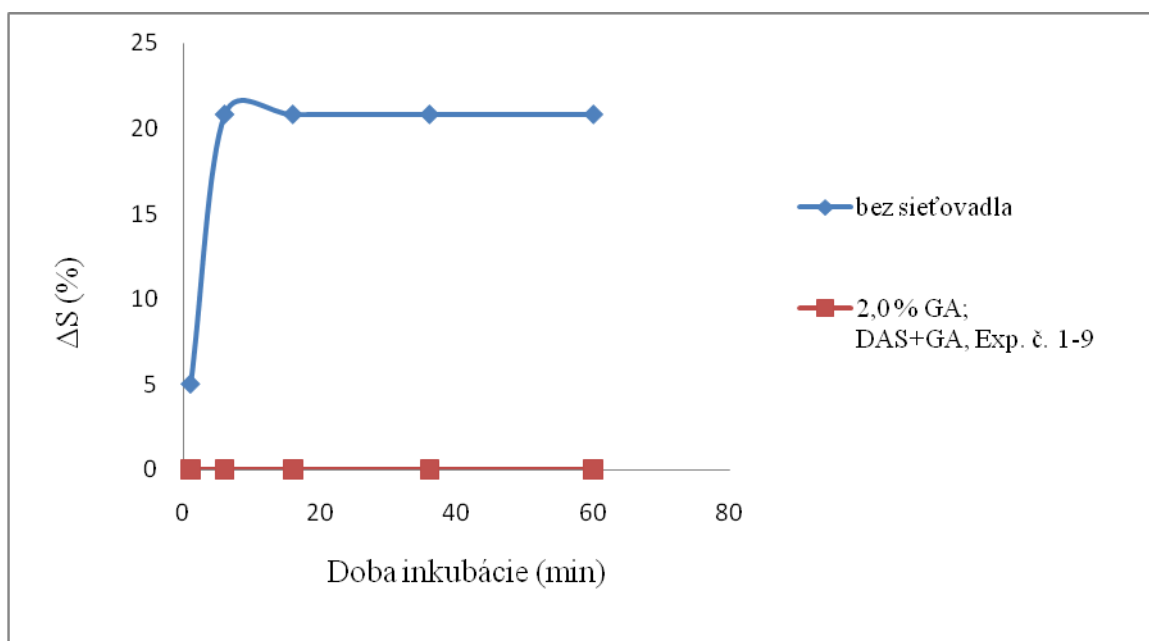
Obr. 16 Stupeň zbobtnania filmov č. 1-4 pri 80 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)



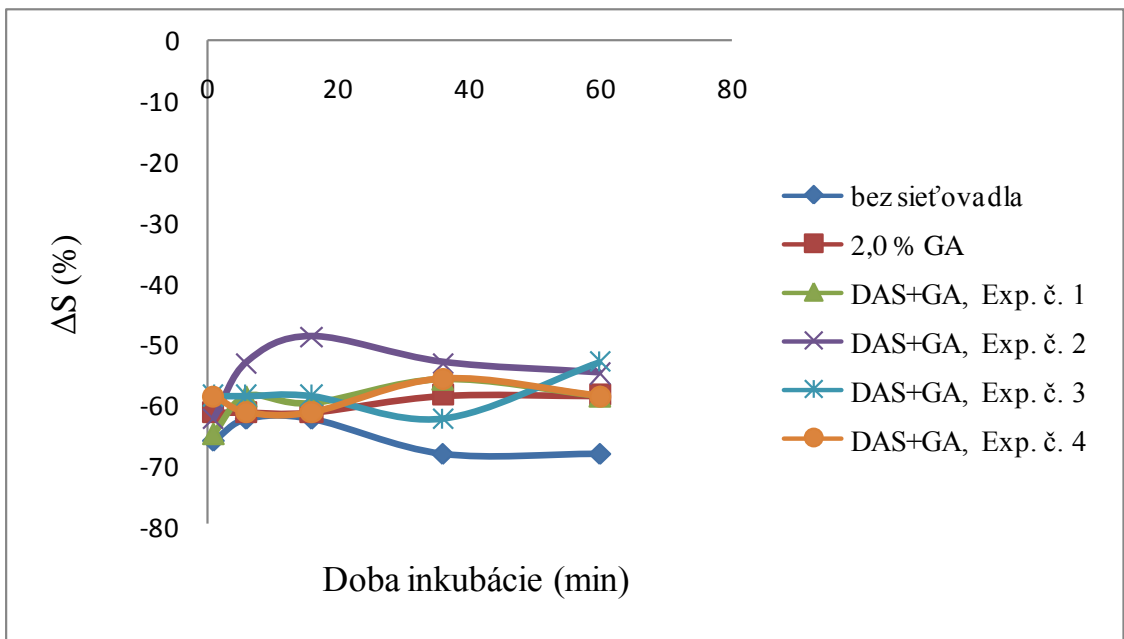
Obr. 17 Stupeň zbobtnania filmov č. 5 a 6 pri 80 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)



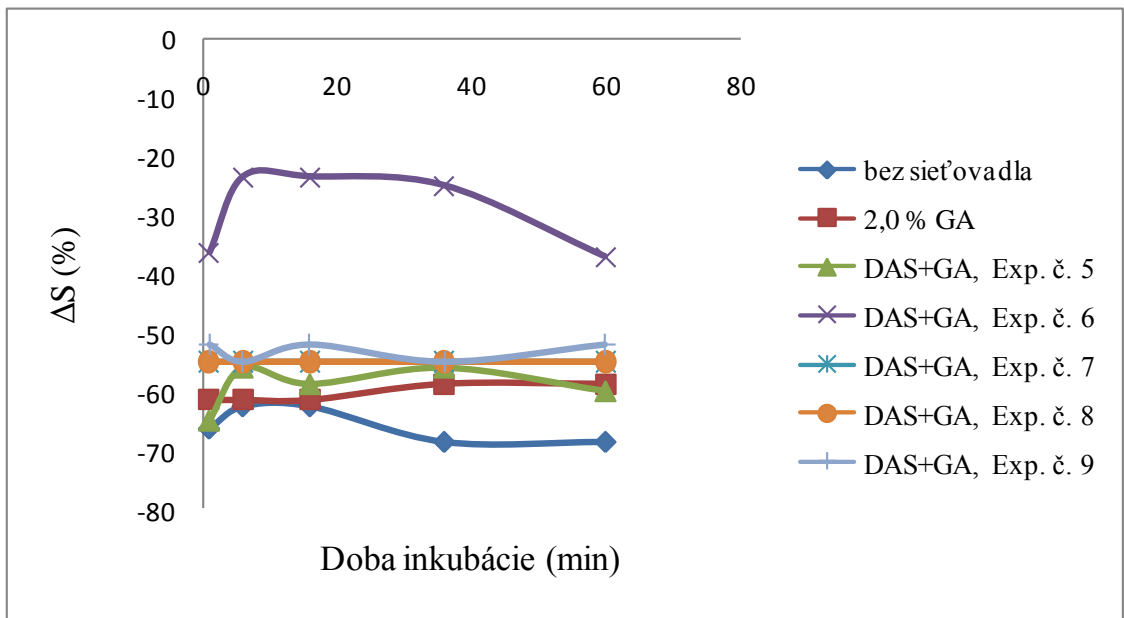
Obr. 18 Zmena plochy vzoriek filmov č. 1-4 behom bobtnacích skúšok pri 26 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)



Obr. 19 Zmena plochy vzoriek filmov č. 5 a 6 behom bobtnacích skúšok pri 26 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)



Obr. 20 Zmena plochy vzoriek filmov č. 1-4 behom bobtnacích skúšok pri 80 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)



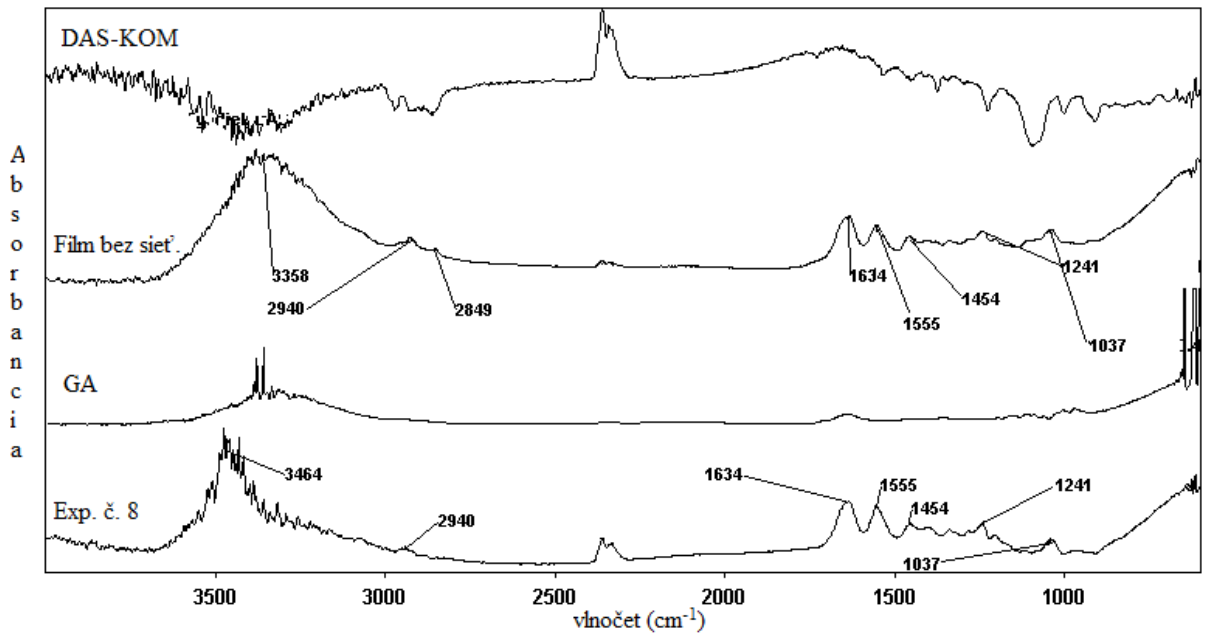
Obr. 21 Zmena plochy vzoriek filmov č. 5 a 6 behom bobtnacích skúšok pri 80 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)

Stupeň zbobtnania pri 26 °C má najmenší film s 2,0 % GA. Filmy č. 1-9 majú hodnoty stupňa zbobtnania s týmto filmom takmer identické, čo znamená, že sa od seba líšia minimálne. Všetky filmy bobtnali výrazne menej, než film bez sieťovadla, ktorý má zreteľne najvyšší stupeň zbobtnania. Pri 80 °C je rovnako vidieť najvyššie bobtnanie filmu bez sieťovadla a výrazne nižšie bobtnanie filmu s 2,0 % GA. Takmer zhodné nízke hodnoty stupňa zbobtnania mali filmy č. 3, 4, 5 a 7. Filmy č. 1, 2 a 6, ktoré majú najmenší prídavok GA, majú o niečo vyššie hodnoty stupňa zbobtnania v porovnaní s filmom s 2,0 % GA, ale stále výrazne nižšie od filmu bez sieťovadla. Pri filmoch č. 7, 8 a 9, ktoré majú najvyššie množstvá obidvoch sieťovadiel, je zaznamenané dokonca o niečo nižšie bobtnanie než má film s 2,0 % GA.

Zmena plochy (ΔS) pri 26 °C je pri filme s 2,0 % GA nulová. Pri filme bez sieťovadla je zrejmé, že ΔS je niekoľkonásobne vyššia. Všetky filmy, tj. č. 1-9 majú ideálne nulové hodnoty ΔS . Pri teplote 80 °C vykazuje film s 2,0 % GA najnižšie hodnoty ΔS , najvyššie hodnoty má film bez sieťovadla. Pri všetkých filmoch č. 1-9 je vidieť, že hodnoty ΔS majú nižšie než je tomu pri filme bez sieťovadla. Filmy č. 1, 3 a 4 sa vo svojich hodnotách ΔS prekrývajú s hodnotami filmu s 2,0 % GA. Ešte menej svoju plochu zmenili filmy č. 2, 5, 6, 7, 8 a 9, z ktorých najmenšie hodnoty ΔS má film č. 6.

Z výsledkov bobtnacích skúšok vyplýva, že najlepšie vlastnosti, a síce najmenší stupeň zbobtnania pri najmenšej zmene plochy je zaznamenané pri filmoch č. 8 (5 % DAS, 1,6 % GA a doba 2. stupňa zrenia 8 hodín) a film č. 9 (5 % DAS, 1,0 % GA a doba 2. stupňa zrenia 4 hodiny). Avšak film č. 6, ktorý má hodnoty stupňa zbobtnania podobné filmu s 2,0 % GA, má zo všetkých filmov najmenšie hodnoty ΔS , a to výrazne nižšie aj v porovnaní s filmom s 2,0 % GA. Zároveň má tento film najväčšie hodnoty teploty zmrštenia, a to ako v pozdĺžnom ($T = 56,1$ °C), tak v priečnom smere ($T = 55,0$ °C).

7.3.3 FTIR



Obr. 22 IČ spektrum filmu č. 8, glutaraldehydu, filmu bez sieťovadla a komerčného dialdehydu škrobu

Z porovnania infračervených spektier jednotlivých filmov so spektrom filmu bez sieťovadla je vidieť, že spektrá sú podobné a vyskytujú sa v nich všetky charakteristické absorpčné pásy. Nebol zaznamenaný žiadny novovzniknutý pík, avšak došlo k vymiznutiu píku alebo ku výraznému zníženiu intenzity píku pri 2940 a 2849 cm^{-1} (vibrácie $-\text{CH}_2-$ a $-\text{CH}_3-$ skupín) pri takmer všetkých filmoch oproti filmu bez sieťovadla. Pri charakteristických pásoch dochádza k zmene intenzity, a to vo väčšine prípadoch ku zníženiu. Všetky filmy mali tiež zníženú intenzitu alebo došlo k posunu píku jedine pri 3358 cm^{-1} ($-\text{CO}-\text{NH}-$ amidová I väzba).

Všetky odlišnosti v spektrách, ktoré majú filmy sieťované kombináciou DAS-KOM a GA vždy v porovnaní so spektrom nezosieťovaného filmu sú zhrnuté v tabuľke 5.

Funkčná skupina	Vlnočet (cm ⁻¹)	Filmy č.								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
-CO-NH-funkčná skupina (amidová I väzba)	3358	nižšia intenzita	posun píku	posun píku	posun píku	nižšia intenzita	nižšia intenzita	nižšia intenzita	posun píku	nižšia intenzita
vibrácie -CH ₂ -skupiny	2940	nižšia intenzita	nižšia intenzita	nižšia intenzita	rovnaká intenzita	zmiznutie píku	nižšia intenzita	nižšia intenzita	nižšia intenzita	zmiznutie píku
vibrácie -CH ₃ -skupiny	2849	rovnaká intenzita	nižšia intenzita	zmiznutie píku	nižšia intenzita	zmiznutie píku	zmiznutie píku	zmiznutie píku	nižšia intenzita	zmiznutie píku
-CO-NH-funkčná skupina (amidová I väzba)	1555	vyššia intenzita	nižšia intenzita	vyššia intenzita	vyššia intenzita	nižšia intenzita	nižšia intenzita	nižšia intenzita	rovnaká intenzita	nižšia intenzita
skupina -N=C=O-	1454	rovnaká intenzita	nižšia intenzita	rovnaká intenzita	rovnaká intenzita	nižšia intenzita	nižšia intenzita	nižšia intenzita	rovnaká intenzita	nižšia intenzita
skupina =C-O-C	1241	vyššia intenzita	rovnaká intenzita	rovnaká intenzita	vyššia intenzita	nižšia intenzita	nižšia intenzita	nižšia intenzita	rovnaká intenzita	nižšia intenzita
primárna funkčná skupina R-OH	1037	rovnaká intenzita	rovnaká intenzita	rovnaká intenzita	vyššia intenzita	nižšia intenzita	nižšia intenzita	nižšia intenzita	rovnaká intenzita	nižšia intenzita

Tab. 5 Odlišnosti charakteristických píkov filmov sieťovaných kombináciou DAS-KOM a GA v porovnaní s filmom bez sieťovadla

7.4 Zhodnotenie výsledkov

Z daných deviatich experimentov, na ktorých boli vykonané jednotlivé skúšky, sa ako najlepšie z hľadiska bobtnania javia film s 5 % DAS-KOM, 1,6 % GA a 8 h zrenia, a film s 3 % DAS-KOM, 1,0 % GA a 4 h zrenia, ktoré majú nízky stupeň zbobtnania so zároveň nízkou zmenou plochy. Avšak film s 5 % DAS-KOM, 0,4 % GA a 8 h zrenia má hodnoty zmeny plochy dokonca výrazne nižšie než film s 2,0 % GA. Tento film má zároveň najvyššie dosiahnuté hodnoty teploty zmrštenia a to ako v pozdĺžnom tak aj v priečnom smere. Najväčší vplyv na teplotu zmrštenia má prídavok DAS-KOM a počet hodín zrenia so súčasným minimálnym prídavkom GA. Tento fakt potvrdzuje spomínaný film č. 6, ktorý obsahuje najvyššie množstvo DAS-KOM, najnižšie množstvo GA a bol ponechaný zrieť najdlhšiu dobu. Ako ukázali infračervené spektrá, došlo pri všetkých filmoch použitím komerčného dialdehydu škrobu k interakciám s kolagénym gelom.

8 SIEŤOVANIE KOLAGÉNEHO GELU POMOCOU LABORATÓRNE PRIPRAVENÉHO DIALDEHYDU ŠKROBU A KOMERČNÉHO DIALDEHYDU ŠKROBU

Pri týchto experimentoch bol použitý laboratórne pripravený dialdehyd škrobu (označenie DAS-KOL) a komerčný dialdehyd škrobu (označenie DAS-KOM).

8.1 Plán experimentov

Experimenty sieťovania kolagénneho gelu pomocou DAS-KOL boli typu 2², s centrálnym experimentom, s týmito premennými:

Faktor A: množstvo DAS-KOL, respektíve DAS-KOM: 2 – 3,5 – 5 % (vzťahnuté na kolagénnu sušinu v hmote)

Faktor B: doba zrenia kolagénneho gelu: 1 – 2 – 3 dni

8.2 Príprava filmov

Kolagénny gel bola dôkladne uzavretý uchovávaný v chladničke, s gelom sa pracovalo ihneď po vytiahnutí. Bolo odobraných 50±0,1 g kolagénneho gelu, z ktorého bola vytvarovaná placka. Podľa faktoru A (tj. 2, 3, alebo 5 %) k nej bolo pridané množstvo DAS-KOL. Roztok bol rovnomerne rozliaty na placku a 10 minút dôkladne miešaný ručne tak, aby sa roztok rovnomerne dostal do celého obsahu. Gel bol po zamiešaní vytvarovaný do guľôčky, hermeticky uzavrený do PE sáčku, uložený do chladničky pri 6±1 °C a ponechaný zrieť podľa faktoru B (tj. 1, 2 alebo 3 dni). Po uplynulom čase bol gel rozprestretý na plastovú doštičku, z hornej strany prikrytý PE sáčkom a vyváľaný rovnomerne oceľovým valčekom. Doštička s filmom bola potom umiestnená do sušiarne pri zapnutom ventilátore a sušila sa v troch stupňoch, 12 minút pri každej teplote 40, 60 a 80 °C pri rýchlosti ohrevu $\Delta T = 4$ °C/min. Doštička s vysušeným filmom bola vytiahnutá zo sušiarne, odfotená, a film sa potom odlepený uzavrel do uzatvárateľných PE, pripravený k jednotlivým skúškam.

8.3 Výsledky a diskusia

Exp. č.	Faktor A: množstvo DAS-KOL (%)	Faktor B: doba zrenia kolagénnej hmoty (dni)	Obsah sušiny (%)	Hrúbka filmu (mm)	T _s (°C)		F (N)	σ (%)	ε (%)
					pozdlžny smer	priečny smer			
Film bez sieťovadla			88,00	0,065±0,005	49,5	48,0	0,5	21,3	98,5
1	2	1	89,69	0,054±0,005	53,0	53,1	1,9	32,2	155,3
2	2	3	91,91	0,043±0,005	54,4	55,3	2,3	16,7	150,1
3	5	1	90,94	0,055±0,005	54,0	56,5	2,7	21,9	143,0
4	5	3	90,61	0,066±0,005	54,6	59,0	2,9	28,6	131,9
5	3,5	2	85,45	0,050±0,005	54,3	54,1	2,3	15,9	121,9
Film s 2,0 % GA			94,80	0,050±0,005	52,2	52,1	5,3	13,3	146,0

F - tržné zaťaženie po denaturácii – pozdlž, σ - variačný koeficient, ε - pretiahnutie

Tab. 6 Charakterizácia filmov sieťovaných pripraveným dialdehydom škrobu, filmu bez sieťovadla a filmu s 2,0 % GA

Exp. č.	Faktor A: množstvo DAS-KOM (%)	Faktor B: doba zrenia kolagénnej hmoty (dni)	Obsah sušiny (%)	Hrúbka filmu (mm)	T _s (°C)		F (N)	σ (%)	ε (%)
					pozdlžny smer	priečny smer			
Film bez sieťovadla			88,0	0,065±0,005	49,5	48,0	0,5	21,3	98,5
1	2	1	89,0	0,070±0,005	51,6	51,2	2,6	13,2	147,2
2	2	3	88,2		51,8	51,5	2,6	27,3	144,1
3	5	1	90,9		51,7	52,2	2,6	24,7	124,6
4	5	3	91,0		53,6	53,0	1,9	19,0	112,3
5	3,5	2	90,7		52,4	52,0	2,7	11,8	127,8
Film s 2,0 % GA			94,8		0,05±0,005	52,2	52,1	5,3	13,3

F - tržné zaťaženie po denaturácii – pozdlž, σ - variačný koeficient, ε - pretiahnutie

Tab. 7 Charakterizácia filmov sieťovaných komerčným dialdehydom škrobu, filmu bez sieťovadla a filmu s 2,0 % GA

8.3.1 Teploty zmrštenia filmov

Teplota zmrštenia a bobtnacie skúšky sa stanovovali po 9-12 dňoch odležania. Teplota zmrštenia filmov bola stanovovaná pri vzorkách vystrihnutých v pozdĺžnom smere (smer váľania filmu) a v priečnom smere (kolmo na smer váľania filmu).

Exp. č.	Predĺženie (-)/zmrštenie (+) filmu v pozdĺžnom smere				Predĺženie (-)/zmrštenie (+) filmu v priečnom smere			
	T ₀ (mm)	T _z – T _s (mm)	T _s – T (mm)	T – 80 °C (mm)	T ₀ (mm)	T _z – T _s (mm)	T _s – T (mm)	T – 80 °C (mm)
Film bez sieťovadla	+2,0	+2,5	+15,5 (T= °C)	0	+2,0	** (pri 39,6 °C)		
1	0	0	+6,7	0	0	0	+2,7 (T=59,9 °C)	0
2	0	0	+6,0	0	0	0	+2,7 (T=71,5 °C)	0
3	0	0	+6,7	0	0	0	+2,3	0
4	0	0	+7,7	0	0	0	+1,0	0
5	0	0	+8,7	0	0	0	+2,0	0
Film s 2,0 % GA	0	0	+14,0	0	0	0	+7,0	0

T_z – teplota, pri ktorej sa systém začal zahrievať; T_s – teplota, pri ktorej sa film začal zmršťovať; T – teplota ukončenia zmršťovania filmu; T₀ - 4 min bez zahrevu pri pokojovej teplote; ** film sa pri skúške roztrhol

Tab. 8 Zmeny filmov sieťovaných pripraveným dialdehydom škrobu v priečnom a pozdĺžnom smere pri stanovení T_s

Exp. č.	Predĺženie (-)/zmrštenie (+) filmu v pozdĺžnom smere				Predĺženie (-)/zmrštenie (+) filmu v priečnom smere			
	T ₀ (mm)	T _z – T _s (mm)	T _s – T (mm)	T – 80 °C (mm)	T ₀ (mm)	T _z – T _s (mm)	T _s – T (mm)	T – 80 °C (mm)
Film bez sieťovadla	-1,8	0	+15,5 (T=77,4 °C)	0	-4,0	0	+2,0 (T=72,0 °C)	0
1	-0,6	0	+17,4		-2,0	0	+2,0 (T=59,0 °C)	-1,3
2	-0,6	0	+16,7		-1,3	0	+6,0 (T=57,0 °C)	0
3	-0,6	0	+12,7		-1,3	0	+7,4 (T=62,0 °C)	0
4	-0,6	0	+17,4		-1,3	0	+8,0	
5	-0,6	0	+16,7 (T=65,0 °C)	0	-1,3	0	+10,0	
Film s 2,0 % GA [▲]	0	0	+14,0	0	0	0	+7,0 (T=70,0 °C)	0

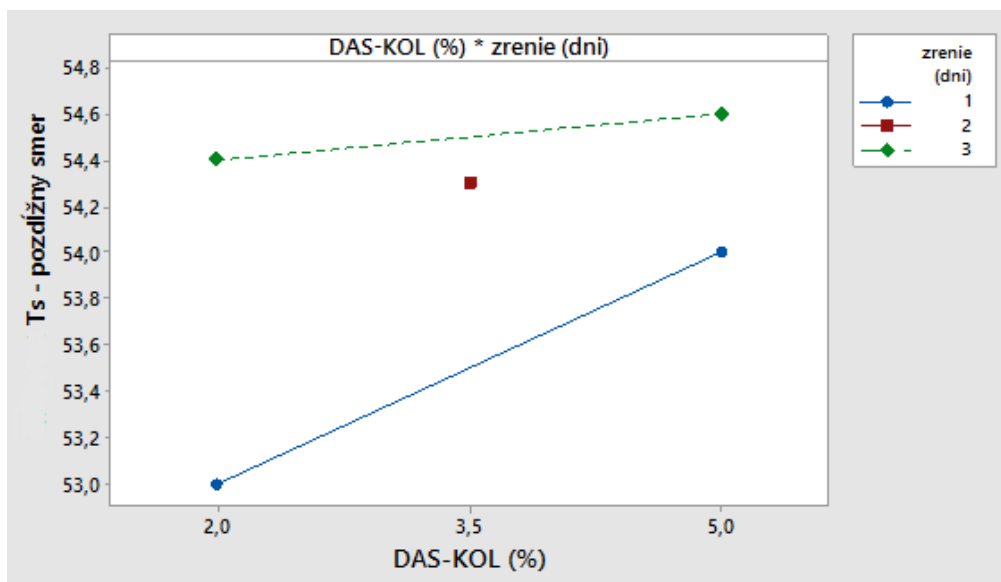
T_z – teplota, pri ktorej sa systém začal zahrievať; T_s – teplota, pri ktorej sa film začal zmršťovať; T – teplota ukončenia zmršťovania filmu; T₀ - 4 min bez zahrevu pri pokojovej teplote

Tab. 9 Zmeny filmov sieťovaných komerčným dialdehydom škrobu v priečnom a pozdĺžnom smere pri stanovení T_s

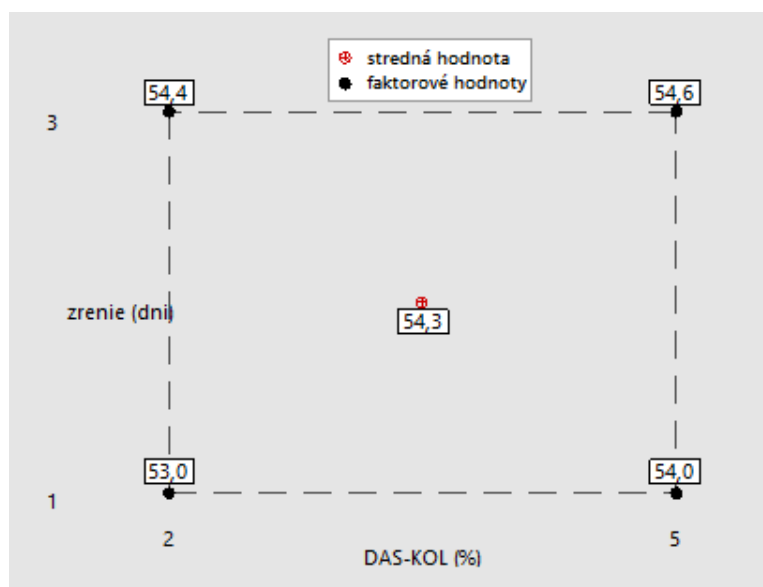
Štatistické vyhodnotenie

Regresná rovnica pre Ts filmov v pozdĺžnom smere má tvar:

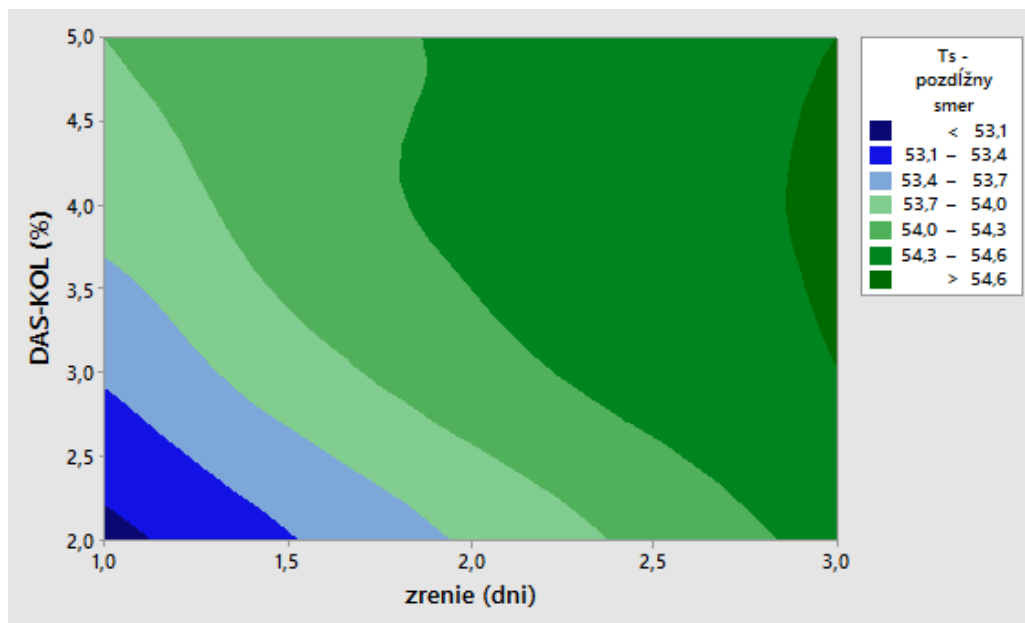
$$y = 51,37 + 0,4667 A + 0,9667 B - 0,1333 AB$$



Obr. 23 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na Ts v pozdĺžnom smere filmov sieťovaných DAS-KOL



Obr. 24 Vplyv jednotlivých faktorov na Ts v pozdĺžnom smere filmov sieťovaných DAS-KOL v kubickom zobrazení

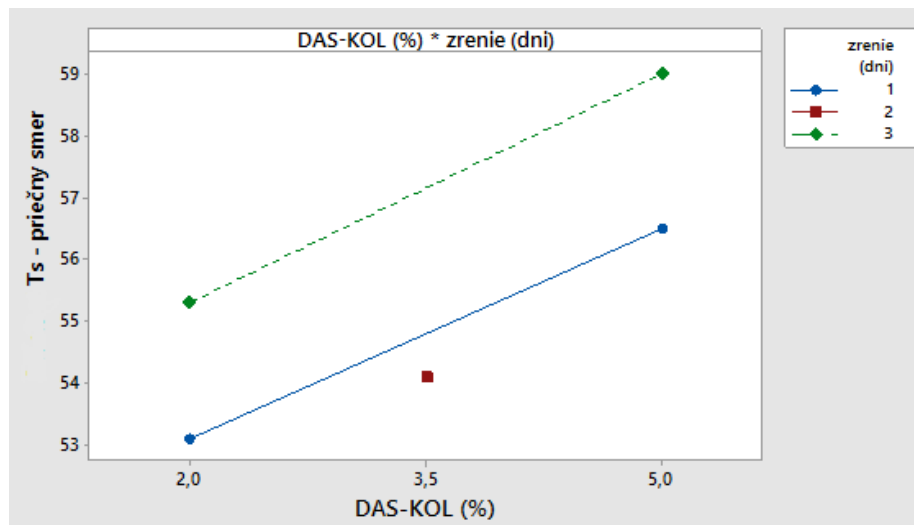


Obr. 25 Vplyv množstva DAS-KOL a zrenia na Ts v pozdĺžnom smere filmov sieťovaných DAS-KOL

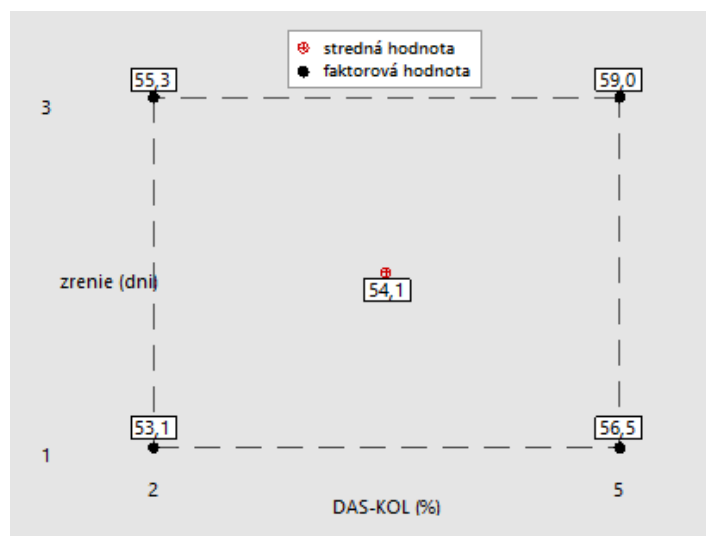
Výsledky vplyvu faktorov na Ts v pozdĺžnom smere ukazujú, že vyšších hodnôt Ts je dosiahnutých pri maximálnej dobe zrenia, so zvyšujúcim sa prídavkom DAS-KOL sa ale Ts ďalej zvyšuje len mierne. Pri minimálnej dobe zrenia sú hodnoty Ts nižšie, avšak so zvyšujúcim sa množstvom DAS-KOL sa Ts výrazne zvyšuje. Najvyššia hodnota Ts v pozdĺžnom smere je zaznamenaná pri maximálnom prídavku DAS-KOL a zároveň najvyššej dobe zrenia. So závislosti množstva DAS-KOL a počte dní zrenia ale vyplýva, že pri určitom množstve DAS-KOL, s cieľom získania vysokých Ts v pozdĺžnom smere stačí ďalej len predlžovať dobu zrenia.

Regresná rovnica pre Ts filmov v priečnom smere má tvar:

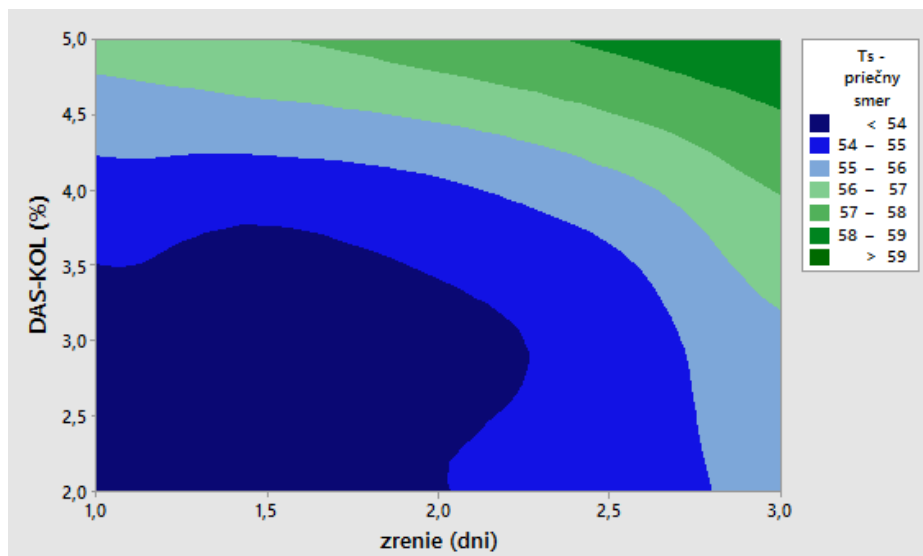
$$y = 49,83 + 1,083 A + 1,000 B + 0,05000 AB$$



Obr. 26 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na Ts v priečnom smere filmov sieťovaných DAS-KOL



Obr. 27 Vplyv jednotlivých faktorov na Ts v priečnom smere filmov sieťovaných DAS-KOL v kubickom zobrazení



Obr. 28 Vplyv množstva DAS-KOL a zrenia na Ts v pričnom smere filmov sieťovaných DAS-KOL

Pri vplyve jednotlivých faktorov na Ts v pričnom smere je vidieť, že pri maximálnej aj minimálnej dobe zrenia sa s postupným prídavkom DAS-KOL identicky výrazne zvyšuje Ts v pričnom smere. Celkovo vyššie hodnoty Ts sú ale dosiahnuté za maximálneho počtu dní zrenia. Tak, ako v prípade Ts v pozdĺžnom smere, tak aj v prípade Ts v pričnom smere je najvyššia hodnota Ts zaznamenaná pri najvyššom prídavku DAS-KOL a najdlhšej dobe zrenia. Na rozdiel od Ts v pozdĺžnom smere je ale so závislosti vplyvu množstva DAS-KOL a zrenia vidieť, že vysokých hodnôt Ts v pričnom smere sa dosahuje so zvyšujúcim sa prídavkom DAS-KOL so zároveň predlžujúcou sa dobou zrenia.

8.3.2 Bobtnacie testy filmov

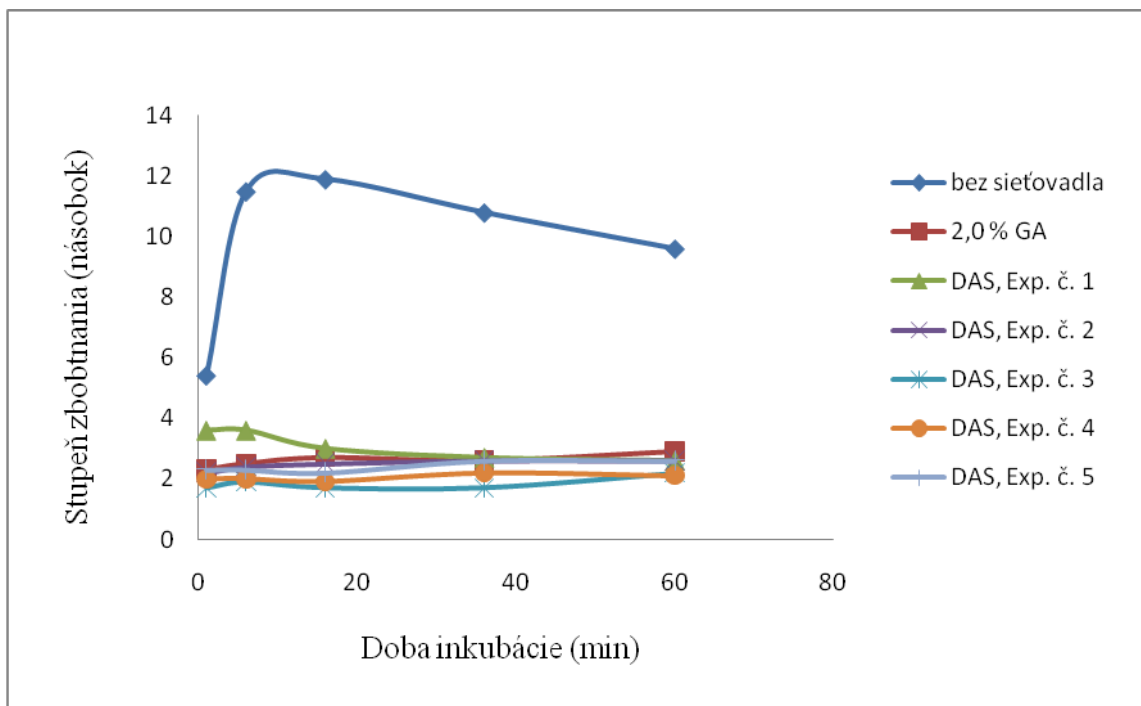
Výsledky bobtnacích skúšok filmov bez sieťovadla, filmu s 2,0 % GA a filmov č. 1-5 sú súhrnne uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Exp. č.	Doba inkubácie (min)	Test pri 26 °C		Test pri 80 °C	
		Stupeň zbobtnania (násobok)	Zmena plochy (%)	Stupeň zbobtnania (násobok)	Zmena plochy (%)
Bez siet'ovadla	1	5,4	5,0	6,2	- 10,0
	6	11,5	20,8	11,9	- 10,8
	16	11,9	20,8	11,3	- 47,0
	36	10,8	20,8	6,2	- 66,0
	60	9,6	20,8	4,8	- 47,5
Pri 80 °C sa film ihneď zvinul do ruličky, od 6 min. inkubácie bol mierne zvlhčený, mliečne sfarbený, od 16 min. bol takmer rovný, na konci sa rozpadal, pri 26 °C sa film nemenil					
1	1	3,6	0	3,2	- 61,5
	6	3,6	0	3,3	- 58,8
	16	3,0	0	3,9	- 56,0
	36	2,7	0	4,0	- 52,0
	60	2,6	0	4,1	- 49,0
Pri 80 °C sa film ihneď zvinul do ruličky, pri 26 °C sa film tiež zvinul do ruličky					
2	1	2,2	0	2,2	- 39,0
	6	2,4	0	2,8	- 41,0
	16	2,5	0	3,3	- 47,8
	36	2,6	0	4,1	- 45,3
	60	2,6	0	4,3	- 47,5
Pri 80 °C sa film ihneď zvinul do ruličky, pri 26 °C sa film tiež zvinul do ruličky					
3	1	1,7	0	2,5	- 43,0
	6	1,9	0	2,7	- 38,3
	16	1,7	0	3,1	- 41,5
	36	1,7	0	3,2	- 43,0
	60	2,2	0	3,0	- 41,5
Pri 80 °C sa film ihneď zvinul do ruličky, pri 26 °C bol film stočený					
4	1	2,0	0	2,6	- 37,0
	6	2,0	0	2,7	- 39,0
	16	1,9	0	2,9	- 40,0
	36	2,2	0	3,0	- 38,3
	60	2,1	0	3,3	- 38,3
Pri 80 °C sa film ihneď zvinul do ruličky, pri 26 °C bol film stočený					
5	1	2,3	0	2,9	- 50,5
	6	2,3	0	2,9	- 50,5
	16	2,2	0	3,0	- 50,5
	36	2,6	0	3,5	- 56,5
	60	2,6	0	3,5	- 55,0
Pri 80 °C sa film ihneď zvinul do ruličky, pri 26 °C sa film tiež zvinul do ruličky					
GA	1	2,3	0	2,4	- 61,5
	6	2,5	0	2,7	- 61,5
	16	2,7	0	2,9	- 61,5
	36	2,6	0	3,3	- 58,8
	60	2,9	0	3,5	- 58,8
Pri 80 °C sa film ihneď zmrštil, potom zostal iba mierne zvlhčený, pri 26 °C sa film nemenil					

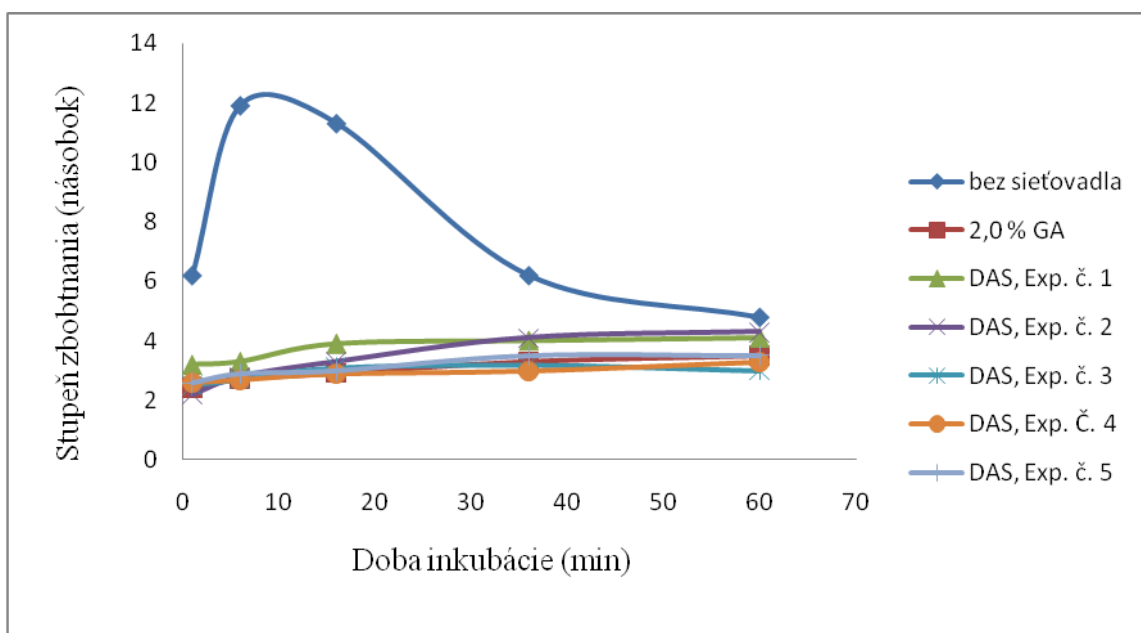
Tab. 10 Výsledky bobtnacích skúšok filmov č. 1-5 siet'ovaných pripraveným dialdehydom škrobu, filmu bez siet'ovadla a filmu s GA

Exp. č.	Doba inkubácie (min)	Test pri 26 °C		Test pri 80 °C	
		Stupeň zbobtnania (násobok)	Zmena plochy (%)	Stupeň zbobtnania (násobok)	Zmena plochy (%)
1	1	2,3	0	2,6	-58,8
	6	2,4	0	3,3	-56,0
	16	2,5	0	3,5	-56,0
	36	2,6	2,5	3,6	-58,0
	60	2,7	2,5	4,0	-53,3
Pri 26 °C je film rovný a pláva na hladine. Pri 80 °C sa film ihneď zmrští a skrúti sa, pláva na hladine					
2	1	2,8	2,5	2,8	-62,5
	6	2,8	2,5	3,4	-60,0
	16	2,6	2,5	3,9	-60,0
	36	2,8	2,5	3,9	-60,0
	60	2,7	2,5	5,0	-50,5
Pri 26 °C je film rovný pláva na hladine. Pri 80 °C sa film ihneď zmrští a skrúti sa, pláva na hladine					
3	1	2,3	0	2,6	-62,5
	6	2,9	0	3,0	-62,5
	16	2,5	0	2,9	-62,5
	36	2,1	0	3,2	-62,5
	60	2,2	0	4,8	-53,3
Pri 26 °C je film rovný pláva na hladine. Pri 80 °C sa film ihneď zmrští a skrúti sa, pláva na hladine					
4	1	2,4	0	2,7	-65,0
	6	2,4	0	3,0	-62,5
	16	2,2	0	3,3	-60,0
	36	2,2	0	3,6	-60,0
	60	2,3	0	4,6	-53,2
Pri 26 °C je film rovný pláva na hladine. Pri 80 °C sa film ihneď zmrští a skrúti sa, pláva na hladine					
5	1	2,1	0	2,5	-61,5
	6	2,3	0	3,0	-58,8
	16	2,4	0	3,1	-62,5
	36	2,5	0	3,8	-58,8
	60	2,6	0	3,9	-58,8
Pri 26 °C je film rovný pláva na hladine. Pri 80 °C bol od 6 min. inkubácie mierne skrútený a plával					

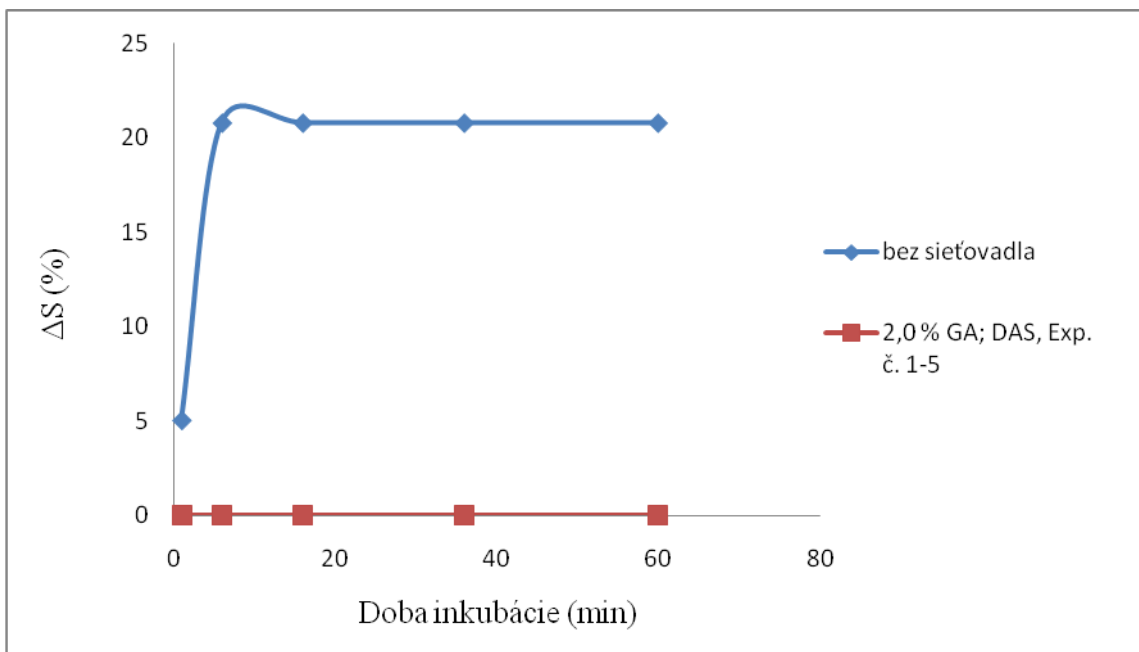
Tab. 11 Výsledky bobtnacích skúšok filmov č. 1-5 sieťovaných komerčným dialdehydom škrobu



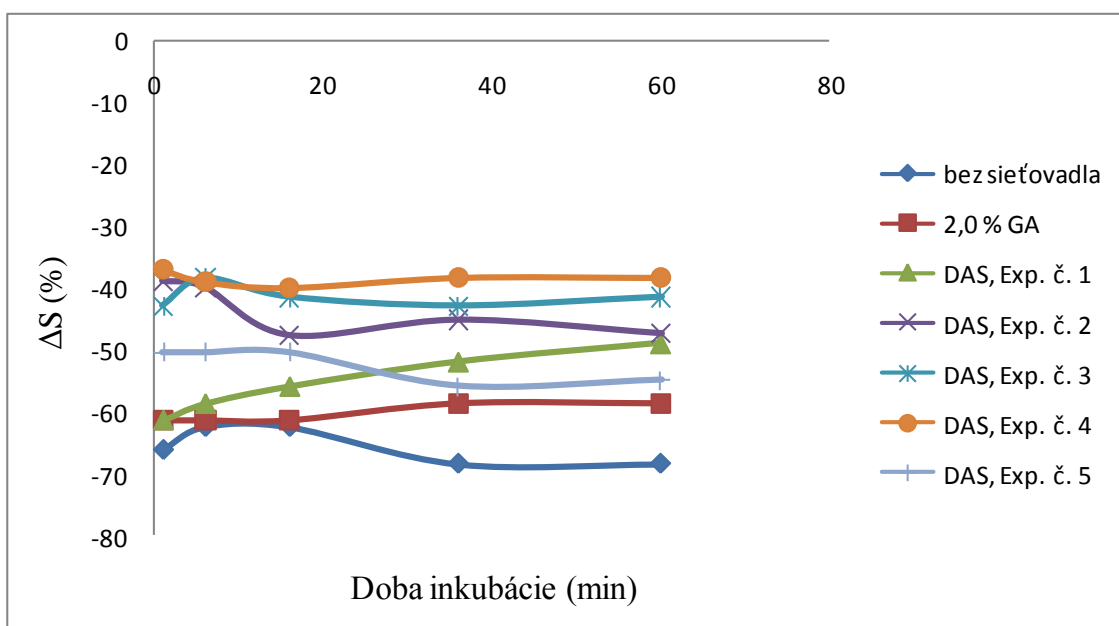
Obr. 29 Stupeň zbobtnania filmov č. 1-5 pri 26 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)



Obr. 30 Stupeň zbobtnania filmov č. 1-5 pri 80 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)



Obr. 31 Zmena plochy vzoriek filmov č. 1-5 behom bobtnacích skúšok pri 26 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)



Obr. 32 Zmena plochy vzoriek filmov č. 1-5 behom bobtnacích skúšok pri 80 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)

Najvyššie hodnoty stupňa zbobtnania pri 26 °C dosahuje film bez sieťovadla. Výrazne nižšie hodnoty má film s 2,0 % GA rovnako ako všetky filmy č. 1-5. Pri filme č. 1 je vidieť mierne vyššie hodnoty stupňa zbobtnania než je to pri filme s 2,0 % GA. Avšak filmy č. 2-5 bobtnajú dokonca o niečo menej než film s 2,0 % GA. Pri teplote 80 °C má takisto film bez sieťovadla najvyššie hodnoty stupňa zbobtnania a film s 2,0 % GA bobtná výrazne menej. Filmy č. 3-5 vykazujú hodnoty takmer identické s filmom s 2,0 % GA. Pri filmoch č. 1, a 2 je zaznamenané o niečo vyššie bobtnanie v porovnaní s filmom s 2,0 % GA a ostatnými filmami.

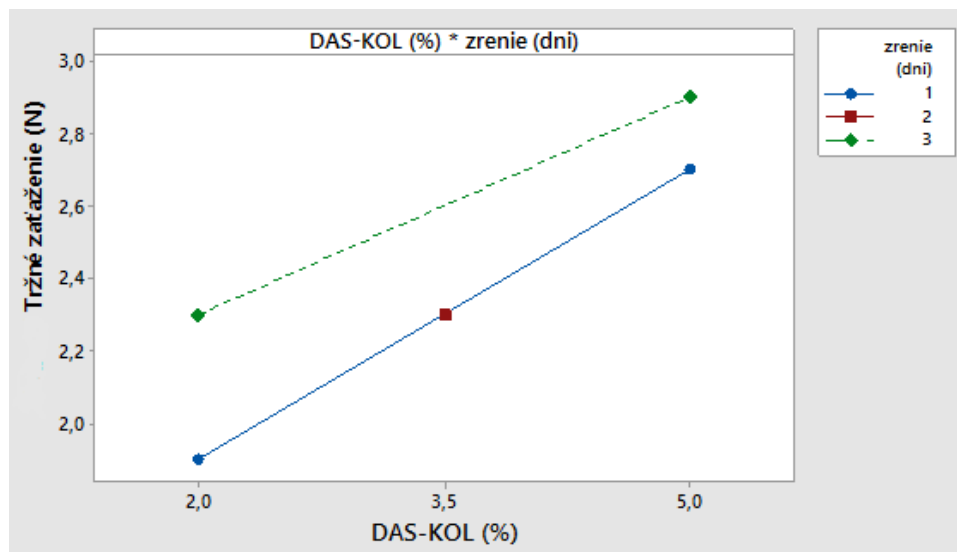
Zmena plochy je pri 26 °C nulová pri filme s 2,0 % GA ako aj všetkých filmoch č. 1-5. Je vidieť, že film bez sieťovadla bobtná niekoľkonásobne viac. Pri teplote 80 °C je ΔS najväčšia pri filme bez sieťovadla. O niečo nižšie hodnoty vykazuje film s 2,0 % GA. Pri všetkých filmoch č. 1-5 je zrejmé, že dosahujú nižšie hodnoty ΔS v porovnaní s filmom s 2,0 % GA. Ich zmena plochy klesá so zvyšujúcim sa množstvom DAS a zvyšujúcou sa dobou zrenia, a teda najmenšiu ΔS má film č. 4.

Výsledky bobtnacích skúšok ukazujú, že najnižšie hodnoty stupňa zbobtnania a zmeny plochy majú film č. 4 (5 % DAS a doba zrenia 3 dni) a film č. 3 (5 % DAS a doba zrenia 1 deň). Tieto filmy dosahujú zároveň najvyššie teploty zmrštenia, a to najmä v priečnom smere, kde pri filme č. 4 teplota zmrštenia dosiahla hodnotu až $T = 59,0$ °C a pri filme č. 3 $T = 56,5$ °C.

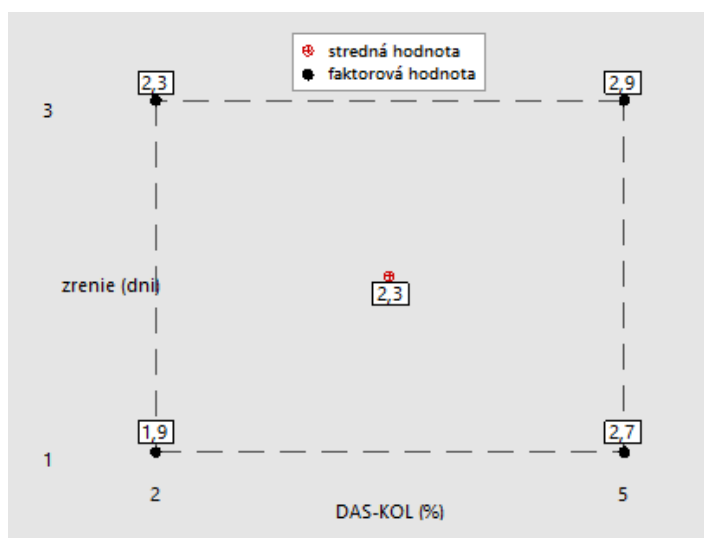
8.3.3 Mechanické skúšky

Regresná rovnica pre tržné zaťaženie filmov má tvar:

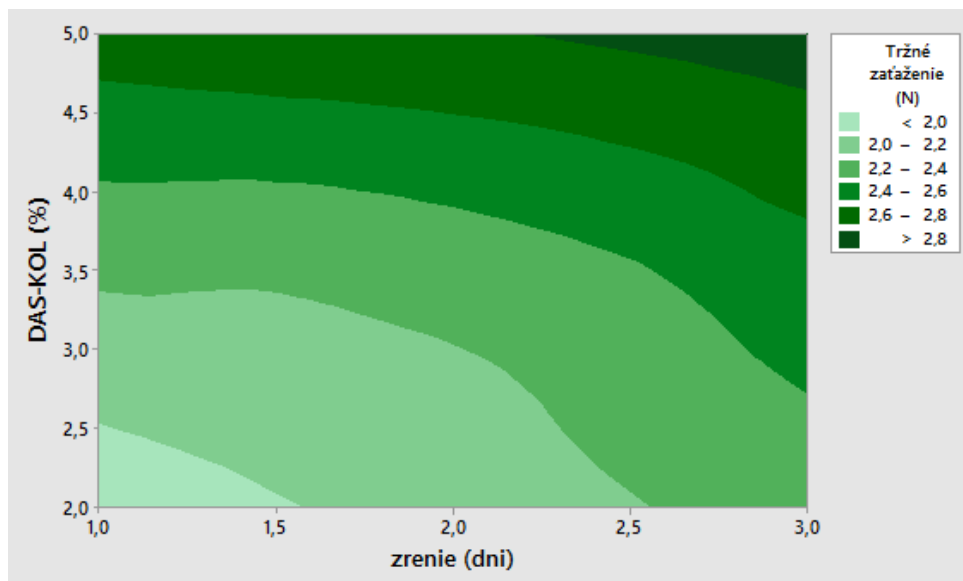
$$y = 1,100 + 0,3000 A + 0,2667 B - 0,03333 AB$$



Obr. 33 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na tržné zaťaženie filmov sieťovaných DAS-KOL



Obr. 34 Vplyv jednotlivých faktorov na tržné zaťaženie filmov sieťovaných DAS-KOL v kubickom zobrazení

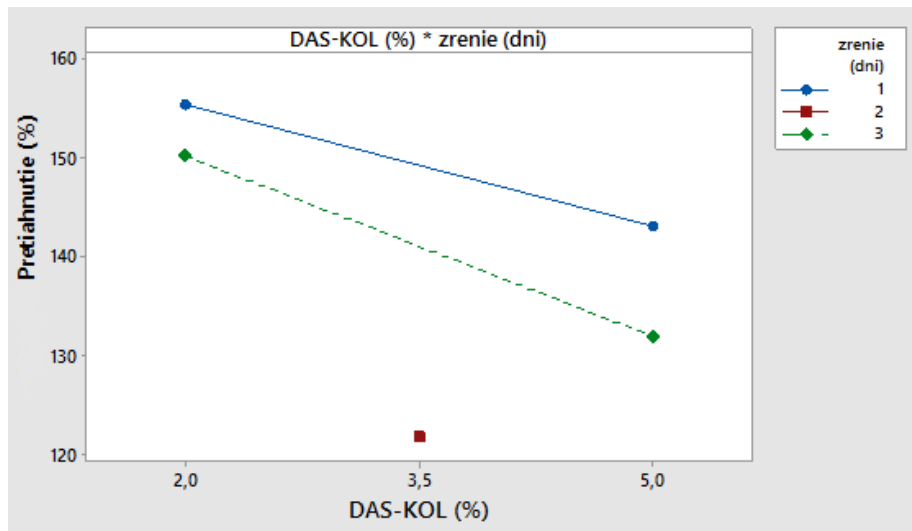


Obr. 35 Vplyv množstva DAS-KOL a zrenia na tržné zaťaženie filmov sieťovaných DAS-KOL

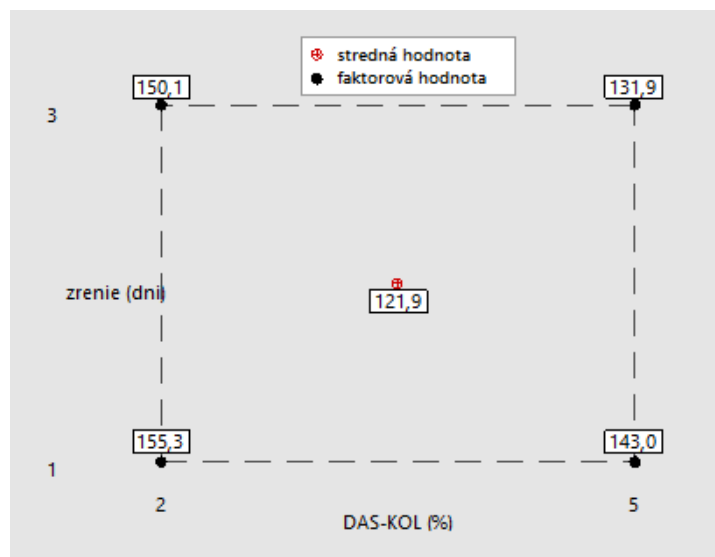
Z výsledkov mechanických skúšok je možné zaznamenať, že sledované faktory majú na tržné zaťaženie po denaturácii takmer identický vplyv ako na T_s v priečnom smere. Tržné zaťaženie sa výrazne zvyšuje so zvyšujúcim sa prídavkom DAS-KOL pri maximálnej dobe zrenia. Tento trend je zachovaný aj pri minimálnej dobe zrenia. Celkovo vyšších hodnôt tržného zaťaženia je ale dosiahnutých pri maximálnom počte dní zrenia. Najvyššia hodnota tržného zaťaženia je zaznamenaná pri maximálnom množstve DAS-KOL a najdlhšej dobe zrenia. Ako v prípade T_s v priečnom smere, tak aj pri mechanických parametroch sa s postupne predlžujúcou dobou zrenia a s postupným prídavkom DAS-KOL priamo úmerne zvyšuje tržné zaťaženie filmov.

Regresná rovnica pre pretiahnutie má tvar:

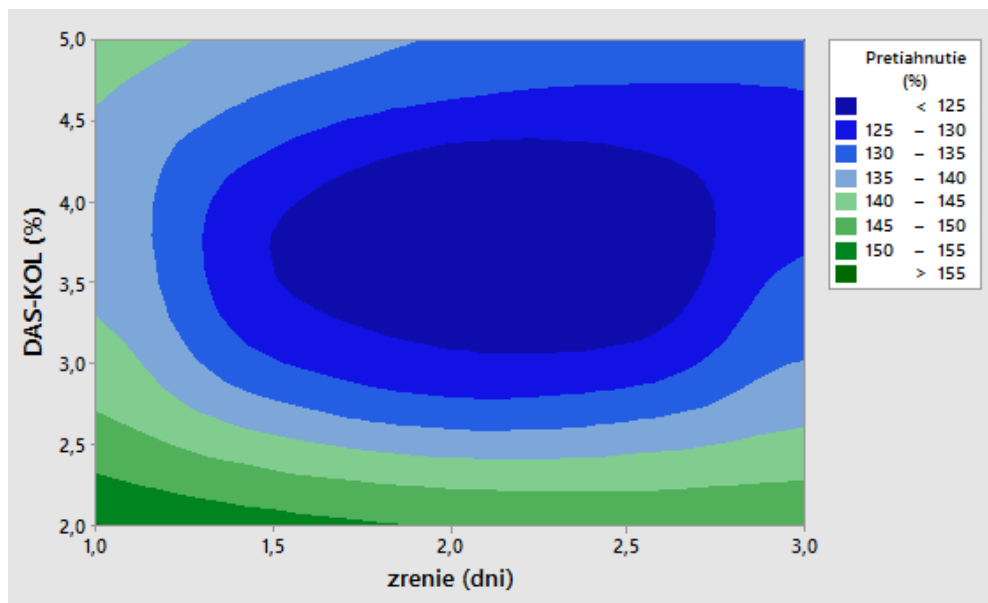
$$y = 164,1 - 3,117 A - 0,6333 B - 0,9833 AB$$



Obr. 36 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na pretiahnutie filmov sieťovaných DAS-KOL



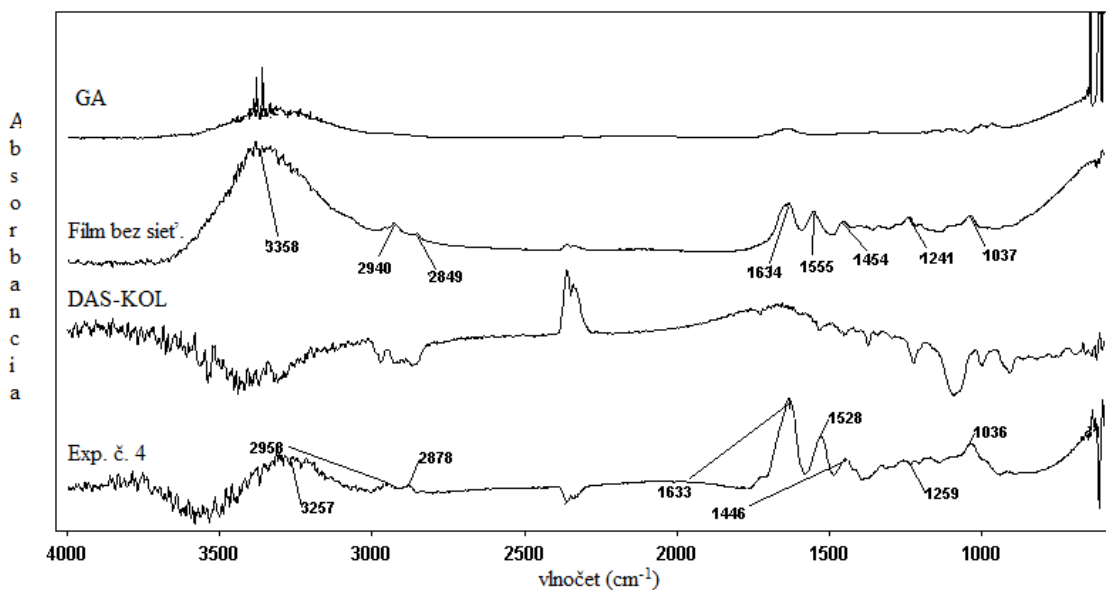
Obr. 37 Vplyv jednotlivých faktorov na pretiahnutie filmov sieťovaných DAS-KOL v kubickom zobrazení



Obr. 38 Vplyv množstva DAS-KOL a zrenia na pretiahnutie filmov sieťovaných
DAS-KOL

Pri vplyve jednotlivých faktorov na pretiahnutie filmov je možné vidieť opačný trend než je zaznamenaný pri tržnom zaťažení po denaturácii. S minimálnym počtom dní zrenia sa pri zvyšujúcom sa prídavku DAS-KOL znižuje pretiahnutie filmov. Nižších hodnôt pretiahnutia sa dosahuje pri naopak maximálnom počte dní zrenia, a so zvyšujúcim sa množstvom DAS-KOL takisto klesá pretiahnutie filmov. Najvyššia hodnota pretiahnutia filmov sa vyskytuje v prípade najnižšieho množstva DAS-KOL a najmenej doby zrenia. Priamo úmerne so zvyšujúcim sa množstvom DAS-KOL so zároveň zvyšujúcou sa dobou zrenia sa dosahuje vysokých hodnôt pretiahnutia filmov.

8.3.4 FTIR



Obr. 39 IČ spektrum filmu č. 4, pripraveného dialdehydu škrobu, filmu bez sieťovadla a glutaraldehydu

Zo získaných infračervených spektier všetkých filmov sieťovaných pomocou DAS-KOL je pri porovnaní s filmom bez sieťovadla možné zhodnotiť, že spektrá majú podobný priebeh, avšak nie sú identické. Vytvorenie nových píkov nebolo zaznamenané, zároveň ani vymiznutie žiadneho z píkov. Rozdiely sú zrejme predovšetkým zo zmien intenzity charakteristických pásov. Vo väčšine prípadov sa jednalo o zníženie intenzity jednotlivých absorpčných pásov. Spoločným znakom pri všetkých filmoch je ale zaznamenaný buď posun alebo výrazné zníženie intenzity píku v rozsahu 3700-3100 cm⁻¹: N-H vibrácie (3325 cm⁻¹) a –OH vibrácie (z vody viazanej na kolagén). Omnoho nižšia intenzita píku v rozsahu týchto vlnočtov pri sieťovanom kolagéne znamená, že behom sieťujúcej reakcie kolagén stratil vodu, ktorá na neho bola naviazaná (85).

V nasledujúcej tabuľke sú zhrnuté všetky odlišnosti v spektrách filmov v porovnaní s nez sieťovaným filmom.

Funkčná skupina	Vlnočet (cm ⁻¹)	Filmy č.				
		1	2	3	4	5
-CO-NH- funkčná skupina (amidová I väzba)	3358	posun píku	posun píku	nižšia intenzita	posun píku	nižšia intenzita
vibrácie -CH ₂ - skupiny	2940	posun píku	nižšia intenzita	rovnaká intenzita	rovnaká intenzita	rovnaká intenzita
vibrácie -CH ₃ - skupiny	2849	nižšia intenzita	nižšia intenzita	rovnaká intenzita	vyššia intenzita	rovnaká intenzita
-CO-NH- funkčná skupina (amidová I väzba)	1555	nižšia intenzita	nižšia intenzita	nižšia intenzita	vyššia intenzita	nižšia intenzita
skupina -N=C=O-	1454	nižšia intenzita	rovnaká intenzita	rovnaká intenzita	rovnaká intenzita	nižšia intenzita
skupina =C-O-C	1241	vyššia intenzita	vyššia intenzita	vyššia intenzita	vyššia intenzita	rovnaká intenzita
primárna funkčná skupina R-OH	1037	vyššia intenzita	posun píku	rovnaká intenzita	nižšia intenzita	nižšia intenzita

Tab. 12 Odlišnosti charakteristických píkov filmov sieťovaných pomocou DAS-KOL v porovnaní s filmom bez sieťovadla

8.4 Porovnanie výsledkov sieťovania obidvoma typmi DAS

Z porovnania výsledkov sieťovania laboratórne pripraveným a komerčným dialdehydom škrobu je zrejmé, že obidva typy DAS majú podobné vlastnosti, pričom laboratórne pripravený dialdehyd škrobu vykazuje vo viacerých parametroch dokonca vlastnosti lepšie. Teplota zmrštenia v pozdĺžnom a v priečnom smere sa u obidvoch typov zvyšuje pri použití maximálneho množstva DAS a najvyššej doby zrenia. Laboratórne pripravený DAS ale dosahuje celkovo vyššie teploty zmrštenia a to aj v pozdĺžnom aj v priečnom smere. Výsledky bobtnacích skúšok tiež ukazujú, že laboratórne pripravený DAS má hodnoty stupňa zbobtnania a zmeny plochy nižšie a že niektoré filmy sieťované komerčným DAS menia plochu aj pri nízkej teplote. Najvyššia T_s , a to v priečnom smere, bola zaznamenaná pri filme sieťovanom pripraveným DAS (5 % DAS a 3 dni zrenia), ktorý mal zároveň najlepšie parametre bobtnania. Obidva typy DAS majú tiež mechanické parametre rovnako ovplyvnené danými faktormi, avšak laboratórne pripravený DAS vykazuje tiež vyššie hodnoty tržného zaťaženia a pretiahnutia.

9 OVERENIE REAKCIÍ KOLAGÉNNEHO GELU S HYDROLYZÁTOM KOLAGÉN-ELASTÍNOVÉHO TYPU

Pri týchto experimentoch bol použitý hydrolyzát kolagén-elastínového typu (označenie KEH).

9.1 Plán experimentov

Experimenty interakcie kolagénneho gelu s kolagén-elastínovým hydrolyzátom boli typu 2^2 , s centrálnym experimentom, s týmito premennými:

Faktor A: množstvo KEH: 5 – 10 – 15 % (vzťahnuté na kolagénnu sušinu v hmote)

Faktor B: zrenie kolagénneho gelu po zamiešaní sieťovadla: 1 – 3 – 5 dní

9.2 Príprava filmov

Kolagénny gel bol dôkladne uzavretý uchovávaný v chladničke, s gelom sa pracovalo ihneď po vytiahnutí. Bolo odobraných $100 \pm 0,1$ g kolagénneho gelu, z ktorého bola vytváraná placka. Podľa faktoru A (tj. 5, 10 alebo 15 %) k nemu bolo pridané množstvo KEH. Roztok bol rovnomerne rozliaty na placku a 10 minút dôkladne miešaný ručne tak, aby sa roztok rovnomerne dostal do celého obsahu. Gel bol po zamiešaní vytvarovaný do guľôčky, hermeticky uzavrený do PE sáčku, uložený do chladničky pri 6 ± 1 °C a ponechaný zrieť podľa faktoru B (tj. 1, 3 alebo 5 dní). Po uplynulom čase bol gel rozprestretý na PMMA doštičku, z hornej strany prikrytý PE sáčkom a vyváľaný rovnomerne oceľovým valčekom. Doštička s filmom bola potom umiestnená do sušiarne pri zapnutom ventilátore a sušila sa v troch stupňoch, 12 minút pri každej teplote 40, 60 a 80 °C pri rýchlosti ohrevu $\Delta T = 4$ °C/min. Doštička s vysušeným filmom bola vytiahnutá zo sušiarne, odfotená, a film sa potom odlepený uzavrel do uzatvárateľných PE, pripravený k jednotlivým skúškam.

Rozpúšťanie KEH

Dané množstvo KEH bolo rozpustené v destilovanej vode pri izbovej teplote na magnetickom miešadle po dobu 5 minút. Pre dolný limit dávkovania KEH bolo použitých 6 ml vody, pri strednom limite 8 ml vody a pri hornom limite 10 ml vody.

9.3 Výsledky a diskusia

Exp. č.	Faktor A: množstvo KEH (%)	Faktor B: doba zrenia kolagénej hmoty (dni)	Obsah sušiny (%)	Hrúbka filmu (mm)	T _s (°C)		Tržné zaťaženie po denaturácii – pozdĺž, F (N)	Variačný koeficient (%)	Pretiahnutie, ε (%)
					pozdĺžny smer	priečny smer			
Film bez sieťovadla			88,03	0,065±0,005	49,5	48,0	0,5	21,3	98,5
1	5	1	91,28	0,052±0,005	53,4	53,7	1,3	17,1	90,3
2	5	5	91,69	0,054±0,005	54,0	58,8	1,3	25,6	104,6
3	15	1	89,71	0,045±0,005	54,3	56,1	1,2	19,1	134,6
4	15	5	90,74	0,053±0,005	53,1	54,8	1,2	14,3	117,9
5	10	3	90,77	0,044±0,005	52,8	57,0	1,7	16,6	138,9
Film s 2,0 % GA			94,78	0,050±0,005	52,2	52,1	5,3	13,3	146,0

Tab. 13 Charakterizácia filmov s použitím kolagén-elastínového hydrolyzátu, filmu bez sieťovadla a filmu s 2,0 % GA

9.3.1 Teploty zmrštenia filmov

Exp. č.	Predĺženie (-)/zmrštenie (+) filmu v pozdĺžnom smere				Predĺženie (-)/zmrštenie (+) filmu v priečnom smere			
	T ₀ (mm)	T _z – T _s (mm)	T _s – T (mm)	T – 80 °C (mm)	T ₀ (mm)	T _z – T _s (mm)	T _s – T (mm)	T – 80 °C (mm)
Film bez sieťovadla	-1,8	+2,5	+15,5 (T= 77,4 °C)	0	-4,0	0	+2,0 (T= 72,0 °C)	0
1	0	0	+7,7	0	-1,34	0	+3,7 (T= 72,5 °C)	0
2	0	0	+9,7	0	-2,68	0	+1,34 (T= 64,4 °C)	0
3	0	0	+9,0 (T= 76,4 °C)	0	0	0	+1,7	0
4	0	0	+8,4	0	-1,34	0	+3,7 (T= 74,2 °C)	0
5	-0,67	0	+9,0	0	0	0	**	0
Film s 2,0 % GA	0	0	+14,0	0	0	0	+7,0	0

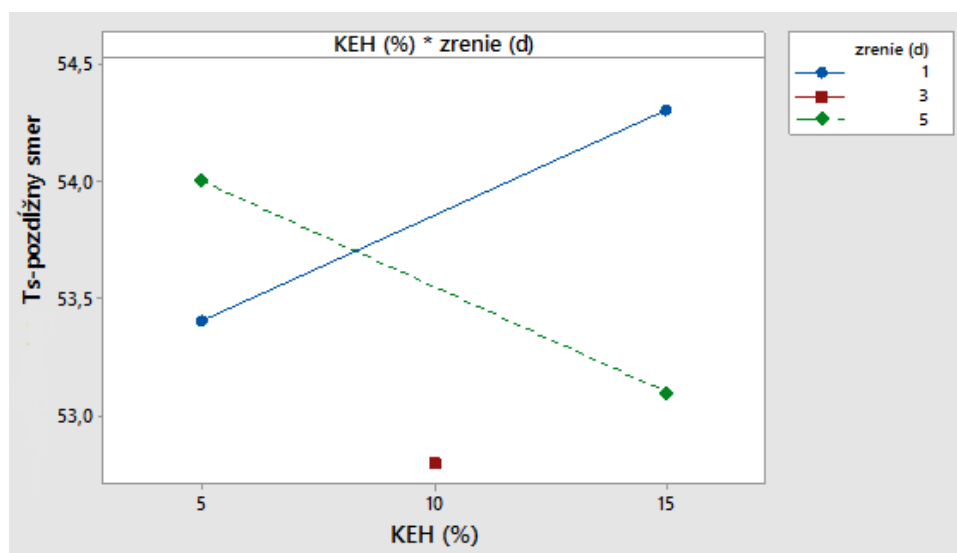
T_z – teplota, pri ktorej sa systém začal zahrievať; T_s – teplota, pri ktorej sa film začal zmršťovať; T – teplota ukončenia zmršťovania filmu; T₀ - 4 min bez zahrevu pri pokojovej teplote; ** film sa pri skúške roztrhol

Tab. 14 Zmeny filmov s použitím kolagén-elastínového hydrolyzátu v priečnom a pozdĺžnom smere pri stanovení T_s

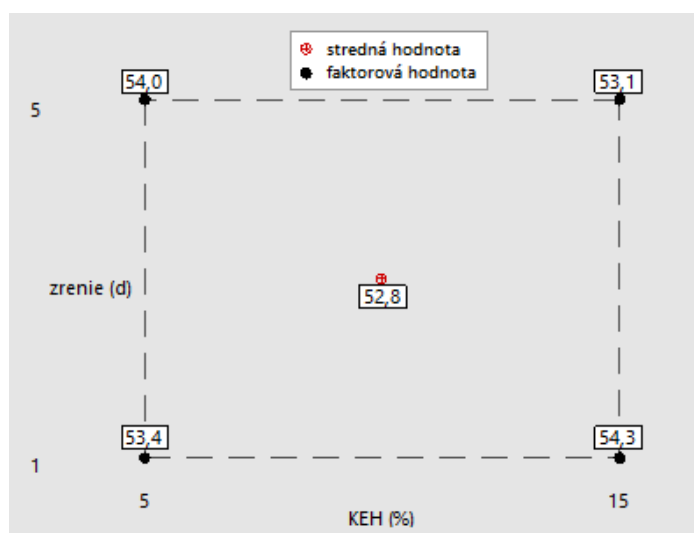
Štatistické vyhodnotenie

Regresná rovnica pre Ts filmov v pozdĺžnom smere má tvar:

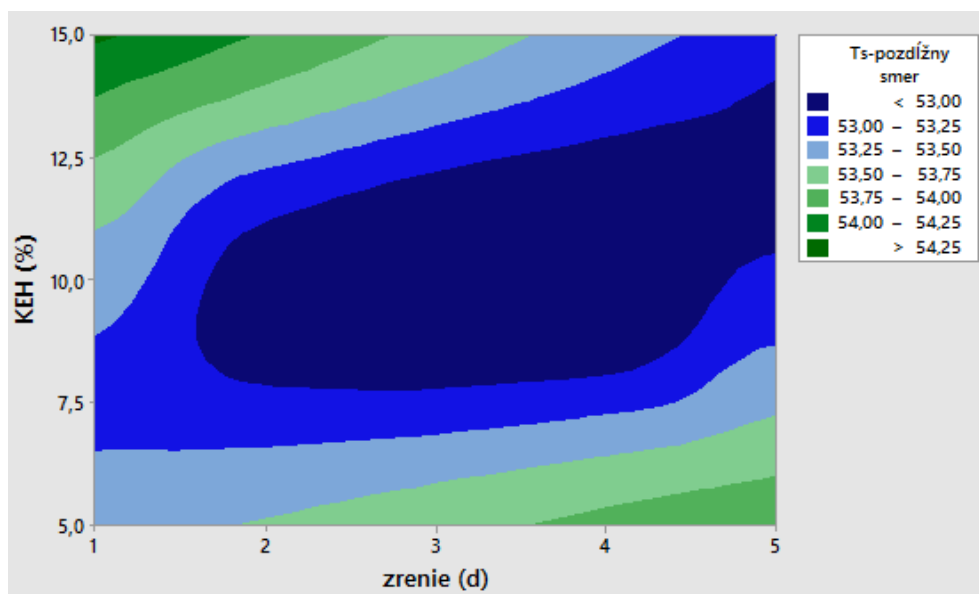
$$y = 52,57 + 0,1350 A + 0,3750 B - 0,04500 AB$$



Obr. 40 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na Ts v pozdĺžnom smere filmov sieťovaných KEH



Obr. 41 Vplyv jednotlivých faktorov na Ts v pozdĺžnom smere filmov sieťovaných KEH v kubickom zobrazení

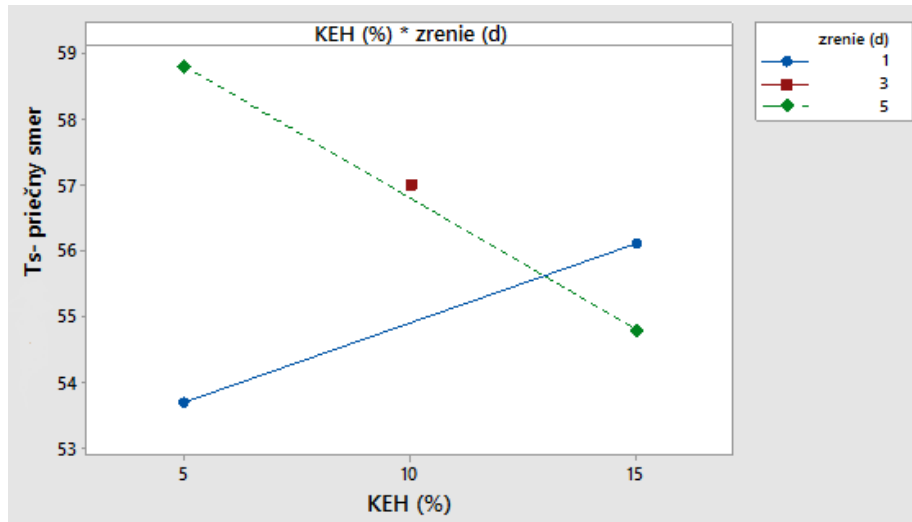


Obr. 42 Vplyv množstva KEH a zrenia na Ts v pozdĺžnom smere filmov siet'ovaných KEH

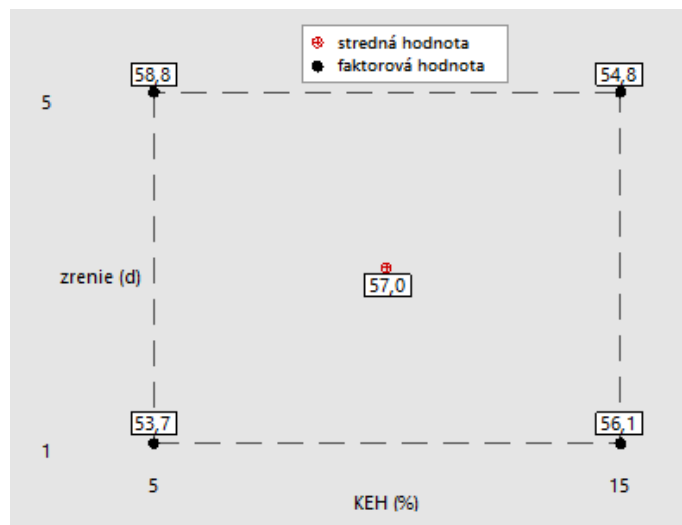
Z vplyvu interakcií sledovaných faktorov na Ts v pozdĺžnom smere vyplýva, že pri minimálnej dobe zrenia sa so zvyšujúcim prídavkom KEH zvyšuje Ts. Naopak, v prípade doby zrenia maximálnej sa s postupným prídavkom KEH znižuje Ts v pozdĺžnom smere. Najvyššej hodnoty Ts je dosiahnutej pri použití maximálneho množstva KEH a minimálnej doby zrenia. Zo závislosti vplyvu množstva KEH a zrenia je vidieť, že vysokých hodnôt Ts je možné dosiahnuť buď pri maximálnej dobe zrenia a minimálnom množstve KEH, alebo pri maximálnom množstve KEH a minimálnej dobe zrenia. Vyšších hodnôt Ts v pozdĺžnom smere sa ale dosahuje v druhom prípade.

Regresná rovnica pre Ts filmov v priečnom smere má tvar:

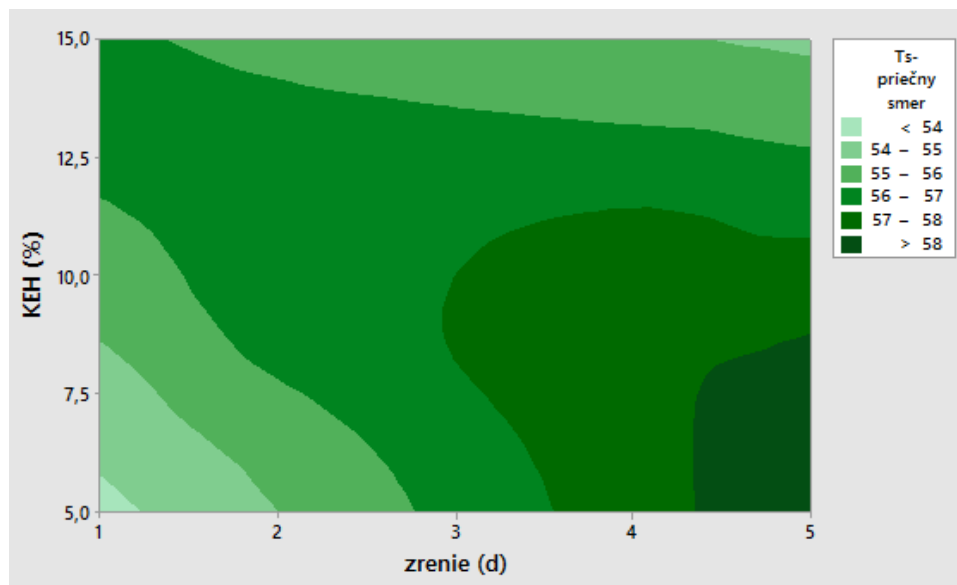
$$y = 50,43 + 0,4000 A + 2,075 B - 0,1600 AB$$



Obr. 43 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na Ts v priechnom smere filmov sieťovaných KEH



Obr. 44 Vplyv jednotlivých faktorov na Ts v priechnom smere filmov sieťovaných KEH v kubickom zobrazení



Obr. 45 Vplyv množstva KEH a zrenia na Ts v pričnom smere filmov sieťovaných KEH

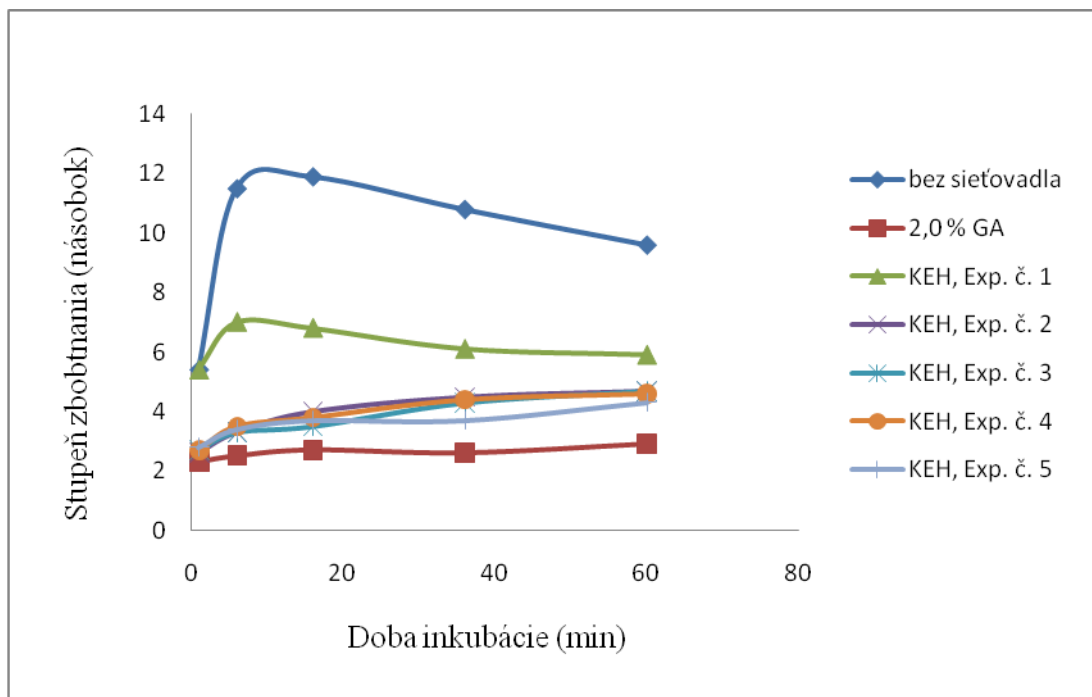
V prípade Ts v pričnom smere je vidieť podobný priebeh v plyvu jednotlivých faktorov. Ts sa znižuje pri maximálnej dobe zrenia s postupným prídavkom KEH. Takisto naopak sa zvyšuje Ts pri minimálnom počte dní zrenia s postupným pribúdajúcim množstvom KEH. Najvyššej hodnoty Ts v pričnom smere sa dosahuje použitím minimálneho množstva KEH pri najvyššej dobe zrenia. Najvyššie hodnoty Ts v pričnom smere sa získavajú priamo úmerne so zvyšujúcou sa dobou zrenia pri minimálnych množstvách KEH.

9.3.2 Bobtnacie testy

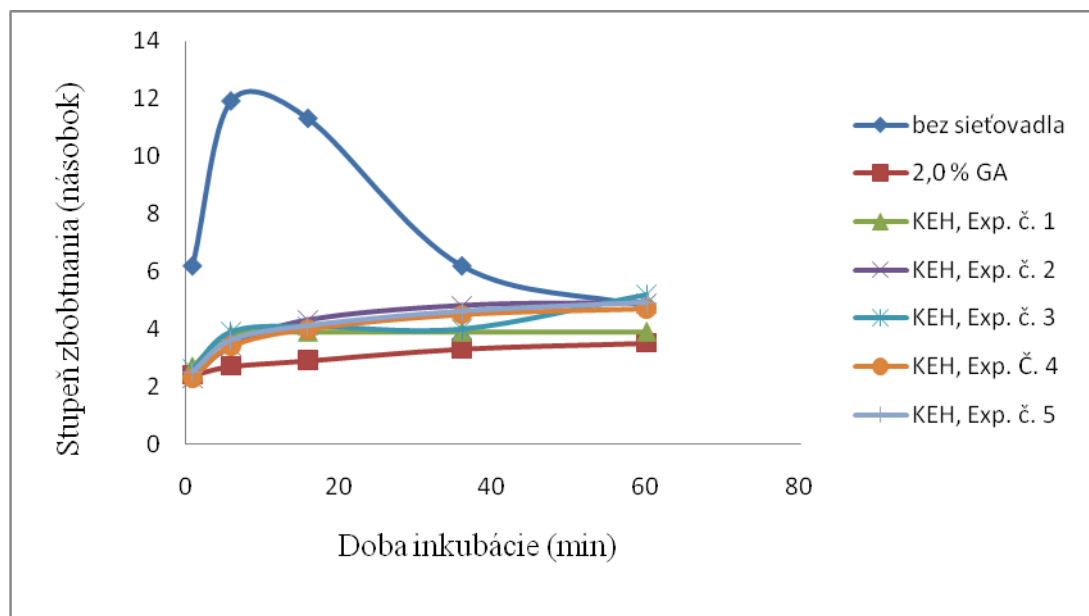
Výsledky bobtnacích skúšok filmov bez sieťovadla, filmu s 2,0 % GA a filmov č. 1-5 sú súhrnne uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Exp. č.	Doba inkubácie (min)	Test pri 26 °C		Test pri 80 °C	
		Stupeň zbobtnania (násobok)	Zmena plochy (%)	Stupeň zbobtnania (násobok)	Zmena plochy (%)
Bez siet'ovadla	1	5,4	5,0	6,2	- 10,0
	6	11,5	20,8	11,9	- 10,8
	16	11,9	20,8	11,3	- 47,0
	36	10,8	20,8	6,2	- 66,0
	60	9,6	20,8	4,8	- 47,5
Pri 80 °C sa film ihneď zvinul do ruličky, od 6 min. inkubácie bol mierne zvltný, mliečne sfarbený, od 16 min. bol takmer rovný, na konci sa rozpadal, pri 26 °C sa film nemenil					
1	1	5,4	0	2,7	-74,0
	6	7,0	0	3,8	-66,3
	16	6,8	0	3,9	-66,3
	36	6,1	0	3,9	-70,8
	60	5,9	0	3,9	-70,8
Pri 80 °C sa film ihneď zvinul do ruličky, pri 26 °C bol rovný, od 6. min. mierne zvltný					
2	1	2,6	0	2,3	-72,5
	6	3,3	0	3,4	-65,0
	16	4,0	0	4,3	-61,3
	36	4,5	0	4,8	-68,0
	60	4,7	0	4,9	-61,3
Pri 80 °C sa film ihneď zvinul do ruličky, pri 26 °C bol rovný, od 6. min. mierne zvltný					
3	1	2,7	0	2,6	-80,0
	6	3,3	0	3,9	-61,8
	16	3,5	0	4,1	-64,0
	36	4,3	0	4,0	-68,0
	60	4,7	0	5,2	-64,0
Pri 80 °C sa film ihneď zvinul do ruličky, pri 26 °C bol film rovný					
4	1	2,7	0	2,3	-76,0
	6	3,5	0	3,4	-68,5
	16	3,8	0	4,0	-68,5
	36	4,4	0	4,5	-72,0
	60	4,6	0	4,7	-64,0
Pri 80 °C sa film ihneď zvinul do ruličky, pri 26 °C bol film rovný					
5	1	2,8	0	2,5	-68,5
	6	3,4	0	3,6	-62,5
	16	3,7	0	4,1	-64,0
	36	3,7	0	4,6	-61,8
	60	4,3	0	4,9	-55,0
Pri 80 °C sa film ihneď zvinul do ruličky, pri 26 °C bol film rovný					
GA	1	2,3	0	2,4	- 61,5
	6	2,5	0	2,7	- 61,5
	16	2,7	0	2,9	- 61,5
	36	2,6	0	3,3	- 58,8
	60	2,9	0	3,5	- 58,8
Pri 80 °C sa film ihneď zmrštil, potom zostal iba mierne zvltný, pri 26 °C sa film nemenil					

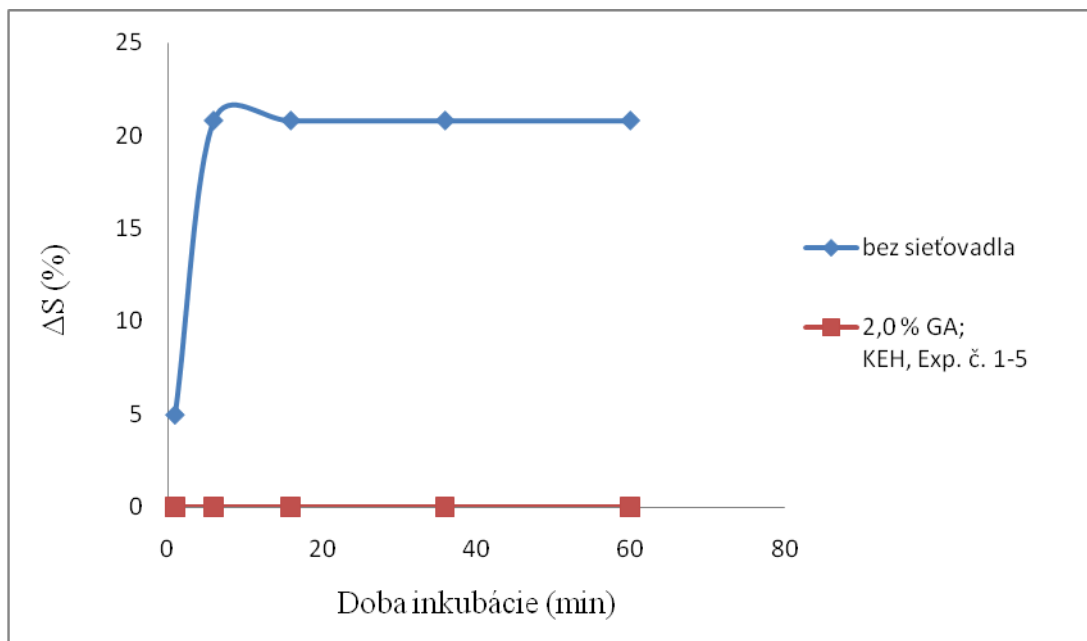
Tab. 15 Výsledky bobtnacích skúšok filmov č. 1-5, filmu bez siet'ovadla a filmu s GA



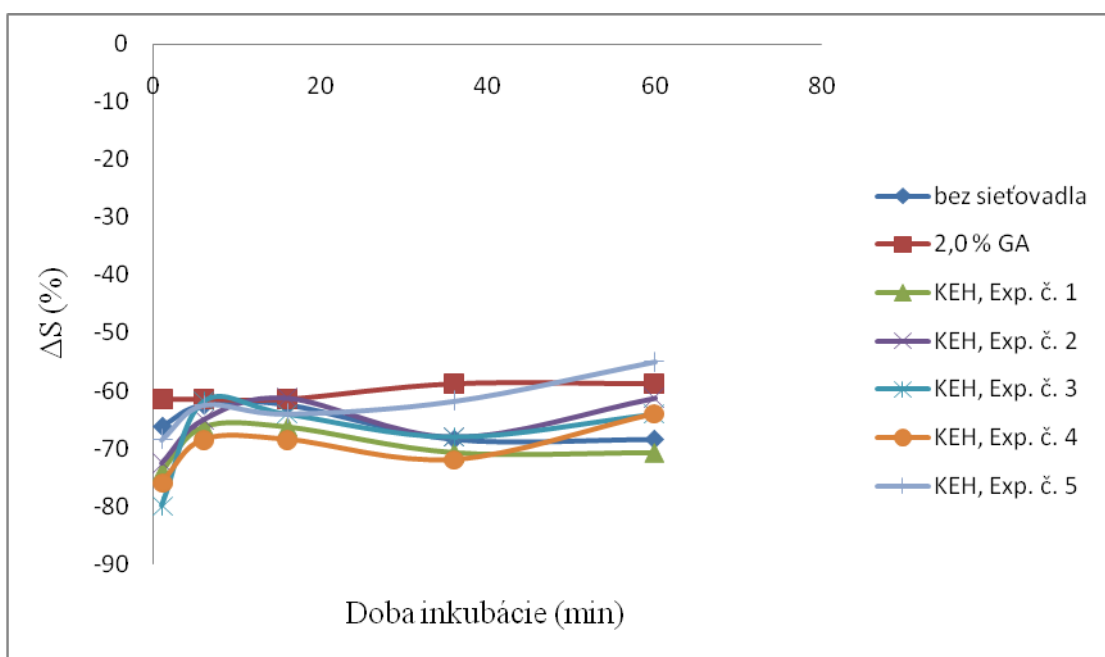
Obr. 46 Stupeň zbobtnania filmov č. 1-5 pri 26 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)



Obr. 47 Stupeň zbobtnania filmov č. 1-5 pri 80 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)



Obr. 48 Zmena plochy vzoriek filmov č. 1-5 behom bobtnacích skúšok pri 26 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)



Obr. 49 Zmena plochy vzoriek filmov č. 1-5 behom bobtnacích skúšok pri 80 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)

Stupeň zbobtnania pri teplote 26 °C má film bez sieťovadla najvyšší. Najlepšie hodnoty dosahuje film s 2,0 % GA. Všetky filmy č. 1-5 majú hodnoty stupňa zbobtnania vyššie v porovnaní s filmom s 2,0 % GA ale zároveň nižšie než má film bez sieťovadla. Najmenšie bobtnanie je zaznamenané pri filme č. 5. Medzi filmami č. 2, 3 a 4 je len minimálny rozdiel v bobtnaní. Najvyššie hodnoty stupňa zbobtnania je možné vidieť pri filme č. 1. Pri teplote 80 °C je situácia podobná. Najmenej bobtná film s 2,0 % GA a výrazne viac film bez sieťovadla. Takisto všetky filmy č. 1-5 bobtnajú viac ako film s 2,0 % GA ale zároveň menej než film bez sieťovadla. Filmy majú takmer identické hodnoty stupňa zbobtnania, o niečo menšie však vykazuje film č. 1.

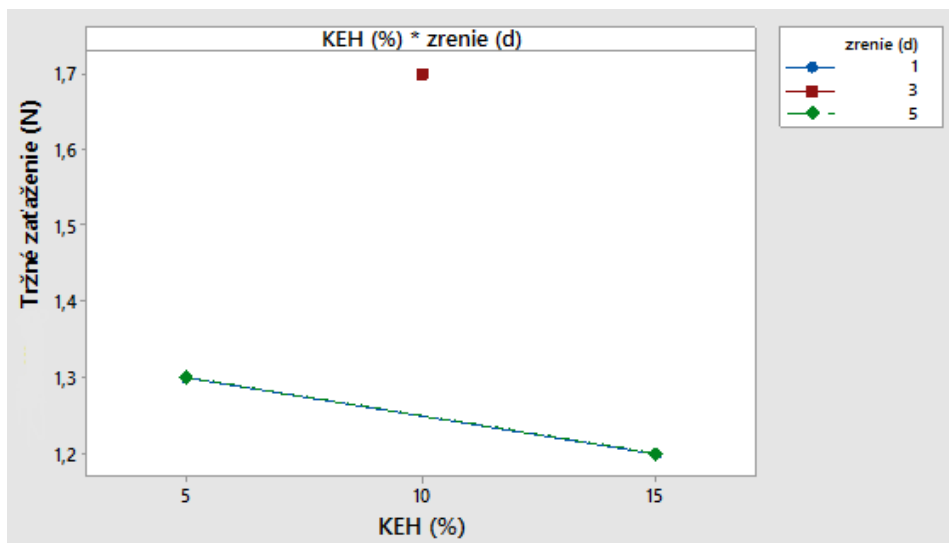
Zmena plochy pri 26 °C je nulová pri filme s 2,0 % GA. Svoju plochu mení film bez sieťovadla, a to výrazne viac. Všetky filmy č. 1-5 majú vlastnosti ako film s 2,0 % GA, a síce nemenia svoju plochu vôbec. Pri teplote 80 °C je zrejmé, že najmenšiu ΔS má film s 2,0 % GA. Film bez sieťovadla má hodnoty ΔS o niečo vyššie, a tieto hodnoty majú podobné všetky filmy č. 1-5. Najviac sa ale svojimi hodnotami ΔS približuje k filmu s 2,0 % GA film č. 5.

Z výsledkov bobtnacích skúšok je zrejmé, že žiadny z filmov nedosahoval parametre lepšie od filmu s 2,0 % GA. Avšak mierne rozdiely medzi filmami ukazujú, že najviac sa k tomuto filmu približuje hodnotami stupňa zbobtnania ako aj zmenou plochy film č. 5, ktorý má jednu z najvyšších teplôt zmrštenia, a to v priečnom smere ($T = 57,0$).

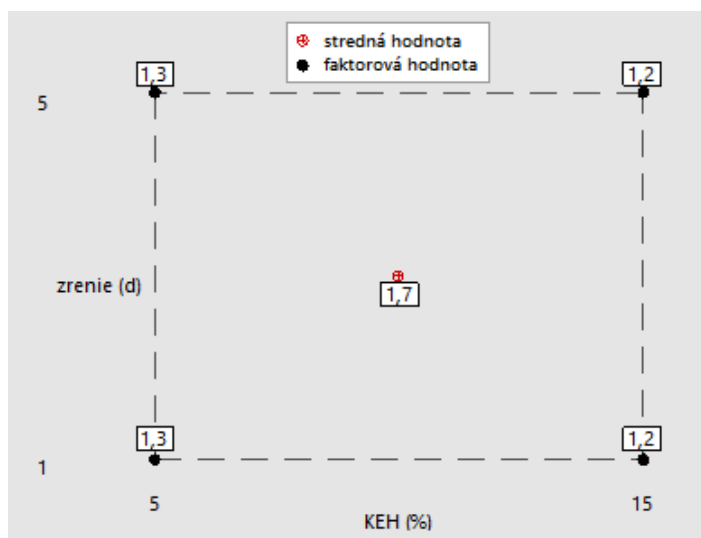
9.3.3 Mechanické testy

Regresná rovnica pre tržné zaťaženie má tvar:

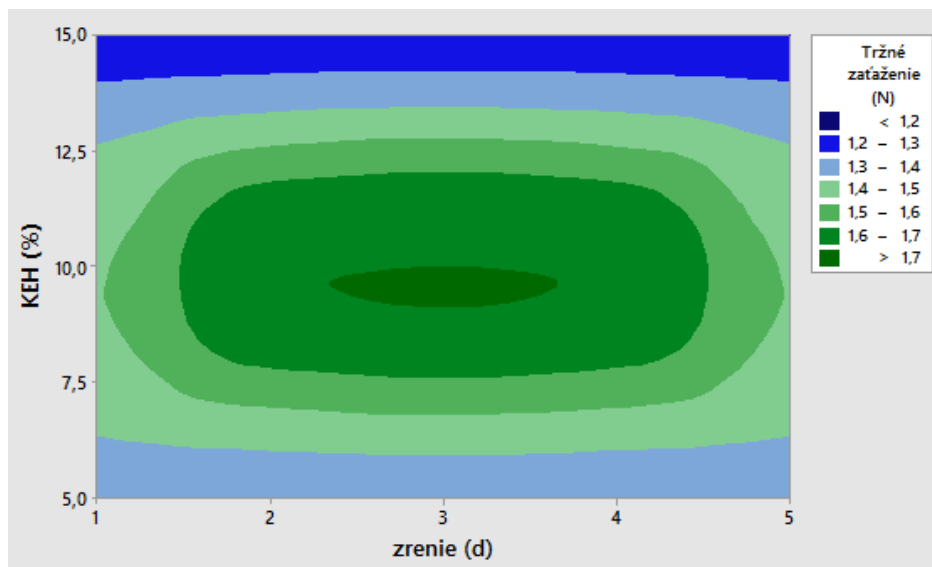
$$y = 1,350 - 0,01000 A - 0,000000 B + 0,000000 AB$$



Obr. 50 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na tržné zaťaženie filmov sieťovaných KEH



Obr. 51 Vplyv jednotlivých faktorov na tržné zaťaženie filmov sieťovaných KEH v kubickom zobrazení

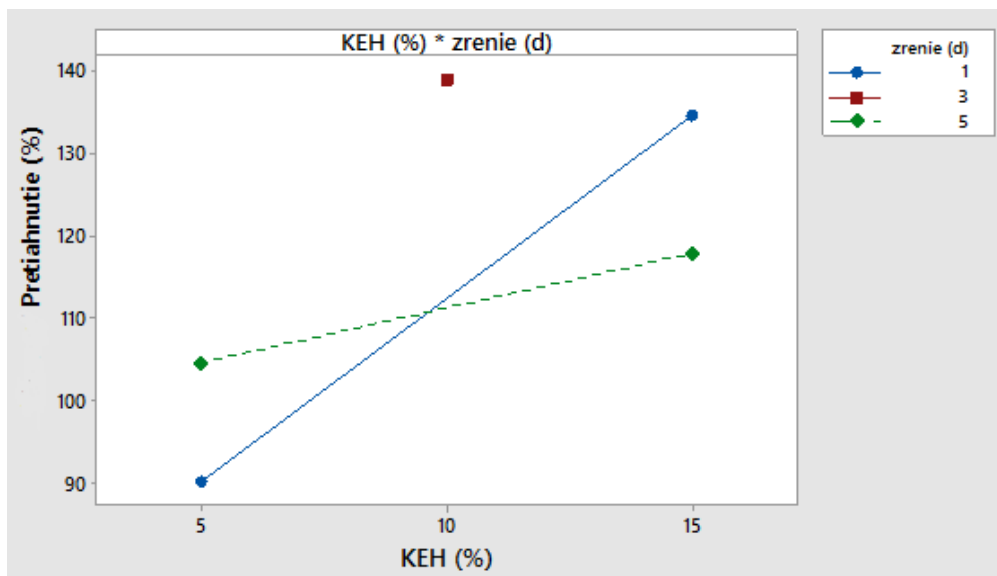


Obr. 52 Vplyv množstva KEH a zrenia na tržné zaťaženie filmov sieťovaných KEH

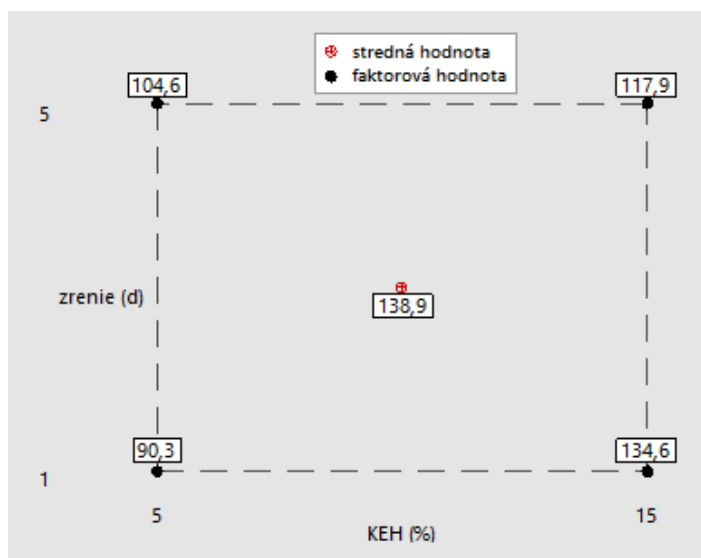
Vplyv jednotlivých faktorov na mechanickú vlastnosť akou je tržné zaťaženie po denaturácii ukazuje, že s postupným prídavkom KEH sa pri maximálnej aj minimálnej dobe zrenia znižujú hodnoty tržného zaťaženia. Najvyššia hodnota tržného zaťaženia je dosiahnutá pri strednom množstve KEH a pri strednom počte hodín zrenia. So závislosti vplyvu množstva KEH a zrenia na tržné zaťaženie filmov je možné usudzovať na optimum, ktorého sa dosahuje pri stredových hodnotách obidvoch sledovaných faktorov.

Regresná rovnica pre pretiahnutie má tvar:

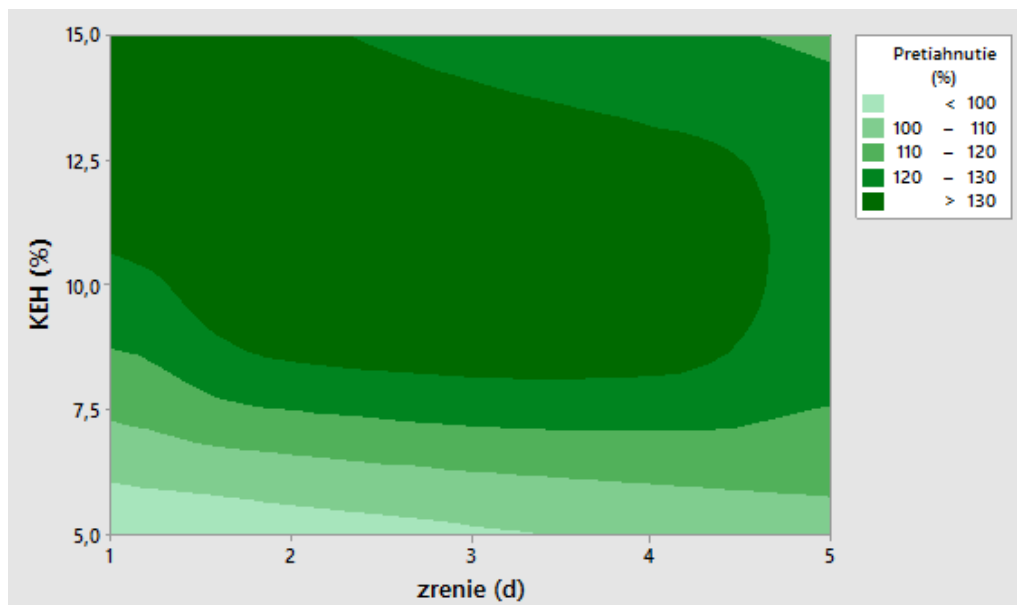
$$y = 60,70 + 5,205 A + 7,450 B - 0,7750 AB$$



Obr. 53 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na pretiahnutie filmov sieťovaných KEH



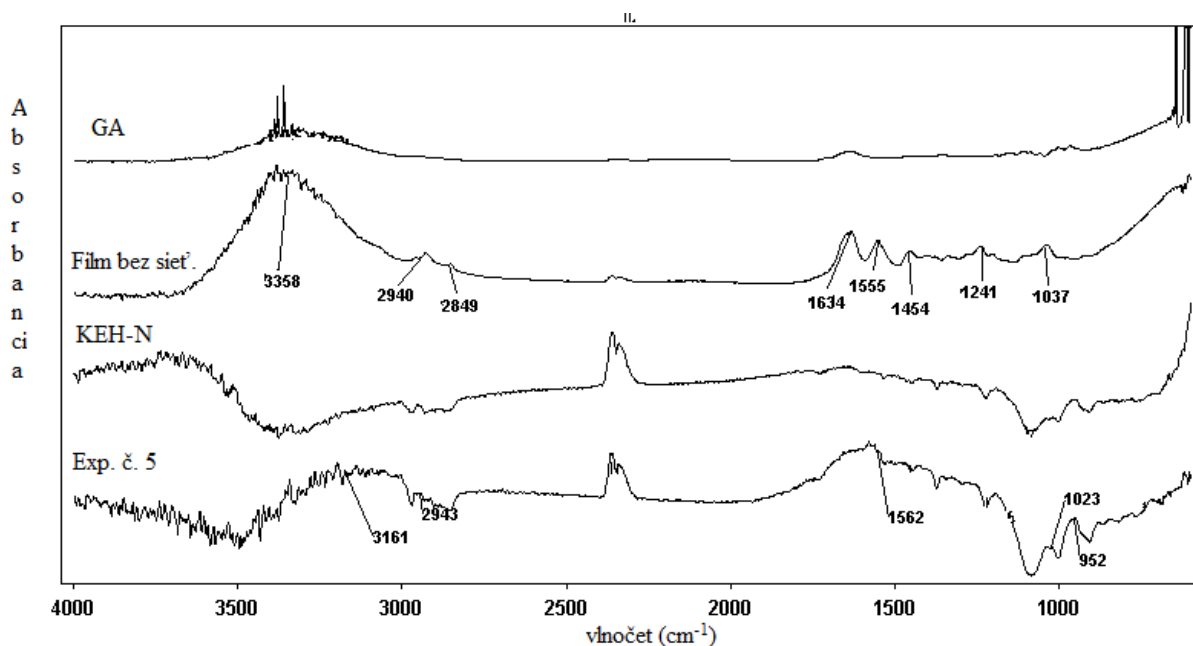
Obr. 54 Vplyv jednotlivých faktorov na pretiahnutie filmov sieťovaných KEH v kubickom zobrazení



Obr. 55 Vplyv množstva KEH a zrenia na pretiahnutie filmov sieťovaných KEH

Z výsledkov interakcií sledovaných faktorov na pretiahnutie filmov vyplýva, že pri maximálnom aj minimálnom počte dní zrenia sa so zvyšujúcim sa prídavkom KEH zvyšujú hodnoty pretiahnutia filmov. Najvyššie hodnoty sú zaznamenané v prípade použitia strednej hodnoty množstva KEH a zároveň strednej hodnoty počtu dní zrenia. Zo závislosti vplyvu množstva KEH a zrenia na pretiahnutie filmov je možné vidieť, že najvyšších hodnôt je možné dosiahnuť už pri minimálnej dobe zrenia pri strednom množstve KEH.

9.3.4 FTIR



Obr. 56 IČ spektrum filmu č. 5, kolagén-elastínového hydrolyzátu, filmu bez sieťovadla a glutaraldehydu

Pri porovnaní infračervených spektier všetkých filmov s filmom bez sieťovadla je vidieť, že došlo k interakciám KEH s kolagénnou hmotou, čo potvrdzuje zmena intenzity charakteristických absorpčných pásov. Zároveň došlo pri takmer všetkých filmoch k vymiznutiu až štyroch pík, ktorým odpovedajú vlnočty 2849 cm^{-1} (vibrácie $-\text{CH}_3-$ skupiny), 1454 cm^{-1} (skupina $-\text{N}=\text{C}=\text{O}-$), 1241 cm^{-1} (skupina $=\text{C}-\text{O}-\text{C}$) a 1037 cm^{-1} (primárna funkčná skupina $\text{R}-\text{OH}$). Objavil sa taktiež nový pík pri 952 cm^{-1} : priradenie $-\text{COOH}$, dimérna forma. Rovnako dochádza k omnoho nižšej intenzite píku v rozsahu 3700-3100 cm^{-1} pri sieťovanom kolagéne, z čoho je možné usudovať, že behom sieťujúcej reakcie kolagén stratil vodu, ktorá na neho bola naviazaná (85).

V nasledujúcej tabuľke sú uvedené všetky odlišnosti v spektrách filmov č. 1 – 5 vždy v porovnaní s filmom bez sieťovadla.

Funkčná skupina	Vlnočet (cm ⁻¹)	Filmy č.				
		1	2	3	4	5
-CO-NH- funkčná skupina (amidová I väzba)	3358	nižšia intenzita	posun píku	posun píku	posun píku	posun píku
vibrácie -CH ₂ - skupiny	2940	zmiznutie píku	rovnaká intenzita	posun píku	rovnaká intenzita	rovnaká intenzita
vibrácie -CH ₃ - skupiny	2849	zmiznutie píku	rovnaká intenzita	zmiznutie píku	zmiznutie píku	zmiznutie píku
-CO-NH- funkčná skupina (amidová I väzba)	1555	posun píku	nižšia intenzita	rovnaká intenzita	rovnaká intenzita	rovnaká intenzita
skupina -N=C=O-	1454	zmiznutie píku	zmiznutie píku	nižšia intenzita	nižšia intenzita	nižšia intenzita
skupina =C-O-C	1241	zmiznutie píku	zmiznutie píku	zmiznutie píku	zmiznutie píku	zmiznutie píku
primárna funkčná skupina R-OH	1037	zmiznutie píku	zmiznutie píku	zmiznutie píku	zmiznutie píku	zmiznutie píku

Tab. 16 Odlišnosti charakteristických píkov filmov sieťovaných pomocou KEH v porovnaní s filmom bez sieťovadla

9.4 Zhodnotenie interakcií kolagénneho gelu s kolagén-elastínovými hydrolyzátmi

Jednotlivé skúšky testovania filmov potvrdili, že medzi kolagénnym gelom a použitými kolagén-elastínovými hydrolyzátmi došlo k určitým interakciám. Tento fakt potvrdzujú získané infračervené spektrá, kde sú zaznamenané posuny, zmeny intenzít, vymiznutie a objavenie nových absorpčných pásov. Pri porovnaní s filmom sieťovaným 2,0 % GA bolo zistené, že hodnoty Ts v pozdĺžnom aj v priečnom smere prevyšujú hodnoty tohto filmu aj o niekoľko stupňov. Avšak lepších bobtnacích vlastností oproti filmu s 2,0 % GA nebolo dosiahnutých pri žiadnom z filmov. Za optimálne technologické podmienky vzhľadom na získanie najlepších mechanických vlastností je možné považovať stredné hodnoty množstva kolagén-elastínového hydrolyzáta (10 % KEH) so zároveň strednou hodnotou počtu dní zrenia (3 dni) kolagénového gelu.

ZÁVER

Biomateriály na báze proteínov, predovšetkým kolagénu sa v posledných desaťročiach stali intenzívne rozvíjajúcou sa oblasťou. Používanie glutaraldehydu ako zatiž najlepšieho a najdostupnejšieho sieťovacieho činidla ale naďalej ostáva sporné z hľadiska jeho potenciálnej toxicity a tejto látke sa preto venuje čoraz viac pozornosti s cieľom jej úplného nahradenia.

Ciele práce sa opierajú o poznatky z literárnych zdrojov v zmysle použitia iných sieťovacích činidiel s cieľom nahradiť čo najväčšie množstvo doposiaľ využívaného glutaraldehydu. Použité boli kombinácie daných sieťovadiel, porovnanie sieťovadiel medzi sebou získaných inými spôsobmi a tiež overenie interakcií zatiaľ neskúmaného sieťovadla s kolagénym gelom. Sieťujúci účinok bol sledovaný na základe zmien daných parametrov filmu.

V prvej časti práce bol overovaný účinok použitia kombinácie komerčného dialdehydu škrobu s glutaraldehydom. Najlepších vlastností bolo získaných pri najväčšom množstve dialdehydu škrobu (5 %), najdlhšej dobe zrenia (8 hodín) a zároveň minimálnom množstve GA (0,4 %). Tým bol dosiahnutý stanovený cieľ náhrady glutaraldehydu lepším sieťovacím činidlom.

V druhej časti práce boli porovnávané účinky dialdehydu škrobu získaného od komerčného dodávateľa s laboratórne pripraveným dialdehydom škrobu s cieľom zníženia nákladov na jeho zadováženie. Laboratórne pripravený dialdehyd škrobu vykazoval, pri rovnakom dávkovaní a rovnakých podmienkach sieťovania, vo všetkých sledovaných parametroch, to je bobtnanie, teploty zmrštenia a mechanické parametre, lepšie vlastnosti oproti komerčnému dialdehydu škrobu.

Tretia časť práce skúmala možné interakcie kolagén-elastínového hydrolyzátu s kolagénym gelom. Bobtnacie vlastnosti neboli dosiahnuté lepšie v porovnaní s filmom sieťovaným glutaraldehydom. Avšak táto látka sa javí ako potenciálne sieťovadlo vzhľadom na získané oveľa vyššie teploty zmrštenia než bolo tomu pri glutaraldehyde.

Experimenty praktickej časti ukázali, že dialdehyd škrobu je možné s úspechom použiť nielen ako náhradu spomínaného glutaraldehydu, ale aj ako lepšiu alternatívu k tomuto najviac využívanému sieťovaciemu činidlu. Lepšie sieťovacie vlastnosti svojpomocne vyrobeného dialdehydu škrobu predstavujú ďalšie pozitívum k jeho využitiu. Kolagén-

elastínové hydrolyzáty v prípade ich pokračujúceho skúmania môžu byť považované za ďalší možný spôsob náhrady glutaraldehydu pre niektoré aplikácie.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATURY

- [1] A. Sionkowska, J. Skopinska-Wisniewska, M. Gawron, J. Kozłowska, A. Planecka: Chemical and thermal cross-linking of collagen and elastin hydrolysates, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 47, Issue 4, 1 November 2010, pp. 570–577
- [2] W.F. Daamen, J.H. Veerkamp, J.C.M. van Hest, T.H. van Kuppevelt: Elastin as a biomaterial for tissue engineering *Biomaterials*, 28 (2007), pp. 4378–4398 SD
- [3] W.Q. Sun, P. Leung: Calorimetric study of extracellular tissue matrix degradation and instability after gamma irradiation, *Acta Biomaterialia*, 4 (2008), pp. 817–826 SD
- [4] D.T. Cheung, N. Perelman, D. Tong, M.E. Nimmi: The effect of γ -irradiation on collagen molecules, isolated α -chains, and crosslinked native fibers, *Journal of Biomedical Materials Research*, 24 (1990), pp. 581–589 SD
- [5] A. Sionkowska, A. Kamińska, Christopher A. Miles, Bailey F., Allen J.: Wpływ promieniowania UV na strukturę i właściwości kolagenu *Polimery*, 6 (2001), pp. 379–452 SD
- [6] R.S. Davidson: The photodegradation of some naturally occurring polymers, *Journal of Photochemistry and Photobiology Part B: Biology*, 33 (1996), pp. 3–25 SD
- [7] R.S. Davidson: The photodegradation of some naturally occurring polymers, *Journal of Photochemistry and Photobiology, Part B: Biology*, 33 (1996), pp. 3–25 SD
- [8] H. Cao, S.-Y. Xu: EDC/NHS cross-linked type II collagen–chondroitin sulfate scaffold: characterization and in vitro evaluation, *Journal of Materials Science*, 19 (2008), pp. 567–575 SD
- [9] K. Nam, T. Kimura, F. Tsuyoshi, A. Kishida: Physical and biological properties of collagen phospholipid polymer hybrid gels, *Biomaterials*, 28 (2007), pp. 3153–3162 SD
- [10] K. Nam, T. Kimura, F. Tsuyoshi, A. Kishida: Preparation of a collagen/polymer hybrid gel designed for tissue membranes. Part I. Controlling the polymer–collagen cross-linking process using an ethanol/water co-solvent, *Acta Biomaterialia*, 6 (2010), pp. 403–408 SD

- [11] K. Nam, T. Kimura, F. Tsuyoshi, A. Kishida: Preparation of a collagen/polymer hybrid gel for tissue membranes. Part II. In vitro and in vivo biological properties of the collagen gels, *Acta Biomaterialia*, 6 (2010), pp. 409–417 SD
- [12] Toxics Use Reduction Institute: Higher hazard substance designation recommendation: Hydrogene fluoride (CAS 7664-39-3) 08-12-2014 [online] Dostupné z: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~PncHng:6>
- [13] Overview of crosslinking and protein modification; [online] Dostupné z: <http://www.piercenet.com/method/overview-crosslinking-protein-modification#modification>
- [14] Weadock, K.S., Miller, E.J., Bellincampi, L.D., Zawadsky, J.P., Dunn, M.G.: Physical crosslinking of collagen fibers: Comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment. *J. Biomed. Mater. Res.* 1995, 29, 1373–1379
- [15] Weadock, K.S., Miller, E.J., Keuffel, E.L., Dunn, M.G.: Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *J. Biomed. Mater. Res.* 1996, 32, 221–226
- [16] Ohan, M.P., Weadock, K.S., Dunn, M.G.: Synergistic effects of glucose and ultraviolet irradiation on the physical properties of collagen. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002, 60, 384–391
- [17] Harriger, M.D., Supp, A.P., Warden, G.D., Boyce, S.T.: Glutaraldehyde crosslinking of collagen substrates inhibits degradation in skin substitutes grafted to athymic mice. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997, 35, 137–145
- [18] Wu, X., Black, L., Santacana-Laffitte, G., Patrick, C.W., Jr.: Preparation and assessment of glutaraldehyde-crosslinked collagen-chitosan hydrogels for adipose tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2007, 81, 59–65
- [19] Chvapil, M., Owen, J.A., Clark, D.S.: Effect of collagen crosslinking on the rate of resorption of implanted collagen tubing in rabbits. *J. Biomed. Mater. Res.* 1977, 11, 297–314
- [20] Yannas, I.V., Burke, J.F.: Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J. Biomed. Mater. Res.* 1980, 14, 65–81
- [21] Osborne, C.S., Barbenel, J.C., Smith, D., Savakis, M., Grant, M.H.: Investigation into the tensile properties of collagen/chondroitin-6-sulphate gels: The effect of crosslinking agents and diamines. *Med. Biol. Eng. Comput.* 1998, 36, 129–134

- [22] Powell, H.M., Boyce, S.T.: EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability. *Biomaterials* 2006, 27, 5821–5827
- [23] Powell, H.M., Boyce, S.T.: Wound closure with EDC cross-linked cultured skin substitutes grafted to athymic mice. *Biomaterials* 2007, 28, 1084–1092
- [24] Duan, X., Sheardown, H.: Crosslinking of collagen with dendrimers. *J. Biomed. Mater. Res.A* 2005, 75, 510–518
- [25] Van Wachem, P.B., van Luyn, M.J., Olde Damink, L.H., Dijkstra, P.J., Feijen, J., Nieuwenhuis P.: Biocompatibility and tissue regenerating capacity of crosslinked dermal sheep collagen. *J. Biomed. Mater. Res.* 1994, 28, 353–363
- [26] Zeugolis, D.I., Paul, G.R., Attenburrow, G.: Cross-linking of extruded collagen fibers—a biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2009, 89, 895–908
- [27] Sung, H.W., Huang, R.N., Huang, L.L., Tsai, C.C.: In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1999, 10, 63–78
- [28] Sundararaghavan, H.G., Monteiro, G.A., Lapin, N.A., Chabal, Y.J., Miksan, J.R., Shreiber, D.I.: Genipin-induced changes in collagen gels: Correlation of mechanical properties to fluorescence. *J. Biomed. Mater. Res.A* 2008, 87, 308–320
- [29] Speer, D.P., Chvapil, M., Eskelson, C.D., Ulreich, J.: Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* 1980, 14, 753–764
- [30] Van Luyn, M.J., van Wachem, P.B., Olde Damink, L.H., Dijkstra, P.J., Feijen, J., Nieuwenhuis, P.: Secondary cytotoxicity of cross-linked dermal sheep collagens during repeated exposure to human fibroblasts. *Biomaterials* 1992, 13, 1017–1024
- [31] Shahabeddin, L., Berthod, F., Damour, O., Collombel, C.: Characterization of skin reconstructed on a chitosan-cross-linked collagen-glycosaminoglycan matrix. *Skin Pharmacol.* 1990, 3, 107–114
- [32] Berthod, F., Saintigny, G., Chretien, F., Hayek, D., Collombel, C., Damour, O.: Optimization of thickness, pore size and mechanical properties of a biomaterial designed for deep burn coverage. *Clin. Mater.* 1994, 15, 259–265
- [33] Berthod, F., Hayek, D., Damour, O., Collombel, C.: Collagen synthesis by fibroblasts cultured within a collagen sponge. *Biomaterials* 1993, 14, 749–754

- [34] Garcia, Y., Hemantkumar, N., Collighan, R., Griffin, M., Rodriguez-Cabello, J.C., Pandit, A.: In vitro characterization of a collagen scaffold enzymatically cross-linked with a tailored elastinlike polymer. *Tissue Eng. A* 2009, 15, 887–899
- [35] Yung, C.W., Wu, L.Q., Tullman, J.A., Payne, G.F., Bentley, W.E., Barbari, T.A.: Transglutaminase crosslinked gelatin as a tissue engineering scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2007, 83, 1039–1046
- [36] Khew, S.T., Yang, Q.J., Tong, Y.W.: Enzymatically crosslinked collagen-mimetic dendrimers that promote integrin-targeted cell adhesion. *Biomaterials* 2008, 29, 3034–3045
- [37] Yeo, T.K., Brown, L., Dvorak, H.F.: Alterations in proteoglycan synthesis common to healing wounds and tumors. *Am. J. Pathol.* 1991, 138, 1437–1450
- [38] Teti, A.: Regulation of cellular functions by extracellular matrix. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1992, 2, 83–87
- [39] Huang-Lee, L.L., Wu, J.H., Nimni, M.E.: Effects of hyaluronan on collagen fibrillar matrix contraction by fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 1994, 28, 123–132
- [40] Zhong, S., Yung, L.Y.: Enhanced biological stability of collagen with incorporation of PAMAM dendrimer. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2009, 91, 114–122
- [41] Caissie, R., Gingras, M., Champigny, M.F., Berthod, F.: In vivo enhancement of sensory perception recovery in a tissue-engineered skin enriched with laminin. *Biomaterials* 2006, 27, 2988–2993
- [42] Antonicelli, F., Bellon, G., Lorimier, S., Hornebeck, W.: Role of the elastin receptor complex (S-Gal/Cath-A/Neu-1) in skin repair and regeneration. *Wound Repair Regen.* 2009, 17, 631–638
- [43] Suh, H., Lee, J.E.: Behavior of fibroblasts on a porous hyaluronic acid incorporated collagen matrix. *Yonsei Med. J.* 2002, 43, 193–202
- [44] Johnson, K.A., Rogers, G.J., Roe, S.C., Howlett, C.R., Clayton, M.K., Milthorpe, B.K., Schindhelm, K.: Nitrous acid pretreatment of tendon xenografts cross-linked with glutaraldehyde and sterilized with gamma irradiation. *Biomaterials* 1999, 20, 1003–1015
- [45] Roe, S.C., Milthorpe, B.K., True, K., Rogers, G.J., Schindhelm, K.: The effect of gamma irradiation on a xenograft tendon bioprosthesis. *Clin. Mater.* 1992, 9, 149–154

- [46] Cheung, D.T., Perelman, N., Tong, D., Nimni, M.E.: The effect of gamma-irradiation on collagen molecules, isolated alpha-chains, and crosslinked native fibers. *J. Biomed. Mater. Res.* 1990, 24, 581–589
- [47] Mollers, S., Heschel, I., Damink, L.H., Schugner, F., Deumens, R., Muller, B., Bozkurt, A., Nava, J.G., Noth, J., Brook, G.A.: Cytocompatibility of a novel, longitudinally microstructured collagen scaffold intended for nerve tissue repair. *Tissue Eng. A* 2009, 15, 461–472
- [48] Ohan, M.P., Dunn, M.G.: Glucose stabilizes collagen sterilized with gamma irradiation. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2003, 67, 1188–1195
- [49] Noah, E.M., Chen, J., Jiao, X., Heschel, I., Pallua, N.: Impact of sterilization on the porous design and cell behavior in collagen sponges prepared for tissue engineering. *Biomaterials* 2002, 23, 2855–2861
- [50] Friess, W., Schlapp, M.: Sterilization of gentamicin containing collagen/PLGA microparticle composites. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2006, 63, 176–187
- [51] Grimes, M., Pembroke, J.T., McGloughlin, T.: The effect of choice of sterilisation method on the biocompatibility and biodegradability of SIS (small intestinal submucosa). *Biomed. Mater. Eng.* 2005, 15, 65–71
- [52] M. Kapoor: How to cross-link proteins. [online] Dostupné z: <http://www.fgsc.net/neurosporaprotocols/How%20to%20cross-link%20proteins.pdf>
- [53] L. H. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, M. J. A. van Luyn, P. B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen: Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials, *Journal of materials science: materials in medicine*, pp.460-472
- [54] M. E. Nimni, D. T. Cheung, B. Strates, M. Kodama and K. Skeikh, *J. Biomed. mater. res.* 21 (1987) 741
- [55] M. Chvapil, D. Gibeault and T. F. Wang, *ibid.* 21 (1987) 1383 J.M. McPherson, P. W. Ledger, S. Sawamura, A. Conti, S. Wade, H. Reihanian and D G. Wallace, *ibid.* 20 (1986) 79
- [56] J.M. McPherson, P. W. Ledger, S. Sawamura, A. Conti, S. Wade, H. Reihanian and D G. Wallace, *ibid.* 20 (1986) 79
- [57] D. T. Cheung and M. E. Nimni, *Conn. Tissue Res.* 10 (1982) 18
- [58] J. M. Ruijgrok, M. E. Boon and J. R. de Wljin, *Histochem. J.* 22 (1990) 389
- [59] R. Lubig, P. Kusch, K. Roper and H. Zahn, *Monatshefte für Chemie* 112 (1981) 1313

- [60] U. Tomimatsu, E. F. Jansen, W. Gaffield and A. C. Olsen, *J. Colloid Interface Sci.* 36 (1971) 51
- [61] D.T. Cheung and M. E. Nimni, *Conn. Tissue Res.* 10 (1982) 201
- [62] P M. Hardy, A. C. Nicholls and H. N Rydon, *J. Chem. Soc. Perkin I.* (1976) 958
- [63] K. Okuda, I. Urabe, Y. Yamada and H. Okada, *J. Ferm. Bioeng.* 71 (1991) 100
- [64] E.A. Woodrooe, *J. Bioengn* 9 2 (1978) 1
- [65] T.J.A. Johnson, *Eur. J. Cell Biol.* 45 (1987) 160
- [66] Raymond Zeeman: *Cross-linking of collagen-based materials* ISBN: 90 365 1207 7, FEBODRUK BV., Enschede, The Netherlands, 1998.
- [67] A. Jayakrishnan and S.R. Jameela: *Glutaraldehyde as a fixative in bioprosthetic and drug delivery matrices*, *Biomaterials*, 17 pp. 471-484 (1996).
- [68] L.H.H. Olde Damink, P.J. Dijkstra, M.J.A. v. Luyn, P.B. v. Wachem, P. Nieuwenhuis, and J. Feijen: *Glutaraldehyde as crosslinking agent for collagen based biomaterials*", *J. Mat. Sci.: Mat in Med.*, 6 pp. 460-472 (1995).
- [69] Giuseppe Tronci, Amanda Doyle, Stephen J. Russell, David J. Wood: *Triple-helical collagen hydrogels via covalent aromatic functionalization with 1,3-Phenylenediacetic acid* *Biomaterials and Tissue Engineering Research Group*. [online] Dostupné z: <http://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/1308/1308.5316.pdf>
- [70] Wilson, E.B.; Decius, J.C.; Cross, P.C. *Molecular Vibrations*, Dover, 1980
- [71] Brown, J.M. *Molecular Spectroscopy*, Oxford University Press, 1998
- [72] W.F. Daamena, J.H. Veerkampa, J.C.M. van Hestb, T.H. van Kuppevelta: *Elastin as a biomaterial for tissue engineering*, *Biomaterials* 28 (2007), pp.4378–4398
- [73] Byju AG et al: *Mechanics of Gelatin and Elastin based Hydrogels as Tissue Engineered Constructs*. *Proceedings of the 13th International Conference on Fracture*, 2013.
- [74] Grover CN et al: *Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering*. *Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2012, 10, 62-74.

- [75] Rashid a Anwar: Elastin: a brief review, Volume 18, Issue 4, [online], Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0307-4412%2890%2990121-4/pdf>
- [76] Průzkum kolagenových materiálů – teoretická část, [online], Dostupné z: http://old.vscht.cz/met/stranky/vyuka/labcv/labor/res_pruzkum_kolagenovych_materialu/teorie.htm
- [77] Ohkawa K, Cha DI, Kim H, Nishida A, Yamamoto H: Electrospinning of chitosan. (2004), *Macromol Rapid Commun* 25:1600-1605
- [78] Ohkawa K, Cha DI, Kim H, Nishida A, Yamamoto H: Electrospinning of chitosan. (2004), *Macromol Rapid Commun* 25:1600-1605
- [79] G Sailakshmi, Tapas Mitra and A Gnanamani: Engineering of chitosan and collagen macromolecules using sebacic acid for clinical applications, *Progress in Biomaterials* 2013
- [80] Jiugao Yu, Peter R. Chang, Xiaofei Ma: The preparation and properties of dialdehyde starch and thermoplastic dialdehyde starch, *Carbohydrate polymers*, Volume 79, Issue 2, 2010, pp. 296–300
- [81] Aristippos Gennadios: *Protein-Based Films and Coatings*, CRC Press, 2002, [online] Dostupné z: <https://books.google.pl/books>
- [82] J.C. Roberts: *Paper Chemistry*, Springer Science & Business Media, 1996, [online] Dostupné z: <https://books.google.pl/books>
- [83] J. Skopinska-Wisniewska, A. Sionkowska, A. Kaminska, A. Kaznica, R. Jachimiak, T. Dresy: Surface characterization of collagen/elastin based biomaterials for tissue regeneration. *Applied Surface Science*, 255 (2009), pp. 8286–8292.
- [84] N. Bonzon, X. Carrat, C. Daminiere, G. Daculsi, F. Lefebvre, M. Rabaud: New artificial connective matrix made of fibrin monomers, elastin peptides and type I + III collagens: structural study, biocompatibility and use as tympanic membranes in rabbit. *Biomaterials*, 16 (1995), pp. 881–885
- [85] Sionkowska A et al.: Chemical and thermal cross-linking of collagen and elastin hydrolysates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 47, 4, 570-577.

- [86] P. Budrugaec, L. Miu, C. Popescu and F.-J. Wortmann: Identification of collagen-based materials that are supports of cultural and historical objects. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 77 (2004) 975–985
- [87] R. Larsen, *Thermochim. Acta*, 365 (2000) 85.
- [88] C. Chahine, *Thermochim. Acta*, 365 (2000) 101.
- [89] N. S. Cohen, M. Odlyha and G. Foster, *Thermochim. Acta*, 365 (2000) 111.
- [90] T. J. Wess and J. P. Orgel, *Thermochim. Acta*, 365 (2000) 119.
- [91] G. M. Nielsen-March, R. E. M. Hedges, T. Mann and M. J. Collins, *Thermochim. Acta*, 365 (2000) 129.
- [92] C. Marcolli and H. G. Wiedemann, *J. Therm. Anal. Cal.*, 64 (2001) 987.
- [93] P. Budrugaec, L. Miu, V. Bocu, C. Popescu and F. J. Wortmann, *J. Therm. Anal. Cal.*, 72 (2003) 1057.
- [94] D. L. Gilbert and S. W. Kim, *J. Biomed. Mater. Res.* 24, (1990) 1221.
- [95] C.L. Wang, T. Miyata, B. Weksler, A. L. Rubin and K. H. Stenzel, *Biochim. Biophys. Acta* 544 (1978) 555.

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

GA	Glutaraldehyd
DAS-KOM	Dialdehyd škrobu komerčný
DAS-KOL	Dialdehyd škrobu pripravený pánom prof. Kolomazníkem
KEH-N	Kolagén-elastínový hydrolyzát vyrobený neutrálnym spôsobom
DMA	Dimethyl adipimidát
DMS	Dimethyl suberimidát
DMP	Dimethyl pimelimidát
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)karbodiimid
SACCH	Chitozan sieťovaný kyselinou sebakovou
SACC	Kolagén sieťovaný kyselinou sebakovou
DHT	Dehydrotermálna technika

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1 Možná štruktúra GA vo vodných roztokoch (66).....	15
Obr. 2 Tvorenie Shiffových báz, ich stabilita a reaktivita počas sieťovania. Vzťah medzi stupňom zosieťovania a počtom voľných amino skupín prítomných v polypeptidovom reťazci (53).....	16
Obr. 3 Schématické znázornenie sieťujúcej reakcie epoxidovej zlúčeniny s kolagénom (66).....	18
Obr. 4 Možný reakčný mechanizmus medzi chitozánom a kyselinou sebakovou.....	19
Obr. 5 Možná reakcia medzi kolagénom a kyselinou sebakovou (79).....	19
Obr. 6 Príprava dialdehydu škrobu a jeho modifikácia v kationový produkt.....	23
Obr. 7 Sieťujúca reakcia dialdehydu škrobu (82).....	23
Obr. 8 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na Ts v pozdĺžnom smere filmov sieťovaných DAS-KOM+GA.....	38
Obr. 9 Vplyv jednotlivých faktorov na Ts v pozdĺžnom smere filmov sieťovaných DAS-KOM+GA v kubickom zobrazení.....	38
Obr. 10 Vplyv množstva DAS-KOM a zrenia na Ts v pozdĺžnom smere filmov sieťovaných DAS-KOM+GA.....	39
Obr. 11 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na Ts v priečnom smere filmov sieťovaných DAS-KOM+GA.....	40
Obr. 12 Vplyv jednotlivých faktorov na Ts v priečnom smere filmov sieťovaných DAS-KOM+GA v kubickom zobrazení.....	40
Obr. 13 Vplyv množstva DAS-KOM a zrenia na Ts v priečnom smere filmov sieťovaných DAS-KOM+GA.....	41
Obr. 14 Stupeň zbobtnania filmov č. 1-4 pri 26 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA).....	44
Obr. 15 Stupeň zbobtnania filmov č. 5 a 6 pri 26 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA).....	44
Obr. 16 Stupeň zbobtnania filmov č. 1-4 pri 80 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA).....	45
Obr. 17 Stupeň zbobtnania filmov č. 5 a 6 pri 80 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA).....	45

Obr. 18 Zmena plochy vzoriek filmov č. 1-4 behom bobtnacích skúšok pri 26 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)	46
Obr. 19 Zmena plochy vzoriek filmov č. 5 a 6 behom bobtnacích skúšok pri 26 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)	46
Obr. 20 Zmena plochy vzoriek filmov č. 1-4 behom bobtnacích skúšok pri 80 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)	47
Obr. 21 Zmena plochy vzoriek filmov č. 5 a 6 behom bobtnacích skúšok pri 80 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)	47
Obr. 22 IČ spektrum filmu č. 8, glutaraldehydu, filmu bez sieťovadla a komerčného dialdehydu škrobu	49
Obr. 23 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na Ts v pozdĺžnom smere filmov sieťovaných DAS-KOL	54
Obr. 24 Vplyv jednotlivých faktorov na Ts v pozdĺžnom smere filmov sieťovaných DAS-KOL v kubickom zobrazení	54
Obr. 25 Vplyv množstva DAS-KOL a zrenia na Ts v pozdĺžnom smere filmov sieťovaných DAS-KOL	55
Obr. 26 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na Ts v priečnom smere filmov sieťovaných DAS-KOL	56
Obr. 27 Vplyv jednotlivých faktorov na Ts v priečnom smere filmov sieťovaných DAS-KOL v kubickom zobrazení	56
Obr. 28 Vplyv množstva DAS-KOL a zrenia na Ts v priečnom smere filmov sieťovaných DAS-KOL	57
Obr. 29 Stupeň zbobtnania filmov č. 1-5 pri 26 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)	60
Obr. 30 Stupeň zbobtnania filmov č. 1-5 pri 80 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)	60
Obr. 31 Zmena plochy vzoriek filmov č. 1-5 behom bobtnacích skúšok pri 26 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)	61
Obr. 32 Zmena plochy vzoriek filmov č. 1-5 behom bobtnacích skúšok pri 80 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)	61
Obr. 33 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na tržné zaťaženie filmov sieťovaných DAS-KOL	63

Obr. 34 Vplyv jednotlivých faktorov na tržné zaťaženie filmov sieťovaných DAS-KOL v kubickom zobrazení	63
Obr. 35 Vplyv množstva DAS-KOL a zrenia na tržné zaťaženie filmov sieťovaných DAS-KOL.....	64
Obr. 36 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na pretiahnutie filmov sieťovaných DAS-KOL.....	65
Obr. 37 Vplyv jednotlivých faktorov na pretiahnutie filmov sieťovaných DAS-KOL v kubickom zobrazení	65
Obr. 38 Vplyv množstva DAS-KOL a zrenia na pretiahnutie filmov sieťovaných DAS-KOL.....	66
Obr. 39 IČ spektrum filmu č. 4, pripraveného dialdehydu škrobu, filmu bez sieťovadla a glutaraldehydu.....	67
Obr. 40 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na Ts v pozdĺžnom smere filmov sieťovaných KEH	71
Obr. 41 Vplyv jednotlivých faktorov na Ts v pozdĺžnom smere filmov sieťovaných KEH v kubickom zobrazení	71
Obr. 42 Vplyv množstva KEH a zrenia na Ts v pozdĺžnom smere filmov sieťovaných KEH.....	72
Obr. 43 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na Ts v priečnom smere filmov sieťovaných KEH	73
Obr. 44 Vplyv jednotlivých faktorov na Ts v priečnom smere filmov sieťovaných KEH v kubickom zobrazení	73
Obr. 45 Vplyv množstva KEH a zrenia na Ts v priečnom smere filmov sieťovaných KEH.....	74
Obr. 46 Stupeň zbobtnania filmov č. 1-5 pri 26 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)	76
Obr. 47 Stupeň zbobtnania filmov č. 1-5 pri 80 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)	76
Obr. 48 Zmena plochy vzoriek filmov č. 1-5 behom bobtnacích skúšok pri 26 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)	77
Obr. 49 Zmena plochy vzoriek filmov č. 1-5 behom bobtnacích skúšok pri 80 °C (a porovnanie s filmom bez sieťovadla a filmom s GA)	77

Obr. 50 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na tržné zaťaženie filmov sieťovaných KEH.....	79
Obr. 51 Vplyv jednotlivých faktorov na tržné zaťaženie filmov sieťovaných KEH v kubickom zobrazení	79
Obr. 52 Vplyv množstva KEH a zrenia na tržné zaťaženie filmov sieťovaných KEH.....	80
Obr. 53 Vplyv interakcií sledovaných faktorov na pretiahnutie filmov sieťovaných KEH.....	81
Obr. 54 Vplyv jednotlivých faktorov na pretiahnutie filmov sieťovaných KEH v kubickom zobrazení	81
Obr. 55 Vplyv množstva KEH a zrenia na pretiahnutie filmov sieťovaných KEH.....	82
Obr. 56 IČ spektrum filmu č. 5, kolagén-elastínového hydrolyzátu, filmu bez sieťovadla a glutaraldehydu.....	83

ZOZNAM TABULIEK

Tab. 1 Charakterizácia filmov sieťovaných komerčným dialdehydom škrobu, filmu bez sieťovadla a filmu s 2,0 % GA.....	36
Tab. 2 Zmeny filmov sieťovaných DAS-KOM a GA v priečnom a pozdĺžnom smere pri stanovení T_S	37
Tab. 3 Výsledky bobtnacích skúšok filmu bez sieťovadla a filmov č. 1-4.....	42
Tab. 4 Výsledky bobtnacích skúšok filmov č. 5-9 a filmu s GA	43
Tab. 5 Odlišnosti charakteristických píkov filmov sieťovaných kombináciou DAS-KOM a GA v porovnaní s filmom bez sieťovadla	50
Tab. 6 Charakterizácia filmov sieťovaných pripraveným dialdehydom škrobu, filmu bez sieťovadla a filmu s 2,0 % GA.....	52
Tab. 7 Charakterizácia filmov sieťovaných komerčným dialdehydom škrobu, filmu bez sieťovadla a filmu s 2,0 % GA.....	52
Tab. 8 Zmeny filmov sieťovaných pripraveným dialdehydom škrobu v priečnom a pozdĺžnom smere pri stanovení T_S	53
Tab. 9 Zmeny filmov sieťovaných komerčným dialdehydom škrobu v priečnom a pozdĺžnom smere pri stanovení T_S	53
Tab. 10 Výsledky bobtnacích skúšok filmov č. 1-5 sieťovaných pripraveným dialdehydom škrobu, filmu bez sieťovadla a filmu s GA.....	58
Tab. 11 Výsledky bobtnacích skúšok filmov č. 1-5 sieťovaných komerčným dialdehydom škrobu	59
Tab. 12 Odlišnosti charakteristických píkov filmov sieťovaných pomocou DAS-KOL v porovnaní s filmom bez sieťovadla	68
Tab. 13 Charakterizácia filmov s použitím kolagén-elastínového hydrolyzátu, filmu bez sieťovadla a filmu s 2,0 % GA.....	70
Tab. 14 Zmeny filmov s použitím kolagén-elastínového hydrolyzátu v priečnom a pozdĺžnom smere pri stanovení T_S	70
Tab. 15 Výsledky bobtnacích skúšok filmov č. 1-5, filmu bez sieťovadla a filmu s GA.....	75
Tab. 16 Odlišnosti charakteristických píkov filmov sieťovaných pomocou KEH-N v porovnaní s filmom bez sieťovadla	84