

Mgr inż. Marta Janus-Kubiak

**Ocena wpływu tlenku grafenu na wybrane właściwości
fizyczne kolagenu rybiego**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne
wykonana w Zakładzie Biofizyki Katedry Biofizyki UMP

Promotor:
Prof. zw. dr hab. Leszek Kubisz
Prof. UAM dr hab. Przemysław Andrzejewski



**Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

Poznań, 2022

Składam serdecznie podziękowania moim Promotorom:

Profesorowi Leszkowi Kubiszowi

za cierpliwość, wsparcie, ogromną motywację do pracy

za wszystkie cenne, merytoryczne uwagi

oraz

Profesorowi UAM Przemysławowi Andrzejewskiemu

za opiekę promotorską, życzliwość i wyrozumiałość.

Podziękowania składam również firmie Anton Paar

za możliwość wykonania pomiarów reometrycznych i analizy wielkości cząstek

oraz nieocenioną pomoc w trakcie ich wykonywania

Praca częściowo finansowana z grantu w ramach projektu „Opracowanie technologii wytwarzania wraz z oceną kliniczną nowych opatrunków absorpcyjnych na bazie rybiego kolagenu do leczenia ran o różnej etiologii” w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020, Poddziałania 1.1.1 „Badania przemysłowe i prace rozwojowe realizowane przez Przedsiębiorstwa”; POIR.01.01.01-00-1004/18 współfinansowany przez NCBiR.

Spis treści

I. WSTĘP.....	7
1. Kolagen.....	8
1.1. Właściwości kolagenu.....	8
1.2. Zastosowanie kolagenu.....	11
1.2.1. Zastosowania w medycynie.....	11
1.2.2. Zastosowania w kosmetologii.....	14
1.3. Cechy kolagenu pochodzenia rybiego.....	14
2. Tlenek grafenu.....	18
2.1. Właściwości tlenku grafenu.....	19
2.2. Metody otrzymywania tlenku grafenu.....	21
2.3. Zastosowania tlenku grafenu.....	24
2.4. Oddziaływanie tlenku grafenu z tkankami.....	29
3. Kolagen domieszkowany tlenkiem grafenu.....	32
3.1. Oddziaływanie pomiędzy tlenkiem grafenu, a kolagenem.....	32
3.2. Zastosowanie kompozytu kolagen/tlenek grafenu.....	33
4. Metody badawcze oceny wpływu tlenku grafenu na kolagen.....	35
4.1. Metoda wiskozymetryczna.....	35
4.2. Badanie właściwości elektrycznych.....	37
4.3. Badania właściwości mechanicznych.....	38
4.3.1. Badania reometryczne.....	38
4.3.2. Teksturometria.....	40
4.4. Analiza wielkości cząstek.....	41
II. CEL PRACY.....	43
III. MATERIAŁ I METODY.....	44
1. Materiały.....	44
2. Metody badawcze.....	45
2.1. Metoda wiskozymetryczna.....	45
2.2. Badania parametrów elektrycznych filmów kolagenowych.....	46
2.3. Badanie właściwości mechanicznych.....	47
2.3.1. Reometria.....	48
2.3.1. Badania teksturometryczne.....	49
2.4. Analiza wielkości cząstek oraz badania mikrostrukturalne.....	50
2.4.1. PSA 1190 Anton Paar.....	50
2.4.2. Skaningowy mikroskop elektronowy (SEM) JEOL JSM-6380LA.....	50
2.5. Pomiar grubości błon kolagenowych.....	50
2.6. Metoda termograwimetryczna.....	51
2.7. Statystyka.....	52
IV. WYNIKI BADAŃ.....	54

1. Metoda wiskozymetryczna.....	54
2. Badania parametrów elektrycznych filmów kolagenowych.....	54
3. Badania reometryczne.....	64
4. Badania teksturometryczne.....	69
5. Analiza wielkości cząstek.....	74
6. Badania mikrostrukturalne.....	77
7. Metoda termograwimetryczna.....	79
8. Podsumowanie wyników.....	80
V. DYSKUSJA.....	81
VI. WNIOSKI.....	91
VII. STRESZCZENIE.....	92
VIII. ABSTRACT.....	93
IX. SPIS TABEL.....	94
X. SPIS RYCIN.....	95
XI. LITERATURA.....	97
XII. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ.....	110
XIII. AKTYWNOŚĆ NAUKOWA.....	111

Wykaz skrótów:

GO - tlenek grafenu, graphene oxide

T_d - temperatura denaturacji, temperature of denaturation

TS - wytrzymałość na rozciąganie, tensile strength

SEM - skaningowa mikroskopia elektronowa, scanning electron microscope

I. WSTĘP

Kolagen dzięki znacznej dostępności jest tematem wielu badań w dziedzinie nauki i jest powszechnie stosowany w medycynie [1]. Obecnie kolagen pochodzący z ryb czy innych zwierząt morskich stanowi przedmiot zainteresowania wielu ośrodków badawczych. Jest to spowodowane względami ekonomicznymi – kolagen ten można pozyskiwać z odpadków przetwórstwa rybnego oraz nie wiąże się z ryzykiem przeniesienia chorób odzwierzęcych na człowieka jak w przypadku białek pochodzących od ssaków [2–4]. Naturalna postać kolagenu w jakiej występuje i funkcjonuje w organizmie zwana jest formą natywną. W poniższej pracy przez kolagen należy rozumieć właśnie tą formę [5]. Tlenek grafenu może służyć jako nośnik leków, które dzięki jego specyficznym właściwościom mogą być uwalniane w sposób kontrolowany [6]. Trwają również badania nad zastosowaniem tlenku grafenu w inżynierii tkankowej [7]. Najnowsze doniesienia wskazują, że układ kolagen/tlenek grafenu jest potencjalnym biomateriałem, który może być wykorzystywany m.in. w leczeniu ran czy inżynierii tkankowej. Jednak interakcja pomiędzy kolagenem, a tlenkiem grafenu nie jest jeszcze dobrze poznana, dlatego tak istotne jest badanie wpływu tlenku grafenu na strukturę kolagenu [8,9].

1. Kolagen

Kolagen jest powszechnie występującym w organizmach żywych biopolimerem. Jest on obecny prawie we wszystkich tkankach i narządach takich jak tkanka łączna, kości, ścięgna, chrząstki, więzadła, zęby czy skóra. Stanowi on około 1/3 wszystkich białek występujących w organizmie. Łańcuchy kolagenowe zawierają długie sekwencje rzędu tysiąca aminokwasów, gdzie trzema najistotniejszymi są glicyna (stanowiąca około 30 % wszystkich reszt aminokwasowych), prolina oraz hydroksyprolina. Struktura składająca się z trzech lewoskrętnych łańcuchów tworzące prawoskrętną konformację superhelisy nosi nazwę tropokolagenu. Struktura ta utrzymywana jest głównie za pomocą wiązań wodorowych [1,10–13]. Poszczególne rodzaje kolagenu różnią się swoją budową – sekwencją aminokwasów, dzięki czemu mogą pełnić rozmaite funkcje w organizmach żywych. Natomiast podstawowym zadaniem tych białek jest utrzymanie spójnej struktury wielu tkanek oraz narządów [1,14].

1.1. Właściwości kolagenu

Kolageny wykazują szeroki zakres właściwości w zależności od swojej budowy, jednakże zwykle charakteryzują się znaczną odpornością na urazy mechaniczne i rozciąganie. Istnieje 6 typów łańcuchów kolagenowych zwanych podjednostkami α , różniących się między sobą zawartością oraz ułożeniem aminokwasów w łańcuchu. Tropokolagen może składać się z 3 tych samych podjednostek alfa, jak i z 3 różnych. Istnieją również kolageny złożone z 2 tych samych podjednostek α i jednej innej. Na chwilę obecną rozróżniamy 29 typów kolagenów [12,15]. Wyróżniamy kolageny fibrylarne i niefibrylarne. Pierwszą grupę stanowią białka, których struktury tworzą włókna, a biorąc pod uwagę procentową zawartość masy w organizmie stanowią zdecydowaną większość [1,12,15]. Występują one głównie w skórze (typ I, III, V), kościach (typ I, V, XXIV), chrząstkach (typ II, XI, XXVII) i rogówce (typ I, V, XXIV). Ponadto typ III występuje w macicy, jelitach oraz naczyniach, a kolagen typu V występuje w łożysku [1]. Kolagenu fibrylarne odpowiadają głównie za integralność tkanek, wytrzymałość na uszkodzenia mechaniczne, sztywność oraz elastyczność [1,16]. Charakterystyczne dla tworzonych włókien kolagenowych jest ich różnorodność

– zazwyczaj włókna zbudowane są z kilku typów kolagenów [1]. Do kolagenów niefibrylarnych zaliczamy: kolagen błony podstawnej, kolagen tworzący heksagonalne układy sieciowe bądź mikrowłókna, kolagen kotwiczący, typu FACITs, MACITs i multipleksyny [1,12]. Kolagen błony podstawnej to przede wszystkim kolagen typu IV, występujący również w naczyniach włosowatych, tkankach tłuszczowych czy w komórkach nerwowych. Jego główną cechą jest stanowienie matrycy dla innych składników błon podstawnych, ponadto jego włókna przeplatane są często z innymi fibrylami kolagenowymi [16]. Do kolagenów tworzących heksagonalne układy sieciowe zaliczamy typy VIII (występujący w komórkach śródbłonna, skórze, mózgu, nerkach, sercu) i X (znajdujący się przede wszystkim we chrząstkach). Typy te posiadają relatywnie krótkie łańcuchy polipeptydowe. Kolagen typu VIII bierze udział w różnicowaniu się komórek śródbłonna, natomiast typ X odpowiada prawdopodobnie za zwapnienie dorosłej chrząstki stawowej [10,15,16]. Do kolagenów tworzących mikrowłókna zaliczamy przede wszystkim typ VI występującego w kościach, chrząstkach, skórze i rogowce. Jego mikrowłókna odpowiadają za utrzymanie spójności tkanek łącznych. Innymi rodzajami tworzącymi mikrowłókna są typ XXVIII, stanowiący element komórek nerwowych oraz typ XXIX, występujący w skórze [1]. Kolageny kotwiczące typu VII tworzą głównie takie tkanki jak śluzówka, pęcherz moczowy, skórę, pępowinę oraz owodnię. Jest on istotnym elementem łączącym naskórek ze skórą właściwą [10,17]. Kolageny typu FACITs są to białka z tak zwaną przerywaną strukturą superhelisy, stanowią one sporą część kolagenów niefibrylarnych. Do tej grupy zaliczamy typy: IX (chrząstki, ciało szkliste, rogowka), XII (skóra, ścięgna, chrząstka), XIV (komórki nerwowe, naczynia, oko, chrząstka, ścięgna, kości, skóra), XVI (mięśnie gładkie, serce, nerki, skóra), XIX (wątroba, nerki, łożysko, śledziona, gruczoł krokowy), XX (nabłonek rogowkowy), XXI (żołądek, serce, łożysko, naczynia, mięśnie szkieletowe), XXII (połączenia tkankowe), XXVI (jajniki, jądra). Struktura powyższych typów kolagenów składa się z części superhelisy, która jest przeplatana z fragmentami niehelikalnymi [1,15]. Kolageny MACITs są to białka zawierające domeny transbłonowe. Do tej grupy zaliczamy typ: XIII (znajdujący się w sercu, oku, mięśniach szkieletowych, skórze), XVII występującego głównie w skórze, XXIII (pojawiający się w sercu, siatkówce oraz przerzutowych komórkach rakotwórczych), XXV (występujący w sercu, oku, mózgu i jądrach) [1]. Typy te służą

głównie jako receptory na powierzchni komórki [1,18]. Do multipleksów zaliczamy kolagen typu XV (łożysko, nerki, naczynia kapilarne, skóra, jajniki jądra) i XVIII (nerki, płuca, wątroba). Kolageny te zbudowane są z powtarzających się potrójnych helis i sekwencji wtrąconych. Typ XV odgrywa ważną rolę w stabilizacji mięśni szkieletowych, natomiast typ XVIII odpowiada za strukturalną integralność błony podstawnej, bierze udział w organogenezie oraz odpowiada za rozwój i odpowiednie funkcjonowanie oczu [15,18,19]. Mimo tak dużej różnorodności kolagenów niefibrylarnych stanowią one zdecydowaną mniejszość jeśli chodzi o procentową masową zawartość w organizmie [12].

Jak wspomniano powyżej właściwości kolagenu zależą od jego budowy, jednak część właściwości jest spójna dla znacznej części kolagenów. Większość kolagenów ze względu na swoją specyficzną budowę są nierozpuszczalne lub słabo rozpuszczalne w wodzie [12].

Właściwości kolagenu zależą również od jego pochodzenia, czym wyżej ewolucyjnie organizm tym z reguły białko kolagenowe jest bardziej usieciowane, a co za tym idzie ma wyższą temperaturę denaturacji. Na przykład kolagen ze skór bydlęcych charakteryzuje się temperaturą denaturacji wynoszącą około 40 °C, gdzie dla porównania kolagen pochodzący z ryb nie przekracza zwykle 30°C, dla kety (rodzina łososiowatych) wynosi ona około 19°C. Ponadto na temperaturę denaturacji ma wpływ też zawartość wody oraz hydroksyproliny w badanej postaci. Zakres temperaturowy denaturacji tego białka dla kręgowców wynosi (5 - 50) °C [20–24]. Jednym z istotnych czynników wpływających na stabilność termiczną kolagenu jest zawartość iminokwasów. Wyższa zawartość iminokwasów jak proliny oraz hydroksyproliny przyczynia się do zwiększenia stabilności strukturalnej kolagenu. Hydroksprolina oraz prolina pomagają stabilizować strukturę omawianego białka poprzez tworzenie wiązań wodorowych [25,26]. Kolagen ze względu na takie właściwości jak biogodność, biodegradowalność, niska antygenowość, hemostatyczność, biowchłanianie oraz możliwość pozyskania z odpadków z przemysłu spożywczego czy skórzanego znalazł szerokie zastosowanie w przeróżnych dziedzinach [27–30].

1.2. Zastosowanie kolagenu

Kolagen ze względu na swoje unikalne właściwości znalazł zastosowanie w przemyśle spożywczym, medycznym oraz farmaceutycznym, jednak w tym pierwszym występuje głównie w zdenaturowanej formie, czyli w popularnej żelatynie [30]. Kolagen pozyskiwany jest w przewadze ze źródeł pochodzenia zwierzęcego, głównie bydłęcy, wieprzowy oraz pochodzący z ryb, natomiast rzadziej stosowany jest ten pochodzący z innych zwierząt morskich, ścięgna ogona szczura, konia czy z ptasich łapek. Wykorzystuje się też kolagen ludzki. Kolagen jest uniwersalnym biomateriałem, gdyż dzięki różnorodności jego właściwości wynikających z różnic w budowie, posiada on szerokie spektrum zastosowań [31]. Kolagen stosowany jest w postaci wielu form: żelu, filmu, gąbki, tabletki czy minipeletu do podskórnego uwalniania leku [29]. Naturalna, natywna postać kolagenu to taka, w której białko to występuje i funkcjonuje w organizmie żywym [5]. Jednak w różnych gałęziach przemysłu stosuje się również formę zdegradowaną kolagenu – żelatynę bądź hydrolizaty [32]. Żelatyna jest niejednorodną mieszaniną łańcuchów peptydów pochodzących z białek kolagenowych, natomiast hydrolizaty kolagenowe to produkty zwykle enzymatycznego rozpadu żelatyny składający się z rozpuszczalnych peptydów [5]. Hydrolizaty kolagenowe nie posiadają wszystkich aminokwasów występujących w kolagenie natywnym, a co za tym idzie posiadają mniejszą wartość biologiczną. Pomimo tego hydrolizaty kolagenowe oraz żelatyna z powodzeniem stosowane są w przemyśle kosmetycznym, spożywczym i w farmaceutycznym jako naturalny składnik o właściwościach antyoksydacyjnych oraz emulgujących [32].

1.2.1. Zastosowania w medycynie

Kolagen posiada spore znaczenie w procesie leczenia ran oraz wydaje się być perspektywnym materiałem służącym do regeneracji tkanek takich jak tkanki kostne, chrzęstne, naczyniowe czy rogówce. Przeszczepy kostne na bazie biomateriałów odgrywają ważną rolę w dziedzinie inżynierii tkankowej, a niektóre rodzaje kolagenów wykazują ciekawe właściwości osteokonduktywne oraz mechaniczne [33]. Specyficznym wymogiem rusztowań kostnych jest zdolność do

zachowania bioaktywności, możliwość stopniowego uwalniania leków oraz to, aby podczas swojej degradacji nie uwalniały szkodliwych dla organizmu substancji. Biorąc pod uwagę powyższe oraz to, że kolagen jest naturalnym składnikiem kości, wydaje się on być odpowiednim wyborem do tego celu, a jego niewątpliwą przewagą nad popularnym hydroksyapatytem jest jego pozytywny wpływ na regenerację tkanki oraz brak problemu z degradacją i kruchością jak w przypadku wyżej wspomnianego materiału. W przypadku uszkodzenia kości można tymczasowo zastąpić syntetycznymi rusztowaniami kostnymi wykonanymi z kolagenu, aby zapewnić mechaniczną integralność, aktywność komórek oraz stymulować osteoindukcję i osteointegrację z tkankami gospodarza. W podobny sposób białka kolagenowe mogą być wykorzystywane w regeneracji innych tkanek np. chrząstek [31]. Deformacje oraz uszkodzenia chrzęstnych struktur, zwłaszcza twarzy w wyniku urazu mechanicznego, resekcji guza bądź wad wrodzonych wymagają zazwyczaj autologicznych przeszczepów pobranych z chrząstki żebrowej czy ucha lub zastosowania materiału syntetycznego. Badania dotyczące wpływu kolagenu na regenerację chrząstek wykazały, iż doskonale nadaje się on również jako rusztowanie zastępcze dla chrząstki, na którym nabudowywane są komórki własne gospodarza [33]. Kolagen w formie błon zaporowych z powodzeniem jest wykorzystywany w chirurgii stomatologicznej oraz implantologii [1]. Białka kolagenowe mogą odgrywać istotną rolę w chorobach rogówki, które to uważane są za drugą co do wielkości chorobą na świecie, która może prowadzić do ślepoty. Kolagen jako składnik rogówki wykazuje wysoką biokompatybilność. Obecne zastosowanie samodzielnej błony kolagenowej jako materiał naprawczy rogówki jest jednak ograniczony przez swoje niewystarczające właściwości mechaniczne. W celu poprawy tych właściwości poddawano kolagen różnym modyfikacjom. Jedną z najbardziej obiecujących metod jest chemiczne sieciowanie kolagenu za pomocą karboimid, które to nie wykazują cytotoksyczności, a ponadto nie zaburzają przejrzystości materiału kolagenowego, jak bywa w przypadku innych substancji sieciujących. Środek sieciujący może zmniejszyć biokompatybilność materiału do regeneracji rogówki i uniemożliwiać lub spowalniać proces nadbudowy rusztowania kolagenowymi komórkami gospodarza, natomiast zwiększa jego wytrzymałość na rozciąganie. Biorąc pod uwagę powyższe kolagen wydaje się jednym z najbardziej perspektywicznych materiałów w dziedzinie regeneracji rogówki, jednak

wymaga dalszych badań [34]. Białko to znalazło również zastosowanie jako system nośnikowy dostarczania leków, białek, a nawet genów. Charakteryzuje się on bowiem biozgodnością, biodegradowalnością, niską antygenowością, wysoką hydrofilowością, oraz różnorodnością form co predysponuje go do zastosowania jako nośnik substancji leczniczej [27,29]. Często jest on wykorzystywany jako nośnik leków o działaniu miejscowym, w hamujących krwawienia czy w wspomagających gojenie ran. Kolagenowe nośniki leków stosowane są głównie w stomatologii, chirurgii czy okulistyce [27]. Kolagen znalazł również zastosowanie we wchłanialnych niciach chirurgicznych, których niewątpliwymi zaletami są mniejsze ryzyko odrzucenia nici przez organizm oraz jej szybka degradacja po zagojeniu rany bez konieczności usuwania szwów [35]. Kolagen jako substytut ludzkiej tkanki wykazał swoją przydatność w inżynierii tkankowej doprowadzając do powstania sztucznych naczyń krwionośnych, zastawek serca czy więzadeł. Oczekuje się, że biomateriały na bazie kolagenu mogą stać się użytecznym materiałem dla różnych zastosowań biomedycznych. Gąbka czy żel kolagenowy inicjują adhezję i agregację płytek krwi. Dzięki temu, że kolagen wyróżnia się właściwościami hemostatycznymi sprzyjając krzepnięciu krwi, wykazuje istotną rolę w procesie regeneracji tkanek oraz leczenia ran [29]. Standardowy proces leczenia rany obejmuje następujące fazy: hemostazę, fazę zapalną, proliferacyjną oraz remodelingu w odpowiedzi na uszkodzone tkanki. Jak już wcześniej wspomniano w reakcji na uraz kolagen indukuje aktywację i agregację płytek krwi powodując powstawanie skrzepu w miejscu urazu. Podczas fazy zapalnej rany rozpuszczalne produkty degradacji kolagenu pobudzają komórki odpornościowe takie jak makrofagi, które usuwają drobnoustroje i rewitalizują tkankę. W fazie proliferacyjnej natomiast pomagają w rozwoju nowych naczyń krwionośnych. Kolagen stosowany w leczeniu ran jest zazwyczaj pochodzenia wołowego, wieprzowego, końskiego lub ptasiego. Istnieją znaczące wady stosowania tych produktów, w tym rozwój reakcji alergicznych, przenoszenie prionów chorobotwórczych czy skażenia mikrobiologiczne. Ponadto w niektórych społecznościach istnieją ograniczenia wynikające z aspektów religijnych związane z używaniem produktów pochodzenia bydłęcego lub wieprzowego. Z tego powodu należy wziąć pod uwagę inne źródła kolagenu np. pochodzenia morskiego lub syntetycznego [36,37].

1.2.2. Zastosowania w kosmetologii

Formy kolagenów stosowanych w kosmetologii możemy podzielić na trzy główne grupy:

1. wypełniacze tkankowe przeznaczone do iniekcji;
2. preparaty do aplikowania na powierzchnię skóry;
3. suplementy diety zawierające kolagen lub hydrolizaty kolagenu stosowane doustnie.

Wypełniacze kolagenowe stosowane są przede wszystkim w celu wypełnienia zmarszczek, modelowanie ust czy owalu twarzy. Preparaty te wstrzykiwane są śródskórnym. Biorąc pod uwagę wielkość cząstek kolagenu (wysoką masę cząsteczkową kolagenu) zazwyczaj nie ma on możliwości penetracji naskórka [10]. Produkty kolagenowe stosowane na skórę działają głównie jako błony hydrofilowe na zasadzie ograniczania transepidermalnej utraty wody. Mają również działanie nawilżające oraz regenerujące. Okluzja peptydowa zapobiega mechanicznym uszkodzeniom skóry i włosów, także może być on stosowany zarówno na skórę jak i na włosy [38]. Suplementy diety zawierające kolagen bądź jego hydrolizaty stosuje się w celu profilaktyki schorzeń związanych ze chrząstkami stawowymi oraz opóźnienia efektów starzenia skóry [10]. Warto wspomnieć, że chociaż kolagen jest powszechnie stosowany w kosmetologii, wyniki nie zawsze są publikowane, ponieważ spora część badań prowadzona jest przez firmy kosmetyczne, które zazwyczaj nie publikują swoich osiągnięć w pracach naukowych. Bez wątpienia kolagen pochodzenia rybiego jest szeroko używany w zastosowaniach kosmetycznych, a jego właściwości różnią się w zależności od gatunku ryby oraz metody pozyskiwania z niej kolagenu, nie mniej kolagen pochodzący od ssaków również jest stosowany do powyższych celów. Pomimo iż kolagen rybi jest mniej stabilny termicznie niż ssaczy, jego powszechność i brak ryzyka przenoszenia chorób odzwierzęcych determinuje powszechne stosowanie właśnie tego kolagenu [38].

1.3. Cechy kolagenu pochodzenia rybiego

Coraz więcej ośrodków badawczych jest zainteresowanych kolagenem pochodzenia rybiego czy innych zwierząt morskich, głównie ze względu na ryzyko chorób

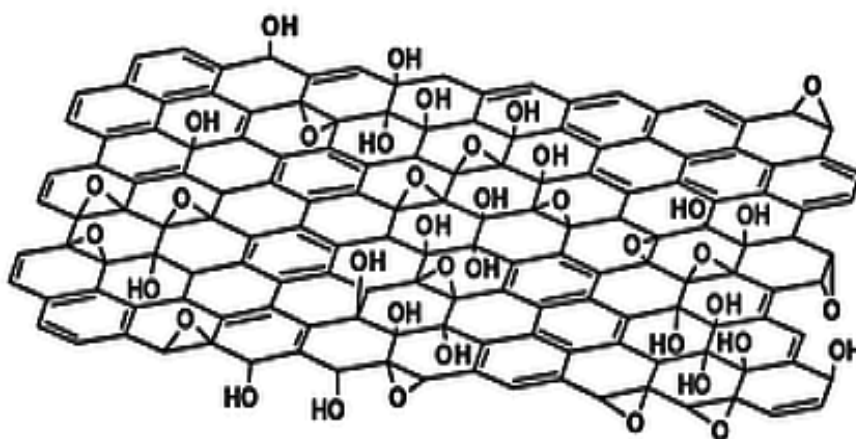
odzwierzęcych produktów pochodzenia ssaczego oraz z aspektów ekonomicznych [2]. Produkty pochodzenia wołowego bądź wieprzowego niosą ze sobą ryzyko transmisji gąbczastej encefalopatii bydła, pasażowalnej encefalopatii gąbczastej oraz pryszczycy. Transmisja ptasiej grypy ograniczyła również wykorzystanie kolagenu pochodzenia drobiowego. Kilka źródeł morskich tego białka jak gąbki morskie, kalmary, meduzy oraz oczywiście ryby zostały uznane za łatwo dostępne źródła kolagenu morskiego [3]. Szacuje się, że ponad 50% do 75% tkanek ryb w tym wnętrzości, płetwy, łuski oraz głowy stanowią odpady, uważane za zrównoważone i opłacalne źródło kolagenu [2,3,30]. Produkty te zawierają cenne białka, witaminy, minerały oraz wielonienasycone kwasy tłuszczowe [3,4]. W związku z powyższym wykorzystanie tych produktów ubocznych jest coraz powszechniejsze również ze względu na jego stosunkowo łatwą ekstrakcję, wysoką zawartość kolagenu, niską masę cząsteczkową w porównaniu do kolagenów innych zwierząt, która może sprzyjać wchłanianiu przez organizm, biokompatybilność, brak ryzyka przeniesienia chorób odzwierzęcych oraz patogenów oraz mniej znaczące ograniczenia religijne czy też etyczne [4]. Rozpuszczalność kolagenu zależna jest od wieku zwierzęcia, czym starszy osobnik, tym więcej wiązań sieciujących występuje w organizmie, a co za tym idzie kolagen jest trudniej rozpuszczalny w porównaniu do tkanek młodych zwierząt [30]. Kolagen ze skór ryb, płetw czy ości ma niską temperaturę denaturacji, dla większości ryb mieszczącą się w przedziale (25-30)°C oraz posiada zwykle zmienny skład co stanowi pewne wyzwanie w zastosowaniach biomedycznych. Niska temperatura denaturacji niektórych gatunków uniemożliwia ich praktyczne zastosowanie medyczne, gdyż powoduje to brak stabilności struktury podczas aplikacji na ciało. W celu zwiększenia stabilności kolagenu stosuje się czasem chemiczne sieciowanie, co wpływa na temperaturę denaturacji. Najbardziej popularnymi metodami ekstrakcji kolagenu jest metoda kwasowej oraz enzymatycznej ekstrakcji [3]. Wstępna obróbka materiału polega na oddzieleniu danej tkanki od reszty zmniejszenie rozmiaru fragmentów tkanki poprzez cięcie lub mielenie oraz wstępną obróbkę chemiczną polegającą na usunięciu substancji innych niż kolagen (białek niekolagenowych, pigmentów oraz tłuszczów). W przypadku ryb przed ekstrakcją kolagenu są one dzielone na poszczególne tkanki: skóry, łuski, płetwy, ości, gdyż ich skład jest inny, co wymaga nieco innego postępowania podczas ekstrakcji. Popularną metodą usuwania białek niekolagenowych

jest zastosowanie wodorotlenku sodu. Skuteczność tej metody zależy od czasu, stężenia oraz temperatury. Pigmenty oraz tłuszcze usuwane są często za pomocą odpowiednich alkoholi: etanolu bądź butanolu lub za pomocą nadtlenu wodoru [30]. Metody ekstrakcji opierają się na jego rozpuszczalności w obojętnych roztworach soli lub roztworach kwaśnych z lub bez odpowiednich enzymów. Kolagen rybi typu I jest znacznie lepiej rozpuszczalny w rozcieńczonych kwasach niż na przykład kolagen pochodzący od ssaków lub ptaków [3]. Kwasami stosowanymi w czasie ekstrakcji są zazwyczaj kwas octowy oraz mlekowy. Proces niestety nie jest zbyt wydajny, często aby wspomóc ten proces stosuje się enzymy proteolityczne, które wspomagają hydrolizę wiązań peptydowych. W tym celu można wykorzystać m.in. trypsynę oraz pepsynę. Następnie w celu wytrącenia kolagenu do roztworu dodaje się odpowiednie stężenie NaCl. Powstały osad poddaje się odwirowaniu, końcowemu oczyszczaniu oraz często liofilizowaniu [30]. Kolagen wykazuje doskonałą biokompatybilność, wysoki poziom adhezji komórek, niską antygenowość w porównaniu z innymi biopolimerami typu chitosan. Kolagen rybi jest szeroko stosowanym biomateriałem. Wspomaga on gojenie ran, rozwój komórek, aktywację płytek krwi czy angiogenezę. Stosowany jest jako system dostarczania leków (zwłaszcza antybiotyków i antyseptyków), w postaci gąbek w celu przyspieszenia leczenia ran i oparzeń, w formie błony osłonowej w okulistyce, w połączeniu z liposomami jako żel o stopniowym uwalnianiu leku czy jako suplement diety [3]. Jest również stosowany w inżynierii tkankowej jako substytut skóry, kości, zastawki czy naczyń krwionośnych. Ponadto stosowany jest jako wypełniacz zmarszczek oraz w celach prewencyjnych [39]. Kolagen pochodzenia rybiego znalazł również zastosowanie w stomatologii. Zazwyczaj służy jako nośnik do miejscowego podawania leku, środek hemostatyczny, czy jako błona otulająca miejsce mocowania implantu czy ekstrakcji w celu regeneracji oraz szybszej odbudowy komórek w miejscu zabiegu [3]. Istnienie tak wiele źródeł oraz typów kolagenu, wydaje się być niezwykle istotnym zbadanie każdego rodzaju ze szczególną starannością i dokładnością. Jest wiele technik pozwalających scharakteryzować próbki kolagenu czy to w roztworze czy w stanie stałym. Charakterystyka ta jest niezwykle istotna, aby dobrze poznać cechy strukturalne i właściwości fizyczne badanego materiału, co ułatwi otrzymanie oczekiwanych parametrów lub pomoże zbadać związek między osiągniętymi wynikami, a badaną cechą. Jedną z powszechnych metod

do oceny czystości oraz rozkładu wielkości cząstek jest elektroforeza. Często oznacza się również zawartość hydroksyproliny, na podstawie której określa się wydajność procesu porównując zawartość hydroksyproliny sprzed i po procesie ekstrakcji. Hydroksyprolina ma też istotne znaczenie na stabilność termiczną otrzymanego kolagenu, a więc w celu oszacowania jej wielkości można zastosować skaningową kalorymetrię różnicową. Temperatura denaturacji jest niezwykle istotnym parametrem, gdyż będzie miała ona wpływ na temperaturę, w której kolagen będzie mógł być przetwarzany oraz będzie decydowała o możliwości zastosowania go jako biomateriału. Kolagen znajduje tak szerokie zastosowanie m.in. dlatego, że w zależności od konkretnego zastosowania można wykorzystać różne procedury przetwarzania białka kolagenowego pochodzenia morskiego. Zasadniczo metody te nie różnią się zbyt od metod stosowanych na kolagenach ssaczych [30]. Biorąc pod uwagę powyższe, kolagen rybi jest perspektywnym biomateriałem o wszechstronnym zastosowaniu.

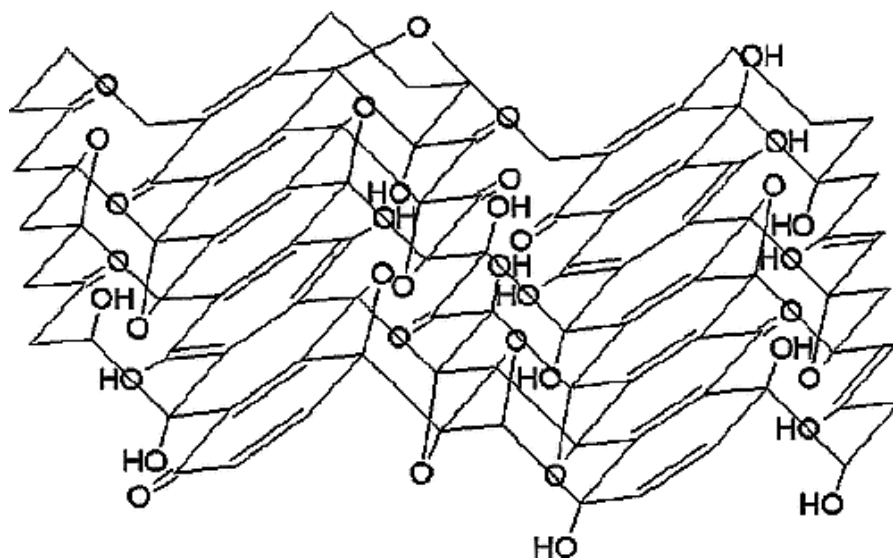
2. Tlenek grafenu

Jednowarstwowy arkusz tlenku grafitu, czyli tlenek grafenu (GO), jest nie tylko ważnym surowcem do wytwarzania grafenu, ale również dzięki swoim doskonałym właściwościom fizycznym i chemicznym może mieć istotne znaczenie w wielu dziedzinach między innymi w optyce i elektronice [40]. Właściwości te silnie zależą od grup chemicznych znajdujących się na powierzchni GO oraz warunków syntezy, gdyż stosując różne odczynniki bądź manipulacje czasem utleniania, można uzyskać niewielką zmienność składu, a co za tym idzie istnieje wiele różnych wariantów powierzchni GO. Zazwyczaj proporcja tlenu do węgla w tych materiałach waha się w granicach od 28% do 36%. Spośród wielu modeli przedstawiających strukturę GO najpopularniejszym jest model Lerfa - Klinowskiego przedstawiony na ryc. 1 [41]. Model ten odróżnia się na tle innych odrzuceniem uporządkowanej struktury na rzecz niestechiometrycznej, amorficznej [42]. Model ten zakłada, że GO składa się z warstwy zawierającej przypadkowo rozłożone domeny aromatyczne z nieutlenionymi pierścieniami benzenowymi oraz obszary zawierające grupy karboksylowe, hydroksylowe i epoksydowe [41,43].



Ryc. 1: Model Lerfa- Klinowskiego [43]

Nieco inną strukturę przedstawia model Szabó-Dékány (ryc.2), który wskazuje na falisty charakter struktury węglowej i jest następnym rozważanym modelem po propozycji Lerfa i Klinowskiego [42,44].



Ryc. 2: Model Szabó-Dékány [44]

Niestety do tej pory dokładna struktura GO nie została jeszcze w pełni poznana, zwłaszcza struktura krawędzi GO, głównie ze względu na różnice między próbkami wynikające z różnych metod syntezy i różnego stopnia utlenienia oraz niestechiometrycznego charakteru GO [42]. GO jest więc bertolidem [45]. Ogólnie przyjmuje się, że GO w swojej płaszczyźnie zawiera przede wszystkim grupy hydroksylowe i epoksydowe, a inne grupy funkcyjne zawierające tlen gromadzą się przy krawędziach arkuszy oraz defektach. Do defektów struktury możemy zaliczyć dziury, obszary silnie utlenione, fałdy czy niesześciokątne odstępstwa topologiczne [46]. W związku z powyższym termin tlenek grafenu może odnosić się do rodziny różnych związków z pewnymi odstępstwami w rozmieszczeniu i zawartości grup funkcyjnych [42]

2.1. Właściwości tlenku grafenu

GO nie jest naturalnie występującym związkiem, ale badania nad nim trwają już ponad 150 lat. [42] Ze względu na różnicę w budowie GO, może mieć on różne właściwości mechaniczne, które można dostosować do danych potrzeb [40]. Zależą one głównie od stopnia utlenienia materiału oraz jego grubości. Innymi czynnikami wpływającymi na właściwości mechaniczne są występujące defekty oraz stopień uporządkowania

struktury. Wraz ze wzrostem pokrycia GO grupami funkcyjnymi oraz defektami pogarszają się właściwości mechaniczne tego materiału, natomiast wzrost uporządkowania struktury czy wzrost ilości warstw arkuszy powoduje zwiększenie wytrzymałości mechanicznej materiału. Z powyższych właściwości GO posiada szeroki przedział wartości modułu Younga dla monowarstwy wynoszący (250 ± 150) GPa. GO charakteryzuje się również porównywalnie większą elastycznością podczas zginania w porównaniu do grafenu. GO wykazuje zatem wysoką wytrzymałość na zerwanie oraz sporą sztywność [46]. Od rodzaju grup funkcyjnych i stopnia utleniania zależą również właściwości elektryczne GO, który mocno utleniony jest izolatorem ze względu na dużą zawartość grup funkcyjnych zawierających tlen [46,47]. Ze względu na swój niejednorodny charakter GO dobrze przepuszcza promieniowanie świetlne, a jego wartość zależy szczególnie od grubości arkusza tego związku [46]. GO nie jest zbyt stabilny termicznie, gdyż już w temperaturze poniżej 100°C zaczyna się proces powolnego rozkładu, wynikający prawdopodobnie z uwalniania wchłoniętej wody [40].

Grupy funkcyjne w strukturze sprawiają, że GO ma właściwości hydrofilowe oraz zwiększają odległości między warstwami w porównaniu do grafenu. GO to przeważnie jedno lub kilkuwarstwowe arkusze, łatwo dyspergujące w wodzie, tworząc stabilną koloidalną zawiesinę. Grubość pojedynczego arkusza waha się w granicach (1- 1,4) nm [45].

Niekiedy w celu uzyskania taniego materiału grafenopodobnego. GO poddaje się procesowi redukcji. Redukcja ta polegać może na chemicznym, termicznym lub fototermicznym usuwaniu części grup tlenowych z powierzchni GO, jednocześnie przekształcając część atomów węgla z hybrydyzacji sp^3 do sp^2 , zwiększając aromatyczność związku. Nowo powstała substancja nazywana jest zredukowanym GO [42].

Z punktu medycznych zastosowań istotne są właściwości toksyczne GO [48]. Wykazano szkodliwy wpływ GO na bakterie *Staphylococcus* i *E. coli* z powodu uszkodzenia błon komórkowych przez krawędzie arkuszy GO [45]. Stwierdzono, że do efektów toksycznych przyczyniają się grupy funkcyjne. Prowadzono również badania toksyczności GO na zwierzętach m.in. myszach, szczurach czy rybach. Więcej informacji na temat wpływu GO na organizmy żywe przedstawiono w podrozdziale

2.4. Oddziaływanie tlenku grafenu z tkankami. Określenie toksyczności jest niezbędnym krokiem do określenia predyspozycji danego materiału do zastosowań biomedycznych [48]. Ponadto istotnymi właściwościami GO do zastosowań biomedycznych są: doskonałe właściwości fizykochemiczne, duża powierzchnia właściwa, wysoka biokompatybilność oraz właściwości antybakteryjne [49,50]. W dodatku GO oraz zredukowany GO mają silny wpływ na różnicowanie komórek macierzystych. Charakterystyczna powierzchnia GO ma silny wpływ na adhezję komórek macierzystych i proliferację komórek [51].

Manipulując strukturą chemiczną GO można osiągać różne właściwości, dzięki którym GO może znaleźć wszechstronne zastosowanie w różnorodnych dziedzinach [46]

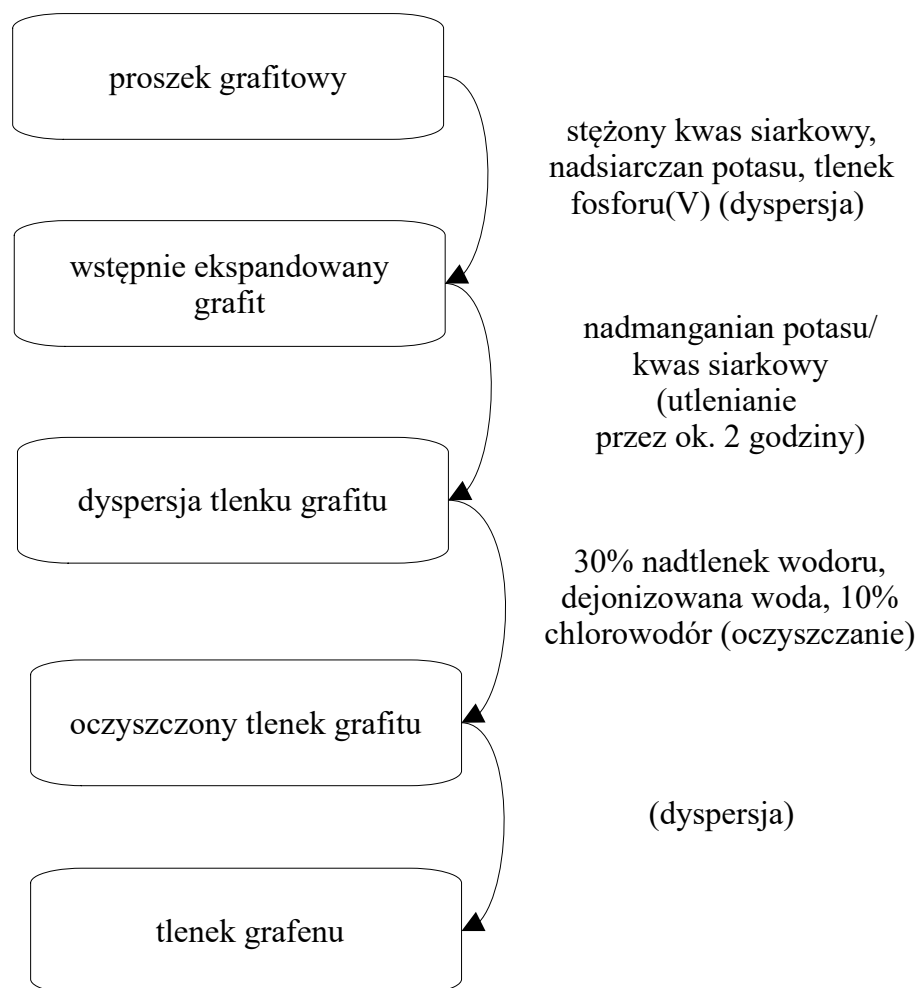
2.2. Metody otrzymywania tlenku grafenu

Jak wcześniej wspomniano GO jest niestechiometrycznym związkiem chemicznym zawierającym jony węgla, tlenu i wodoru w zmiennych proporcjach, które w znacznym stopniu zależą od metodologii jego wytwarzania. Istnieje co najmniej kilkanaście sposobów produkcji GO, jednak do najistotniejszych należą:

- metoda Brodie'go
- metoda Straudenmaier'a
- metoda Hummers'a wraz z jej modyfikacjami [52].

Metoda Brodie'go zasługuje na uwagę, gdyż jest pierwszym udokumentowanym sposobem otrzymywania GO. W 1859 roku podczas badań nad grafitem Brodie otrzymał nowy, inny związek, GO. Dodał chloran potasu do zawiesiny grafitu w dymiącym kwasie azotowym (V). Po czym umył otrzymany produkt wypłukując sole wytworzone podczas procesu utleniania, wysuszył w 100°C i ponownie poddał go opisanemu wcześniej procesowi. Proces powtarzał kilkakrotnie aż do momentu kiedy produkt końcowy przestał zmieniać się wizualnie (przestał się bardziej utleniać w sposób widoczny gołym okiem). Jedno z najwcześniej wprowadzonych ulepszeń do tej metody powstało w 1898 roku dzięki Straudenmaier'owi. Wprowadził on dwie bardzo istotne zmiany: dodał stężony kwas siarkowy w celu poprawy kwasowości środowiska utleniania oraz zastosował dodawanie wielu porcji chloranu potasu do mieszanin reakcyjnej podczas trwania całego procesu. Zmiany te skutkowało otrzymaniem wysoce

utlenionego GO w jednym naczyniu reakcyjnym co znacznie uprościło cały proces produkcji. Pomimo tego, metoda ta nadal była czasochłonna (zwykle trwała ponad tydzień), a także niebezpieczna – istniało zagrożenie eksplozji gazów, a wydzielany dwutlenek chloru musiał być systematycznie usuwany. Niecałe 60 lat później Hummers i Offeman przedstawili nową metodę otrzymywania GO. Bezwodną mieszaninę stężonego kwasu siarkowego, azotanu sodu oraz nadmanganianu potasu utrzymywano w temperaturze poniżej 45°C do momentu utlenienia grafitu. Trwało to około 2 godziny. Otrzymano produkt o jeszcze wyższym stopniu utlenienia niż Straudenmaier [42]. Metodę Hummers’a w stosunku do poprzednich wyróżnia: krótki czas reakcji (czas skrócony do kilku godzin), chloran potasu został zastąpiony nadmanganianem potasu co znacznie zwiększyło bezpieczeństwo całej procedury, gdyż nie wydzielano już groźny dwutlenek chloru. Ponadto zastosowanie azotanu sodu zamiast kwasu azotowego eliminuje problem z tworzeniem się kwaśnych oparów [53]. Obecnie do grona najpowszechniej stosowanych procedur można zaliczyć jedną ze zmodyfikowanych metod Hummers’a przedstawioną na ryc. 3. [42].



Ryc. 3: Metoda Hummers'a przedstawiona w schematyczny sposób [42]

W metodzie tej do łaźni lodowej, w której znajduje się stężony kwas siarkowy dodaje się grafit w postaci proszku. Układ zaopatrzonej jest w mieszadło, aby podczas całego procesu substancja reakcyjna była mieszana. Następnie podczas energicznego mieszania do łaźni powoli dodaje się nadmanganian potasu, tak aby utrzymać temperaturę zawiesiny poniżej 20°C. W dalszym kroku mieszaninę reakcyjną utrzymuje się w 40°C przez około pół godziny. W kolejnym etapie dodaje się wodę i miesza w 95°C przez 15 minut. W dalszym ciągu reakcji znów dodaje się wodę oraz nadtlenek wodoru. Mieszaninę przesącza się, a następnie przepłukuje roztworem chlorowodoru w celu usunięcia jonów metali. Otrzymaną substancję osusza się na powietrzu, następnie znów dysperguje się ją w wodzie i poddaje dializie w celu usunięcia pozostałych jonów metali. W końcowym etapie wodną dyspersję powstałego

tlenku grafitu miesza się oraz poddaje 30 minutowej sonifikacji (zastosowanie ultradźwięków) w celu zdyspergowania go do GO [53]. Typowy produkt otrzymany tą metodą składa się z arkuszy o grubości około 1nm (pojedyncza warstwa) oraz o wymiarach bocznych około 1 μ m. Stosunek zawartości węgla:tłenu:wodoru powinien wynosić 4:2,95:2,5. W 2010 roku Tour i współtwórcy przedstawili nową, ciekawą modyfikację znanej wcześniej metody Hummers'a. Grafit dodaje się do mieszaniny kwasów siarkowego i fosforowego, który to jest nowością w mieszaninie reakcyjnej, oraz zwiększono w tej procedurze ilość nadmanganianu potasu. Pomimo iż same wytworzenie GO nie stanowi już problemu jednak nadal brakuje pewnej wiedzy na temat procesów utleniania i szczegółowych mechanizmów tego procesu, aby swobodnie kontrolować wielkość arkuszy, strukturę krawędzi itp. [42].

2.3. Zastosowania tlenku grafenu

Jak wspomniano powyżej GO oferuje różne unikalne właściwości, którymi stosunkowo łatwo można manipulować [48]. Dzięki temu GO może znaleźć zastosowanie w elektronice, optyce, biotechnologii, w konwersji i magazynowaniu energii oraz w ochronie środowiska. Mocno zredukowany GO, dzięki zbliżonym właściwościom do grafenu, z powodzeniem może znaleźć zastosowanie w przeźroczystych przewodnikach w urządzeniach takich jak ogniwa fotowoltaiczne i wyświetlacze. GO może znaleźć również zastosowanie w tranzystorach polowych, dzięki swoim właściwościom emisji polowej. Zmieniając stopień utlenienia GO, można wpływać na jego przewodność elektryczną co sprawia, że materiał ten jest odpowiedni do produkcji sensorów elektrycznych. Folie zredukowanego GO są niezwykle elastyczne co pozwala na zastosowanie ich również w elastycznych materiałach elektronicznych wykorzystywanych w urządzeniach mobilnych [40]. Z potencjalnych zastosowań w optyce możemy wyróżnić: zastosowanie w ultracienkich soczewkach w miniaturowych urządzeniach analitycznych (w tzw. laboratoriach chipowych), w produkcji fotodetektorów czy przy wykrywaniu znakowanych barwnikiem biocząstek i DNA [54]. GO o odpowiednim poziomie redukcji okazał się być również pomocny jako fotokatalizator przy produkcji wodoru z wody lub wodnego roztworu metanolu czy w bateriach litowo-jonowych wydłużając żywotność baterii (utrzymują stałą

pojemność baterii). Wykazano, że wysoce utleniony GO może znaleźć zastosowanie jako separator w superkondensatorach. GO może również służyć usuwaniu zanieczyszczeń z powietrza czy wody. GO funkcjonalizowany metalami może wspomóc wychwytywanie i przetwarzanie szkodliwych gazów takich jak tlenek węgla, dwutlenek azotu oraz amoniak. Stosowany może być również do oczyszczania wody z jonów metali ciężkich, a kompozyty na bazie GO mogą być przydatne w fotodegradacji zanieczyszczeń organicznych w ściekach [40].

Niezwykle istotne wydają się też potencjalne zastosowania biomedyczne w szczególności: w systemach dostarczania leków i genomów, w szczególności terapii antynowotworowej, bioobrazowaniu, inżynierii tkankowej, leczeniu ran oraz środkach antybakteryjnych [48,55]. Materiały na bazie GO są szeroko stosowane do projektowania ukierunkowanych i reagujących na dane bodźce systemów dostarczania leków. Substancje takie charakteryzują się ogromnym potencjałem zmiany pod wpływem ekspozycji na konkretny czynnik. Ten sposób dostarczania leków jest nie tylko skuteczny, ale znacząco zmniejsza występowanie skutków ubocznych, gdyż ogranicza wpływ działania leku na zdrowe tkanki. Do bodźców zewnętrznych należą m.in. temperatura, światło, pola magnetyczne i elektryczne, natomiast do wewnętrznych pH, enzymy [50,56]. Struktury grafenowe mają wysoką zdolność absorpcji promieniowania podczerwonego, co daje możliwość wykorzystania ich w terapii fototermicznej [57]. W związku z powyższym materiały grafenowe z powodzeniem można by zastosować jako reagujące na dany czynnik (np. ciepło) nośniki substancji leczniczych głównie w terapiach antynowotworowych [56]. Przykładem takiego potencjalnego zastosowania jest praca zespołu Zhang'a, którzy wykorzystali kompozyt zawierający histydynę, tlenek cynku, złoto, glikol polietylenowy oraz GO. Materiał ten wykazał wysoką nośność doksorubicyny oraz charakteryzował się uwalnianiem leku zależnym od pH, dzięki czemu kompleks mógł zdysocjować w celu uwolnienia antyrakowych jonów cynku w środowisku o niskim pH (takim jak w lizosomie komórki nowotworowej). Autorzy tej pracy wykazali znaczące ukierunkowanie działania leku oraz jego wysoką skuteczność w terapii antynowotworowej płuc *in vivo* [58]. Zestawienie wybranych ciekawych i obiecujących badań dotyczących ukierunkowanych systemów dostarczania leków wraz z ich zaletami i ograniczeniami przedstawiono w tabeli 1. [56].

Tabela 1: Zalety i ograniczenia niektórych wybitnych opublikowanych badań dotyczących funkcjonalizowanych nanocząstek tlenku grafenu [56]

Rodzaj nanomateriałów	Zalety	Ograniczenia	Lek/Geny
GO-kwas foliowy- βcyklodekstryna	in vivo cytokompatybilność , zahamowanie wzrostu guza in vivo	potrzeba badań immunogennych	doksorubicyna
adriamycyna/ doksorubicyna -GO	wysoka zdolność ładowania leku, biokompatybilność, uwalnianie leku reagujące na pH	potrzeba badań in vivo, potencjalna kumulacja nanocząstek w śledzienie	adriamycyna/ doksorubicyna
polietylenoimina - GO	biokompatybilność, sekwencyjne dostarczanie genów i leków	złożona metoda syntezy, niska rozpuszczalność w wodzie,	siRNA, doksorubicyna
GO-kwas sulfonowy	dostarczanie wielu leków,	potrzeby badań in vivo, możliwość immunogeniczności	doksorubicyna, kamptotecyna
tytan-GO-białko morfogenetyczne kości-2	wydajny nośnik białka terapeutycznego, wysoka specyficzność	rozkład białka w obecności tytanu, potrzeba badań immunogennych	białko morfogenetyczne kości-2

Obecnie prowadzonych jest wiele badań nad zastosowaniem GO w terapiach antynowotworowych jako nośnik lub współnośnik leku [56]. Przykładem może być zastosowanie kamptotecyny oraz 3,3'-diindolilometanu jako współnośnika w terapii raka piersi lub jako wrażliwy na pH współnośnik dostarczania doksorubicyny w leczeniu raka szyjki macicy [6,59]. GO może być też w przyszłości użyty jako współnośnik w leczeniu raka wątroby czy guza sutka [50].

Ze względu na wszechstronną możliwość funkcjonalizacji powierzchni pochodnych grafenu, w tym GO mogą być one stosunkowo łatwo funkcjonalizowane za pomocą

barwników, polimerów, leków w celu otrzymania nanomateriału do różnych zastosowań bioobrazowania m.in. w obrazowaniu fluorescencyjnym, pozytonowej tomografii emisyjnej oraz tomografii emisyjnej pojedynczych fotonów głównie w celu wykrywania guzów nowotworowych [60].

W inżynierii tkankowej GO znajduje potencjalne zastosowanie m.in. w regeneracji kości. Wciąż poszukiwany jest idealny materiał jako rusztowania kości. Pochodne grafenu jak GO dzięki swoim interesującym właściwościom mechanicznym, chemicznym, antybakteryjnym, których brakuje bardziej konwencjonalnym materiałom stosowanym w inżynierii tkankowej jak tytan lub poli(metakrylan metylu) mogą stanowić unikalny materiał do zastosowań w regeneracji kości. W związku z tym, że GO można modyfikować, materiały na bazie GO mogą spełniać określone cechy biochemiczne oraz łączyć w sobie właściwości mechaniczne materiałów grafenowych z cząsteczkami bioaktywnymi np. białkami odpowiadającymi za stymulującymi regenerację tkanek. Przykładem takiego połączenia jest materiał składający się z GO i chitosanu. Jako, że kości wykazują różne właściwości mechaniczne w zależności od ich funkcji i lokalizacji w ciele, tak więc optymalny materiał przeznaczony na implanty kości powinien charakteryzować się łatwym dopasowywaniem właściwości mechanicznych do konkretnych potrzeb, a modyfikowanie materiałów grafenowych pozwala na ich regulację. Przykładem porowatego, elastycznego i cytokompatybilnego materiału o regulowanych właściwościach mechanicznych jest kompozyt składający się z poliuretanu, poli (kwasu mlekowego) oraz GO. Dodatkową zaletą materiałów na bazie GO są jego właściwości antybakteryjne, które mogą ograniczyć ryzyko wystąpienia infekcji w miejscu ubytku kości [7].

Niezwykle interesującym i stosunkowo nowym pomysłem są badania nad GO w kierunku leczenia ran [50]. Hussein i wsp. przedstawili obiecujące badania na temat GO poddanego ultradźwiękom (ma mniejszą ilość grup funkcyjnych zawierających tlen) w celu regeneracji zarówno skóry jak i kości. GO poddawany był ultradźwiękom przez 2 dni w temperaturze 60°C. Wykazano, że taki GO może wspierać przyczepianie się i proliferację komórek, a więc sprzyja tworzeniu nowych kości. Wspomagał on też zamykanie ran w modelu szczurzym. Powyższe badania sugerują, że GO poddany ultradźwiękom może znaleźć potencjalne zastosowanie w regeneracji tkanek [61]. Nowroozi i wsp. przedstawili ciekawą koncepcję kompozytu zawierającego GO,

chitosan oraz kurkuminę, który mógłby wspomóc leczenie ran i owrzodzeń. Bezspornymi zaletami chitosanu jako środka wspomagającego proces gojenia są m.in. pobudzanie krzepnięcia krwi, przyspieszanie regeneracji tkanek oraz działanie antybakteryjne. Wadą tego polisacharydu są natomiast słabe właściwości mechaniczne. Dodatek GO mógłby poprawić właściwości mechaniczne chitosanu oraz wspomóc działanie antybakteryjne. Jednak z uwagi na to, że zbyt duże stężenie GO może wpływać cytotoksycznie na organizm, jego bezpieczna ilość może nie wystarczyć do znacznej poprawy właściwości antybakteryjnych chitosanu. W takiej sytuacji warto zastosować dodatkowy środek wspomagający walkę z drobnoustrojami. Kurkumina charakteryzuje się działaniem nie tylko przeciwbakteryjnym, ale również przeciwzapalnym, regenerującym, a także jest antyoksydantem. GO, kurkumina oraz chitosan stanowią kompozyt mający potencjalne zastosowanie w leczeniu ran, gdyż dzięki swoim doskonałym właściwościom materiał ten predysponuje do zastosowań klinicznych [55]. Natomiast Soliman i wsp. przedstawili inny obiecujący kompozyt w dziedzinie leczenia ran składający się z GO oraz celulozy. Przeprowadzone badania na szczurach wykazały przyspieszoną regenerację skóry w porównaniu z grupą kontrolną oraz tworzenie się grubej tkanki ziarninowej i intensywną budowę struktur kolagenowych. Biorąc pod uwagę powyższe badania, kompozytu celuloza-GO wykazał pozytywny wpływ na proces gojenia się ran, co sugeruje jego obiecujące i potencjalne zastosowanie w regeneracji tkanek skóry [62]. Zespół Rehman'a przedstawił również interesujące badania dotyczące hydrożelu zawierającego metakryloil żelatyny ze zredukowanym GO w celu wspomagania leczenia ran zwłaszcza cukrzycowych, które wykazują zmniejszone tworzenie naczyń krwionośnych, nieodpowiednią proliferację komórek oraz słabą migrację komórek w okolicy ran. Opracowany przez badaczy hydrożel zawierający zredukowany GO wspiera migrację i proliferację komórek, a ponadto wspomagał tworzenie naczyń krwionośnych, co sprawiło, że również ten materiał może stać się potencjalnym środkiem wspomagającym leczenie ran [63].

2.4. Oddziaływanie tlenku grafenu z tkankami

Szczegółowa charakterystyka działania GO na organizmy oraz ich tkanki jest niezbędnym etapem do określenia przydatności danego materiału do zastosowań biomedycznych [48].

Liu i wsp. przeprowadzili test toksyczności GO na embrionach ryb z gatunku dania pręgowatego. Zarodki były wystawiane na różne stężenia GO w przedziale 1-100 mg/L przez 96 godzin. Nie zaobserwowano nieprawidłowości, takich jak anomalie ogona czy układu krążenia u badanych zarodków. Ponadto GO nie powodował śmiertelności zarodków [64].

Liang i wsp. przeprowadzili badania dotyczące wpływu GO na płodność samców myszy. GO wstrzykiwany był w żyłę ogonową (25 mg/kg myszy) lub do jamy brzusznej (60 mg/kg co 24 godziny przez 5 dni). Myszy wykazywały prawidłowe wydzielanie hormonów płciowych i zachowywały normalną aktywność reprodukcyjną. Ponadto samice nie poddawane działaniu GO skojarzone z samcami narażonymi na jego działanie wydawały zdrowe potomstwo. Nie było znaczących różnic w liczbie młodych, proporcjach płci, wadze, wskaźnikach przeżywalności młodych między grupą narażoną na działanie GO, a grupą kontrolną. GO wykazywał bardzo niską lub prawie żadną toksyczność dla reprodukcji samców myszy. Prace te znacznie ułatwią przyszłe badania nanoarkuszy GO do zastosowań biomedycznych [65].

An i wsp. ocenili toksyczność wpływu GO na oczy również w modelu mysim. Do worka spojówkowego przez 7 dni aplikowano każdorazowo 10 µl wodnego roztworu GO o stężeniu maksymalnym 100 µg/ml. U części z myszy nastąpił stan zapalny oka oraz zmętnienie rogówki, prawdopodobnie z powodu stresu oksydacyjnego. Ponadto autorzy pracy zauważyli, że GO odgrywa ważną rolę we wzmacnianiu proliferacji komórek zrębu rogówki *in vivo*. Informują także, że wymagane są dodatkowe eksperymenty, aby zbadać, w jaki sposób GO wywołuje powyżej wymienione procesy [66].

Zespół Kim'a przeprowadził natomiast krótkoterminową analizę toksyczności inhalacji GO. Badanie przeprowadzono na samcach szczurów. Inhalacja odbywała się jedynie przez nos. Największym zastosowanym stężeniem było ok. 10 mg/m³. Inhalacja trwała przez 5 dni, 6 godzin dziennie. Nie zaobserwowano u szczurów znaczących zmian

masy ciała ani narządów. Co istotne, krótkoterminowe badanie inhalacji wyłącznie przez nos wykazało jedynie minimalną lub niezauważalną toksyczność tlenku grafenu w płucach i innych narządach jak nerki czy wątroba [67].

Jako, że komórki odpornościowe stanowią pierwszą linię kontaktu organizmu z nanomateriałem i odpowiadają za występowanie ewentualnych reakcji niepożądanych, informacje dotyczące wpływu GO na układ odpornościowy pozwoli ocenić potencjalny wpływ GO na organizm człowieka. Badania prowadzono na makrofagach w warunkach *in vitro*. Wynika to z faktu, że komórki te stanowią pierwszą „linię obrony” organizmu na patogeny i obce substancje wprowadzone do krwiobiegu. Ponadto makrofagi stanowią najpopularniejszą grupę komórek w modelach badawczych układu odpornościowego. Uważa się, że makrofagi odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej na badany nanomateriał. Powszechnie przyjmuje się, że GO stymuluje proces fagocytozy we wszystkich fagocytach, zwłaszcza w makrofagach. Nanocząstki takie jak GO, powodują zaburzenia czynności mitochondriów i zwiększają stężenie wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu, co prowadzi do stresu oksydacyjnego i śmierci komórki. GO może również powodować zwiększoną produkcję cytokin takich jak niektóre interleukiny [68].

Zauważono również, że podczas hydratacji GO, pierścienie epoksydowe reagują z nukleofilami w roztworach wodnych, powodując otwarcie grup epoksydowych na powierzchni GO. Podczas styku liposomu z taką powierzchnią, dochodzi do peroksydacji lipidów (utlenienia lipidu i powstania jego nadtlenków) [48].

Grupy karboksylowe, epoksydowe i hydroksylowe sprawiają, że GO jest bardziej hydrofilowy i znacznie zwiększa jego biodostępność w porównaniu do grafenu oraz ułatwia interakcje z innymi cząsteczkami i składnikami komórki [68]. Toksyczność może zależeć od modyfikacji powierzchni GO oraz od wielkości jego struktur [50]. Małe cząstki GO wykazują wysoką toksyczność, ze względu na mały rozmiar i ostre krawędzie, łatwiej penetrując błonę komórkową i wnikać do cytoplazmy, a w konsekwencji powodując uszkodzenie błony komórkowej i wyciek treści cytoplazmatycznej. Z drugiej strony małe cząstki GO są łatwo usuwane ze względu na ich małe rozmiary, które pozwalają im łatwo przeniknąć przez kłębuszki nerkowe i zostać szybko usunięte. Arkusze GO większe niż 200 nm są mniej toksyczne dla komórek, ponieważ nie mogą przenikać przez błonę komórkową, ale są silnie

zatrzymywane w różnych narządach ciała, powodując długotrwałe efekty uboczne [51]. Toksyczność GO zależy również od kształtu, metody utleniania, ilości podanej dawki oraz czasu ekspozycji [60]. Przyjęto, że dawka powyżej 50 $\mu\text{g/ml}$ uszkadza ludzkie fibroblasty [45]. GO w dawkach niższych niż 20 $\mu\text{g/ml}$ nie wykazywał toksyczności wobec ludzkich komórek fibroblastów, natomiast dawki powyżej 50 $\mu\text{g/ml}$ zmniejszając adhezję komórek oraz indukują ich apoptozę. Wykazano również obecność GO w lizosomach, mitochondriach, endoplazmie i jądrze komórkowym [51]. Das i jego zespół wywnioskowali, że chociaż rozmiar arkusza GO odgrywa istotną rolę w toksyczności GO, to gęstość grup funkcyjnych na jego arkuszu jest jednym z kluczowych elementów pośredniczących w cytotoksyczności komórkowej. Kontrolując redukcję GO i utrzymując rozpuszczalność, możliwe jest zminimalizowanie toksyczności GO i poznanie szerokiego zakresu zastosowań biomedycznych [69]. Jak już wspomniano wcześniej charakterystyczna powierzchnia GO ma silny wpływ na adhezję komórek macierzystych i proliferację komórek [51]. Właściwości te przypisuje się grupom funkcyjnym zawierającym tlen, takim jak grupa hydroksylowa, karboksylowa i epoksydowa, które umożliwiają różnego rodzaju interakcje, wiązania elektrostatyczne i wodorowe pomiędzy GO a induktorami osteogennymi i czynnikami wzrostu [70].

3. Kolagen domieszkowany tlenkiem grafenu

Interakcje pomiędzy GO i kolagenem są niezwykle istotne oraz niezbędne zarówno w projektowaniu jak i produkcji nowych materiałów mających potencjalne zastosowanie w inżynierii tkankowej. Jak wcześniej wspomniano, kolagen jako atrakcyjny materiał białkowy, zwłaszcza kolagen typu I ma dobrą biokompatybilność, biodegradowalność i niską immunogenność. GO natomiast wykazuje się niezwykle ciekawymi właściwościami mechanicznymi, hydrofilowością oraz elastycznością co czyni go jednym z najlepszych kandydatów do tworzenia kompozytu GO-kolagen [71].

3.1. Oddziaływanie pomiędzy tlenkiem grafenu, a kolagenem

Zespół Yue twierdzi, że grupy funkcyjne zawierające tlen powodują, że nanoarkusze GO są hydrofilowe i wysoce dyspergowalne w wodzie, natomiast aromatyczne regiony GO oferują miejsca aktywne, umożliwiające interakcję międzyfazowe z innymi polimerami makrocząsteczkowymi. Samoorganizacja cząsteczek kolagenu na powierzchni nanoarkuszy GO może zachodzić poprzez oddziaływania elektrostatyczne, wiązania wodorowe i hydrofobowe oddziaływania π - π w zależności od grup funkcyjnych na powierzchni arkuszy GO i konkretnego regionu cząstek kolagenowych oddziałujących z powierzchnią nanoarkuszy GO. Należy wziąć pod uwagę amfifilowy charakter nanoarkuszy GO (zazwyczaj hydrofobowe centrum, hydrofilowe krawędzie). Przy pH równym 5 praktycznie nie występuje odpychanie elektrostatyczne między kolagenem, a GO co powoduje, że kolagen tworzy fibryle na powierzchni nanoarkuszy GO poprzez wiązania wodorowe i oddziaływania hydrofobowe. Natomiast przy wartości pH 7,4 zaobserwowano, że w procesie adsorpcji kolagenu na GO dominują oddziaływania hydrofobowe. Włókna kolagenowe są adsorbowane na nieutlenionych hydrofobowych domenach nanoarkuszy GO poprzez oddziaływania hydrofobowe z powodu odpychania elektrostatycznego między grupami zawierającymi tlen na krawędzi nanoarkuszy GO i cząstek kolagenowych. Zauważono, że oddziaływania wiązania wodorowego zachodzą często między grupami karboksylowymi GO i grupami aminowymi kolagenu [71].

Marco i wsp. również wspominają, że GO posiada zdolność do interakcji z kolagenem poprzez wiązania wodorowe wytworzone z utlenionymi grupami funkcyjnymi GO [72]. Yue i wsp. badając folię z GO oraz kolagenu ze ścięgna Achillesa bydła wykazali, że na powierzchni nanoarkuszków GO gromadzi się warstwa kolagenu. Silne interakcje międzyfazowe między nanoarkuszami GO i kolagenem mogą skutecznie zapobiegać przesuwaniu się międzyfazowemu podczas procesu rozciągania, co zapewnia doskonałą wytrzymałość folii nanokompozytowej [71].

Badania kompozytu kolagen-GO opierają się głównie na sprawdzeniu toksyczności, biokompatybilności oraz przydatności do potencjalnych zastosowań. Interakcja pomiędzy potrójną helisą kolagenu, a tlenkiem grafenu nie jest jeszcze dobrze poznana, dlatego prowadzenie badań nad kolagenem domieszkowanym GO wydaje się być warte zainteresowania badaczy [71,73].

3.2. Zastosowanie kompozytu kolagen/tlenek grafenu

Zespół Liu przedstawił koncepcję aerożelu (materiał porowaty o bardzo dużej zawartości powietrza) wykonanego z GO ze względu na swoje właściwości mechaniczne i biokompatybilność oraz kolagenu. Materiał ten ma mieć potencjalne zastosowanie w regeneracji kości. Autorzy tego badania opracowali wysoce porowaty aerożel składający się z GO o różnych stężeniach GO (w przedziale 0%, -0,2%) i kolagenu typu I. Wyniki wskazują, że aerożele te są wysoce porowate i hydrofilowe. W badaniach in vivo lepszy efekt naprawy kości zaobserwowano w 0,1% oraz 0,2% aerożelu GO-kolagen niż w czystym aerożelu kolagenowym w szczurzych modelach ubytków czaszki. Badanie to wykazało, że 0,1% aerożel GO-kolagen wykazywał dobrą biokompatybilność i zdolność osteogenną in vivo, co czyni go obiecującym biokompatybilnym rusztowaniem do regeneracji kości i inżynierii tkankowej [8].

Radunovic i wsp. przedstawili badania dotyczące błon kolagenowych domieszkowanych GO o potencjalnym zastosowaniu ich w chirurgii jamy ustnej do leczenia ubytków kostnych. W celu poprawy biokompatybilności czystych błon kolagenowych pokryto je GO. Celem tej pracy było zbadanie biokompatybilności błon kolagenowych pokrytych GO z komórkami macierzystymi miazgi zęba człowieka, skupiając się na cytotoksyczności biomateriału, zdolności do promowania procesu

różnicowania komórek oraz kontrolowania indukcji stanu zapalnego. Badania te wykazały, że filmy kolagenowe powlekane GO nie są toksyczne dla komórek macierzystych miazgi zęba oraz wywołują szybsze różnicowanie tych komórek w odontoblasty oraz osteoblasty niż czyste błony kolagenowe i mogą stanowić dobrą alternatywę dla membran konwencjonalnych, zapewniając w ten sposób bardziej efektywne tworzenie kości i poprawę wyników klinicznych [74].

Zespół Marco również przedstawił badania na temat błon kolagenowych wzbogacanych GO, również z myślą o zastosowaniach w zabiegach chirurgii jamy ustnej oraz regeneracji kości. W niniejszej pracy membrany powlekane GO scharakteryzowano pod względem stabilności, nanoszerstkości, biokompatybilności i indukcji odpowiedzi zapalnej w ludzkich komórkach fibroblastów dziąsłowych. Wykazano, że otrzymany materiał jest biokompatybilny i nie wywołuje stanu zapalnego w badanych komórkach. [72].

Deepachitra i wsp. poddali badaniu kompozyt złożony z kolagenu, fibryny oraz GO. Kompozyt ten badano pod kątem zastosowań jako materiałów opatrunkowych. Wykazano, że materiał ten jest biokompatybilny. Zastosowano go jako materiał opatrunkowy na rany doświadczalne szczurów. Badania biochemiczne, hematologiczne oraz histopatologiczne wykazały, że rany leczone za pomocą filmów złożonych z kolagenu, fibryny oraz GO goiły się szybciej niż rany w grupie kontrolnej, co sugeruje, że kompozyt ten może być stosowany jako przyszłościowy materiał opatrunkowy [9].

Zespół Senthil przedstawił badania kompozytu złożonego z poli(alkoholu winylowego), który jest polimerem syntetycznym, z kolagenu pochodzenia rybiego (biopolimer) oraz z GO o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu ran. Wykazano biokompatybilność przedstawionego materiału. Skuteczność kompozytu oceniano w modelu mysim. Wykazano, że materiał złożony z poli(alkoholu winylowego), kolagenu oraz GO skutecznie przyspieszał proces gojenia się ran [75].

Jayavardhini i wsp. zaprezentowali badania dotyczące rusztowania serycynowo-kolagenowego wzbogaconego GO o potencjalnym zastosowaniu w inżynierii tkankowej. Zastosowany kolagen również i w tych badaniach pochodził z ryb. Wykazano skuteczność omawianych rusztowań w indukowaniu tworzenia nowych naczyń krwionośnych, dzięki czemu możliwe staje się ich zastosowanie jako nowego środka terapeutycznego w leczeniu chorób niedokrwienych [76].

4. Metody badawcze oceny wpływu tlenku grafenu na kolagen

Poznanie interakcji pomiędzy GO i kolagenem jest niezwykle ważne oraz niezbędne zarówno podczas projektowania jak i produkcji nowych materiałów mających potencjalne zastosowanie w medycynie. Badania kompozytu kolagen-GO opierają się głównie na sprawdzeniu toksyczności, biokompatybilności oraz przydatności do potencjalnych zastosowań (przeważnie są to badania wytrzymałościowe). Interakcja pomiędzy kolagenem, a GO nie jest jeszcze dobrze poznana, dlatego prowadzenie badań nad kolagenem domieszkowanym tlenkiem grafenu wydaje się być niezwykle istotne [71,73],

4.1. Metoda wiskozymetryczna

Badania wiskozymetryczne są jednymi z podstawowych metod analitycznych badania zarówno struktury jak i właściwości płynów polimerowych. „Lepkość definiuje się jako stosunek naprężenia ścinającego do szybkości ścinania. Naprężenie ścinające jest siłą wywieraną na element powierzchni cieczy równoległy do kierunku przepływu. Szybkość ścinania natomiast to stosunek różnicy prędkości dwóch warstw płynu do odległości pomiędzy nimi” [77]. Jest to tzw. lepkość dynamiczna, którą rozumiemy właśnie pod pojęciem lepkości [78]. Istotnym pojęciem w wiskozymetrii jest lepkość względna η_r (z ang. relative viscosity), która jest „stosunkiem lepkości roztworu η do lepkości rozpuszczalnika η_0 ”:

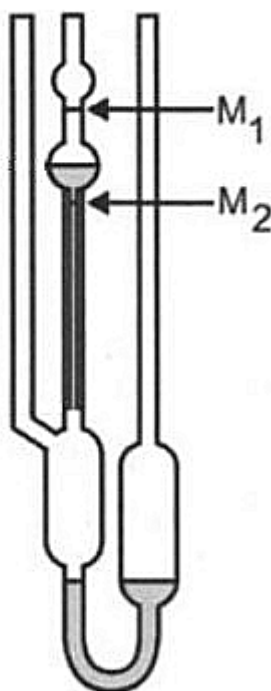
$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} \quad (1)$$

Natomiast lepkość właściwa η_{sp} (z ang. specific viscosity) wyraża „stosunek lepkości rozpuszczonego polimeru η_p do lepkości rozpuszczalnika” [77]:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_p}{\eta_0} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \eta_r - 1 \quad (2)$$

Dobór odpowiedniego rodzaju wiskozymetru zależy głównie od rodzaju polimeru oraz rozpuszczalnika. Jednym z najbardziej popularnych typów wiskozymetrów są lepkościomierze kapilarne. Ich powszechność bierze się stąd, że są one kompromisem pomiędzy dokładnym określeniem lepkości, a niedrogim urządzeniem pomiarowym. Generalną zasadą wiskozymetrów kapilarnych jest przepływ grawitacyjny badanej próbki, ciecz przepływa przez kapilarę pod własnym ciężarem. Mierzony jest czas

przepływu znanej objętości cieczy przez kapilarę wiskozymetru (czas przepływu od punktu M_1 do M_2 zaznaczonych na poniższym rysunku). Temperatura w tego typu wiskozymetrach może być dobrze regulowana, ponieważ cała kapilara może być zanurzona w kąpeli wodnej. Do wiskozymetrów kapilarnych należy m.in. wiskozymetr Ubbelohde przedstawiony na poniższej rycinie [77].



Ryc. 4: Wiskozymetr Ubbelohde [77]

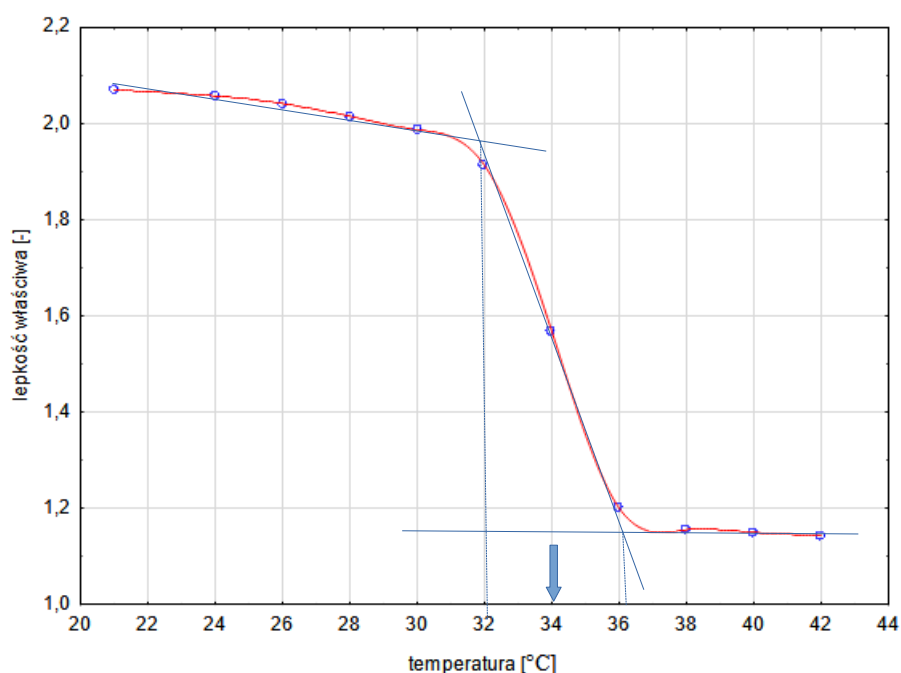
Do oceny lepkości względnej konieczne jest tylko określenie czasów przebiegu czystego rozpuszczalnika t_0 i roztworu próbki t . Zakłada się, że gęstość rozcieńzonego roztworu polimeru ρ równa się gęstości czystego rozpuszczalnika ρ_0 ze względu na bardzo małe stężenie polimeru, gdzie K jest stałą kapilary, która jest specyficznym współczynnikiem zależnym od parametrów kapilary:

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{K \cdot \rho \cdot t}{K \cdot \rho_0 \cdot t_0} = \frac{t}{t_0} \quad (3)$$

Aby dobrze wykorzystać natywny kolagen, należy go poddać obróbce i przechowywać w temperaturze poniżej temperatury denaturacji, aby zachować jego natywną konfigurację. W konsekwencji temperatura denaturacji (T_d) jest ważnym parametrem

kolagenu w jego wykorzystaniu. Pomiary lepkości właściwej są często wykorzystywane do wyznaczenia temperatury denaturacji kolagenu. [79]

W celu wyznaczenia temperatury denaturacji T_d można zastosować zależność lepkości właściwej od temperatury. Temperaturę denaturacji można przyjąć jako punkt środkowy liniowej części (odpowiadającej przemianie fazowej) krzywej sigmoidalnej [80]. T_d to inaczej mówiąc temperatura, odpowiadająca połowie zmianie lepkości podczas procesu denaturacji [81]. Poniższy rysunek przedstawia sposób odczytu tej wartości:



Ryc. 5: Sposób odczytu temperatury denaturacji

Jest to prosta metoda pozwalająca badać konformację m.in. białek. W literaturze można odnaleźć wiele badań na temat wyznaczania temperatury denaturacji metodą wiskozymetryczną np. kolagenu ze skóry żaby ryczącej, ze skór cielęcych czy też skór ryb [79–81].

4.2. Badanie właściwości elektrycznych

Spektroskopia dielektryczna jest szeroko stosowana w ocenie właściwości różnych rodzajów materii. Metoda ta może być także zastosowana w analizie mieszanin, gdyż nawet niewielka ilość dodanego związku może być zobrazowana za pomocą tej

metody. Technika ta polega na analizie konkretnych parametrów elektrycznych układu złożonego z badanej substancji oraz elektrod podczas pobudzania układu zewnętrznym sygnałem zazwyczaj o niewielkiej amplitudzie (do ok. 1 V) oraz różnych częstotliwościach. Często wyniki takiej analizy przedstawiane są w sposób graficzny za pomocą tzw. wykresów Nyquista (zależność części urojonej impedancji od wartości części rzeczywistej impedancji) lub w postaci wykresu Bodego (zależność modułu impedancji bądź przesunięcie kąta fazowego w funkcji częstotliwości. [82].

Przewodność elektryczną właściwą κ można wyznaczyć na podstawie wyznaczonej rezystancji R próbki oraz znajomości parametrów takich jak odległość pomiędzy elektrodami l oraz powierzchnia przekroju poprzecznego elektrody A . Stosunek tych dwóch wielkości jest tzw. stałą naczynia pomiarowego K [83].

$$\kappa = \frac{K}{R} = \frac{l}{R \cdot A} \quad (4)$$

Badania takie stosowane są do oceny procesu denaturacji niektórych białek np. kolagenu albo obserwacji procesów uwalniania wody swobodnej bądź też związanej. Podczas procesu denaturacji dochodzi do zmian strukturalnych, które wpływają na przewodnictwo elektryczne badanych materiałów, dzięki czemu badania temperaturowe przewodnictwa elektrycznego mogą posłużyć do określenia temperatury przemian fazowych, takich jak denaturacja [84,85].

4.3. Badania właściwości mechanicznych

Właściwości mechaniczne są niezwykle istotne podczas poznawania i projektowania nowych materiałów. Posiadanie stosunkowo słabych właściwości mechanicznych jest czynnikiem ograniczającym możliwość zastosowania takiego materiału np. w inżynierii tkankowej. Kontrolowanie i przewidywanie właściwości kompozytów w różnych warunkach ma więc niebagatelne znaczenie [86].

4.3.1. Badania reometryczne

Badania reometryczne służą do oceny charakterystyki badanego materiału, głównie jego cech lepkich oraz sprężystych. Ocena cech lepkich próbki ogranicza się głównie do „wyznaczenia krzywej płynięcia, czyli zależności naprężenia stycznego,

wywołanego ścinaniem płynu, od szybkości ścinania czyli gradientu prędkości w przepływającym płynie”. Niektóre reometry umożliwiają również pomiary oscylacyjne (sinusoidalne zmienne odkształcenie), dzięki którym możemy badać zarówno właściwości lepkie jak i sprężyste badanych próbek. Do oceny cech lepkich badanej cieczy służy tzw. moduł stratności G'' , natomiast do oceny cech sprężystych służy tzw. moduł zachowawczy G' [87]. G' odzwierciedla zatem naprężenia proporcjonalne do odkształcenia, natomiast G'' odzwierciedla naprężenia proporcjonalne do szybkości ścinania [88]. G' można zdefiniować:

$$G' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos \delta \quad (5)$$

„gdzie: σ_0 jest naprężeniem stycznym przy szybkości ścinania dążącej do zera, γ_0 jest szybkością ścinania dążącą do zera, a δ jest kątem przesunięcia fazowego”. Kąt przesunięcia fazowego wynika z różnicy pomiędzy zadaniem naprężeniem i odkształceniem próbki w czasie na to naprężenie, w praktyce jest to przesunięcie krzywych naprężenia i odkształcenia względem siebie w funkcji czasu. Natomiast G'' można zdefiniować:

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \sin \delta \quad (6)$$

Jednym z popularnych testów oscylacyjnych jest tzw. przemiatanie amplitudy, dzięki któremu możemy zbadać stabilność mikrostruktur badanego materiału, podczas zmiennej amplitudy a stałej wartości częstotliwości [89]. Oba moduły łączy zależność [90]:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (7)$$

Dla białek np. kolagenu z uwagi na zmiany w strukturze, na podstawie zależności $\tan \delta$ od temperatury można wyznaczyć temperaturę denaturacji kolagenu. T_d jest temperaturą odpowiadającą maksymalnej wartości $\tan \delta$ [91].

Badania reometryczne znalazły z powodzeniem zastosowanie w badaniu struktury oraz wpływu różnych czynników na budowę biopolimerów takich jak kolagen [90–93].

4.3.2. Teksturometria

Teksturometria jest niezwykle wszechstronną dziedziną pozwalającą na określenie właściwości mechanicznych badanych materiałów. Teksturometry zaopatrzone są zazwyczaj w zestaw przeróżnych przystawek służących do m.in. rozciągania, ściskania bądź ścinania próbek. Poznanie dokładnych właściwości mechanicznych materiałów przydają się szczególnie w ocenie jakości i stabilności badanych produktów [94]. Badania teksturometryczne polegają głównie na makroskopowej ocenie właściwości mechanicznych testowanego materiału [95].

Podczas badania filmów (np. o zastosowaniu medycznym) najistotniejszym pomiarem wydaje się być rozciąganie próbki podczas, którego mierzy się jednocześnie wydłużenie próbki oraz siłę, przy której próbka ulegnie zerwaniu [96,97].

Wydłużenie próbki przy zerwaniu E (z ang. elongation at break) można wyznaczyć znając początkowy wymiar próbki L_0 oraz długość próbki podczas jej zerwania L_B :

$$E \% = \frac{L_B - L_0}{L_0} 100 \% \quad (8)$$

Istotnym parametrem obliczanym na podstawie siły F , przy której próbka ulega zerwaniu jest wytrzymałość na rozciąganie TS (z ang. tensile strength). Jest to stosunek siły F , przy której następuje rozerwanie materiału do powierzchni przekroju poprzecznego tej próbki sprzed pomiaru:

$$TS = \frac{F}{L \cdot W} \quad (9)$$

gdzie L jest średnią grubością badanej folii, a W to szerokość tej próbki [98].

Teksturometria znalazła szerokie zastosowanie w ocenie właściwości filmów polimerowych w przemyśle spożywczym, opakowaniowym, czy też biomedycznym [94,96,99,100].

Badania takie wykonywane są również powszechnie dla błon czy też pianek kolagenowych [97,98,101,102].

4.4. Analiza wielkości cząstek

Istnieje wiele metod służących do oszacowania rozmiarów cząstek np. techniki mikroskopowe, dyfrakcja laserowa, analiza sedymentacyjna czy analiza sitowa. Wymiary badanych cząstek można opisać za pomocą metod, które są odpowiednie dla rozpatrywanego zakresu wielkości [103]. Rozmiar cząstek często określa istotne cechy materiału takie jak jakość, biodostępność czy wytrzymałość [104].

W sytuacji nieregularnych kształtów jakie występują w budowie niektórych cząstek i tak stosuje się modele zakładające, że dana cząstka zbliżona jest kształtem do kuli. Należy zaznaczyć, że to uogólnienie doprowadza do sytuacji, kiedy pod wyznaczoną średnicę kuli, czyli tak naprawdę średnicą badanych cząstek przyjmujemy wartość średnią z różnych kształtów i ich ustawienia. Biorąc pod uwagę np. cząstkę o kształcie walca, średnica będzie wartością średnią rzutów walca pod różnymi kątami (pomiar długości może odbyć się od boku, pod kątem lub od góry dając różne wartości). Model ten stosuje się w laserowych metodach analizy wielkości cząstek [105]

Często spotykanymi modelami średnic są tak zwane średnice równoważne długości, powierzchni oraz objętości [106]. W modelu długości brana jest pod uwagę jest średnia arytmetyczna, natomiast w modelu objętościowym średnica D jest równa:

$$D = \sqrt[3]{\frac{\sum d^3}{n}} \quad (10)$$

gdzie d są zmierzonymi średnicami, a n to ilość zmierzonych cząstek.

Porównując rozkład długości i objętości można łatwo zauważyć, że większy udział objętości mają większe cząstki zatem porównując te dwie metody średnica uzyskana w modelu objętościowym dla tych samych cząstek będzie wyższa niż w modelu długości. Łatwo można zobrazować to prostym przykładem pomiaru 3 cząstek o długości (1,2 i 3) μm . W pierwszym modelu otrzymamy średnią średnicę o wartości 2 μm , natomiast w modelu objętościowym uzyskamy wynik równy 2,29 μm . [105].

Wyniki uzyskane za pomocą mikroskopów konstruuja swój początkowy wynik jako rozkład długości. Aparaty stosujące dyfrakcję laserową konstruuja swój wynik w postaci rozkładu objętości. Rozkłady objętości są często też domyślnym wyborem dla większości metod stosujących rozpraszanie światła [103].

Należy więc zwrócić uwagę, że tak naprawdę każda z metod jest prawidłowa pomimo różnic w wynikach pomiędzy tymi metodami, dlatego aby móc miarodajnie przyrównywać ze sobą różne wyniki należy zastosować tę samą metodę. W praktyce oznacza to, że nie istnieją standardowe wielkości danych cząstek o nieregularnych kształtach, a wiele zależy od zastosowanych założeń [105].

Dyfrakcja laserowa jest jedną z metod pomiaru wielkości cząstek, gdzie pomiary możemy dokonywać na „mokro” oraz na „sucho”. Oznacza to, że badaną próbkę możemy rozpraszać w cieczy lub w gazie. W metodzie tej wiązki światła lasera padają na cząsteczki i ulegają rozproszeniu pod różnymi kątami, a następnie są rejestrowane przed odpowiednie detektory. Większe cząstki załamują światło pod mniejszym kątem niż mniejsze cząstki. Dane te zbierane są i przetwarzane przez analizator wielkości cząstek, a następnie na podstawie wyżej omówionych modeli matematycznych obliczane są rozkłady rozmiarów cząstek w danej analizie. Gdy mamy do czynienia z próbką w postaci proszku zazwyczaj słusznym wyborem jest pomiar na „sucho”. Jednak gdy zależy nam na zbadaniu aglomeracyjności próbki lub innego czynnika, wpływającego na rozmiar cząstek warto zastosować metodę na „mokro”. Odpowiednia dyspersja próbki następuje przez odpowiedni dobór parametrów takich jak prędkość mieszadła, pompy transportującej próbkę przez układ pomiarowy oraz ewentualnie zastosowanie ultradźwięków. Wyboru odpowiednich parametrów ustala się doświadczalnie podczas analizy komputerowej obrazu [107].

Metoda ta znajduje zastosowanie w naukach medycznych m.in. w inżynierii tkankowej do oceny materiałów kompozytowych, również tych na bazie kolagenu [108,109].

Inną metodą służącą do badań mikrostruktury cząstek jest skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM). Metoda ta opiera się na działaniu mikroskopu elektronowego, w którym wykorzystywana jest wiązka elektronów. W SEM wiązka elektronów skupiona w niewielką plamkę, która skanuje badany obszar powierzchni próbki. Pod wpływem działania wiązki elektronów na próbkę emitowane są różnego rodzaju sygnały, które rejestrowane są dzięki odpowiednim detektorom, a w dalszym kroku przetwarzane są na obraz badanego materiału [110]. Metoda ta również znalazła zastosowanie w naukach biomedycznych m.in. w badaniu hydrożeli na bazie kolagenu, kompozytu na bazie żelatyny czy hydrolizatów kolagenowych [111–113].

II. CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie wpływu tlenku grafenu na konformacje makrocząsteczki kolagenu rybiego w postaci roztworu oraz w postaci stałej za pomocą:

- badań reologicznych,
- wiskozymetrycznych,
- analizy wielkości cząstek poprzez zastosowanie analizatora wielkości cząstek,
- spektroskopii dielektrycznej.

Dodatkowym celem była analiza wytrzymałościowa błon kolagenowych za pomocą teksturometru, która umożliwiła ocenę wytrzymałości materiału w postaci stałej.

III. MATERIAŁ I METODY

1. Materiały

Kolagen rybi

Nazwa produktu: Collagen New Generation

Producent: Regionalne Centrum Zdrowia Sp. z o.o.

Skład badanego żelu kolagenowego:

woda (91,1 – 96,1) %

kolagen (3,2 – 5,5) %

kwask mlekowy (0,5 – 2,4) %

melanina i Rokonsal ND (konserwant) <0.3 %

Badany żel kolagenowy został pozyskany metodą kwaśnej hydratacji ze skór tołpygi białej.

Tlenek grafenu

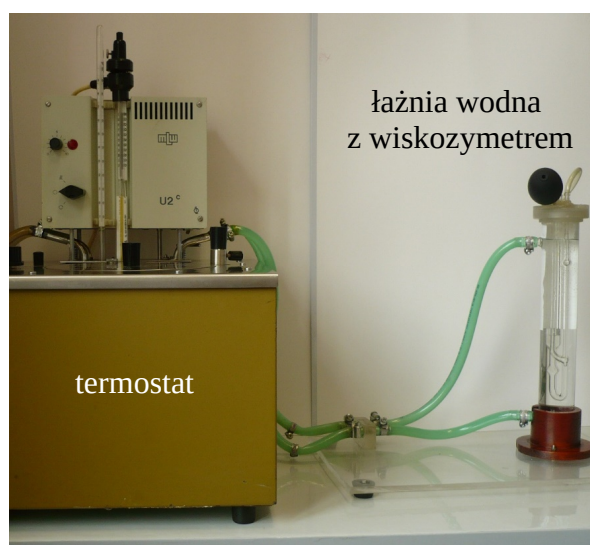
Tlenek grafenu został pozyskany w Zakładzie Technologii Uzdatniania Wody Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu metodą Hummersa [114].

Wytworzono mieszaniny 33% żelu kolagenowego (czyli ok. 1% kolagenu) z 0,01%; 0,02% i 0,05% tlenkiem grafenu. Proporcje te wykorzystywane były zarówno do pomiarów reologicznych, analizy wielkości cząstek jak i do wytwarzania filmów kolagenowych testowanych za pomocą spektroskopii dielektrycznej oraz teksturometru. Przeprowadzono również analizę ok. 0,1% kolagenu z 0,01% GO za pomocą metody wiskozymetrycznej. Tak duże rozcieńczenie było niezbędne do przeprowadzenia badań za pomocą tej metody.

2. Metody badawcze

2.1. Metoda wiskozymetryczna

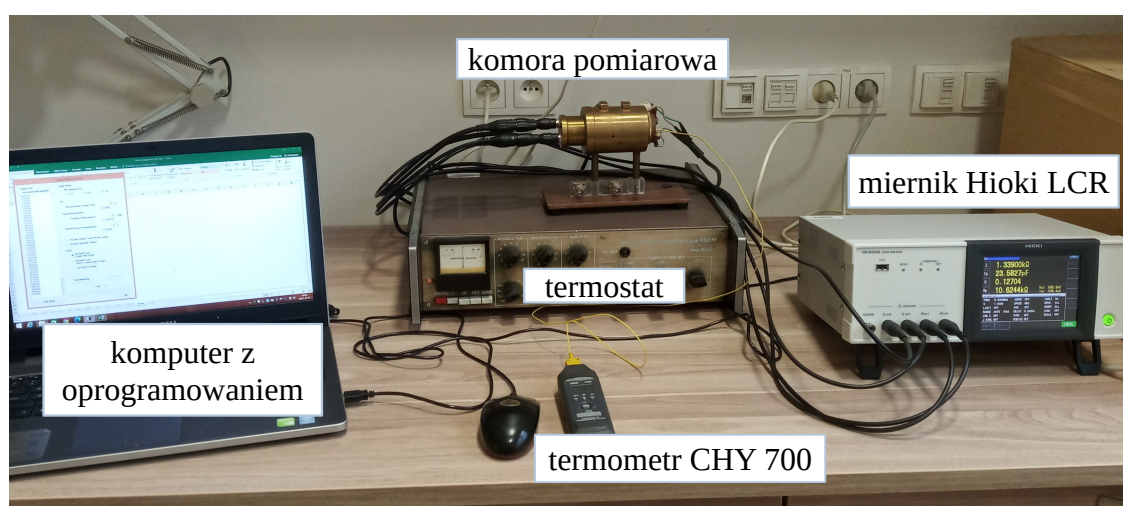
Do badań wykorzystano wiskozymetr Ubbelohde'a, z którego pomocą wyznaczono zależność lepkości względnej od temperatury. Metoda ta jest procedurą uzupełniającą do badań reometrycznych. Jest to prosta metoda oceny struktury związków chemicznych, czuła na zmianę konformacji biopolimerów. Żel kolagenowy rozpuszczono w wodzie destylowanej, w stosunku wagowym 1:39 (uzyskując ok. 0,1% roztwór kolagenu) w temperaturze pokojowej w celu uzyskania stężenia możliwego do zbadania na wiskozymetrze kapilarnym. Podobnie przygotowano badany roztwór o składzie: ok 0,1% kolagenu i 0,01% GO. Tak przygotowaną próbkę umieszczono w termostatowanym wiskozymetrze kapilarnym z dokładnością pomiaru do $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Temperaturę w układzie pomiarowym dodatkowo kontrolowano za pomocą termometru elektronicznego CHY 700. Pomiary wykonano w zakresie od 20°C do 60°C . Po osiągnięciu danej temperatury przez próbkę wygrzewano ją przez 10 min. lub dłużej, do otrzymania stabilnego czasu przepływu cieczy przez wiskozymetr, po czym wykonano pomiar lepkości (co najmniej 10 prób). Pomiar przeprowadzony w sposób płynny tzn. tą samą próbkę mierzono w różnych temperaturach, od najniższej do najwyższej. Układ pomiarowy przedstawiono na poniższej rycinie:



Ryc. 6: Układ pomiarowy do badań wiskozymetrycznych

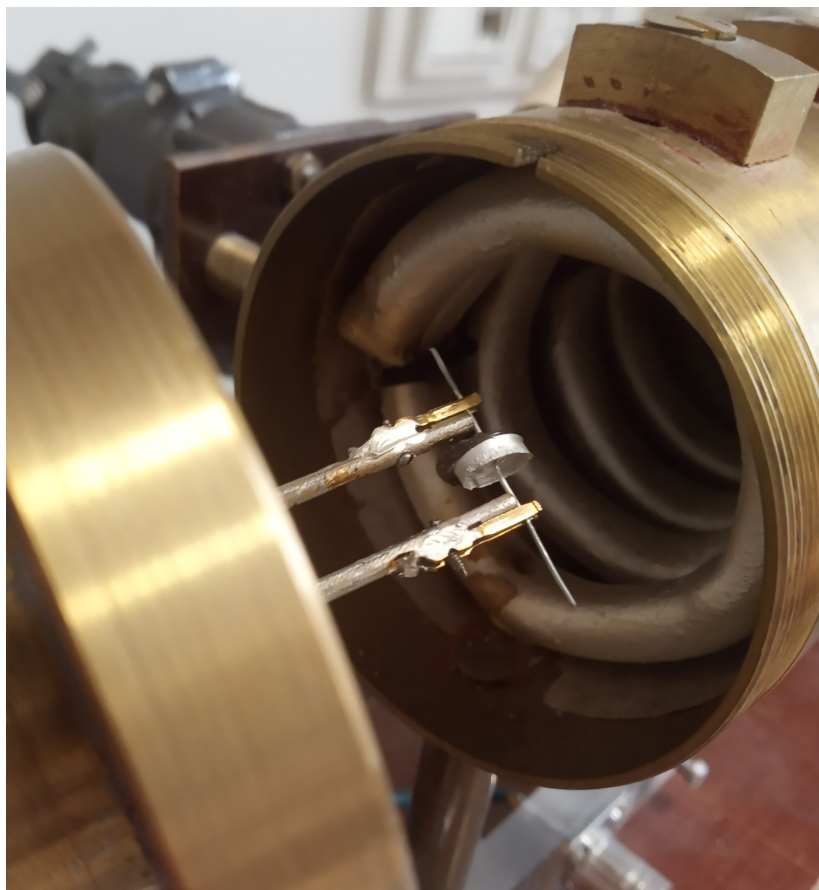
2.2. Badania parametrów elektrycznych filmów kolagenowych

33% roztwór żelu kolagenowego (czyli ok. 1% roztwór kolagenu) oraz mieszaninę 33% roztwór żelu kolagenowego i odpowiednio 0,01%, 0,02% i 0,05% GO wylano na szalki Petriego i pozostawiono w temperaturze pokojowej równej około 23°C do całkowitego wyschnięcia. Po odparowaniu wody otrzymano folię, z której wycięto krążki o średnicy 10 mm. Grubość krążków mierzono sondą ultradźwiękową Ultrametr A400 firmy Metrison. Po obu stronach wyciętego krążka z folii kolagenowej nałożono srebrne elektrody i przymocowano za pomocą past srebrowej Leitsilber 200N Hans Wolbring. Zmierzono powierzchnię czynną badanego układu. Przygotowaną próbkę umieszczono w termostatycznej komorze pomiarowej. Testy właściwości elektrycznych próbki przeprowadzono przy użyciu mostka Hioki LCR IM3536 w zakresie temperaturowym od ok. 20°C do 160°C za pomocą prądu przemiennego o napięciu równym ok. 1V. Układ pomiarowy składający się z miernika Hioki, ultratermostatu unipan 650H, komory pomiarowej wraz z termometrem do ciągłego monitorowania temperatury w celce pomiarowej oraz komputera z odpowiednim oprogramowaniem zgrywającym wyniki uzyskane z miernika bezpośrednio do komputera przedstawiono na poniższym zdjęciu:



Ryc. 7: Układ pomiarowy do spektroskopii dielektrycznej

Rycina 8 przedstawia natomiast przykładową próbkę umieszczaną w celce pomiarowej:



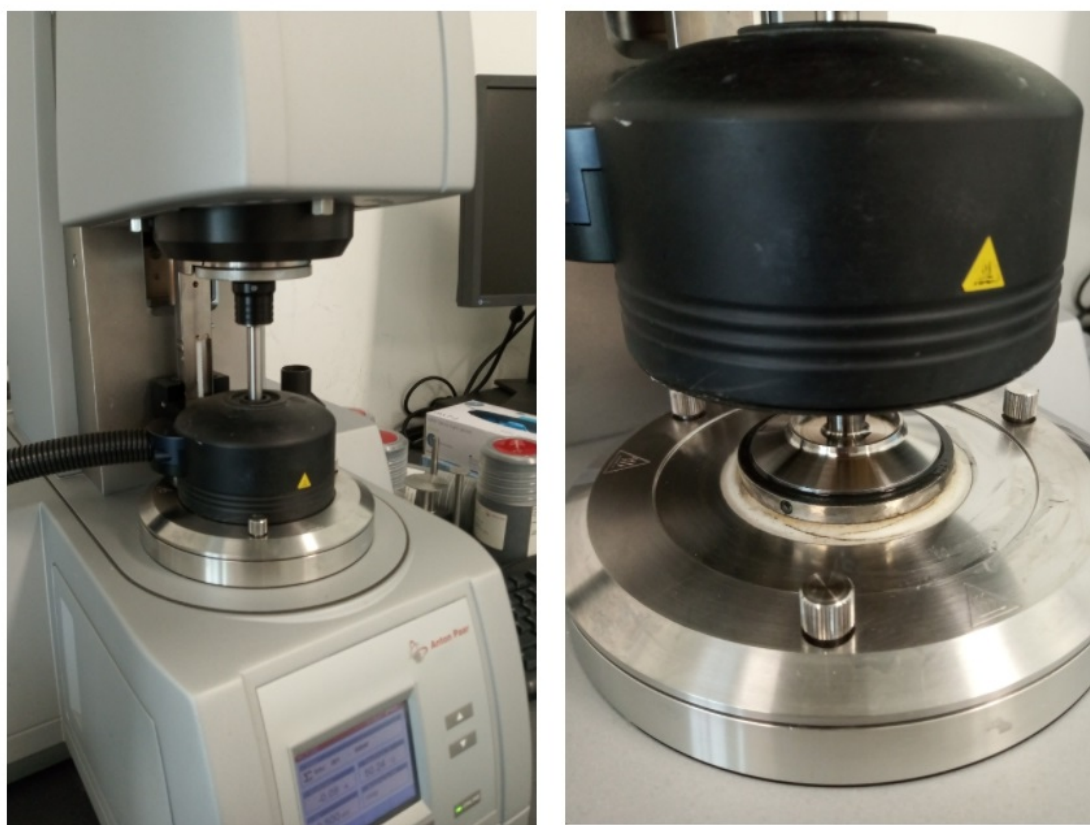
Ryc. 8: Celka pomiarowa wraz z próbką do badań spektroskopii dielektrycznej

2.3. Badanie właściwości mechanicznych

Badania właściwości mechanicznych obejmują badania reologiczne wykonane na próbkach w formie roztworu oraz obejmują teksturometryczne pomiary wytrzymałościowe błon kolagenowych w postaci stałych. 33% roztwór żelu kolagenowego (czyli ok. 1% roztwór kolagenu) oraz mieszaninę 33% roztwór żelu kolagenowego i odpowiednio 0,01%, 0,02% i 0,05% GO wykorzystano bezpośrednio do badań reometrycznych oraz do wytworzenia filmów rozciąganych za pomocą teksturometru.

2.3.1. Reometria

Do badań reometrycznych wykorzystano Modular Compact Rheometer MCR302 w układzie płytka-płytki PP50 firmy Anton Paar. Szczelina pomiarowa wynosiła 0,5 mm. Z jego pomocą zbadano zależność modułu zachowawczego próbek (G') oraz modułu stratności (G'') od naprężenia przy ścinaniu w celu doboru odpowiedniego odkształcenia przy pomiarach oscylacyjnych. Częstotliwość kątowna zastosowana w pomiarach wynosiła 10s^{-1} . G' i G'' zbadano względem temperatury (przy odkształceniu 3%). Zbadano również zależność naprężenia ścinającego i lepkości od szybkości ścinania, a następnie przy wybranej prędkości ścinania (5s^{-1}) zmierzono zależność lepkości od temperatury. Pomiary wykonano w zakresie od 20 – 90 °C. Poniższa rycina obrazuje stanowisko pomiarowe:

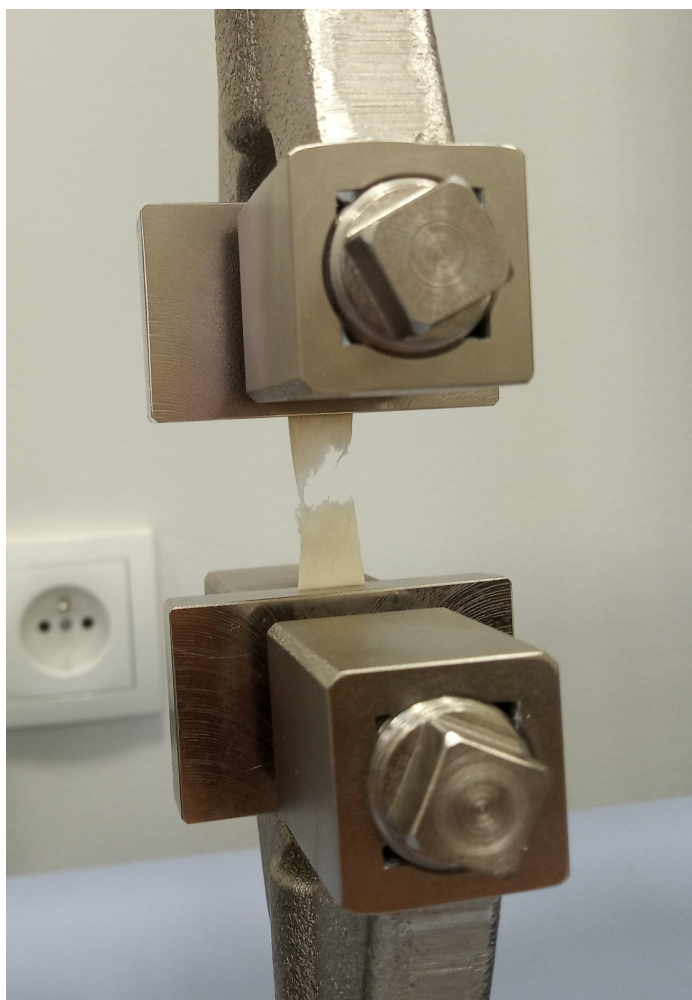


Ryc. 9: Reometr. Zbliżenie na wybrany układ pomiarowy płytka-płytki

Badania reometryczne zostały wykonane dzięki uprzejmości Anton Paar.

2.3.1. Badania teksturometryczne

W badaniach wykorzystano teksturometr AGS-X firmy Shimadzu zaopatrzonego w uchwyt do rozciągania z czujnikiem siły w zakresie (2-1000) N. Rozciągano filmy kolagenowe o wymiarach 5 cm x 1 cm przy rozstawie łap rozciągających wynoszącym 3 cm. Próbkę rozciągano z szybkością 2 mm/min. Próbkę z pęcherzykami powietrza bądź ze znaczną zmianą grubości były odrzucane. Pomiary wykonane były w temperaturze pokojowej, a więc w temperaturze przechowywania takiego materiału. Poniższe zdjęcie ilustruje układ do pomiaru wytrzymałości próbek:



Ryc. 10: Przykładowe badanie wytrzymałości próbki na rozciąganie

Badania teksturometryczne wykonano we współpracy z Katedrą i Zakładem Technologii Postaci Leku UMP.

2.4. Analiza wielkości cząstek oraz badania mikrostrukturalne

2.4.1. PSA 1190 Anton Paar

Pomiary analizy wielkości cząstek przeprowadzonych za pomocą analizatora PSA 1190 Anton Paar powtarzano co najmniej raz i uzyskiwano zgodność wyników. Wszystkie omawiane pomiary wykonano przy maksymalnych obrotach mieszadła oraz szybkim tempie pompy odpowiadającej za przemieszczanie się próbki przez układ pomiarowy. Za pomocą analizatora cząstek oszacowano wielkość cząstek kolagenu natywnego jak i zdenaturowanego, wielkość cząstek występujących w mieszaninie kolagenu i GO oraz wielkość cząsteczek samego tlenku grafenu. Analizie poddano 33% roztwór żelu kolagenowego (czyli ok. 1% roztwór kolagenu) oraz mieszaninę 33% roztwór żelu kolagenowego oraz 0,01%, 0,02% i 0,05% GO.

Badania analizy wielkości cząstek zostały wykonane dzięki uprzejmości Anton Paar.

2.4.2. Skaningowy mikroskop elektronowy (SEM) JEOL JSM-6380LA

Za pomocą mikroskopu SEM dokonano analizy morfologii powierzchni nanocząstek tlenku grafenu. Zastosowano powiększenia: 10 000, 25 000 oraz 50 000. Zdjęcia wykonano przy napięciu przyspieszenia równym 15 kV. Pomiary zostały wykonane przez Uczelniane Centrum Aparaturowe UMP.

2.5. Pomiar grubości błon kolagenowych

Z pomocą grubościomierza Metrison A400 dokonano pomiaru grubości błon kolagenowych wykorzystywanych w spektroskopii dielektrycznej oraz filmów rozciąganych błon na teksturometrze.



Ryc. 11: Grubościomierz

2.6. Metoda termograwimetryczna

Za pomocą wagosuszarki Mettler Toledo HB43-S określono suchą masę kolagenu w żelu kolagenowym. Hydrożel suszono w 110°C . Temperaturę tę dobrano na podstawie wcześniejszych badań odnoszących się do uwalniania wody swobodnej [115]. Przeprowadzony pomiar utraty wody swobodnej żelu kolagenowego wyjściowego trwało kilka godzin do utrzymania stałej wartości masy.



Ryc. 12: Wagosuszarka

2.7. Statystyka

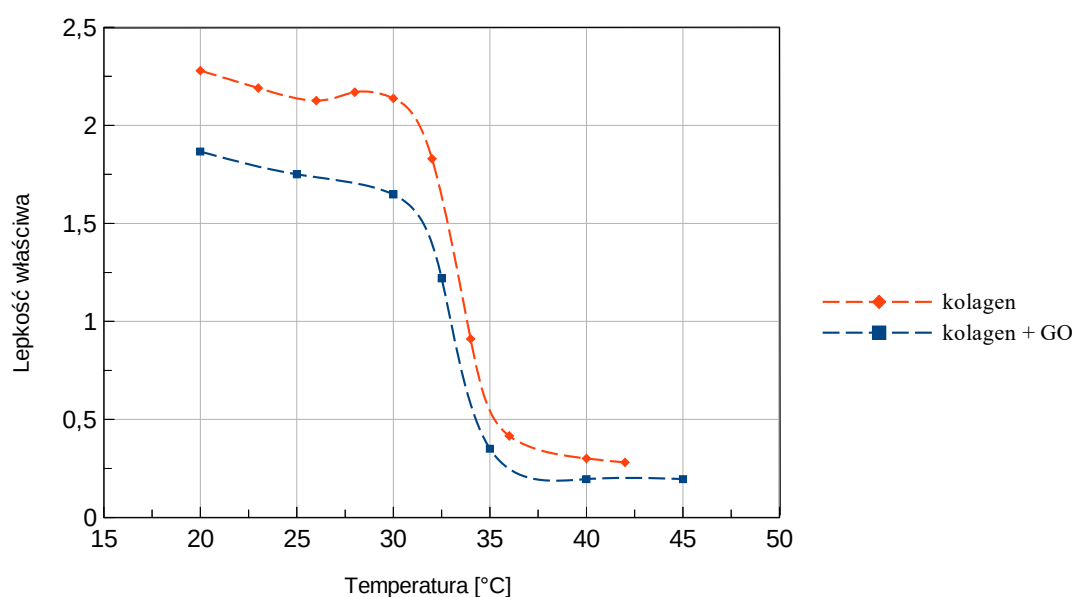
Wszelkie opracowania statystyczne uzyskano za pomocą programu Statistica 13.3. Analiza statystyczna została wykonana dla badań teksturometrycznych przez specyfikę swoich pomiarów. Badania te polegają zwykle na przebadaniu większej ilości próbek. W przedstawionej pracy dla każdego z rodzaju folii wykonano minimum 30 powtórzeń. Pierwszym etapem podczas przeprowadzania analizy statystycznej było sprawdzenie czy próbki można uznać za pochodzące z rozkładu normalnego i do tego celu zastosowana test Shapiro-Wilka. Takiej analizie poddano siłę, przy której nastąpiło

zerwanie próbki, parametr wytrzymałości materiału na zerwanie TS oraz wydłużenie względne próbek podczas ich zerwania. W każdym z parametrów znalazł się chociaż jeden rozkład, którego nie można było uznać za pochodzącego z rozkładu normalnego o wartości prawdopodobieństwa $p < 0,05$. W takiej sytuacji przeprowadzono test nieparametryczny dla porównań wielu grup niezależnych jest to tzw. ANOVA Kruskala-Wallisa. Jeśli okazało się, że różnice w danym parametrze dla różnych rodzajów błon kolagenowych (czystych lub domieszkowanych 0,01%, 0,02%, 0,05% GO) są istotne, zastosowano wielokrotne porównanie średnich rang dla wszystkich prób z poprawką Bonferroniego w celu wyznaczenia, między którymi grupami znajdują się te różnice.

IV. WYNIKI BADAŃ

1. Metoda wiskozymetryczna

Za pomocą metody wiskozymetrycznej wykreślono zależność lepkości właściwej od temperatur dla czystego roztworu kolagenowego (ok.0,1%) oraz roztworu mieszaniny ok. 0,1% kolagenu oraz 0,01% GO. Poniższy wykres przedstawia badaną zależność. Każda wartość jest średnią z 10 pomiarów.



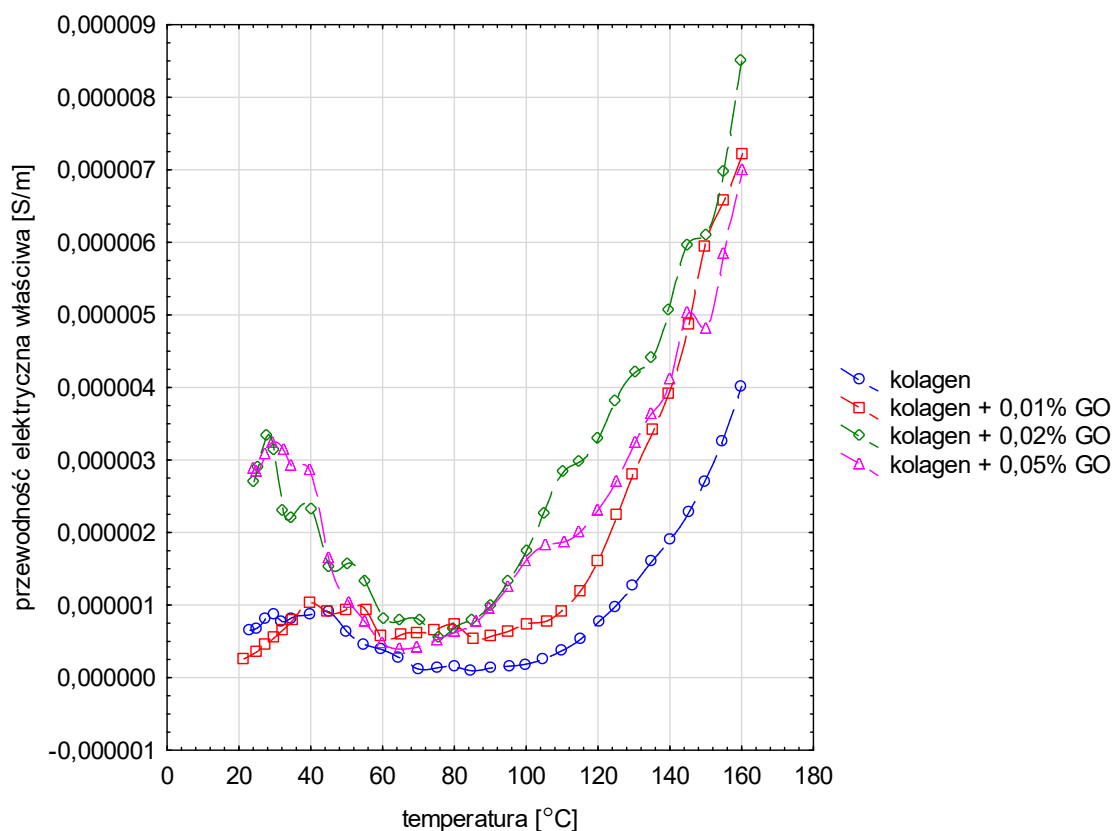
Ryc. 13: Zależność lepkości właściwej od temperatury

Na podstawie metody wiskozymetrycznej wyznaczono temperaturę denaturacji wynoszącą ok. 33,5 °C zarówno dla czystego roztworu kolagenu jak i dla kolagenu domieszkowanego tlenkiem grafenu. Nie zauważono istotnego wpływu dodatku GO do roztworu kolagenu na jego strukturę.

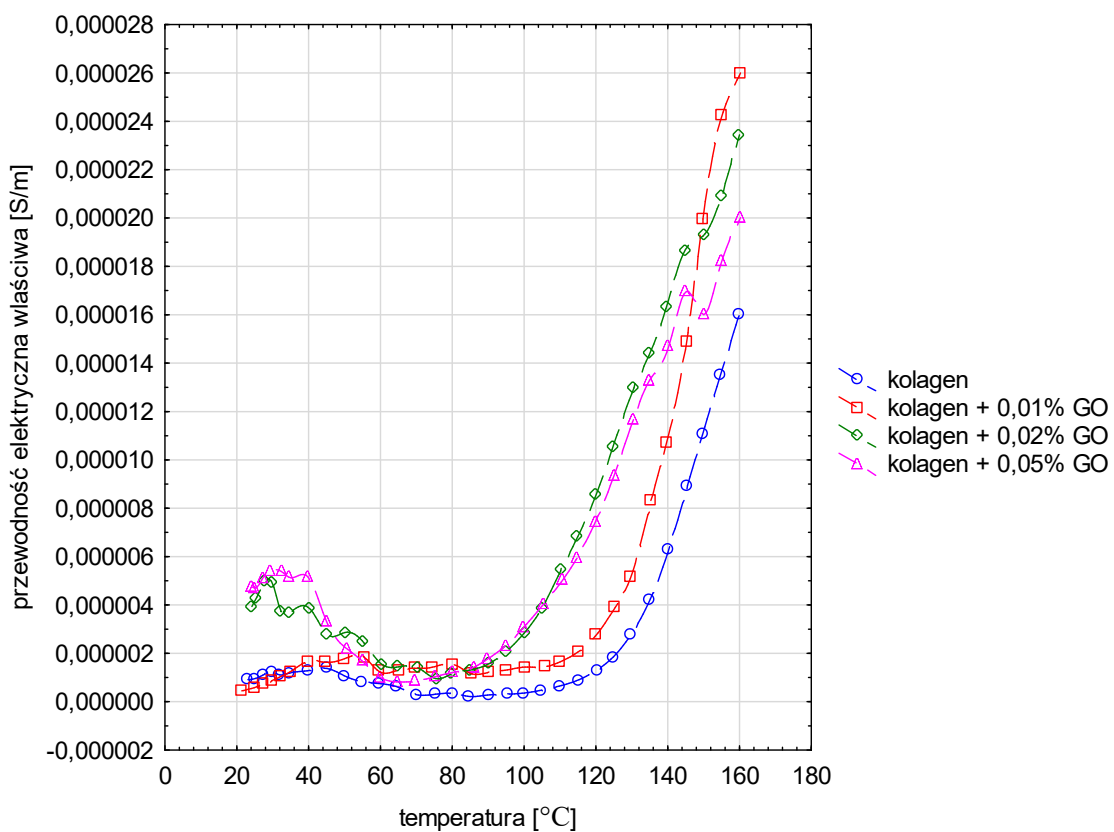
2. Badania parametrów elektrycznych filmów kolagenowych

Przeprowadzono pomiary oporu elektrycznego, modułu zawady oraz tangensa strat dielektrycznych. Wyniki są wartością średnią z 3 pomiarów. Z bezpośrednich badań oporu elektrycznego oraz geometrii układu na podstawie równania 4 wyznaczono

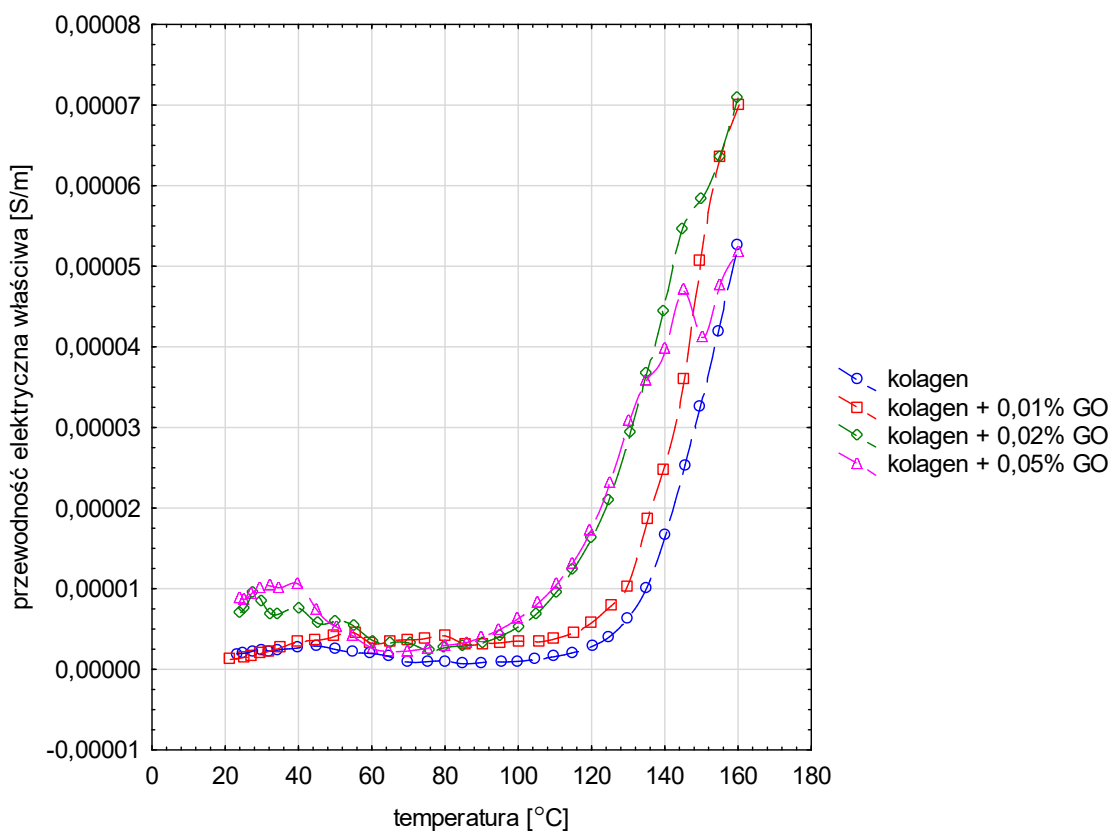
wartości przewodności elektrycznej właściwej badanych próbek. Sporządzono zależność tego parametru od temperatury dla różnych częstotliwości zarówno dla folii z czystego kolagenu jak i tych domieszkowanych tlenkiem grafenu, które przedstawiono na poniższych wykresach.



Ryc. 14: Zależność przewodności elektrycznej właściwej od temperatury przy częstotliwości 100 Hz



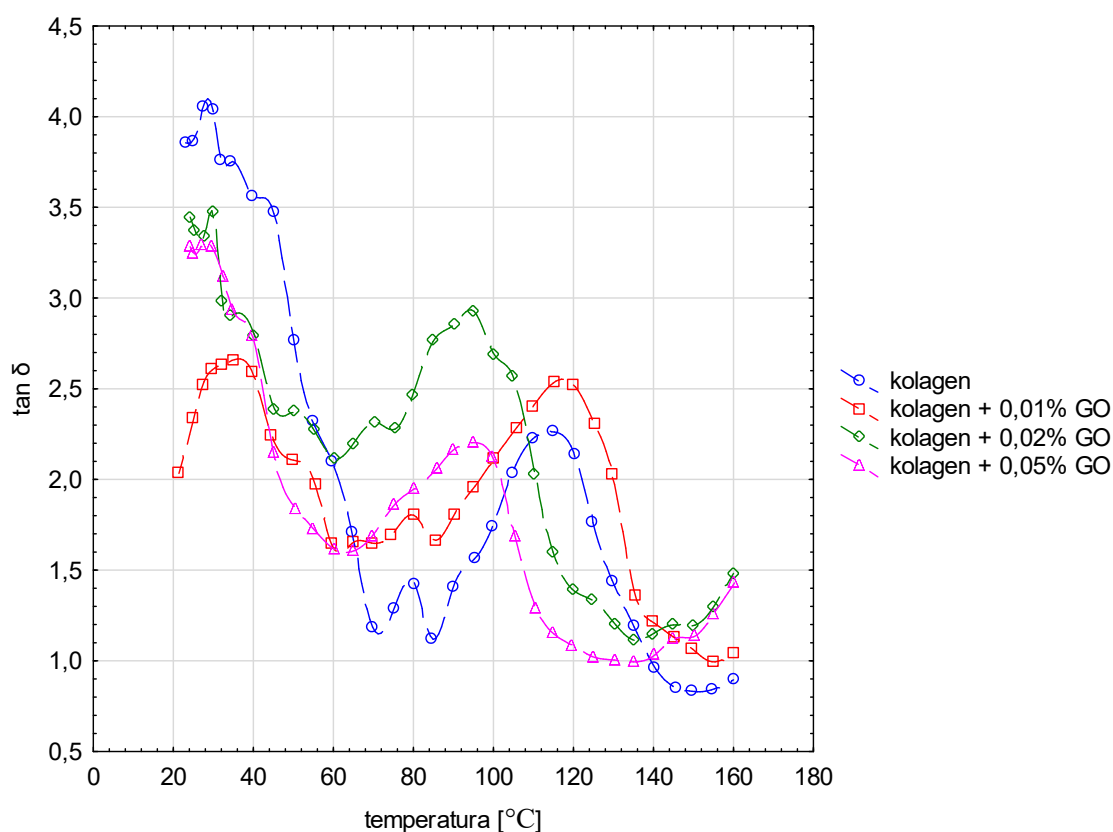
Ryc. 15: Zależność przewodności elektrycznej właściwej od temperatury przy częstotliwości 1 kHz



Ryc. 16: Zależność przewodności elektrycznej właściwej od temperatury przy częstotliwości 10 kHz

Na podstawie powyższych wykresów można zauważyć większą przewodność właściwą dla materiałów zawierających GO w porównaniu do folii z czystego kolagenu. Natomiast sam charakter zmian jest podobny dla przedstawionych częstotliwości. Największe zmiany można zaobserwować w obszarze od 30°C do 60 °C (zakres ten charakteryzuje spadek przewodności) oraz powyżej 100°C/120°C (widoczny jest szybki wzrost przewodności właściwej). Można zaobserwować, że drugi zakres temperatur dla filmów kolagenowych z 0,02% i 0,05% dodatkiem GO przesunięty jest o ok. 20°C w stronę temperatur niższych.

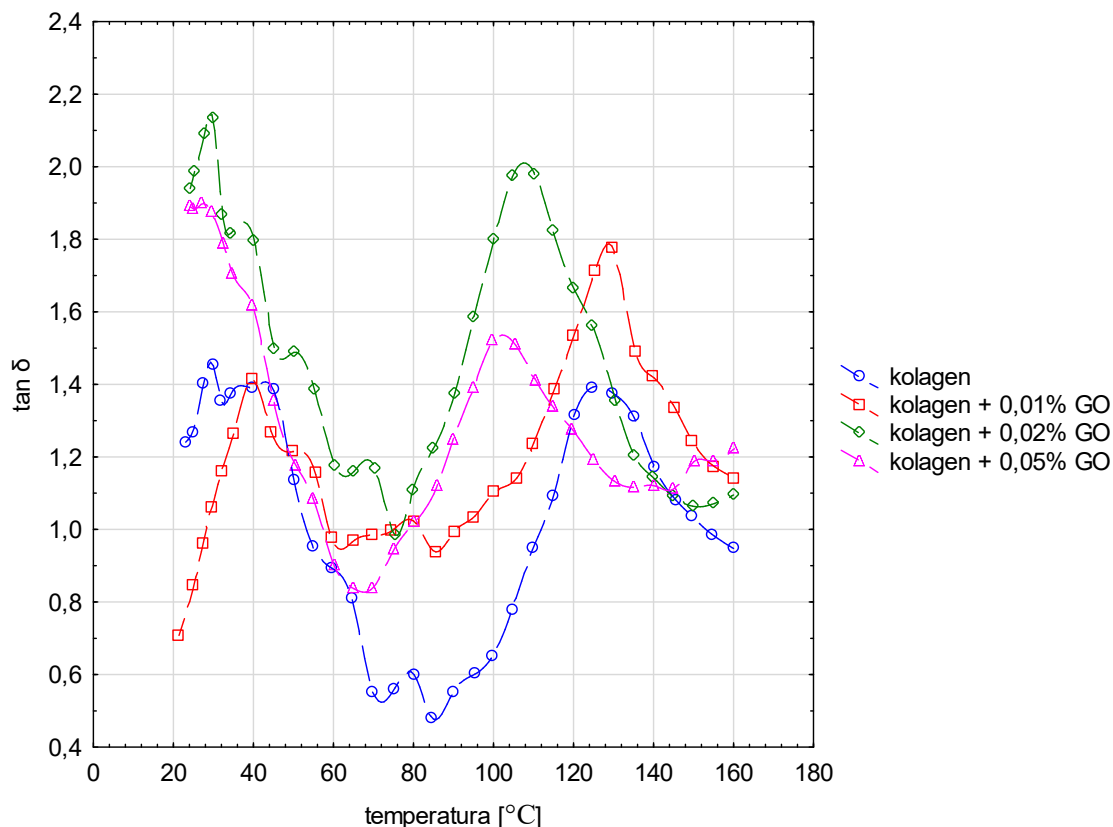
Przeprowadzono również pomiar tangensa strat dielektrycznych $\tan \delta$ od temperatury dla wybranych wcześniej częstotliwości.



Ryc. 17: Zależność współczynnika strat dielektrycznych od temperatury dla 100 Hz

Na podstawie zależności współczynnika strat dielektrycznych od temperatury dla 100 Hz można zaobserwować kilka maksimów. Pierwsze znajdują się w obrębie (30-35)°C dla wszystkich próbek, natomiast drugie niewielkie maksimum jest obserwowane w okolicy 80 °C dla próbki z samym kolagenem jak i próbki z najmniejszym stężeniem

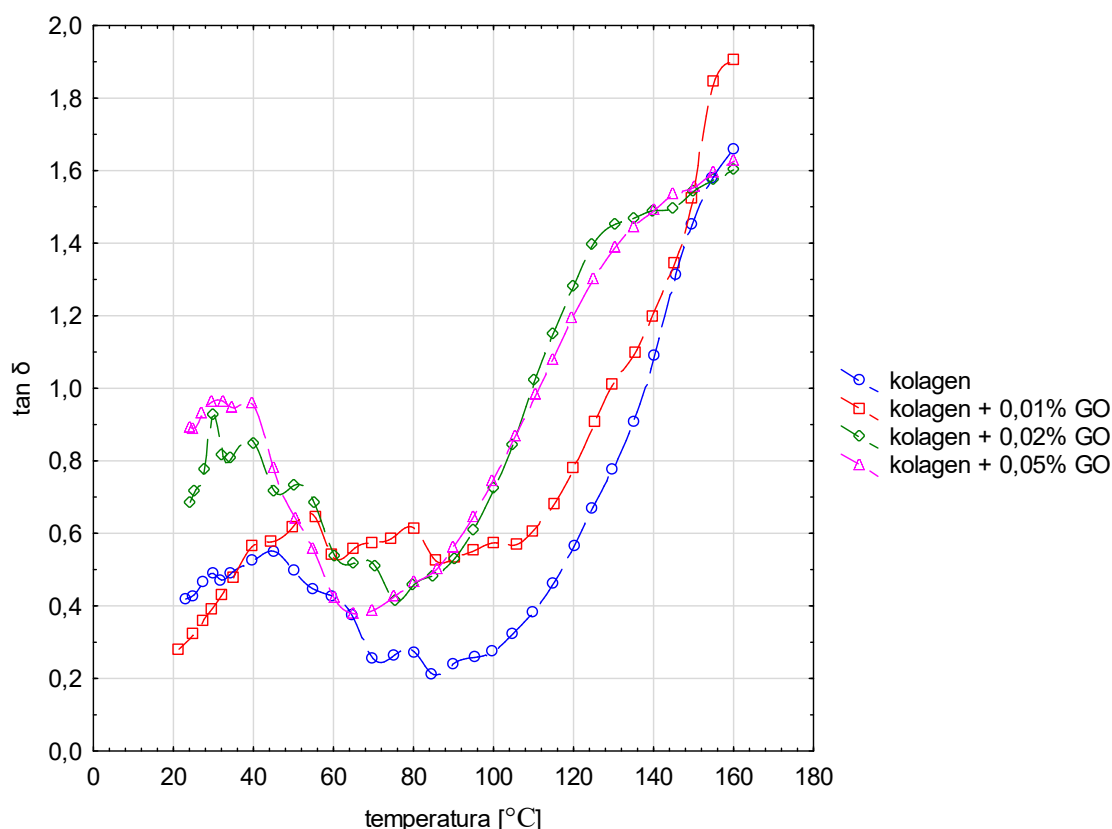
GO (0,01% GO). Kolejne maksimum przy ok. 95 °C widoczne jest dla próbek kolagenowych z 0,02% oraz 0,05% GO. Natomiast maksimum to dla czystej próbki kolagenowej oraz próbki ze 0,01% stężeniem GO waha się w okolicy (115-120)°C.



Ryc. 18: Zależność współczynnika strat dielektrycznych od temperatury dla 1 kHz

Na podstawie pomiarów tangensa strat dielektrycznych przy częstotliwości 1kHz można również zauważyć pierwsze maksimum w okolicy (30-35)°C dla większości próbek. Podobnie jak dla 100 Hz drugie niewielkie maksimum jest obserwowane w okolicy 80 °C dla próbki z samym kolagenem jak i próbki z 0,01% GO. Natomiast można zaobserwować przesunięcie ostatnich maksimów w stronę wyższych temperatur tj. przy przedziale (105-100) °C widoczne jest dla próbek kolagenowych z 0,02% oraz 0,05% GO, a dla czystej próbki kolagenowej oraz próbki ze 0,01% stężeniem GO waha się w okolicy (125-130)°C.

Dla próbek przy częstotliwości 10 kHz pierwsze maksimum przy 30°C jest albo w ogóle niewidoczne, lub w jaki przypadku próbki z czystym kolagenem oraz domieszkowanym 0,02% GO jest nieznacznie widoczne. Jak w przypadku powyższych analizowanych częstotliwości przy 10 kHz również można zaobserwować maksimum przy 80 °C dla próbki z samym kolagenem jak i próbki z 0,01% GO, natomiast w przedziale (90-130)°C maksima nie występują. Wartości współczynnika strat dielektrycznych wykazują zatem istotne różnice zależne od dobranej częstotliwości pomiarowej oraz są zależne od temperatury.



Ryc. 19: Zależność współczynnika strat dielektrycznych od temperatury dla 10 kHz

Wyznaczono składową rzeczywistą ϵ' oraz urojoną ϵ'' zespolonej przenikalności elektrycznej. Składową rzeczywistą obliczono na podstawie wzoru 11 [116].

$$\epsilon' = \sin(\varphi) / (2\pi f C_0 |Z|) \quad (11)$$

gdzie f to częstotliwość, $|Z|$ to moduł impedancji, a C_0 oznacza pojemność układu bez próbki, wyznaczony na podstawie parametrów geometrycznych układu oraz przenikalności elektrycznej próżni ϵ_0 [117] :

$$C_0 = \varepsilon_0 \frac{A}{h} \quad (12)$$

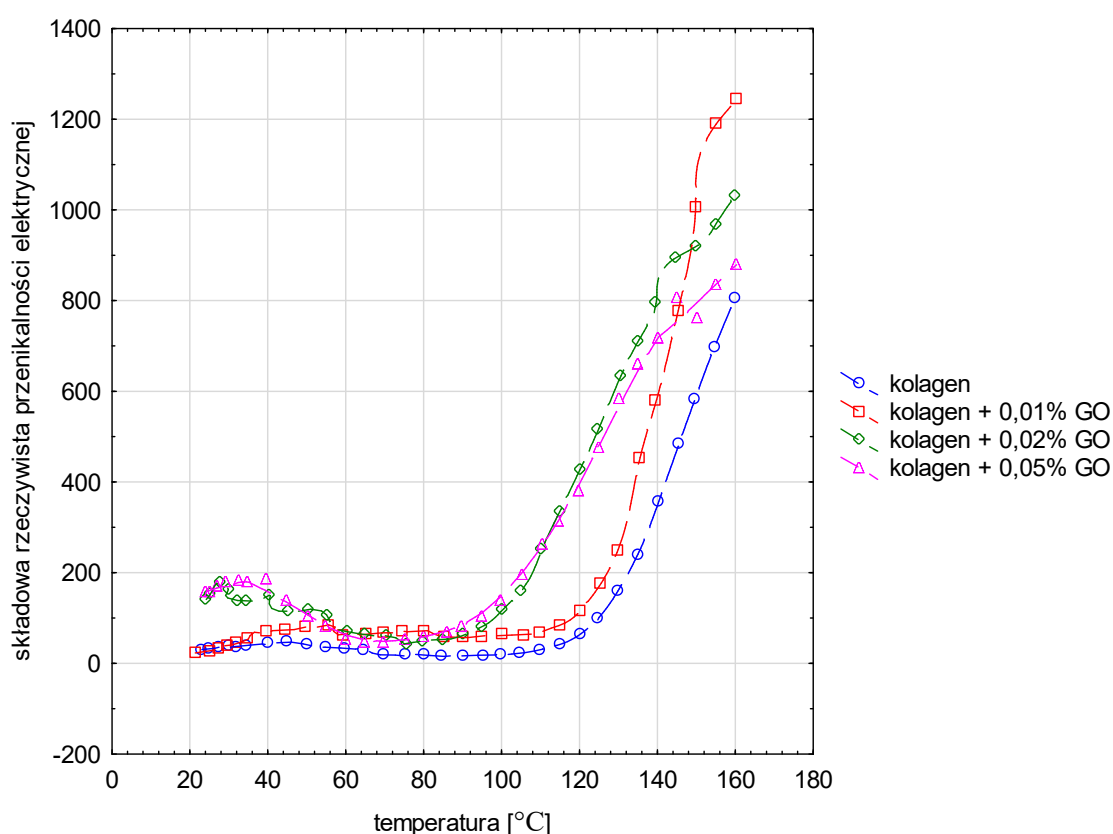
gdzie A – jest powierzchnią czynną elektrody, a h to odległość pomiędzy elektrodami. Natomiast kąt przesunięcia fazowego φ i współczynnika strat dielektrycznych łączy zależność na podstawie, której wyznaczono kąt φ [116]:

$$\tan \delta = 1 / \tan \varphi \quad (12)$$

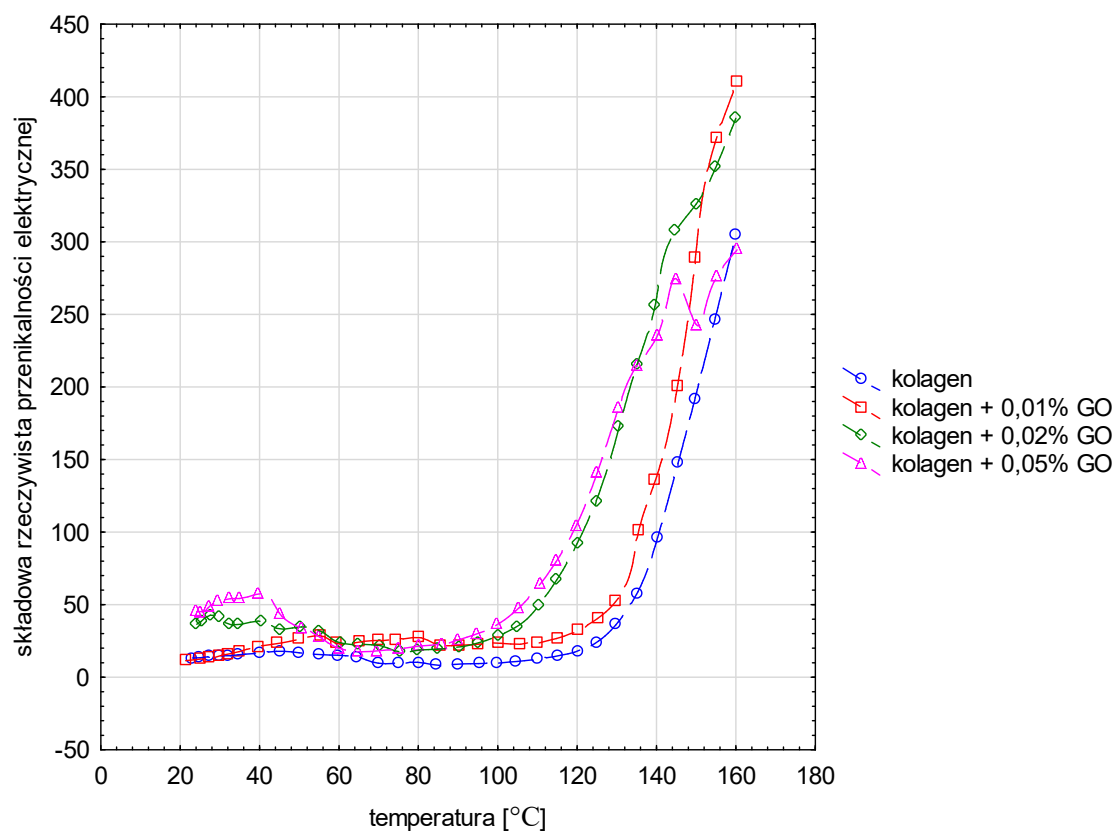
Składową urojoną przenikalności elektrycznej wyznaczono na podstawie równania 13 [116].

$$\varepsilon'' = \varepsilon' (\tan \delta - \sigma / 2 \pi f \varepsilon_0 \varepsilon') \quad (13)$$

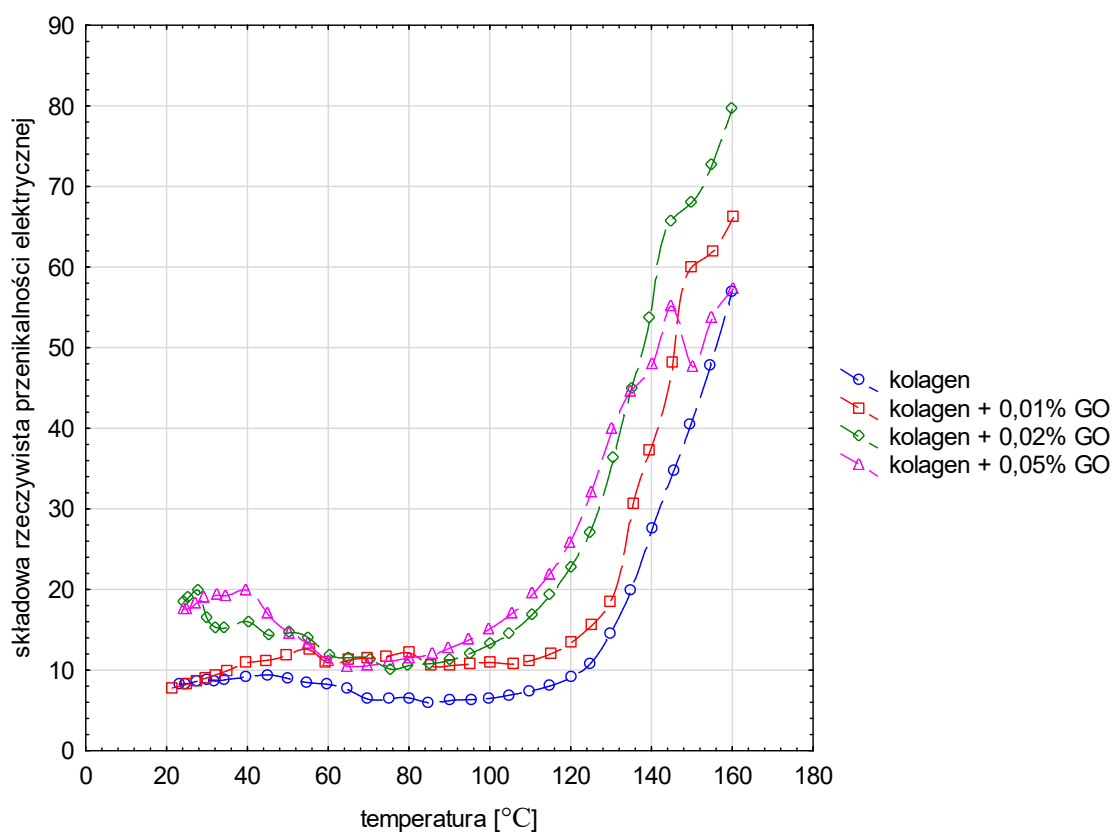
Na poniższych rycinach przedstawiono zależność składowej rzeczywistej przenikalności elektrycznej od temperatury dla wybranych częstotliwości.



Ryc. 20: Zależność rzeczywistej składowej przenikalności elektrycznej od temperatury dla 100 Hz



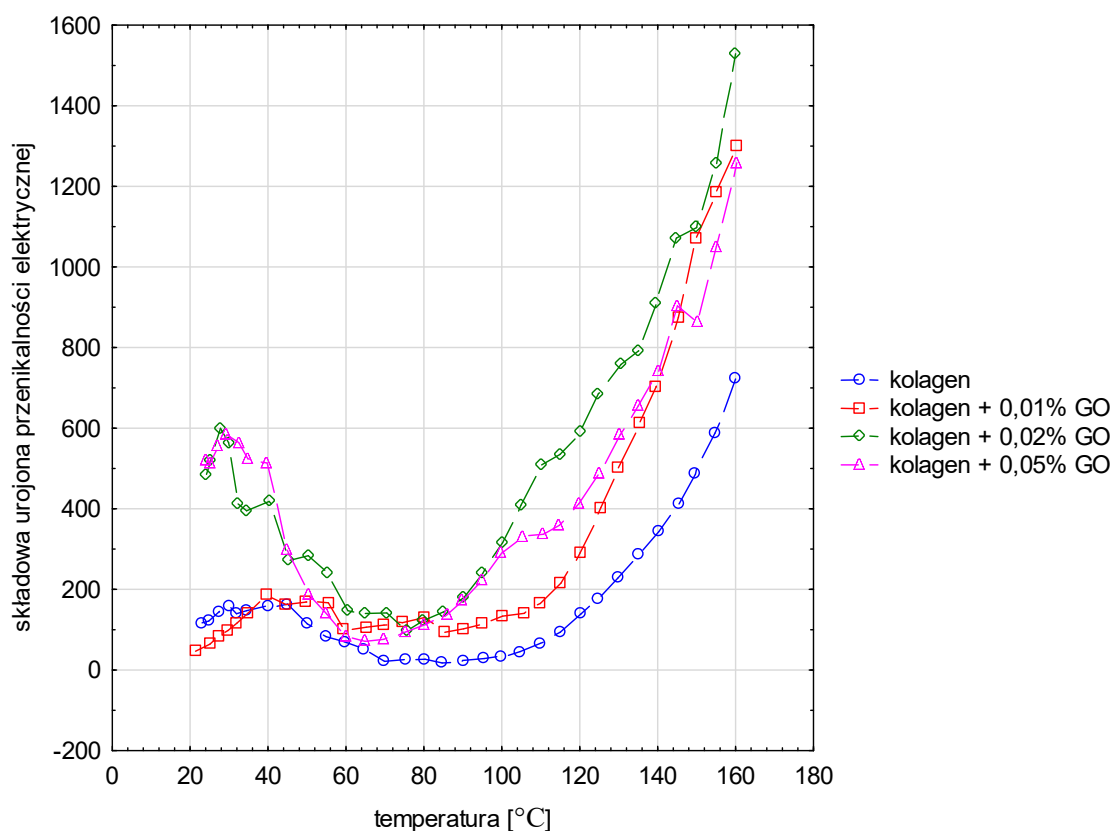
Ryc. 21: Zależność składowej rzeczywistej przenikalności elektrycznej od temperatury dla 1 kHz



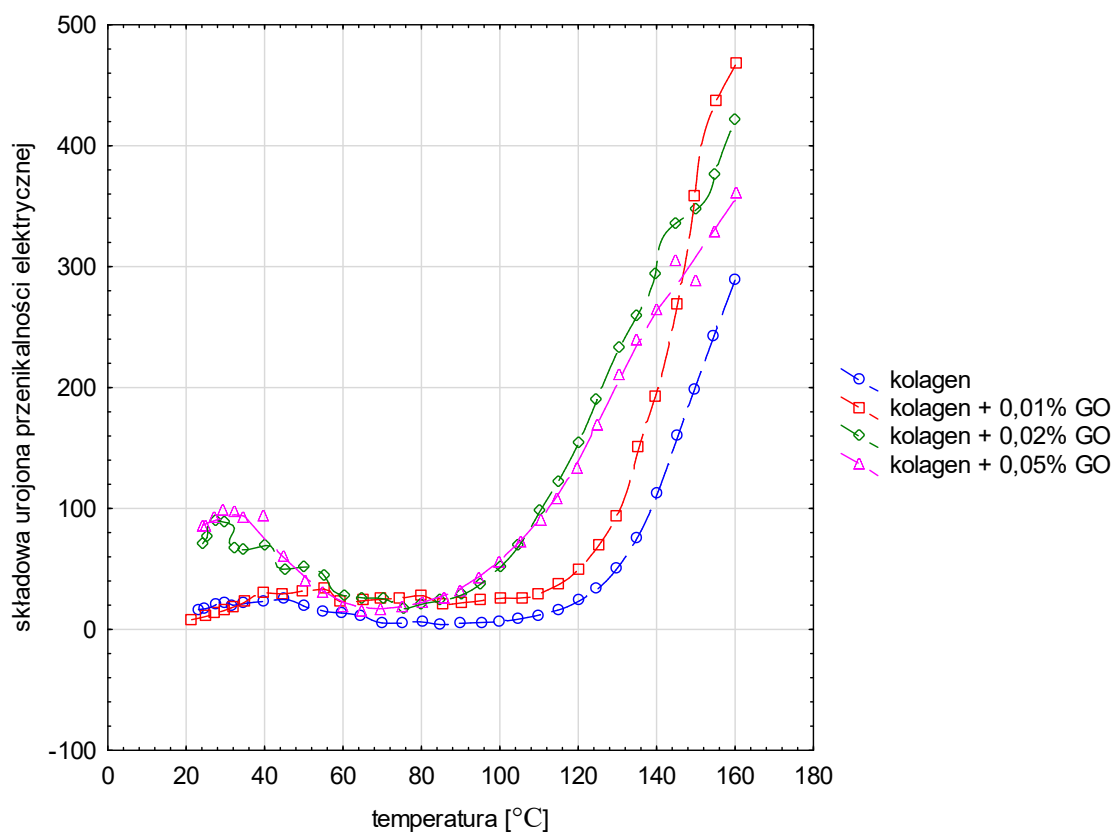
Ryc. 22: Zależność składowej rzeczywistej przenikalności elektrycznej od temperatury dla 10 kHz

Analizując zależności składowej rzeczywistej przenikalności elektrycznej od temperatury można zaobserwować, że niezależnie od częstotliwości oraz dodatku GO w filmach zależności te mają podobny charakter. Można zaobserwować niewielkie zmiany w niskich temperaturach oraz nagły wzrost wartości powyżej 125°C dla folii kolagenowej oraz z 0,01% dodatkiem GO, natomiast wzrost ten dla folii z 0,02% i 0,05% GO jest już widoczny powyżej 110°C.

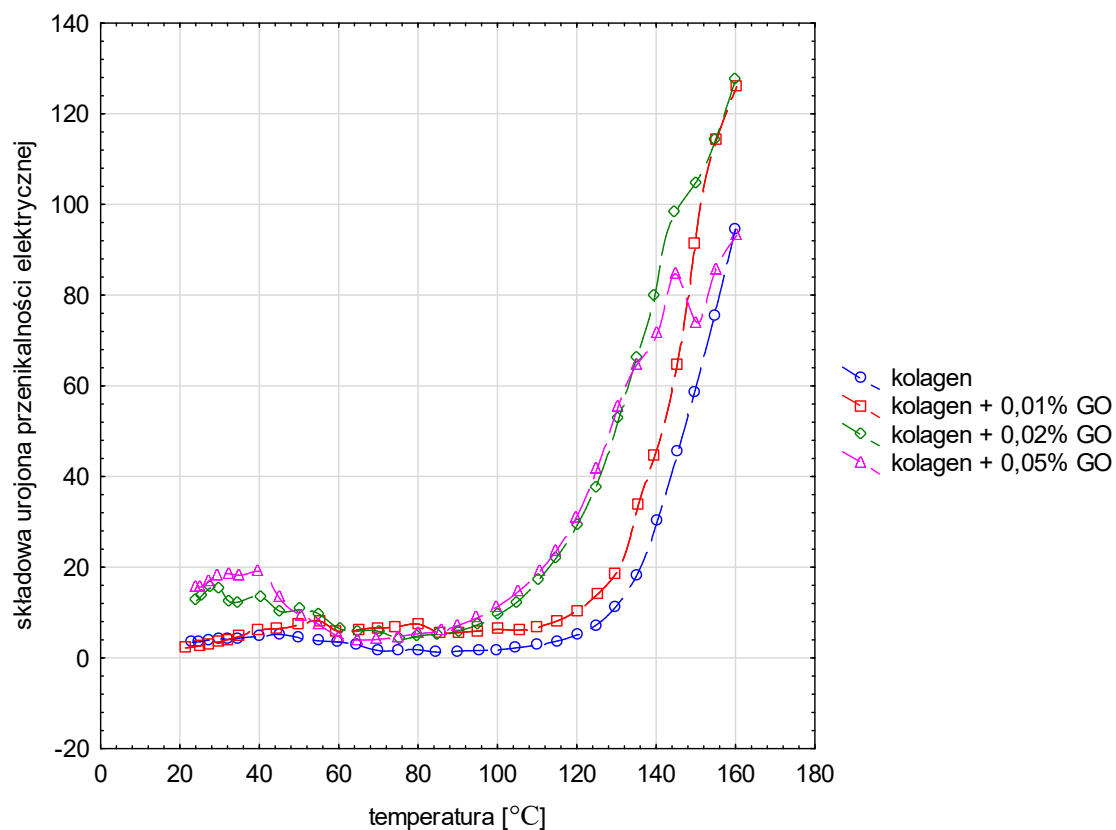
Na poniższych rycinach przedstawiono zależność składowej urojonej przenikalności elektrycznej od temperatury dla wybranych częstotliwości.



Ryc. 23: Zależność składowej urojonej przenikalności elektrycznej od temperatury dla 100 Hz



Ryc. 24: Składowa urojona przenikalności elektrycznej od temperatury dla 1 kHz



Ryc. 25: Składowa urojona przenikalności elektrycznej od temperatury dla 10 kHz

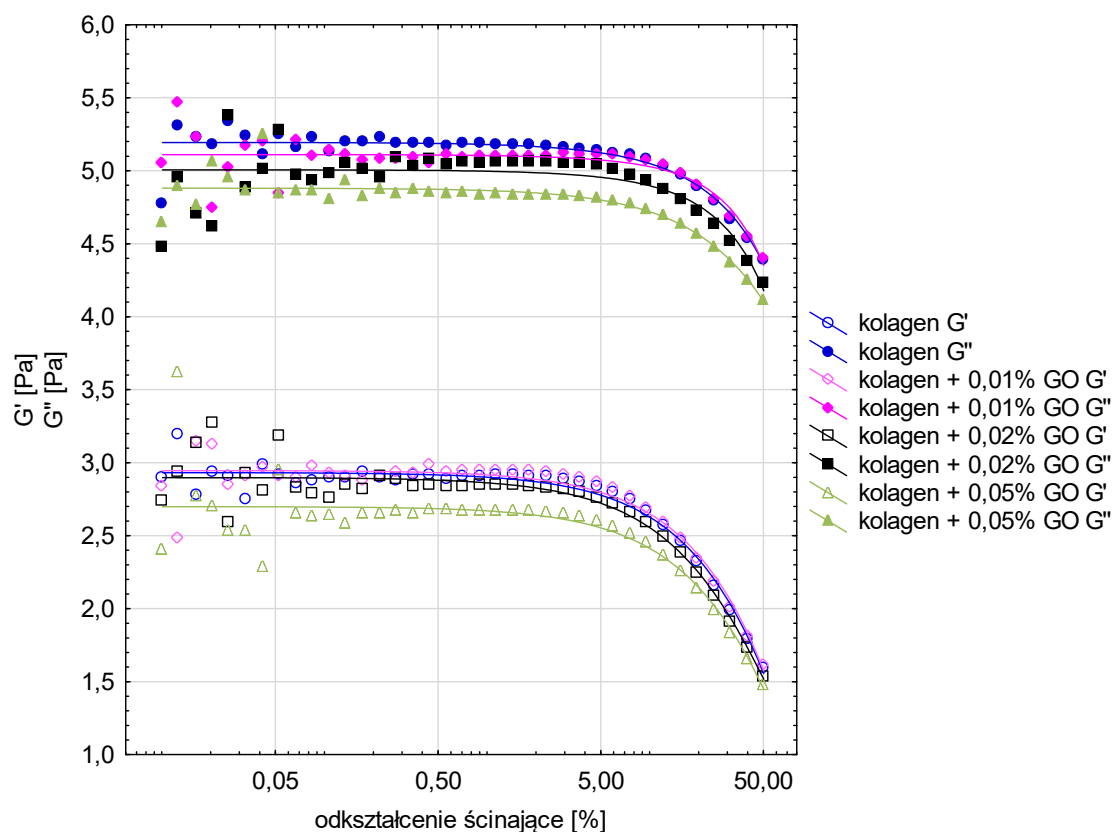
Analizując zależności składowej urojonej przenikalności elektrycznej od temperatury można zaobserwować, że niezależnie od częstotliwości oraz dodatku GO w filmach zależności te również mają dość zbliżony charakter. W zakresie temperaturowym (20-50)°C można zaobserwować większe wartości ϵ'' dla próbek z większym dodatkiem GO (0,02% oraz 0,05%) niż wartości dla czystego filmu kolagenowego lub z najmniejszym 0,01% dodatkiem GO. Można również zaobserwować nagły wzrost wartości powyżej 120°C dla folii kolagenowej bez i z dodatkiem 0,01% tlenku grafenu i już powyżej 100°C dla folii z 0,02% i 0,05% dodatkiem GO. Pomimo zbliżonych charakterów zależności składowej rzeczywistej i urojonej dla różnych częstotliwości, wzrost częstotliwości powoduje spadek wartości przenikalności elektrycznej. Tangens kąta strat dielektrycznych i części składowe zespolonej przenikalności elektrycznej łączy poniższa zależność [117] .

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad (14)$$

Biorąc powyższe pod uwagę, pomimo że różnice pomiędzy ϵ' i ϵ'' w charakterze zależności na pierwszy rzut oka wydają się niewielkie, dobrze obrazuje je zależność współczynnika strat dielektrycznych od temperatury.

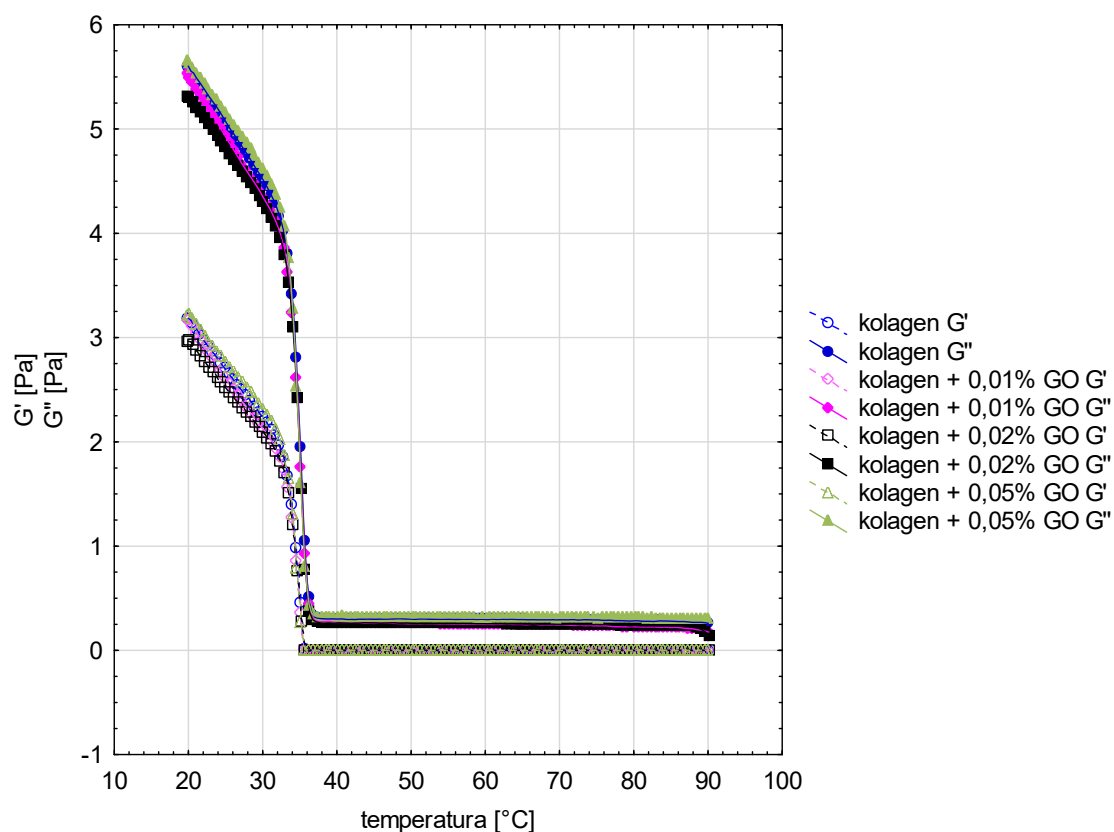
3. Badania reometryczne

Przeprowadzono pomiary oscylacyjne próbek kolagenowych oraz próbek kolagenu domieszkowanych tlenkiem grafenu w zmiennych proporcjach. Stężenie kolagenu w próbkach wynosiło ok. 1%. Wykonano co najmniej jedno powtórzenie każdego pomiaru. Zaobserwowano, że uzyskane wyniki są do siebie bardzo zbliżone, wręcz są powielane, co świadczy również o dokładności przyrządu pomiarowego. Zbadano zależność modułu zachowawczego oraz stratności od odkształcenia ścinającego.



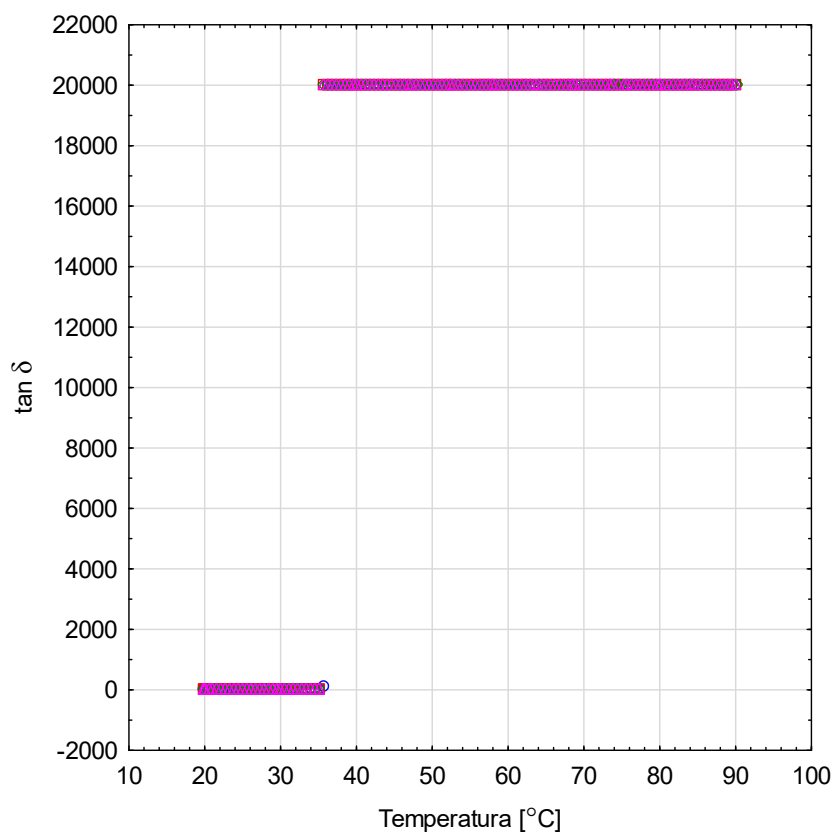
Ryc. 26: Zależność G' i G'' od odkształcenia ścinającego

Na podstawie powyższego wykresu można stwierdzić iż nie ma istotnych różnic w powyższych zależnościach dla próbek z czystym kolagenem jak i domieszkowanym tlenkiem grafenu w zmiennych proporcjach. Do dalszej analizy wybrano 3 % odkształcenie – jest to maksymalne odkształcenie, dla którego zależność G' i G'' od odkształcenia ścinającego jest jeszcze stała.



Ryc. 27: Zależność G' i G'' od temperatury przy 3% odkształceniu

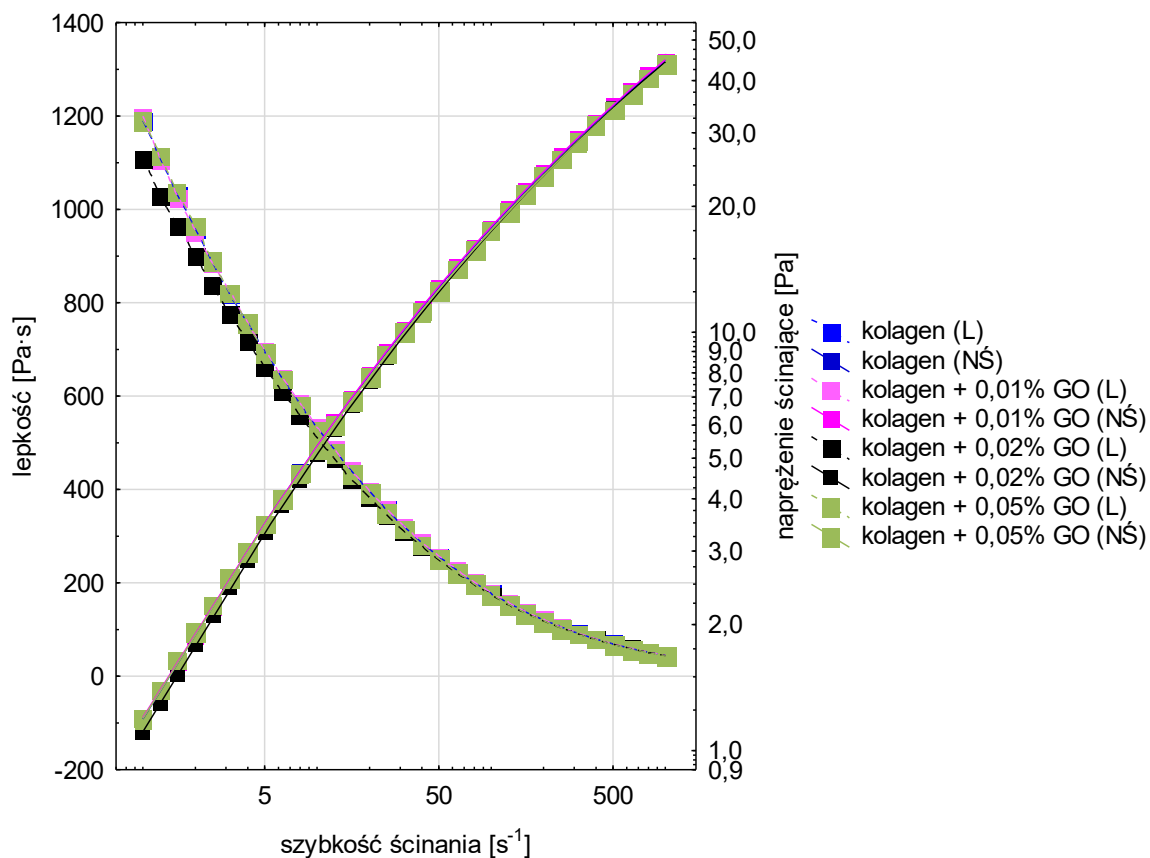
Na podstawie powyższego wykresu można stwierdzić iż nie ma istotnych różnic w powyższych zależnościach dla próbek z czystym kolagenem jak i domieszkowanym tlenkiem grafenu w zmiennych proporcjach. Nagła zmiana G' i G'' w okolicy (34-36) $^{\circ}\text{C}$ jest spowodowana denaturacją próbki. Korzystając z metody przedstawionej na ryc. 5 można uznać, że temperatura denaturacji dla wszystkich próbek wynosi ok. 35 $^{\circ}\text{C}$. Sporządzono również zależność $\tan \delta$ od temperatury, na podstawie której można również odczytać temperaturę denaturacji badanej próbki.



Ryc. 28: Zależność $\tan \delta$ od temperatury

Na podstawie powyższej zależności również można zauważyć, że GO nie wpływa na wartość $\tan \delta$ próbki, a co za tym idzie na konformację kolagenu. Za temperaturę denaturacji przyjęto miejsce „skoku” i wyniosła ona ok. 36°C zarówno dla czystego kolagenu jak i próbek domieszkowanym GO, gdyż w tej specyficznej zależności okazał się problem z wyznaczeniem konkretnego maksimum.

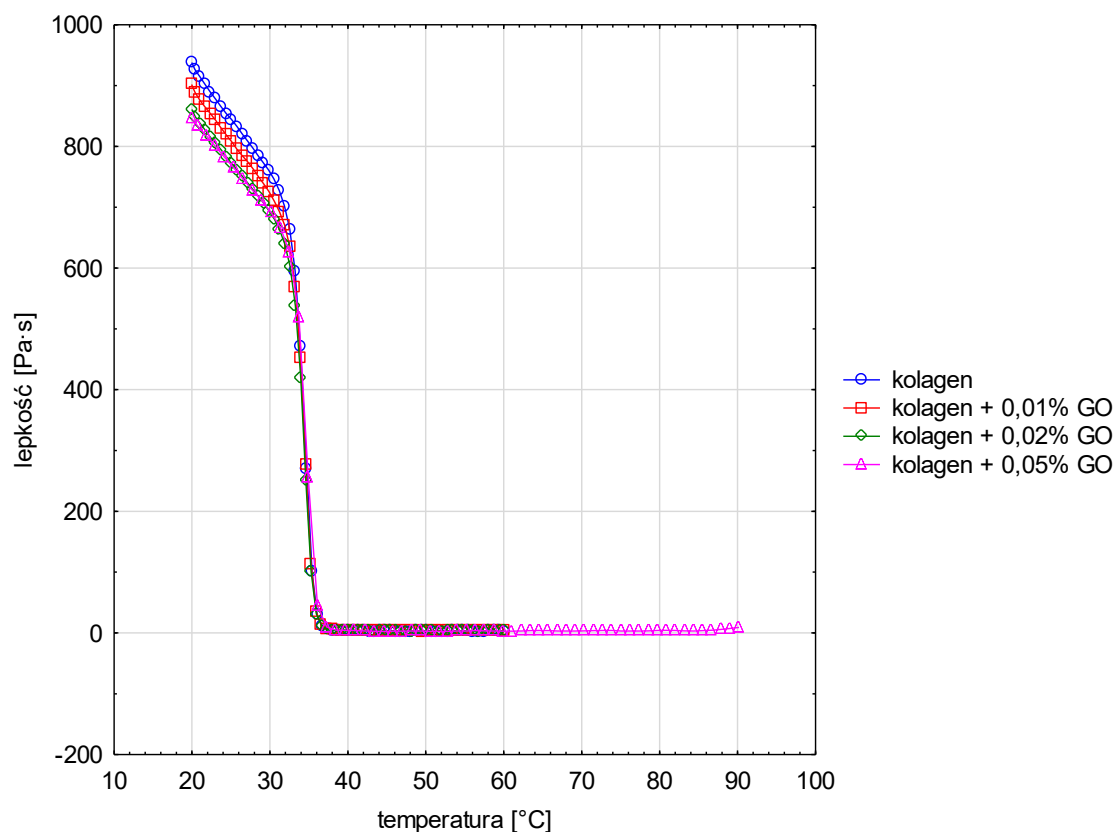
Dodatkowo przeprowadzono pomiary rotacyjne próbek kolagenowych oraz próbek kolagenu domieszkowanych tlenkiem grafenu w zmiennych proporcjach. Sporządzono zależność lepkości oraz naprężenia ścinającego od szybkości ścinania.



Ryc. 29: Zależność lepkości oraz naprężenia ścinającego od szybkości ścinania

Po przeanalizowaniu powyższego wykresu, dalsze pomiary wykonano przy szybkości ścinania równej 5s^{-1} . Jest to maksymalna wartość, przy której zależność lepkości od szybkości ścinania oraz zależność naprężenia ścinającego od szybkości ścinania ma charakter zależności liniowej.

Zbadano również zależność lepkości dynamicznej od temperatury. Wyniki przedstawia poniższy wykres.



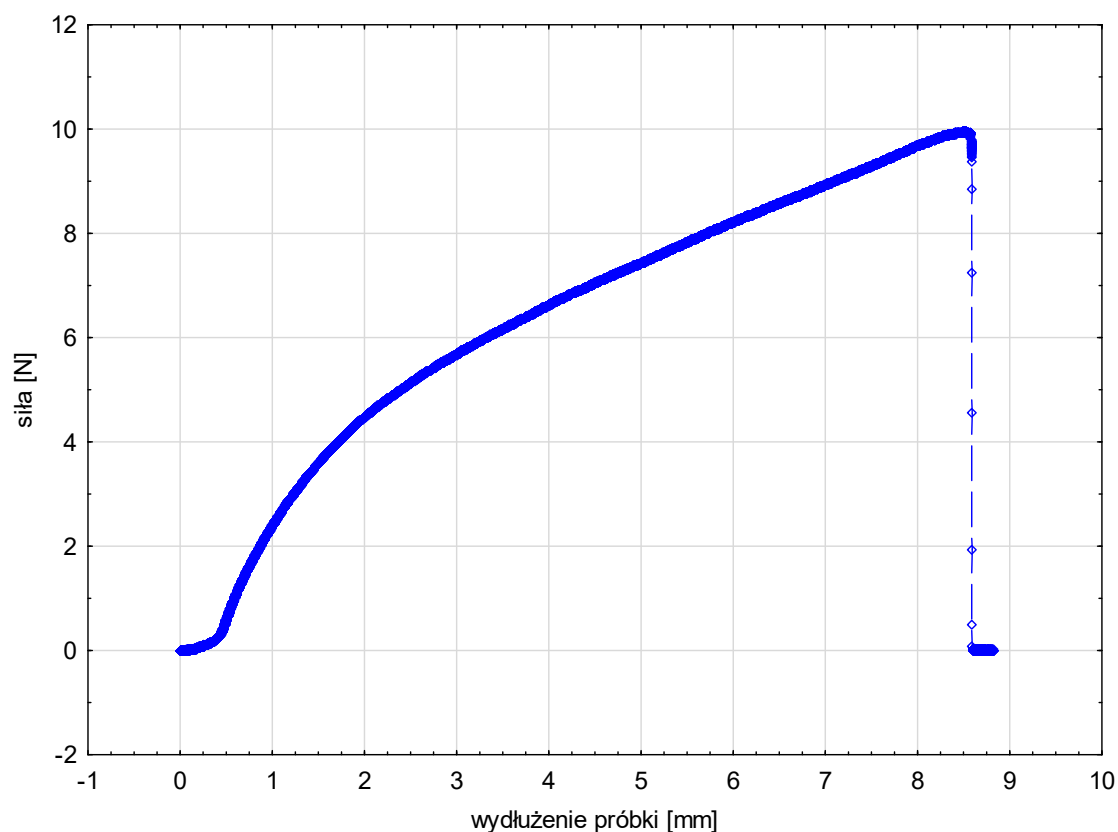
Ryc. 30: Zależność lepkości od temperatury dla szybkości ścinania równej 5 s^{-1}

Na podstawie powyższego wykresu można stwierdzić iż nie ma istotnych różnic w powyższych zależnościach dla próbek z czystym kolagenem jak i domieszkowanym tlenkiem grafenu w zmiennych proporcjach. Temperaturę denaturacji wyznaczono analogicznie do zależności lepkości właściwej od temperatury. Temperatura denaturacji zarówno dla czystego kolagenu jak i domieszkowanego GO w różnych proporcjach wyniosła ok. $35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4. Badania teksturometryczne

Grubości rozciąganych folii wyznaczono za pomocą grubościomierza. Każdą folię zmierzono co najmniej 10 razy. Średnią z tych pomiarów zastosowano do obliczeń wytrzymałości próbek na rozciąganie – TS. Grubość błon wahała się w przedziale $60\text{--}120\text{ }\mu\text{m}$.

Przykładową próbę rozciągania próbki przedstawiono za pomocą poniższej zależności.



Ryc. 31: Przykładowa zależność siły od wydłużenia próbki błony kolagenowej z 0,05% GO podczas rozciągania próbek

Poniższa tabela zawiera wartości średnie siły, przy której nastąpiło rozerwanie filmów z czystego kolagenu oraz domieszkowanego tlenkiem grafenu.

Tabela 2: Średnie wartości siły, przy których nastąpiło zerwanie próbek

	kolagen [N]	kolagen + 0,01% GO [N]	kolagen + 0,02% GO [N]	kolagen + 0,05% GO [N]
średnia	19,5	27,4	10,3	8,1
mediana	18,6	26,2	9,8	7,8
odchylenie standardowe	7,1	8,7	3,2	3,2

Na podstawie powyższej tabeli zaobserwowano, że największą siłą, przy której nastąpiło rozerwanie próbki charakteryzują się folie kolagenowe z 0,01% dodatkiem

GO. Natomiast najbardziej podatne na rozerwanie okazały się błony z największym procentowym udziałem GO.

Przeprowadzono test Shapiro -Wilka dla powyższych próbek, sprawdzający czy próbki można uznać za pochodzące z rozkładu normalnego. Za poziom istotności dla wszystkich poniższych analiz przyjęto wartość 0,05. Wartości prawdopodobieństwa p zaznaczone w tabelach zawierających wartości prawdopodobieństw testu Shapiro-Wilka na czerwono, świadczą o odrzuceniu hipotezy zerowej, mówiącej że analizowany rozkład pochodzi z rozkładu normalnego.

Tabela 3: Wartości prawdopodobieństw testu Shapiro-Wilka

	kolagen	kolagen + 0,01% GO	kolagen + 0,02% GO	kolagen + 0,05% GO
p	0,01	0,18	0,03	0,09

Na podstawie powyższych testów, uznano, że rozkład sił zrywających dla kilku rodzajów błon odbiega od rozkładu normalnego do dalszej analizy zastosowano test ANOVA rang Kruskala Wallisa dla którego otrzymano $p < 0,01$. Świadczyć to może o różnicy w sile, przy której nastąpiło zerwanie poszczególnych filmów. W związku z powyższym zastosowano porównania wielokrotne testu Kruskala-Wallisa otrzymując następujące wyniki przedstawione w tabeli poniżej.

Tabela 4: Wartości prawdopodobieństwa porównania wielokrotnego testu Kruskala-Wallisa

p	kolagen	kolagen + 0,01% GO	kolagen + 0,02% GO	kolagen + 0,05% GO
kolagen	-	0,11	<0,01	<0,01
kolagen + 0,01% GO	0,11	-	<0,01	<0,01
kolagen + 0,02% GO	<0,01	<0,01	-	0,76
kolagen + 0,05% GO	<0,01	<0,01	0,76	-

Na podstawie powyższej tabeli można wnioskować, że istnieje istotna różnica w sile zrywania filmów pomiędzy błonami z dodatkiem 0,02% i 0,05% GO, a błoną z samego kolagenu oraz błoną zawierającą 0,01% dodatek GO.

Poniższa tabela 5 zawiera wartości średnie wytrzymałość materiałów na rozerwanie dla folii z czystego kolagenu oraz domieszkowanego tlenkiem grafenu. Dla każdego rodzaju filmu wykonano co najmniej 30 prób rozrywania błon.

Tabela 5: Wartości wytrzymałości próbki na rozerwanie (TS) filmów kolagenowych czystych oraz domieszkowanych GO

	kolagen [MPa]	kolagen + 0,01% GO [MPa]	kolagen + 0,02% GO [MPa]	kolagen + 0,05% GO [MPa]
średnia	20,2	23,9	15,9	11,9
mediana	19,9	23,7	15,4	11,0
odchylenie standardowe	6,5	5,3	5,3	6,0

Przeprowadzono test Shapiro -Wilka dla powyższych próbek sprawdzający czy próbki można uznać za pochodzące z rozkładu normalnego.

Tabela 6: Wartości prawdopodobieństw testu Shapiro-Wilka

	kolagen	kolagen + 0,01% GO	kolagen + 0,02% GO	kolagen + 0,05% GO
p	0,52	0,73	0,19	<0,01

Na podstawie powyższych testów, uznając, że rozkład naprężeń zrywających dla błony kolagenowej z 0,05% GO odbiega od rozkładu normalnego do dalszej analizy zastosowano test ANOVA rang Kruskala Wallisa dla którego otrzymano $p < 0,01$. Świadczyć to może o różnicy w naprężeniu zrywającym poszczególnych filmów. W związku z powyższym zastosowano porównania wielokrotne testu Kruskala-Wallisa otrzymując następujące wyniki przedstawione w tabeli poniżej.

Tabela 7: Wartości prawdopodobieństwa porównania wielokrotnego testu Kruskala-Wallisa

p	kolagen	kolagen + 0,01% GO	kolagen + 0,02% GO	kolagen + 0,05% GO
kolagen	-	0,21	0,08	<0,01
kolagen + 0,01% GO	0,21	-	<0,01	<0,01
kolagen + 0,02% GO	0,08	<0,01	-	0,07
kolagen + 0,05% GO	<0,01	<0,01	0,07	-

Można zauważyć istotne różnice w wartości naprężeń zrywających dla błon z czystego kolagenu oraz kolagenu domieszkowanego 0,05% GO oraz pomiędzy folią domieszkowaną 0,01% GO, a tymi domieszkowanymi 0,02% i 0,05% GO.

Mniejsza wartość naprężenia zrywającego dla błon z 0,02% oraz 0,05% GO może być wynikiem zwiększenia sztywności bądź kruchości błon kolagenowych pod wpływem GO.

Wyznaczono również wydłużenie próbki podczas zerwania dla wszystkich rodzajów filmów. Poniższa tabela przedstawia wartości średnie względnego wydłużenia.

Tabela 8: Wartości średnie względnego wydłużenia filmów kolagenowych

	kolagen [%]	kolagen + 0,01% GO [%]	kolagen + 0,02% GO [%]	kolagen + 0,05% GO [%]
średnia	12,3	8,3	10,3	18,4
mediana	11,7	8,8	10,5	16,9
odchylenie standardowe	5,4	5,7	5,7	12,5

Również w tym przypadku przeprowadzono analizę zbieżności otrzymanych wyników do rozkładu normalnego.

Tabela 9: Wartości prawdopodobieństw testu Shapiro-Wilka

	kolagen	kolagen + 0,01% GO	kolagen + 0,02% GO	kolagen + 0,05% GO
p	0,08	0,06	0,02	0,11

Na podstawie powyższych testów można uznać, że rozkład względnego wydłużenia błon kolagenowych z 0,02% GO odbiega od rozkładu normalnego, a co za tym idzie do dalszej analizy zastosowano test ANOVA rang Kruskala Wallisa dla którego otrzymano $p < 0,01$. W związku z tym zastosowano porównania wielokrotne testu Kruskala-Wallisa otrzymując następujące wyniki przedstawione w tabeli poniżej.

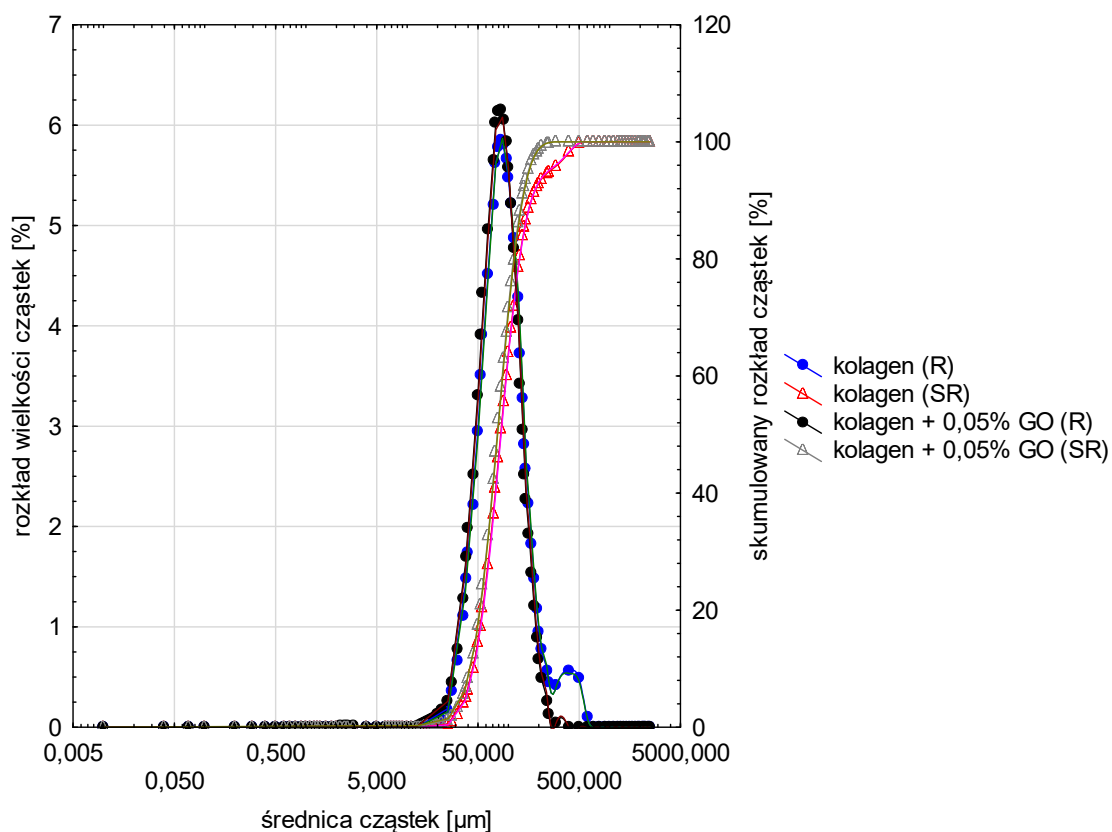
Tabela 10: Wartości prawdopodobieństwa porównania wielokrotnego testu Kruskala-Wallisa

p	kolagen	kolagen + 0,01% GO	kolagen + 0,02% GO	kolagen + 0,05% GO
kolagen	-	~1	~1	0,02
kolagen + 0,01% GO	~1	-	~1	<0,01
kolagen + 0,02% GO	~1	~1	-	<0,01
kolagen + 0,05% GO	0,02	<0,01	<0,01	-

Na podstawie powyższej tabeli można sądzić, że różnica w wydłużeniu próbek kolagenowych z 0,05% GO istotnie różni się od pozostałych błon charakteryzując się największym wydłużeniem.

5. Analiza wielkości cząstek

Poniższy wykres przedstawia rozkład wielkości cząstek próbek kolagenu oraz mieszaniny kolagenu i największego przyjętego stężenia tlenku grafenu.



Ryc. 32: Zależność rozkładu (R) i rozkładu skumulowanego (SR) wielkości cząsteczek od średnicy cząsteczek

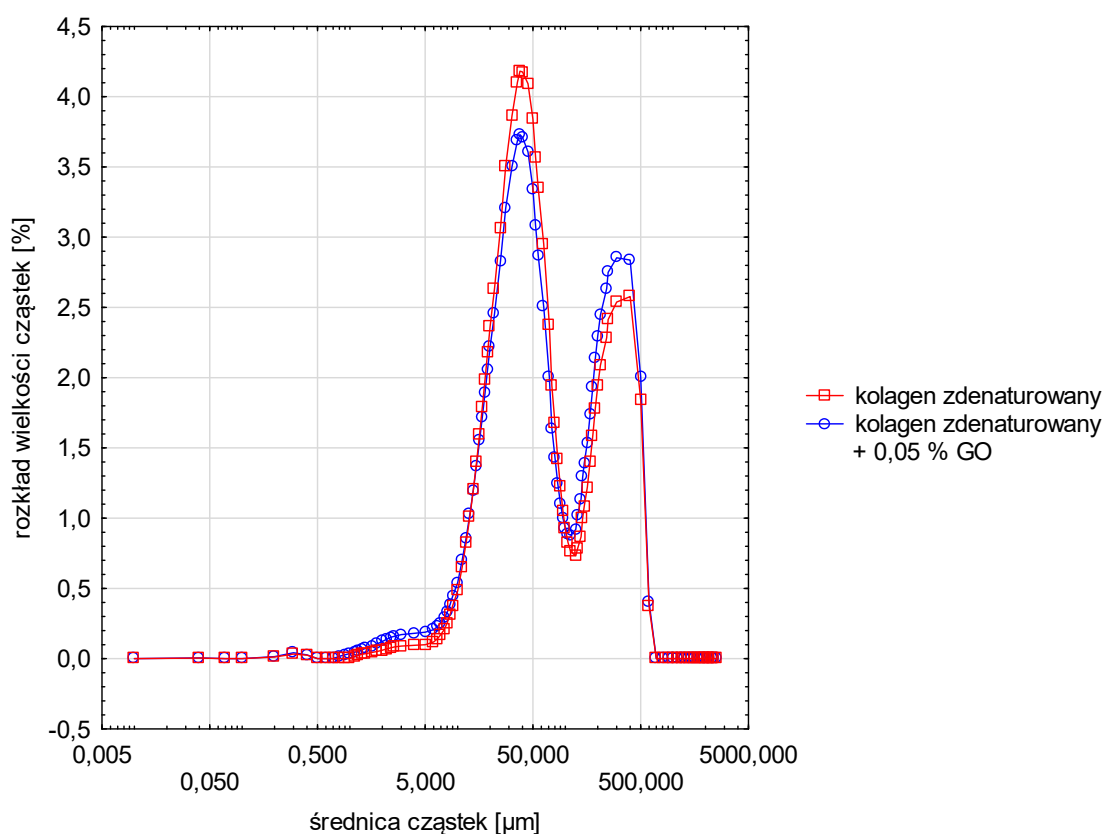
Na podstawie powyższego wykresu można zauważyć brak istotnych różnic pomiędzy próbkami samego kolagenu oraz tego domieszkowanego tlenkiem grafenu. Istnieje jedynie nieznaczna różnica w ilości największych cząstek pomiędzy próbką czystego kolagenu a tą domieszkowaną GO. Poniższa tabela przedstawia średnie rozmiary cząstek z co najmniej 2 pomiarów w 10, 50 oraz 90 percylu zarówno dla próbek czystego kolagenu, domieszkowanego GO oraz próbek 0,05% roztworu GO. Wyniki przedstawiono dla modelu objętościowego.

Tabela 11: Rozkład wielkości średnic cząstek kolagenu czystego i domieszkowanego tlenkiem grafenu oraz wielkości samego GO w roztworze wodnym

Próbka	D ₁₀ [μm]	D ₅₀ [μm]	D ₉₀ [μm]	Wartość średnia [μm]
kolagen	45,1	84,24	168,47	109,25
kolagen + 0,05% GO	41,92	77,76	136,83	87,88
0,05% GO	9,08	313,72	462,34	304,71

Na podstawie analizy powyższej tabeli można stwierdzić nieznaczne różnice w wielkości cząstek roztworu kolagenu oraz roztworu kolagenu z tlenkiem grafenu.

Analizie wielkości cząstek poddano również próbki denaturowane przez 1 godzinę w 40°C (w celu uzyskania zdenaturowanych próbek). Uzyskane wyniki przedstawiono na poniższym wykresie.



Ryc. 33: Zależność rozkładu wielkości cząstek od średnicy cząstek dla próbek zdenaturowanych

Na podstawie powyższej ryciny można stwierdzić kumulację cząstek większych ok. 300 μm i mniejszych ok. 40 μm .

Poniższa tabela przedstawia średnie rozmiary cząstek w 10, 50 oraz 90 percylu dla kolagenu zdenaturowanego bez i z dodatkiem 0,05% tlenku grafenu. Wyniki przedstawiono dla modelu objętościowego.

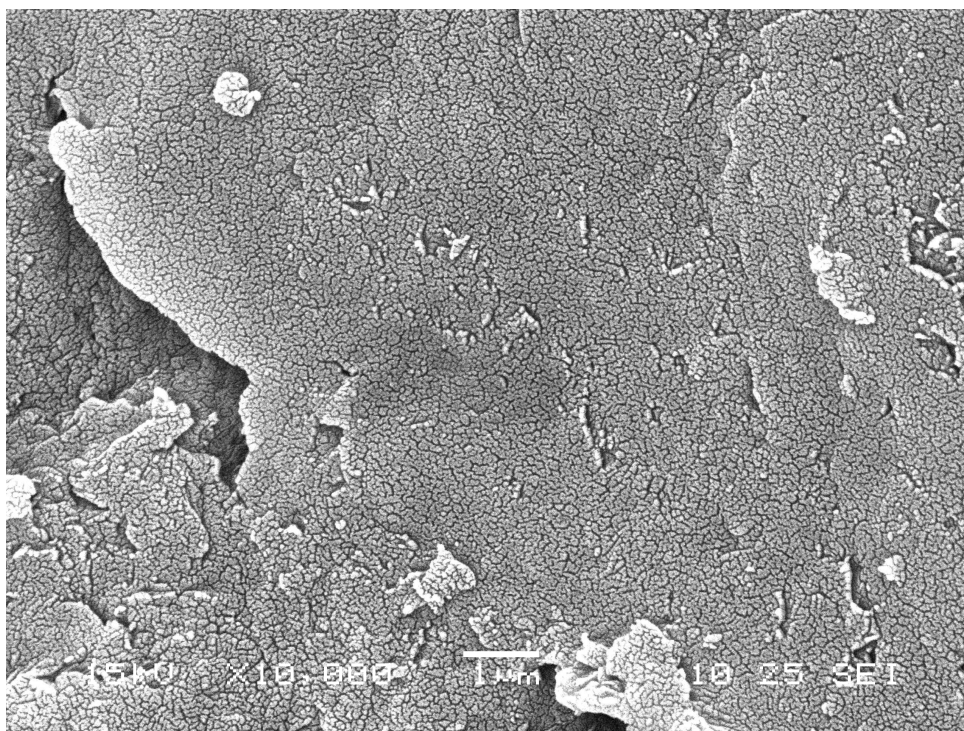
Tabela 12: Rozkład wielkości średnic cząstek kolagenu zdenaturowanego czystego i domieszkowanego tlenkiem grafenu

Próbka	D10 [μm]	D50 [μm]	D90 [μm]	Wartość średnia [μm]
Kolagen zdenaturowany	16,24	44,91	352,07	114,8
Kolagen zdenaturowany + 0,05% GO	15,61	56,93	352,08	143,16

Na podstawie powyższych wyników można zaobserwować występowanie mniejszych fragmentów cząstek oraz dużo większych cząstek co jest oznaką denaturacji próbek. Większe cząstki to najprawdopodobniej tzw. kłębki zdenaturowanych łańcuchów kolagenowych. Natomiast nie zaobserwowano znaczącego wpływu GO na wielkość cząstek a co za tym idzie na denaturację kolagenu.

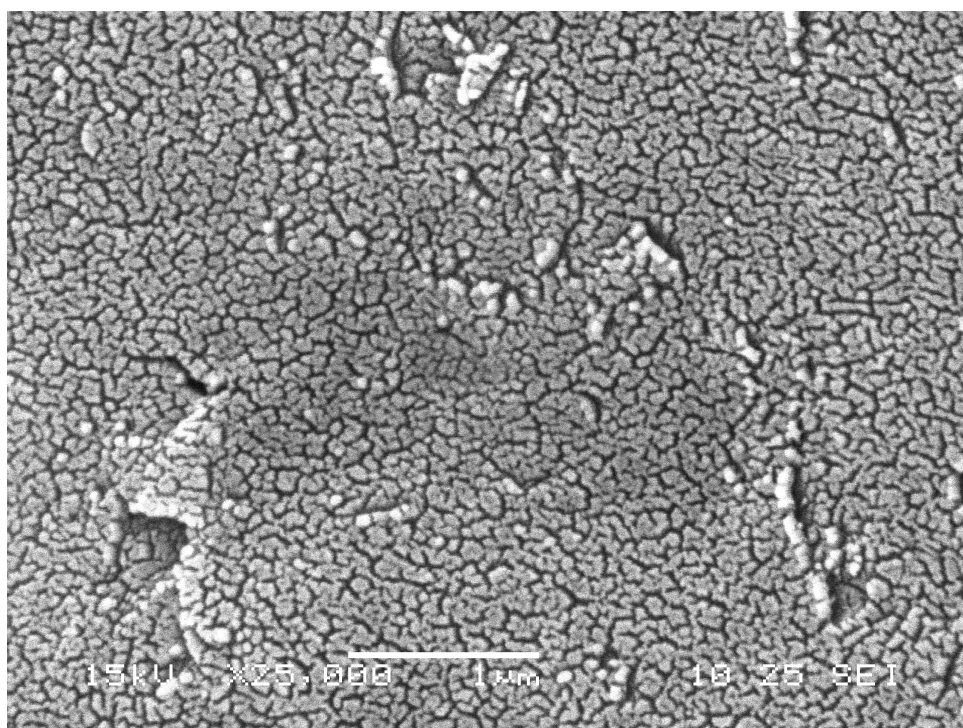
6. Badania mikrostrukturalne

Poniżej przedstawiono zdjęcia powierzchni GO uzyskane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Ryc. 34 przedstawia strukturę suchego tlenku grafenu w powiększeniu 10 000 krotnym.



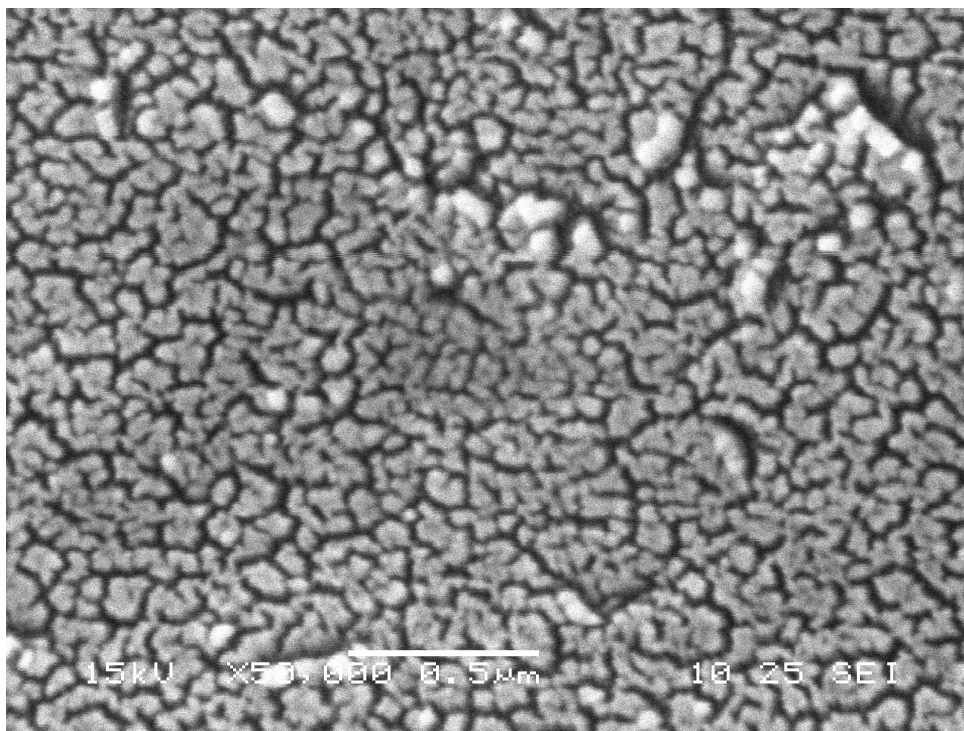
Ryc. 34: Struktura tlenku grafenu w powiększeniu 10 000 krotnym

Rycina 35 przedstawia strukturę suchego tlenku grafenu w powiększeniu 25 000 krotnym.



Ryc. 35: Struktura suchegoGO w powiększeniu 25 000 krotnym.

Rycina 36 przedstawia strukturę suchego tlenku grafenu w powiększeniu 50 000 krotnym.



Ryc. 36: Struktura suchego GO w powiększeniu 50 000 krotnym.

Na podstawie powyższych zdjęć można stwierdzić, że budowa tlenku grafenu jest dość jednorodna. Pewne zaburzenia poziomów wysokości w teoretycznie płaskiej strukturze, które są widoczne zwłaszcza przy powiększeniu 10 000 krotnym mogą wynikać raczej z formy samej próbki – postaci suchej, a więc prawdopodobnie możemy mieć do czynienia nie tyle z GO a z jego wielowarstwową postacią – tlenkiem grafitu.

7. Metoda termograwimetryczna

Średnia zawartość masy suchej pozostałości po suszeniu wyjściowego żelu kolagenowego wyniosła $(2,9 \pm 0,1)$ %. Na tej podstawie oszacowano, że zawartość wody wynosi około $(97,1 \pm 3,3)$ %.

8. Podsumowanie wyników

1. Zaobserwowano, że 0,05% dodatek tlenku grafenu nie ma wpływu na temperaturę denaturacji kolagenu, co zostało potwierdzone zarówno metodą wiskozymetryczną jak i reometryczną.
2. Na podstawie badań parametrów elektrycznych, można stwierdzić, że:
 - a. charakter badanych zależności jest zbliżony niezależnie od zawartości tlenku grafenu w badanym filmie,
 - b. w zakresie temperatur od temperatury pokojowej do 60°C, a więc w obszarze denaturacji kolagenu, wszystkie testowane próbki nie wykazywały znaczących różnic pomiędzy sobą,
 - c. dostrzegalna jest różnica temperatury, przy której w końcowym etapie parametry ulegają szybkiemu wzrostowi, co związane jest z degradacją próbki. Dla próbek kolagenowych z 0,01% dodatkiem tlenku grafenu oraz dla folii bez dodatku wartość ta dla wszystkich parametrów przekracza 120°C, natomiast dla folii z 0,02% oraz 0,05% dodatkiem tlenku grafenu wzrost ten odnotowany jest już powyżej 100°C,
 - d. próbki z 0,02% oraz 0,05% dodatkiem tlenku grafenu wykazują większą przewodność właściwą w porównaniu do folii z czystego kolagenu.
3. Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy wielkością cząstek samego kolagenu, a kolagenu z 0,05% dodatkiem tlenku grafenu. Istnieje jedynie nieznaczna różnica w ilości największych cząstek pomiędzy próbką czystego kolagenu, a tą domieszkowaną tlenkiem grafenu.
4. Porównując wytrzymałość folii kolagenowych, ustalono, że największą wytrzymałością na rozerwanie charakteryzuje się folia kolagenowa z 0,01% dodatkiem tlenku grafenu, natomiast największe względne wydłużenie próbki zaobserwowano dla folii kolagenowych z 0,05% tlenkiem grafenu

V. DYSKUSJA

Istotnym sposobem oceny wpływu tlenku grafenu na kolagen, jest sprawdzenie jego wpływu na strukturę kolagenu m.in. poprzez obserwację wpływu tlenku grafenu na proces termicznej denaturacji kolagenu. Z tego powodu w niniejszej pracy próbowano ocenić różnymi metodami i w różnych stanach skupienia wpływ tlenku grafenu na denaturację kolagenu. Istnieje wiele prac na temat temperatury denaturacji kolagenu, w tym kolagenu pochodzącego ze skór rybich. W oparciu o dane literaturowe można spostrzec, że brakuje doniesień na temat wpływu niektórych potencjalnych dodatków jak tlenek grafenu na jego strukturę lub ogólny wpływ na cząsteczki kolagenu poprzez badania temperatury denaturacji. Metoda wiskozymetryczna jest prostym, szybkim i stosunkowo tanim sposobem oceny denaturacji białek. Dodatkowo większość publikacji skupia się obecnie na potencjalnym wykorzystaniu kompozytu kolagenu z tlenkiem grafenu z punktu widzenia toksyczności i właściwości mechanicznych. Niewiele informacji można znaleźć na temat wpływu tlenku grafenu na strukturę kolagenu. Temperatura denaturacji kolagenu ze skór tołpygi białej wyznaczona metodą wiskozymetryczną zarówno dla czystego roztworu kolagenu jak i dla roztworu kolagenu z tlenkiem grafenu wyniosła 33,5°C. Brak różnicy w tej temperaturze wskazuje na to, że przy niewielkim stężeniu kolagenu (wymaganego do zastosowania wiskozymetru kapilarnego), tlenek grafenu nie wpłynął na jego konformację. Temperatura ta różni się o stopień w stosunku do badań Safandowskiej i Pietruchy na temat kolagenu ze skór tołpygi białej, które ustaliły temperaturę denaturacji również metodą wiskozymetryczną równą 34,5°C [118]. Różnica ta może być spowodowana stopniem uwodnienia próbki, bądź stopniem usieciowania kolagenu, bowiem parametry te mają wpływ na temperaturę denaturacji kolagenu. Wraz ze wzrostem zawartości wody temperatura denaturacji obniża się [119]. Zespół Rodziewicz-Motowidło z pomocą pomiaru dichronizmu kołowego ustalił temperaturę denaturacji omawianego kolagenu na poziomie 34,5°C oraz za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej na poziomie 34,8°C [120]. Wyniki te są zgodne z pracą Safandowskiej i Pietruchy [118]. Do obserwacji wpływu tlenku grafenu na kolagen wykorzystano również pomiary parametrów elektrycznych takich jak moduł zawady, opór elektryczny czy tangens kąta strat dielektrycznych w funkcji temperatury. Na podstawie pomiaru przewodności

elektrycznej właściwej folii kolagenowych wytworzonych z mieszanin ok. 1% roztworu kolagenu z 0,01, 0,02 lub 0,05% tlenkiem grafenu. można zauważyć, że dodatek tlenku grafenu do folii kolagenowych zwiększał przewodność właściwą materiału w stosunku do czystych folii kolagenowych (ryc. 14-16). MacDonald i wsp. przedstawili badania na temat kompozytu złożonego z żelu kolagenowego oraz nanorurek węglowych. Wykazali, że ich obecność w żelu kolagenowym zwiększa przewodność elektryczną właściwą materiałów kolagenowych [121]. Charakter zmian przewodności właściwej w funkcji temperatury jest zbliżonych we wszystkich analizowanych częstotliwościach (100Hz, 1kHz, 10kHz).

Zmiany w wartościach przewodności w obszarze (30-60)°C związane są prawdopodobnie z denaturacją kolagenu. Proces denaturacji folii kolagenowej charakteryzują wyższe temperatury niż denaturacji roztworów kolagenowych, gdyż jest to związane jak już wcześniej wspomniano, z zawartością wody w próbce. Uzyskanie więc wyższych temperatury podczas badania denaturacji jest więc zgodne z doniesieniami literaturowymi. Stancl i wsp. przeprowadzili badania przewodności właściwej roztworu kolagenowego pochodzącego ze skór wołowych. Dla tego typu kolagenu uznano za optymalną częstotliwość o wartości 2,5 kHz i napięciu ok. 10 V. Zaobserwowali oni zmianę trendu badanej zależności w przedziale temperaturowym (32-43)°C i uznali, że jest to spowodowane denaturacją próbki [122]. Przedział ten zawiera się w wyznaczonym przedziale w niniejszej pracy, pomimo iż kolagen wołowy charakteryzuje się wyższą temperaturą denaturacji, bo ok. 40°C [23]. Ponownie spowodowane jest to zapewne stanem skupienia badanej próbki, gdyż kolagen wołowy badany był w postaci roztworu, a w niniejszej pracy badano kolagen w postaci stałej. Gauza i wsp. w jednej ze swoich prac na temat kolagenu rybiego przedstawili badania przewodności elektrycznej właściwej folii kolagenowej w funkcji temperatury, uzyskując wartości przewodności właściwej w zakresie (10^{-6} - 10^{-4}) S/m w przedziale temperaturowym (17-237)°C [20]. Dla porównania w niniejszej pracy uzyskano zbliżone wartości różniące się nieznacznie w zależności od częstotliwości pomiarów. Dla 100 Hz uzyskano zakres rzędu (10^{-7} - 10^{-6}) S/m, dla 1 kHz oraz 10 kHz otrzymano przedział (10^{-7} - 10^{-5}) S/m w zakresie temperaturowym (20-60) °C dla wszystkich rodzajów badanych próbek. W innej pracy Gauzy i wsp. również na temat przewodności kolagenu rybiego w przedziale temperaturowym (17-107)°C w postaci

filmów kolagenowych zobrazowano istotność zawartości wody w próbce. Biorąc pod uwagę właściwości higroskopijne kolagenu zaobserwowano wpływ wilgotności powietrza na wartość przewodności elektrycznej właściwej kolagenu. Ustalili, że im wyższa wilgotność względna powietrza tym wyższe wartości przewodności filmu kolagenowego [123]. Na tej podstawie, można uznać, że niewielkie różnice w próbkach mogą być spowodowane innym poziomem wilgotności powietrza podczas przeprowadzanych pomiarów, pomimo iż pomiary przeprowadzono w standardowym zakresie wilgotności względnej (pomiędzy 40% , a 60 %). Marianiová i wsp. również badali przewodność elektryczną właściwą kolagenu pochodzącego z bydlęcego ścięgna Achillesa w postaci filmów kolagenowych, jednak otrzymali duże mniejsze wartości przewodności rzędy (10^{-13} - 10^{-11}) S/m, co związane jest z innym pochodzeniem kolagenu oraz z niższymi temperaturami pomiarowymi, gdyż przedział pomiarowy temperatury wynosił od -50°C do 40°C [124]. Uzyskany w przedłożonej pracy charakter zmian przewodności elektrycznej właściwej w funkcji temperatury jest zgodny z charakterem zmian innego białka-keratyny przedstawionego w pracy Kubisza. W publikacji tej widoczny jest najpierw lekki wzrost przewodności, a następnie spadek z maksimum lokalnym ok. 27°C . Minimalna wartość przewodności przypada na temperaturę ok. 77°C , a następnie wzrasta. Zmiany w zakresie $(97-127)^{\circ}\text{C}$ uznano za spowodowane uwalnianiem wody związanej [125]. Charakter ten pomimo iż uzyskany dla innego białka jest zbieżny z tym uzyskanym w niniejszej pracy. Nagły wzrost przewodności elektrycznej właściwej powyżej 100°C jest prawdopodobnie związany również z degradacją struktury kolagenu. Dla filmów kolagenowych z dodatkiem 0,02% oraz 0,05% tlenku grafenu następuje już ona powyżej 110°C , natomiast dla błon z czystego kolagenu oraz z 0,01% dodatkiem tlenku grafenu powyżej 130°C i jest to prawdopodobnie związane z niszczeniem II rzędowej struktury kolagenu. Wyniki te są zgodne z uzyskanymi przez zespół Połomskiej, który prowadził badania spektroskopii Ramana w podczerwieni kolagenu pochodzącego ze skór tołpygi białej i ustalił że, nieodwracalne zniszczenie II rzędowej struktury kolagenu następuje powyżej 130°C [126].

Niniejsza praca zawiera również opracowanie zależności tangensa kąta strat dielektrycznych od temperatury dla wybranych częstotliwości tj. 100 Hz, 1 kHz oraz 10 kHz (ryc. 17-19). Na podstawie zależności uzyskanej przy częstotliwości 100 Hz

można zaobserwować maksimum znajdujące się w obrębie (30-35)°C zarówno dla filmu z czystego kolagenu jak i domieszkowanego tlenkiem grafenu oraz drugie niewielkie maksimum w okolicy 80 °C dla próbki z samym kolagenem jak i próbki z 0,01% tlenkiem grafenu. Kolejne maksimum widoczne jest przy ok. 95 °C dla próbek kolagenowych z 0,02% oraz 0,05% dodatkiem tlenu grafenu. Natomiast maksimum to dla czystej próbki kolagenowej oraz próbki ze 0,01% stężeniem GO waha się w okolicy (115-120)°C. Na podstawie pomiarów tangensa strat dielektrycznych przy częstotliwości 1kHz można również dostrzec maksimum w okolicy (30-35)°C dla większości próbek. Podobnie jak dla 100 Hz drugie niewielkie maksimum jest obserwowane w okolicy 80 °C dla filmów kolagenowych bez dodatku jak i z 0,01% dodatkiem tlenu grafenu. Natomiast można zauważyć przesunięcie ostatnich maksimów w stronę wyższych temperatur tj. w zakresie (105-100) °C można zaobserwować maksimum dla błon kolagenowych z 0,02% oraz 0,05% tlenkiem grafenu, a dla folii kolagenowej oraz próbki z 0,01% stężeniem tlenu grafenu maksimum to waha się w okolicy (125-130)°C. Dla próbek przy częstotliwości 10 kHz pierwsze maksimum przy 30°C jest widoczne jedynie w przypadku filmu z czystym kolagenem oraz domieszkowanym 0,02% GO, jednak maksima te są nieznaczne. Jak w przypadku zależności współczynnika strat dielektrycznych od temperatury dla 100 Hz oraz 1 kHz przy częstotliwości 10 kHz również można zaobserwować maksimum przy 80 °C dla próbki z samego kolagenu jak i próbki z 0,01% dodatkiem tlenu grafenu, natomiast w przedziale (90-130)°C maksima nie występują. Wartości współczynnika strat dielektrycznych zatem są zależne od dobranej częstotliwości pomiarowej oraz od temperatury. Przesunięcie maksimum z (125-130)°C na (105-100) °C dla 1 kHz oraz z (115-120)°C na ok. 95 °C w stronę niższych temperatur dla próbek z większym dodatkiem tlenu grafenu (0,02% oraz 0,05%) może być wynikiem szybciej następujących zmian (prawdopodobnej degradacji) w filmach kolagenowych przez zbyt duży dodatek tlenu grafenu. Podobne badania jednak dla niższego zakresu temperatur (od -50°C do 40°C) przedstawił zespół Marianiová. Jak już wcześniej wspomniano zespół ten pracował na kolagenie bydlęcym wyekstrahowanym ze ścięgna Achillesa w postaci błon kolagenowych. W badaniach tych występuje jedno silne maksimum w obrębie -22°C i drugie mniejsze maksimum w okolicy 5°C, jednak nie pokrywają się one z zakresem w przedłożonej pracy, co uniemożliwia dokładne

porównanie tych badań. Natomiast można chociaż porównać zakres wartości współczynnika strat dielektrycznych. W pracy Marianiová waha się on w zakresie $6 \cdot 10^{-4}$ do $3 \cdot 10^{-3}$ dla częstotliwości 1,6 kHz [124]. Natomiast w niniejszej pracy dla 1 kHz uzyskano przedział wartości 0,5-2, a dla 10 kHz otrzymano 0,2 a 1,6. Co daje znacznie większe wartości tangensa kąta strat dielektrycznych niż w pracy zespołu Marianiová. Może być to spowodowane różnicą w pochodzeniu kolagenu jak i zakresu zastosowanych w pomiarach temperatur. Liu i wsp. przedstawiają badania zależności tangensa kąta strat dielektrycznych włókien kolagenowych ze skór wołowych, ale jedynie od częstotliwości, nie uwzględniając czynnika jakim jest temperatura. W zakresie do 2 GHz dla niższych częstotliwości otrzymali nieco wyższe wartości niż dla częstotliwości wyższych [127]. Jest to zgodne z uzyskanymi wynikami w przedłożonej pracy. Natomiast Połomska i wsp. za pomocą spektroskopii Ramana w podczerwieni wykazali, że struktura drugorzędowa kolagenu rybiego jest stabilna do ok. 85°C [126]. Temperatura ta jest zbliżona do maksimum występującego w zależności współczynnika strat dielektrycznych od temperatury dla niektórych wyżej wspomnianych, przebadanych próbek wahająca się w okolicy 80°C. Temperatura ta jest też zbliżona do temperatury skurczu kolagenu, która wg Krasnowskiej występuje w zakresie 60-75°C i jest zależna od szybkości zmiany temperatury w badanym materiale, od rodzaju tkanki oraz od pH [21]. Na chwilę obecną w bazach literaturowych znajdują się szczątkowe informacje na temat zależności współczynnika strat dielektrycznych od temperatury dla kolagenu lub innych białek. Większość autorów skupia się na pomiarach samego przewodnictwa właściwego badanych materiałów.

Kolejnymi przeanalizowanymi parametrami folii kolagenowych były składowa rzeczywista oraz urojona zespolonej przenikalności elektrycznej. Zaobserwowano że charakter zależności składowej rzeczywistej przenikalności elektrycznej od temperatury jest zbliżony dla wszystkich przebadanych próbek, niezależnie od częstotliwości oraz dodatku tlenu grafenu w filmach (ryc. 20-22). Zauważono niewielkie zmiany w zakresie (20-60)°C, prawdopodobnie związane z denaturacją termiczną próbek występujące dla wszystkich rodzajów folii. Można również spostrzec nagły wzrost wartości powyżej 125°C dla folii kolagenowej oraz z 0,01% dodatkiem tlenu grafenu, natomiast wzrost ten dla folii z 0,02% i 0,05% tlenu grafenu jest już widoczny powyżej 110°C. Może to świadczyć o niekorzystnym wpływie zbyt dużego

stężenia tlenku grafenu na degradację kolagenu, a co za tym idzie na pogorszenie właściwości termicznych folii kolagenowych, która przy zbyt dużym stężeniu tlenku grafenu ulega degradacji w niższej temperaturze, jednak nadal jest to akceptowalna temperatura, wystarczająca w potencjalnych medycznych zastosowaniach.

Analizując zależności składowej urojonej przenikalności elektrycznej od temperatury (ryc. 23-25) można zauważyć, że niezależnie od częstotliwości oraz zawartości tlenku grafenu w filmach zależności te również mają dość zbliżony charakter, jedna w obszarze temperaturowym (20-50)°C można zaobserwować większe wartości ϵ'' dla próbek z 0,02% oraz 0,05% dodatkiem tlenku grafenu, niż wartości dla czystej błony kolagenowej i błony z 0,01% dodatkiem tlenku grafenu. Można również zaobserwować nagły wzrost badanej wartości powyżej 120°C dla folii kolagenowej bez i z dodatkiem 0,01% tlenku grafenu i już powyżej 100°C dla folii z 0,02% i 0,05% dodatkiem GO, co prawdopodobnie ma również związek jak w przypadku składowej rzeczywistej przenikalności elektrycznej z degradacją próbek.

Marzec i Pietrucha w swojej pracy zawarły badania zarówno składowej rzeczywistej jak i urojonej dla kolagenu pozyskanego ze skór tołpygi białej. Badania te jednak różnią się znacznie od badań przedstawionych w przedłożonej pracy. W pracy Marzec i Pietruchy w pomiarach dla 5 kHz widoczne jest maksimum zarówno składowej rzeczywistej jak i urojonej w okolicy 70°C, maksimum to w przedłożonej pracy jest niewidoczne. Odnotowano również spadek obu składowych powyżej 140°C, gdzie w przedłożonej pracy odnotowano wzrost tych wartości. Autorki odnotowały również, że charakter zmian jest zbliżony w zakresie częstotliwości od 100 do 100 kHz, co jest zgodnym czynnikiem z przedłożoną pracą. Porównano wartości składowej rzeczywistej przenikalności elektrycznej dla 25°C, gdzie zespół Marzec i Pietrucha wykazały wartość równą 2,6 dla 5 kHz, natomiast w niniejszej pracy uzyskano dla 1 kHz wartość równą 13, a dla 10 kHz około 8 [128]. Tak istotne różnice pomiędzy wynikami mogą być spowodowane innym stopniem wilgotności bądź usieciowania próbki. Otrzymany w przedłożonej pracy charakter zależności składowej urojonej przenikalności elektrycznej jest mocno zbliżony do otrzymanego przez zespół Marzec i Warchoła dla suchego wołowego ścięgna Achillesa [129]. Jak powszechnie wiadomo w ścięgnie tym występuje kolagen, a więc istnieje szansa, że zbieżność charakterów tych zależności nie jest przypadkowa. Pomimo zbliżonych charakterów zależności składowej rzeczywistej

i urojonej dla różnych częstotliwości, wzrost częstotliwości powoduje spadek wartości przenikalności elektrycznej, co jest zgodne z badaniami zespołu Liu dla częstotliwości do 2GHz zarówno jeśli chodzi o składową rzeczywistą jak i urojoną przenikalności elektrycznej. Jak już wcześniej wspomniano badania te przeprowadzone zostały dla kolagenu pochodzenia wołowego [127]. Taką samą zależność potwierdzają badania Marzec i Pietruchy dla próbek kolagenowych z tołpygi białej [128].

Kolejnym typem badań wpływu tlenku grafenu na kolagen były pomiary reometryczne. Przeprowadzono zarówno pomiary rotacyjne jak i oscylacyjne próbek o ok.1% Na początku skupiono się na pomiarach oscylacyjnych i zbadano zależność modułu zachowawczego oraz stratności od odkształcenia ścinającego (ryc. 26). Na podstawie tych pomiarów można stwierdzić iż nie ma istotnych różnic w powyższych zależnościach dla próbek z czystym kolagenem jak i domieszkowanym tlenkiem grafenu. Można zaobserwować jedynie niewielką tendencję, że wraz ze wzrostem zawartości tlenku grafenu w próbce wartość modułów nieznacznie maleje. Do dalszej analizy wybrano 3 % odkształcenie – jest to maksymalne odkształcenie, dla którego zależność G' i G'' od odkształcenia ścinającego jest jeszcze stała, a więc niezależna od odkształcenia. Na podstawie zależności G' i G'' od temperatury przy 3% odkształceniu (ryc. 27) można stwierdzić iż nie ma istotnych różnic w powyższych zależnościach dla próbek z czystym kolagenem jak i domieszkowanym tlenkiem grafenu w różnych proporcjach. Nagły spadek wartości G' i G'' w okolicy (34-36)°C jest spowodowana denaturacją próbki. Korzystając z metody przedstawionej na ryc. 5 można uznać, że temperatura denaturacji dla wszystkich próbek wynosi ok. 35°C. Wynik ten jest zgodny z wcześniej wspomnianymi doniesieniami literaturowymi [118,120]. Sporządzono również zależność G''/G' od temperatury (ryc.28), na podstawie której można również odczytać temperaturę denaturacji badanej próbki. Na podstawie tej zależności również można zauważyć, że tlenek grafenu nie wpływa na wartość stosunku G''/G' próbki, a co za tym idzie nie wpływa na konformację kolagenu. Za temperaturę denaturacji przyjęto miejsce skokowego wzrostu tego parametru i wyniosła ona ok. 36°C zarówno dla czystego kolagenu jak i próbek domieszkowanym tlenkiem grafenu, gdyż w tej specyficznej zależności okazał się problem z wyznaczeniem konkretnego maksimum. Zespół Safandowska i Pietrucha zbadały zależność modułu zachowawczego kolagenu rybiego w funkcji temperatury uzyskując znacznie większe wartości parametru.

Powodem może być zastosowanie innego układu pomiarowego – współosiowych cylindrów (nie jak w przypadku przedłożonej pracy układu płytka-płytki) lub zastosowanie innego stężenia badanego kolagenu [118].

Dodatkowo przeprowadzono pomiary rotacyjne wszystkich rodzajów próbek. Rozpoczęto od sporządzenia zależności lepkości oraz naprężenia ścinającego od szybkości ścinania (ryc. 29). Po jego przeanalizowaniu stwierdzono, że do dalszych pomiarów zastosowano szybkości ścinania równą 5s^{-1} . Jest to maksymalna wartość, przy której zależność lepkości od szybkości ścinania oraz zależność naprężenia ścinającego od szybkości ścinania ma charakter liniowy. Następnie przeanalizowano zależność lepkości dynamicznej od temperatury (ryc. 30). Na podstawie tej zależności stwierdzono, iż nie ma istotnych różnic w zależnościach dla próbek z czystym kolagenem jak i domieszkowanym 0,01%, 0,02% oraz 0,05% tlenkiem grafenu. Temperaturę denaturacji wyznaczono analogicznie do zależności lepkości właściwej od temperatury. Zarówno dla czystego kolagenu jak i domieszkowanego 0,01%, 0,02% i 0,05% tlenkiem grafenu wyniosła ok. $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, co daje wynik zgodny z wcześniejszymi doniesieniami [118,120]. Badania reometryczne potwierdzają brak wpływu tlenku grafenu na jego temperaturę denaturacji, co oznacza, że nie działa on destrukcyjnie na natywną strukturę kolagenu. Jest to istotne poz względem aktywności biologicznej kolagenu. Skoro tlenek grafenu nie niszczy natywnej konformacji kolagenu można domniemywać, że nie zmniejsza jej aktywności biologicznej co ma niebagatelne znaczenie pod kątem potencjalnych zastosowań medycznych.

Przeprowadzono również pomiary teksturometryczne w celu oceny wpływu tlenku grafenu na właściwości mechaniczne folii kolagenowych. Przeanalizowano siłę jaką należy zadziałać, aby zerwać próbkę, wydłużenie względne próbki w momencie zerwania oraz wytrzymałość próbek na zerwanie czyli stosunek siły rozrywającej próbkę do jej powierzchni przekroju poprzecznego. Na podstawie uzyskanych sił, podczas zrywania próbek oraz przeprowadzonej analizy statystycznej stwierdzono, że istnieje istotna różnica w sile zrywania filmów pomiędzy błonami z dodatkiem 0,02% i 0,05% tlenku grafenu, a błoną z samego kolagenu oraz błoną zawierającą 0,01% dodatek tlenku grafenu. Można również zauważyć istotne różnice w wartości naprężeń zrywających dla błon z czystego kolagenu oraz kolagenu domieszkowanego 0,05% tlenku grafenu oraz pomiędzy folią domieszkowaną 0,01% tlenku grafenu, a tymi

domieszkowanymi 0,02% i 0,05% tlenku grafenu. Największą wytrzymałość wykazały folie kolagenowe z domieszką 0,01% tlenku grafenu uzyskując wartość równą 23,9 MPa. Mniejsza wartość naprężenia zrywającego dla błon z 0,02% oraz 0,05% tlenku grafenu może być wynikiem zwiększenia sztywności, elastyczności bądź kruchości błon kolagenowych pod wpływem tlenku grafenu. Przeprowadzono również pomiar wydłużenia względnego próbek w momencie zrywania do wyjściowej długości próbek. Na podstawie uzyskanych wyników można sądzić, że różnica w wydłużeniu próbek kolagenowych z 0,05% tlenkiem grafenu istotnie różni się od pozostałych błon charakteryzując się przy tym największym wydłużeniem. Badania teksturometryczne takiego kompozytu złożonego z kolagenu pochodzącego z wołowego ścięgna Achillesa i tlenku grafenu przedstawił zespół Yue. Uzyskali wysokie wartości wytrzymałości filmów na rozciąganie mieszczące się w przedziale 77-124 MPa w zależności od rodzaju próbki. Wydłużenie względne natomiast mieściło się w przedziale (3,1-6,8) % [71].

Za pomocą analizatora wielkości cząstek przeprowadzono badanie wielkości cząstek kolagenu w ok. 1 % roztworze oraz w mieszaninie ok. 1 % kolagenu z 0,05% tlenkiem grafenu. Na podstawie ryc. 32 można zauważyć brak istotnych różnic pomiędzy próbkami samego kolagenu oraz tego domieszkowanego tlenkiem grafenu. Istnieje jedynie nieznaczna różnica w ilości największych cząstek pomiędzy próbką czystego kolagenu, a tą domieszkowaną tlenkiem grafenu. Może to oznaczać nieznaczny destrukcyjny wpływ tlenku grafenu na największe cząstki kolagenu. Dla roztworu kolagenu otrzymano średnią wielkości cząstek równą 109 μm , a dla roztworu kolagenu z dodatkiem 0,05% tlenku grafenu 88 μm . Analizie wielkości cząstek poddano również próbki zdenaturowane przez 1 godzinę w 40°C. Na podstawie przeprowadzonej analizy można stwierdzić kumulację cząstek większych ok. 300 μm i mniejszych ok. 40 μm , co jest oznaką denaturacji próbek. Większe cząstki to najprawdopodobniej tzw. kłębki zdenaturowanych łańcuchów kolagenowych. Natomiast nie zaobserwowano znaczącego wpływu GO na wielkość cząstek w badanych próbkach, a co za tym idzie na denaturację kolagenu. Cząsteczki kolagenu ludzkiego wahają się w granicach 10-300nm, co może sugerować, że w analizowanej próbce znajdują się bardziej złożone struktury obrazowane jako cząsteczki w skali mikro [130].

Dodatkowo w celu oceny morfologii wykorzystywanego tlenku grafenu wykonano zdjęcie suchego tlenku grafenu za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Zastosowano powiększenie 10 000, 25 000 oraz 50 000 krotne. Na podstawie uzyskanych zdjęć, można stwierdzić, że budowa tlenku grafenu jest dość jednorodna. Niewielkie odchylenia w grubości w teoretycznie płaskiej strukturze, mogą wynikać z formy sypkiej samej próbki, a więc możemy mieć do czynienia z wielowarstwową postacią tlenku grafenu– tlenkiem grafitu. W pracy zespołu Wang’a przedstawili obraz tlenku grafenu w 100 000 powiększeniu, a jego struktura została określona jako wielowarstwowa ze pomarszczonymi fragmentami [131].

Za pomocą metody termogravimetrycznej ustalono średnią zawartość suchej masy, pozostałości po suszeniu wyjściowego żelu kolagenowego i wyniosła ona $(2,9 \pm 0,3) \%$. Na tej podstawie oszacowano zawartość wody, która wyniosła $(97 \pm 10) \%$. Dane te mieszczą się w zakresie podanym przez producenta, który wynosi dla kolagenu $(3,2 - 5,5) \%$, natomiast dla wody $(91,1 - 96,1) \%$.

W dostępnej literaturze brak jest doniesień dotyczących badań wiskozymetrycznych, reometrycznych czy badania parametrów elektrycznych kompozytów złożonych z kolagenu i tlenku grafenu. Dowodzi to innowacyjności przedstawionych badań. Biorąc powyższą analizę pod uwagę, można uznać, że tlenek grafenu nie wpływa negatywnie na strukturę kolagenu pochodzącego ze skór tołpygi białej, co zostało niedawno potwierdzone za pomocą spektroskopii w podczerwieni. Wong i wsp. wywnioskowali, że dodatek tlenku grafenu nie wpływa negatywnie na drugorzędową strukturę kolagenu [71].

VI. WNIOSKI

1. Na podstawie przeprowadzonych pomiarów wiskozymetrycznych, reometrycznych, spektroskopii dielektrycznej oraz analizy wielkości cząstek, stwierdzono, że dodatek 0,05% tlenku grafenu nie wpływa na konformację kolagenu ze skór tołpygi białej czy to w postaci roztworu czy w stanie stałym.
2. Na podstawie badań parametrów elektrycznych, można stwierdzić, że w obszarze denaturacji kolagenu, analizowane próbki nie wykazywały znacznych różnic, natomiast można dostrzec różnicę w temperaturach związanych z degradacją próbki.
3. Porównując wytrzymałość folii kolagenowych, ustalono, że największą wytrzymałością na rozerwanie charakteryzuje się folia kolagenowa z 0,01% dodatkiem tlenku grafenu, natomiast największe względne wydłużenie próbki zaobserwowano dla folii kolagenowych z 0,05% tlenkiem grafenu.

VII. STRESZCZENIE

Celem niniejszej rozprawy była ocena wpływu tlenku grafenu na konformację makrocząsteczki kolagenu rybiego w postaci roztworu oraz w postaci stałej za pomocą:

- badań reologicznych,
- wiskozymetrycznych,
- analizy wielkości cząstek,
- spektroskopii dielektrycznej.

Dodatkowym celem była analiza wytrzymałościowa błon kolagenowych za pomocą teksturometru, która umożliwiła ocenę wytrzymałości materiału w postaci stałej.

W pracy omówiono podstawowe właściwości, zastosowanie oraz otrzymywanie zarówno kolagenu, ze szczególnym uwzględnieniem kolagenu rybiego, jak i tlenku grafenu. Przedstawiono obecny stan wiedzy na temat oddziaływań pomiędzy tlenkiem grafenu, a kolagenem oraz potencjalne zastosowania takiego kompozytu. Zamieszczono również podstawowe informacje o zastosowanych technikach badawczych. Przedstawiono wyniki badań oraz przeprowadzono analizę statystyczną, tam gdzie była taka możliwość. W niniejszej pracy przeanalizowano wpływ temperatury na takie parametry jak: lepkość właściwa, moduł zachowawczy, moduł stratności, lepkość dynamiczna, przewodność elektryczna właściwa, tangens kąta strat dielektrycznych oraz przenikalność elektryczna. Dokonano również analizy wielkości cząstek oraz wytrzymałości folii kolagenowych na zerwanie. Dodatkowo przeprowadzono analizę mikrostrukturalną powierzchni tlenku grafenu. Następnie uzyskane wyniki poddano dyskusji. Na podstawie zrealizowanych pomiarów można stwierdzić, że tlenek grafenu w analizowanych proporcjach nie wpływa na konformację kolagenu ze skór tołpygi białej.

VIII. ABSTRACT

The aim of this dissertation was to evaluate the effect of graphene oxide on the conformation of the fish collagen macromolecule in the form of a solution and in a solid form using:

- rheological tests,
- viscometric,
- particle size analysis,
- dielectric spectroscopy.

An additional goal was the strength analysis of collagen membranes, using a texturometer, which allowed the strength of the solid material to be assessed.

The paper discusses the basic properties, application and production of both, collagen, with particular emphasis on fish collagen and graphene oxide. The present state of knowledge on the interactions between graphene oxide and collagen as well as potential applications of such a composite was presented. Basic information on the research techniques used is also included. The results of the research were presented and the statistical analysis was carried out, where it was possible. In this study, the influence of temperature on parameters such as: specific viscosity, storage modulus, loss modulus, dynamic viscosity, specific conductivity, tangent of the dielectric loss angle and electric permittivity was analyzed. The analysis of particle size and tensile strength of collagen foils was also performed. Additionally, microstructural analysis of the graphene oxide surface was performed. Then the obtained results were discussed. On the basis of the performed measurements, it can be concluded that graphene oxide in the analyzed proportions does not affect on the conformation of collagen from silver carp skins.

IX. SPIS TABEL

Tabela 1: Zalety i ograniczenia niektórych wybitnych opublikowanych badań dotyczących funkcjonalizowanych nanocząstek tlenku grafenu [56].....	26
Tabela 2: Średnie wartości siły, przy których nastąpiło zerwanie próbek.....	70
Tabela 3: Wartości prawdopodobieństw testu Shapiro-Wilka.....	71
Tabela 4: Wartości prawdopodobieństwa porównania wielokrotnego testu Kruskala-Wallisa.....	71
Tabela 5: Wartości wytrzymałości próbki na rozerwanie (TS) filmów kolagenowych czystych oraz domieszkowanych GO.....	72
Tabela 6: Wartości prawdopodobieństw testu Shapiro-Wilka.....	72
Tabela 7: Wartości prawdopodobieństwa porównania wielokrotnego testu Kruskala-Wallisa.....	73
Tabela 8: Wartości średnie względnego wydłużenia filmów kolagenowych.....	73
Tabela 9: Wartości prawdopodobieństw testu Shapiro-Wilka.....	74
Tabela 10: Wartości prawdopodobieństwa porównania wielokrotnego testu Kruskala-Wallisa.....	74
Tabela 11: Rozkład wielkości średnic cząstek kolagenu czystego i domieszkowanego tlenkiem grafenu oraz wielkości samego GO w roztworze wodnym.....	76
Tabela 12: Rozkład wielkości średnic cząstek kolagenu zdenaturowanego czystego i domieszkowanego tlenkiem grafenu.....	77

X. SPIS RYCIN

Ryc. 1: Model Lerfa- Klinowskiego [43].....	18
Ryc. 2: Model Szabó-Dékány [44].....	19
Ryc. 3: Metoda Hummers'a przedstawiona w schematyczny sposób [42].....	23
Ryc. 4: Wiskozymetr Ubbelohde [77].....	36
Ryc. 5: Sposób odczytu temperatury denaturacji.....	37
Ryc. 6: Układ pomiarowy do badań wiskozymetrycznych.....	45
Ryc. 7: Układ pomiarowy do spektroskopii dielektrycznej.....	46
Ryc. 8: Celka pomiarowa wraz z próbką do badań spektroskopii dielektrycznej.....	47
Ryc. 9: Reometr. Zbliżenie na wybrany układ pomiarowy płytka-płytki.....	48
Ryc. 10: Przykładowe badanie wytrzymałości próbki na rozciąganie.....	49
Ryc. 11: Grubościomierz.....	51
Ryc. 12: Wagosuszarka.....	52
Ryc. 13: Zależność lepkości właściwej od temperatury.....	54
Ryc. 14: Zależność przewodności elektrycznej właściwej od temperatury przy częstotliwości 100 Hz.....	55
Ryc. 15: Zależność przewodności elektrycznej właściwej od temperatury przy częstotliwości 1 kHz.....	56
Ryc. 16: Zależność przewodności elektrycznej właściwej od temperatury przy częstotliwości 10 kHz.....	56
Ryc. 17: Zależność współczynnika strat dielektrycznych od temperatury dla 100 Hz. .	57
Ryc. 18: Zależność współczynnika strat dielektrycznych od temperatury dla 1 kHz. .	58
Ryc. 19: Zależność współczynnika strat dielektrycznych od temperatury dla 10 kHz. .	59
Ryc. 20: Zależność rzeczywistej składowej przenikalności elektrycznej od temperatury dla 100 Hz.....	60
Ryc. 21: Zależność składowej rzeczywistej przenikalności elektrycznej od temperatury dla 1 kHz.....	61
Ryc. 22: Zależność składowej rzeczywistej przenikalności elektrycznej od temperatury dla 10 kHz.....	61
Ryc. 23: Zależność składowej urojonej przenikalności elektrycznej od temperatury dla 100 Hz.....	62

Ryc. 24: Składowa urojona przenikalności elektrycznej od temperatury dla 1 kHz.....	63
Ryc. 25: Składowa urojona przenikalności elektrycznej od temperatury dla 10 kHz....	63
Ryc. 26: Zależność G' i G'' od odkształcenia ścinającego.....	65
Ryc. 27: Zależność G' i G'' od temperatury przy 3% odkształceniu.....	66
Ryc. 28: Zależność $\tan \delta$ od temperatury.....	67
Ryc. 29: Zależność lepkości oraz naprężenia ścinającego od szybkości ścinania.....	68
Ryc. 30: Zależność lepkości od temperatury dla szybkości ścinania równej 5 s^{-1}	69
Ryc. 31: Przykładowa zależność siły od wydłużenia próbki błony kolagenowej z 0,05% GO podczas rozciągania próbek.....	70
Ryc. 32: Zależność rozkładu (R) i rozkładu skumulowanego (SR) wielkości cząsteczek od średnicy cząsteczek.....	75
Ryc. 33: Zależność rozkładu wielkości cząstek od średnicy cząstek dla próbek zdenaturowanych.....	76
Ryc. 34: Struktura tlenku grafenu w powiększeniu 10 000 krotnym.....	78
Ryc. 35: Struktura suchego GO w powiększeniu 25 000 krotnym.....	78
Ryc. 36: Struktura suchego GO w powiększeniu 50 000 krotnym.....	79

XI. LITERATURA

- [1] K.A. Czubak, H.M. Żbikowska, Struktura , funkcja i znaczenie biomedyczne kolagenów Structure , function and biomedical significance of collagens, *Ann. Acad. Med. Siles.* 64 (2014) 245–254.
- [2] Caruso G., Fishery Wastes and By-products: A Resource to Be Valorised, *J. Fish. Sci.* 9 (2015) 080–083.
- [3] M. Raman, K. Gopakumar, Fish Collagen and its Applications in Food and Pharmaceutical Industry: A Review, *EC Nutr.* 12 (2018) 752–767.
- [4] H. Jafari, A. Lista, M.M. Siekapen, P. Ghaffari-Bohlouli, L. Nie, H. Alimoradi, A. Shavandi, Fish collagen: Extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering, *Polymers (Basel)*. 12 (2020) 1–37. <https://doi.org/10.3390/polym12102230>.
- [5] D. Liu, M. Nikoo, G. Boran, P. Zhou, J.M. Regenstein, Collagen and gelatin, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 6 (2015) 527–557. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-031414-111800>.
- [6] A. Deb, N.G. Andrews, V. Raghavan, Natural polymer functionalized graphene oxide for co-delivery of anticancer drugs: In-vitro and in-vivo, *Int. J. Biol. Macromol.* 113 (2018) 515–525. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.153>.
- [7] Z.M. Wright, A.M. Arnold, B.D. Holt, K.E. Eckhart, S.A. Sydlik, Functional Graphenic Materials, Graphene Oxide, and Graphene as Scaffolds for Bone Regeneration, *Regen. Eng. Transl. Med.* 5 (2019) 190–209. <https://doi.org/10.1007/s40883-018-0081-z>.
- [8] S. Liu, C. Zhou, S. Mou, J. Li, M. Zhou, Y. Zeng, C. Luo, J. Sun, Z. Wang, W. Xu, Biocompatible graphene oxide–collagen composite aerogel for enhanced stiffness and in situ bone regeneration, *Mater. Sci. Eng. C.* 105 (2019) 110137. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110137>.
- [9] R. Deepachitra, V. Ramnath, T.P. Sastry, Graphene oxide incorporated collagen–fibrin biofilm as a wound dressing material, *RSC Adv.* 4 (2014) 62717–62727. <https://doi.org/10.1039/C4RA10150B>.
- [10] D. Żelaszczyk, A. Waszkielewicz, H. Marona, Kolagen – struktura oraz zastosowanie w kosmetologii i medycynie estetycznej, *Estetologia Med. i Kosmetologia.* (2012) 14–20. <https://doi.org/10.14320/emk.2012.003>.

- [11] A. Sionkowska, Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review, *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 1254–1276. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.05.003>.
- [12] Monika Morąg, Agnieszka Burza, Budowa, właściwości i funkcje kolagenu oraz elastyny w skórze, *J. Heal. Study Med.* (2017) 77–100.
- [13] E. Bańkowski, *Biochemia. Podręcznik dla studentów uczelni medycznych*, Edra Urban & Partner, Wrocław, 2020.
- [14] J. Brinckmann, Collagens at a glance, *Top. Curr. Chem.* 247 (2005) 1–6. <https://doi.org/10.1007/b103817>.
- [15] A. Kuzan, A. Chwiłkowska, Heterogeneity and functions of collagen in arteries, *Pol. Merkur. Lekarski.* 31 (2011) 111–3.
- [16] K. Gelse, E. Pöschl, T. Aigner, Collagens - Structure, function, and biosynthesis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003) 1531–1546. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>.
- [17] M.K. Gordon, R.A. Hahn, Collagens [review], *Cell Tissue Res.* 339 (2010) 247–257. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0844-4.Collagens>.
- [18] S. Ricard-Blum, F. Ruggiero, The collagen superfamily: From the extracellular matrix to the cell membrane, *Pathol. Biol.* 53 (2005) 430–442. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.12.024>.
- [19] M. Banaś, K. Pietrucha, Typy i struktura białka kolagenowego, *Zesz. Nauk. Politech. Łódzkiej. Chem. Spożywcza i Biotechnol.* (2009) 93–103.
- [20] J. Gauza, Marlena; Kubisz, Leszek; Przybylski, Właściwości preparatów kolagenowych ze skór ryb pozyskiwanych metodą kwaśnej hydratacji, *Now. Lek.* 79 (2010) 157–162.
- [21] G. Krasnowska, Charakterystyka i wykorzystanie białek kolagenowych, *Med. Wet.* 61 (2005) 271–274.
- [22] M. Gauza-Włodarczyk, L. Kubisz, S. Mielcarek, D. Włodarczyk, Comparison of thermal properties of fish collagen and bovine collagen in the temperature range 298–670 K, *Mater. Sci. Eng. C.* 80 (2017) 468–471. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.012>.
- [23] W. Liu, Z. Tian, C. Li, G. Li, Thermal denaturation of fish collagen in solution: A calorimetric and kinetic analysis, *Thermochim. Acta.* 581 (2014) 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2014.02.012>.

- [24] S. Yunoki, T. Suzuki, M. Takai, Stabilization of Low Denaturation Temperature Collagen from Fish by Physical Cross-Linking Methods, *J. Biosci. Bioeng.* 96 (2003) 575–577. <https://doi.org/10.1263/jbb.96.575>.
- [25] Y. Li, L. Yang, S. Wu, J. Chen, H. Lin, Structural, functional, rheological, and biological properties of the swim bladder collagen extracted from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), *Lwt.* 153 (2022) 112518. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112518>.
- [26] O. Kaewdang, S. Benjakul, T. Kaewmanee, H. Kishimura, Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), *Food Chem.* 155 (2014) 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.076>.
- [27] Z. Dzierżewicz, A. Turek, J. Kasperczyk, Zastosowanie kolagenu w technologii postaci leku : osiągnięcia i perspektywy, *Chemik.* 64 (2010) 229–237.
- [28] M. Łączkowska, D. Gendaszewska, E. Grzesiak, M. Lasoń, Przegląd metod ekstrakcji kolagenu z odpadów skórzanych Methods of collagen extraction from leather wastes – a review, *Technol. i Jakość Wyr.* 61 (2016) 74–79.
- [29] C.H. Lee, A. Singla, Y. Lee, Biomedical applications of collagen, *Int. J. Pharm.* 221 (2001) 1–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00691-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00691-3).
- [30] T.H. Silva, J. Moreira-Silva, A.L.P. Marques, A. Domingues, Y. Bayon, R.L. Reis, Marine origin collagens and its potential applications, *Mar. Drugs.* 12 (2014) 5881–5901. <https://doi.org/10.3390/md12125881>.
- [31] E. Rezvani Ghomi, N. Nourbakhsh, M. Akbari Kenari, M. Zare, S. Ramakrishna, Collagen-based biomaterials for biomedical applications, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 109 (2021) 1986–1999. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34881>.
- [32] K. Dybka, P. Walczak, Collagen hydrolysates as a new diet supplement, *Food Chem. Biotechnol.* 73 (2009) 83–92.
- [33] O. El Blidi, N. El Omari, A. Balahbib, R. Ghchime, N. El Menyiy, A. Ibrahimi, K. Ben Kaddour, A. Bouyahya, O. Chokairi, M. Barkiyou, Extraction methods, characterization and biomedical applications of collagen: A review, *Biointerface Res. Appl. Chem.* 11 (2021) 13587–13613. <https://doi.org/10.33263/BRIAC115.1358713613>.
- [34] X. Zhao, W. Song, S. Liu, L. Ren, Corneal regeneration by utilizing collagen based materials, *Sci. China Chem.* 59 (2016) 1548–1553. <https://doi.org/10.1007/s11426-016-0248-6>.

- [35] K.D. Saraswati, P. Widiyanti, D. Gustiono, J. Setiawan, PLGA-collagen composite synthesis with the antibacterial addition of *Jatropha curcas* L. leaf extract as absorbable surgical suture candidate, *J. Biomimetics, Biomater. Biomed. Eng.* 32 (2017) 90–97. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JBBBE.32.90>.
- [36] S.S. Mathew-Steiner, S. Roy, C.K. Sen, Collagen in wound healing, *Bioengineering*. 8 (2021). <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063>.
- [37] R. Santhanam, M.A.P. Rameli, A. Al Jeffri, W.I.W. Ismail, Bovine Based Collagen Dressings in Wound Care Management, *J. Pharm. Res. Int.* 32 (2020) 48–63. <https://doi.org/10.9734/jpri/2020/v32i3330949>.
- [38] A. Sionkowska, K. Adamiak, K. Musial, M. Gadomska, Collagen based materials in cosmetic applications: A review, *Materials (Basel)*. 13 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.3390/MA13194217>.
- [39] M.I. Avila Rodríguez, L.G. Rodríguez Barroso, M.L. Sánchez, Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications, *J. Cosmet. Dermatol.* 17 (2018) 20–26. <https://doi.org/10.1111/jocd.12450>.
- [40] J. Zhao, L. Liu, F. Li, *Graphene Oxide: Physics and Applications*, Springer, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-662-44829-8_1.
- [41] F. Mouhat, F.X. Coudert, M.L. Bocquet, Structure and chemistry of graphene oxide in liquid water from first principles, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15381-y>.
- [42] W. Gao, *Graphene Oxide: Reduction Recipes, Spectroscopy, and Applications*, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15500-5_1.
- [43] D.R. Dreyer, S. Park, C.W. Bielawski, R.S. Ruoff, The chemistry of graphene oxide, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 228–240. <https://doi.org/10.1039/B917103G>.
- [44] T. Szabó, O. Berkesi, P. Forgó, K. Josepovits, Y. Sanakis, D. Petridis, I. Dékány, Evolution of Surface Functional Groups in a Series of Progressively Oxidized Graphite Oxides, *Chem. Mater.* 18 (2006) 2740–2749. <https://doi.org/10.1021/cm060258+>.
- [45] Z.U. Khan, A. Kausar, H. Ullah, A. Badshah, W.U. Khan, A review of graphene oxide, graphene buckypaper, and polymer/graphene composites: Properties and fabrication techniques, *J. Plast. Film Sheeting*. 32 (2016) 336–379. <https://doi.org/10.1177/8756087915614612>.

- [46] X.-M. Huang, L.-Z. Liu, S. Zhou, J.-J. Zhao, Physical properties and device applications of graphene oxide, *Front. Phys.* 15 (2020) 33301. <https://doi.org/10.1007/s11467-019-0937-9>.
- [47] J. Phiri, L.-S. Johansson, P. Gane, T. Maloney, A comparative study of mechanical, thermal and electrical properties of graphene-, graphene oxide- and reduced graphene oxide-doped microfibrillated cellulose nanocomposites, *Compos. Part B Eng.* 147 (2018) 104–113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2018.04.018>.
- [48] S. Jaworski, B. Strojny-Cieślak, M. Wierzbicki, M. Kutwin, E. Sawosz, M. Kamaszewski, A. Matuszewski, M. Sosnowska, J. Szczepaniak, K. Daniluk, A. Lange, M. Pruchniewski, K. Zawadzka, M. Łojkowski, A. Chwalibog, Comparison of the toxicity of pristine graphene and graphene oxide, using four biological models, *Materials (Basel)*. 14 (2021). <https://doi.org/10.3390/ma14154250>.
- [49] S. Zhang, H. Wang, J. Liu, C. Bao, Measuring the specific surface area of monolayer graphene oxide in water, *Mater. Lett.* 261 (2020) 127098. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.127098>.
- [50] T. V. Patil, D.K. Patel, S.D. Dutta, K. Ganguly, K.T. Lim, Graphene oxide-based stimuli-responsive platforms for biomedical applications, *Molecules*. 26 (2021) 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules26092797>.
- [51] A. Raslan, L. Saenz del Burgo, J. Ciriza, J. Luis Pedraz, Graphene oxide and reduced graphene oxide-based scaffolds in regenerative medicine, *Int. J. Pharm.* 580 (2020) 119226. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119226>.
- [52] L. Sun, Structure and synthesis of graphene oxide, *Chinese J. Chem. Eng.* 27 (2019) 2251–2260. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2019.05.003>.
- [53] J. Chen, B. Yao, C. Li, G. Shi, An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide, *Carbon N. Y.* 64 (2013) 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.07.055>.
- [54] J. Wu, L. Jia, Y. Zhang, Y. Qu, B. Jia, D.J. Moss, Graphene Oxide for Integrated Photonics and Flat Optics, *Adv. Mater.* 33 (2021). <https://doi.org/10.1002/adma.202006415>.
- [55] N. Nowroozi, S. Faraji, A. Nouralishahi, M. Shahrousvand, Biological and structural properties of graphene oxide/curcumin nanocomposite incorporated chitosan as a scaffold for wound healing application, *Life Sci.* 264 (2021) 118640. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118640>.

- [56] M. Hoseini-Ghahfarokhi, S. Mirkiani, N. Mozaffari, M.A. Abdolahi Sadatlu, A. Ghasemi, S. Abbaspour, M. Akbarian, F. Farjadian, M. Karimi, Applications of graphene and graphene oxide in smart drug/gene delivery: Is the world still flat?, *Int. J. Nanomedicine*. 15 (2020) 9469–9496. <https://doi.org/10.2147/IJN.S265876>.
- [57] K. Yang, J. Wan, S. Zhang, B. Tian, Y. Zhang, Z. Liu, The influence of surface chemistry and size of nanoscale graphene oxide on photothermal therapy of cancer using ultra-low laser power, *Biomaterials*. 33 (2012) 2206–2214. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.064>.
- [58] M. Zhang, F. Wu, W. Wang, J. Shen, N. Zhou, C. Wu, Multifunctional Nanocomposites for Targeted, Photothermal, and Chemotherapy, *Chem. Mater*. 31 (2019) 1847–1859. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.8b00934>.
- [59] Z. Rao, H. Ge, L. Liu, C. Zhu, L. Min, M. Liu, L. Fan, D. Li, Carboxymethyl cellulose modified graphene oxide as pH-sensitive drug delivery system, *Int. J. Biol. Macromol*. 107 (2018) 1184–1192. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.096>.
- [60] J. Lin, X. Chen, P. Huang, Graphene-based nanomaterials for bioimaging, *Adv. Drug Deliv. Rev*. 105 (2016) 242–254. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.013>.
- [61] K.H. Hussein, H.N. Abdelhamid, X. Zou, H.M. Woo, Ultrasonicated graphene oxide enhances bone and skin wound regeneration, *Mater. Sci. Eng. C*. 94 (2019) 484–492. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.051>.
- [62] M. Soliman, A.A. Sadek, H.N. Abdelhamid, K. Hussein, Graphene oxide-cellulose nanocomposite accelerates skin wound healing, *Res. Vet. Sci*. 137 (2021) 262–273. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.05.013>.
- [63] S.R. Ur Rehman, R. Augustine, A.A. Zahid, R. Ahmed, M. Tariq, A. Hasan, Reduced graphene oxide incorporated gelma hydrogel promotes angiogenesis for wound healing applications, *Int. J. Nanomedicine*. 14 (2019) 9603–9617. <https://doi.org/10.2147/IJN.S218120>.
- [64] X.T. Liu, X.Y. Mu, X.L. Wu, L.X. Meng, W.B. Guan, Y.Q. Ma, H. Sun, C.J. Wang, X.F. Li, Toxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and reduced graphene oxide to zebrafish embryos, *Biomed. Environ. Sci*. 27 (2014) 676–683. <https://doi.org/10.3967/bes2014.103>.
- [65] S. Liang, S. Xu, D. Zhang, J. He, M. Chu, Reproductive toxicity of nanoscale graphene oxide in male mice, *Nanotoxicology*. 9 (2015) 92–105. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.893380>.

- [66] W. An, Y. Zhang, X. Zhang, K. Li, Y. Kang, S. Akhtar, X. Sha, L. Gao, Ocular toxicity of reduced graphene oxide or graphene oxide exposure in mouse eyes, *Exp. Eye Res.* 174 (2018) 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.05.024>.
- [67] Y.H. Kim, M.S. Jo, J.K. Kim, J.H. Shin, J.E. Baek, H.S. Park, H.J. An, J.S. Lee, B.W. Kim, H.P. Kim, K.H. Ahn, K.S. Jeon, S.M. Oh, J.H. Lee, T. Workman, E.M. Faustman, I.J. Yu, Short-term inhalation study of graphene oxide nanoplates, *Nanotoxicology*. 12 (2018) 224–238. <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1431318>.
- [68] I. Dudek, M. Skoda, A. Jarosz, D. Szukiewicz, The Molecular Influence of Graphene and Graphene Oxide on the Immune System Under In Vitro and In Vivo Conditions, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 64 (2016) 195–215. <https://doi.org/10.1007/s00005-015-0369-3>.
- [69] S. Das, S. Singh, V. Singh, D. Joung, J.M. Dowding, D. Reid, J. Anderson, L. Zhai, S.I. Khondaker, W.T. Self, S. Seal, Oxygenated functional group density on graphene oxide: Its effect on cell toxicity, *Part. Part. Syst. Charact.* 30 (2013) 148–157. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201200066>.
- [70] S.H.M. Wong, S.S. Lim, T.J. Tiong, P.L. Show, H.F.M. Zaid, H.S. Loh, Preliminary in vitro evaluation of chitosan–graphene oxide scaffolds on osteoblastic adhesion, proliferation, and early differentiation, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms21155202>.
- [71] C. Yue, C. Ding, X. Du, Y. Wang, J. Su, B. Cheng, Self-assembly of collagen fibrils on graphene oxide and their hybrid nanocomposite films, *Int. J. Biol. Macromol.* 193 (2021) 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.098>.
- [72] P. De Marco, S. Zara, M. Colli, M. Radunovic, V. Lazovic, V. Ettorre, A. Di Crescenzo, A. Piattelli, A. Fontana, Graphene oxide improves the biocompatibility of collagen membranes in an in vitro model of human primary gingival fibroblasts, *Biomed. Mater.* 12 (2017). <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa7907>.
- [73] N.A. Zakharov, Z.A. Ezhova, E.M. Koval, A.G. Tkachev, N.T. Kuznetsov, Calcium hydroxyapatite in hydroxyapatite/graphene oxide/collagen nanohybrids, *Russ. J. Inorg. Chem.* 60 (2015) 1467–1480. <https://doi.org/10.1134/S0036023615120268>.
- [74] M. Radunovic, M. De Colli, P. De Marco, C. Di Nisio, A. Fontana, A. Piattelli, A. Cataldi, S. Zara, Graphene oxide enrichment of collagen membranes improves DPSCs differentiation and controls inflammation occurrence, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 105 (2017) 2312–2320. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36085>.

- [75] R. Senthil, R. Berly, T. Bhargavi Ram, N. Gobi, Electrospun poly(vinyl) alcohol/collagen nanofibrous scaffold hybridized by graphene oxide for accelerated wound healing, *Int. J. Artif. Organs.* 41 (2018) 467–473. <https://doi.org/10.1177/0391398818775949>.
- [76] B. Jayavardhini, Y.R. Pravin, C. Kumar, R. Murugesan, S.W. Vedakumari, Graphene oxide impregnated sericin/collagen scaffolds – Fabrication and characterization, *Mater. Lett.* 307 (2022) 131060. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2021.131060>.
- [77] W.-M. Kulicke, C. Clasen, *Viscosimetry of Polymers and Polyelectrolytes*, Springer Berlin Heidelberg, 2004.
- [78] W. Grzegorz, Wznaczenie wpływu temperatury na lepkość dynamiczną biopaliw roślinnych, *Inżynieria Rol.* 10 (2008) 277–282.
- [79] Y. Li, Y. Li, Z. Du, G. Li, Comparison of dynamic denaturation temperature of collagen with its static denaturation temperature and the configuration characteristics in collagen denaturation processes, *Thermochim. Acta.* 469 (2008) 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2008.01.006>.
- [80] H. Li, B.L. Liu, L.Z. Gao, H.L. Chen, Studies on bullfrog skin collagen, *Food Chem.* 84 (2004) 65–69. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00167-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00167-5).
- [81] A. Sionkowska, J. Kozłowska, M. Skorupska, M. Michalska, Isolation and characterization of collagen from the skin of *Brama australis*, *Int. J. Biol. Macromol.* 80 (2015) 605–609. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.032>.
- [82] Ł. Macioszek, K. Mazur, Badanie właściwości olejów napędowych metodą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej, *PAK.* 60 (2014) 626–628.
- [83] J. Dumańska-Kulpa, I. Grzybowska, Pomiary przewodności elektrycznej właściwej elektrolitów metodą podstawową, *Metrol. Biul. Głównego Urzędu Miar.* 6 (2011) 31–37.
- [84] M. Gauza, L. Kubisz, Effect of water content on electrical conductivity of fish skin collagen, *J. Non. Cryst. Solids.* 357 (2011) 686–690. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2010.07.032>.
- [85] M. Gauza, L. Kubisz, Percolation thresholds in temperature dependence of electric conductivity of collagen films, *Polish J. Med. Phys. Eng.* 15 (2009) 183–191. <https://doi.org/10.2478/v10013-009-0018-4>.
- [86] A. Vedadghavami, F. Minooei, M. Hossein, S. Khetani, A. Rezaei, S. Mashayekhan, A. Sanati-nezhad, Manufacturing of hydrogel biomaterials with

- controlled mechanical properties for tissue engineering applications, *Acta Biomater.* 62 (2017) 42–63. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.07.028>.
- [87] T. Kiljański, M. Dziubiński, J. Sęk, K. Antosik, Wykorzystanie pomiarów właściwości reologicznych płynów w praktyce inżynierskiej, *EKMA Krzysztof Antosik*, 2009. <http://cybra.lodz.pl/Content/16817>.
- [88] T. Kiljański, Metody pomiaru własności sprężystolepkich, *Inżynieria i Apar. Chem.* 53 (2014) 344–346.
- [89] M. Paszkowski, P. Kowaleski, T. Leśniewski, Badania właściwości reologicznych smarów plastycznych zagęszczanych 12-hydroksystearynianem litu w zakresie liniowej i nieliniowej lepkośćsprężystości, *Tribologia.* 4 (2012) 183–194.
- [90] T. Zheng, P. Tang, L. Shen, H. Bu, G. Li, Rheological behavior of collagen/chitosan blended solutions, *J. Appl. Polym. Sci.* 138 (2021) 50840. <https://doi.org/10.1002/app.50840>.
- [91] Z. Min, C. Yihui, L. Guoying, D. Zongliang, Rheological properties of fish skin collagen solution: Effects of temperature and concentration, *Korea-Australia Rheol. J.* 22 (2010) 119–127.
- [92] Z. Tian, L. Duan, L. Wu, L. Shen, G. Li, Rheological properties of glutaraldehyde-crosslinked collagen solutions analyzed quantitatively using mechanical models, *Mater. Sci. Eng. C.* 63 (2016) 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.02.047>.
- [93] T.K. Tenchurin, S.I. Belousov, Y.I. Kiryukhin, L.P. Istranov, E. V Istranova, A.D. Shepelev, V.G. Mamagulashvili, R.A. Kamyshinsky, S.N. Chvalun, Control on rheological behavior of collagen 1 dispersions for efficient electrospinning, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 107A (2018) 312–318. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36459>.
- [94] K. Dolik, M.S. Kubiak, Instrumentalny Test Analizy Profilu Tekstury, *LAB Lab. Apar. Badania.* 22 (2017) 23–28.
- [95] L.C. Lv, Q.Y. Huang, W. Ding, X.H. Xiao, H.Y. Zhang, L.X. Xiong, Fish gelatin: The novel potential applications, *J. Funct. Foods.* 63 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103581>.
- [96] E. Jamróz, A. Para, Folie biopolimerowe na bazie kompleksów furcelleranu z białkami, *EPISTEME.* 15 (2012) 97–105.
- [97] X. Chen, L. Zhou, H. Xu, M. Yamamoto, M. Shinoda, I. Tada, S. Minami, K. Urayama, H. Yamane, The structure and properties of natural sheep casing and

- artificial films prepared from natural collagen with various crosslinking treatments, *Int. J. Biol. Macromol.* 135 (2019) 959–968. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.182>.
- [98] D. Ma, Y. Jiang, S. Ahmed, W. Qin, Y. Liu, Physical and antimicrobial properties of edible films containing *Lactococcus lactis*, *Int. J. Biol. Macromol.* 141 (2019) 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.006>.
- [99] L. Yang, J. Yang, X. Qin, J. Kan, F. Zeng, J. Zhong, Ternary composite films with simultaneously enhanced strength and ductility: Effects of sodium alginate-gelatin weight ratio and graphene oxide content, *Int. J. Biol. Macromol.* 156 (2020) 494–503. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.057>.
- [100] K.K. Peh, C.F. Wong, Polymeric films as vehicle for buccal delivery: swelling, mechanical, and bioadhesive properties., *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2 (1999) 53–61.
- [101] S. Van Vlierberghe, G.J. Graulus, S.K. Samal, I. Van Nieuwenhove, P. Dubruel, Porous hydrogel biomedical foam scaffolds for tissue repair, Woodhead Publishing Limited, 2014. <https://doi.org/10.1533/9780857097033.2.335>.
- [102] M. Andonegi, K. Las Heras, E. Santos-Vizcaíno, M. Igartua, R.M. Hernandez, K. de la Caba, P. Guerrero, Structure-properties relationship of chitosan/collagen films with potential for biomedical applications, *Carbohydr. Polym.* 237 (2020) 116159. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116159>.
- [103] Baliński Andrzej, Analiza wielkości cząstek, *Ann. Acad. Paedagog. Cracoviensis.* 32 (2006) 1–6.
- [104] O. Scheibelhofer, M.O. Besenhard, M. Piller, J.G. Khinast, Comparing particle size distributions of an arbitrary shape, *Powder Technol.* 294 (2016) 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.02.028>.
- [105] J. Rakowska, K. Radwan, Z. Śłosorz, Problemy oceny wielkości i kształtu ziaren materiałów sypkich, *Bezpieczeństwo i Tech. Pożarnicza.* 3 (2012) 59–64.
- [106] U. Frank, S.E. Wawra, L. Pflug, W. Peukert, Multidimensional Particle Size Distributions and Their Application to Nonspherical Particle Systems in Two Dimensions, *Part. Part. Syst. Charact.* 36 (2019) 1–9. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201800554>.
- [107] D. Krawczykowski, Zastosowanie dyfrakcyjnej analizy laserowej do kontroli uziarnienia produktów przeróbki rud metali, *Inżynieria Miner.* 18 (2017) 233–240.
- [108] K. Sakai, Y. Hashimoto, S. Baba, A. Nishiura, N. Matsumoto, Effects on bone regeneration when collagen model polypeptides are combined with various sizes

- of alpha-tricalcium phosphate particles, *Dent. Mater. J.* 30 (2011) 913–922. <https://doi.org/10.4012/dmj.2011-126>.
- [109] M.T. Calejo, A.J. Almeida, A.I. Fernandes, Exploring a new jellyfish collagen in the production of microparticles for protein delivery, *J. Microencapsul.* 29 (2012) 520–531. <https://doi.org/10.3109/02652048.2012.665089>.
- [110] G. Gilewska, Przydatność różnych technik obrazowania struktur biologicznych wykorzystujących elektronowy mikroskop skaningowy, *Pr. Inst. Elektrotechniki Politech. Białostockiej.* 244 (2010) 161–169.
- [111] J. Filipowska, J. Lewandowska-Łańcucka, A. Gilarska, Ł. Niedźwiedzki, M. Nowakowska, In vitro osteogenic potential of collagen/chitosan-based hydrogels-silica particles hybrids in human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell cultures, *Int. J. Biol. Macromol.* 113 (2018) 692–700. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.161>.
- [112] S. Bagheri-Khoulenjani, M. Etrati-Khosroshahi, H. Mirzadeh, Particle size and distribution modelling of nanohydroxyapatite-in-gelatin nanocomposite microspheres by surface response method, *Iran. Polym. J. (English Ed.)* 19 (2010) 743–755.
- [113] Y. Zhang, Z. Chen, X. Liu, J. Shi, H. Chen, Y. Gong, SEM, FTIR and DSC Investigation of Collagen Hydrolysate Treated Degraded Leather, *J. Cult. Herit.* 48 (2021) 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2020.11.007>.
- [114] S. Das, R. Ghadai, A. Krishna, A. Trivedi, R. Bhujel, S. Rai, I. Shivakoti, K. Kalita, A comparative analysis of structural and electrochemical properties of graphene oxide (Go) and reduced graphene oxide (rgo) synthesized by using hummer's and modified hummer's method, *Iran. J. Mater. Sci. Eng.* 17 (2020) 25–32. <https://doi.org/10.22068/ijmse.17.4.25>.
- [115] A. Czerniecka-Kubicka, G. Neilsen, M.S. Dickson, B.F. Woodfield, M. Janus-Kubiak, L. Kubisz, I. Zarzyka, W. Zielecki, M. Skotnicki, D. Hojan-Jeziarska, M. Pyda, Vibrational heat capacity of silver carp collagen, *Int. J. Biol. Macromol.* 163 (2020) 833–841. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.051>.
- [116] I. Malaescu, C.N. Marin, Dependence on the temperature of the activation energy in the dielectric relaxation processes for ferrofluids in low-frequency field, *J. Magn. Magn. Mater.* 252 (2002) 68–70.
- [117] M. Lisowski, *Pomiary rezystywności i przenikalności elektrycznej dielektryków stałych*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 2004.

- [118] M. Safandowska, K. Pietrucha, Effect of fish collagen modification on its thermal and rheological properties, *Int. J. Biol. Macromol.* 53 (2013) 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.10.026>.
- [119] A. Sionkowska, A. Kamińska, Thermal helix-coil transition in UV irradiated collagen from rat tail tendon, *Int. J. Biol. Macromol.* 24 (1999) 337–340. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00047-1](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00047-1).
- [120] S. Rodziejewicz-Motowidło, A. Śladewska, E. Mulkiewicz, A. Kołodziejczyk, A. Aleksandrowicz, J. Miskiewicz, P. Stepnowski, Isolation and characterization of a thermally stable collagen preparation from the outer skin of the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*, *Aquaculture*. 285 (2008) 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.026>.
- [121] R.A. MacDonald, C.M. Voge, M. Kariolis, J.P. Stegemann, Carbon nanotubes increase the electrical conductivity of fibroblast-seeded collagen hydrogels, *Acta Biomater.* 4 (2008) 1583–1592. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.005>.
- [122] J. Stancel, J. Skocilas, A. Landfeld, R. Zitny, M. Houska, Electrical and thermodynamic properties of a collagen solution, *Acta Polytech.* 57 (2017) 229–234. <https://doi.org/10.14311/AP.2017.57.0229>.
- [123] M. Gauza, L. Kubisz, Electrical conductivity of fish skin collagen in the temperature range 290–380 K, *Acta Phys. Pol. A.* 118 (2010) 54–57. <https://doi.org/10.12693/APhysPolA.118.54>.
- [124] D. Marianiová, L. Lapčík, Electrical conductivity measurements of hyaluronic acid and collagen, *Colloid Polym. Sci.* 271 (1993) 143–147. <https://doi.org/10.1007/BF00651816>.
- [125] L. Kubisz, The influence of storage time on the temperature dependence of the dc electrical conductivity of horn keratin, *Bioelectrochemistry*. 53 (2001) 161–164. [https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(00\)00124-0](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(00)00124-0).
- [126] M. Połomska, L. Kubisz, J. Wolak, D. Hojan-Jezierska, Effects of temperature on the FT NIR Raman spectra of fish skin collagen, *Appl. Sci.* 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/app11188358>.
- [127] Y.S. Liu, X. Huang, P.P. Guo, X.P. Liao, B. Shi, Skin collagen fiber-based radar absorbing materials, *Chinese Sci. Bull.* 56 (2011) 202–208. <https://doi.org/10.1007/s11434-010-4343-5>.
- [128] E. Marzec, K. Pietrucha, Efficacy evaluation of electric field frequency and temperature on dielectric properties of collagen cross-linked by glutaraldehyde, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 162 (2018) 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.12.005>.

- [129] E. Marzec, W. Warchoł, Dielectric properties of a protein-water system in selected animal tissues, *Bioelectrochemistry*. 65 (2005) 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2004.10.001>.
- [130] D. Tororian, E.L. Joo, P.A. Price, The size exclusion characteristics of type I collagen: Implications for the role of noncollagenous bone constituents in mineralization, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 22437–22447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700591200>.
- [131] J. Wang, Y. Wang, D. Liu, Q. Yang, C. Huang, C. Yang, Q. Zhang, Preparation and cytological study of collagen/nano-hydroxyapatite/graphene oxide composites, *Acta Bioeng. Biomech.* 20 (2018) 65–74. <https://doi.org/10.5277/ABB-01188-2018-04>.

XII. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Poznań, dnia 05.01.2018r.

KB nr 41/18

OŚWIADCZENIE

Badanie naukowe pt.:

**„Ocena wpływu tlenu grafenu na wybrane właściwości fizyczne
kolagenu rybiego”.**

prowadzone przez Panią **Martę Janus**

nie nosi cech eksperymentu medycznego i zgodnie z polskim prawem
i Dobrą Praktyką Klinikzną (GCP) nie podlega opiniowaniu
Komisji Bioetycznej.

Przewodniczący Komisji

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pawel Chenciński".

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

XIII. AKTYWNOŚĆ NAUKOWA

Autorka 51 prac o łącznej punktacji ministerialnej 685 punktów, w tym 5 publikacji z IF o łącznej punktacji 16,52. Współautorką 2 artykułów w polskich czasopismach, 10 rozdziałów punktowanych oraz 35 streszczeń zjazdowych. W trakcie pracy na UMP wzięła udział w 13 konferencjach naukowych, przedstawiając na nich 12 prezentacji.

W 2016 była członkiem komitetów organizacyjnych Sympozjów „Biofizyka a medycyna”

Od 2015 roku jest członkiem Polskiego Towarzystwa Biofizycznego.

Spis najważniejszych publikacji:

1. W. Kawałekiewicz, M. Matthews-Kozanecka, M. Janus-Kubiak, L. Kubisz, D. Hojan-Jezierska, Instrumental diagnosis of facial skin - a necessity or a pretreatment recommendation in esthetic medicine, *J. Cosmet. Dermatol.* 20 (2021) 875-883 2021.
2. A. Czerniecka-Kubicka, G. Neilsen, M.S. Dickson, B.F. Woodfield, M. Janus-Kubiak, L. Kubisz, I. Zarzyka, W. Zielecki, M. Skotnicki, D. Hojan-Jezierska, M. Pyda, Vibrational heat capacity of silver carp collagen, *Int. J. Biol. Macromol.* 163 (2020) 833-841.
3. A. Czerniecka-Kubicka, W. Zielecki, W. Frącz, M. Janus-Kubiak, L. Kubisz, M. Pyda, Vibrational heat capacity of the linear 6,4-polyurethane, *Thermochim. Acta* 683 (2020) 178433
4. L. Kubisz, D. Hojan-Jezierska, M. Szewczyk, A. Majewska, W. Kawałekiewicz, E. Pankowski, M. Janus, J. Cwajda-Białasik, P. Mościcka, A. Jawień, In vivo electrical impedance measurement in human skin assessment, *Pure Appl. Chem.* 91 (2019) 1481-1491.
5. J. Cwajda-Białasik, P. Mościcka, M. T. Szewczyk, D. Hojan-Jezierska, W. Kawałekiewicz, A. Majewska, M. Janus-Kubiak, L. Kubisz, A. Jawień, Venous leg ulcers treated with fish collagen gel in a 12-week randomized single-centre study, *Post. Derm. Alerg.* (2021) DOI: 10.5114/ada.2021.108424
6. L. Kubisz, M. Matthews-Kozanecka, W. Kawałekiewicz, M. Janus-Kubiak, D. Hojan-Jezierska, Coefficient of elasticity of young and adults skin of female face, 4 (2021) 85-93.