

3D tisk polymerních směsí na bázi hedvábného proteinu

Adam Trtek

Bakalářská práce
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Adam Trtek
Osobní číslo: T19997
Studijní program: B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace: Materiálové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Téma práce: 3D tisk polymerních směsí na bázi hedvábného proteinu

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na tisk polymerních směsí s obsahem hedvábného proteinu.
2. Připravte směsi s hedvábným proteinem a otestujte možnosti 3D tisku pomocí dostupných tiskáren.
3. Tisknuté struktury charakterizujte pomocí mikroskopických technik.
4. Výsledky přehledně zpracujte a diskutujte hlavní závěry.

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

Seznam doporučené literatury:

1. Tao, H.; Marelli, B.; Yang, M.; An, B.; Onses, M. S.; Rogers, J. A.; Kaplan, D. L.; Omenetto, F. G. Inkjet Printing Of Regenerated Silk Fibroin: From Printable Forms To Printable Functions. *Advanced Materials* 2015, 27 (29), 4273–4279. <https://doi.org/10.1002/adma.201501425>.
2. Narayan, R. *Rapid Prototyping Of Biomaterials : Principles And Applications*; Woodhead Publishing: Oxford, 2013; p. 328, ISBN: 9780857097217.
3. Rodriguez, M. J.; Dixon, T. A.; Cohen, E.; Huang, W.; Omenetto, F. G.; Kaplan, D. L. 3D Freeform Printing Of Silk Fibroin. *Acta Biomaterialia* 2018, 71, 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.02.035>.
4. Guvendiren, M.; Molde, J.; Soares, R. M. D.; Kohn, J. Designing Biomaterials For 3D Printing. *ACS BIOMATERIALS SCIENCE & ENGINEERING* 2016, 2 (10), 1679–1693. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00121>

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Karolína Kocourková**
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2021**

Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 21. února 2022

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá zpracováním hedvábného proteinu v kombinaci s polykaprolaktonem metodou 3D tisku. Byly studovány možnosti tisku hedvábného proteinu, přičemž bylo zjištěno, že pro zlepšení zpracovatelnosti je vhodné kombinovat hedvábný protein s jinými materiály. Byly připraveny roztoky polykaprolaktону a hedvábného proteinu v hexafluoroisopropanolu, ze kterých byly následně extruzním tiskem připravovány mřížky. Změny povrchové textury výtisků způsobené složením tištěného materiálu byly sledovány pomocí elektronové mikroskopie a mikroskopie atomárních sil, složení směsi bylo analyzováno pomocí infračervené spektroskopie a konfokální mikroskopie. Bylo zjištěno, že hedvábný protein ve směsi s polykaprolaktonem tvoří mikro až nano částice ovlivňující uspořádání sférolitů PCL matrice.

Klíčová slova: hedvábný protein, aditivní výroba, polykaprolakton, tkáňové inženýrství

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the processing of silk protein in combination with polycaprolactone by 3D printing method. The possibilities of printing silk protein were studied and it was found that it is advisable to combine silk protein with other materials to improve processability. Solutions of polycaprolactone and silk protein in hexafluoroisopropanol were prepared, from which grids were subsequently prepared by extrusion printing. Changes in the surface texture of the prints caused by the composition of the printed material were monitored by electron microscopy and atomic force microscopy, and the composition of the mixture was analyzed by infrared spectroscopy and confocal microscopy. It was found that silk protein mixed with polycaprolactone forms micro to nano particles affecting the spherulite arrangement of the PCL matrix.

Keywords: silk protein, additive manufacturing, polycaprolactone, tissue engineering

Na tomto místě patří největší poděkování Ing. Karolíně Kocourkové za naprosto skvělé vedení mé bakalářské práce a taky za velmi dobrý přístup, pomoc, cenné rady, úsilí, trpělivost, péči a množství času, které mně věnovala.

V poslední řadě patří poděkování mé rodině za podporu během celého studia.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 3D TISK.....	11
1.1 FDM	11
1.2 SLS, SLM.....	12
1.3 SLA	13
1.4 LOM.....	13
1.5 INK-JET	14
1.6 EXTRUZNÍ TISK.....	15
2 BIOMATERIÁLY.....	17
2.1 KOVY	17
2.2 KERAMIKY	18
2.3 POLYMERNÍ MATERIÁLY.....	18
2.3.1 Přírodní polymery	19
2.3.2 Syntetické polymery.....	19
2.4 KOMPOZITY.....	19
3 FIBROIN.....	20
3.1 PROCES ZVLÁKŇOVÁNÍ	20
3.2 STAVBA VLÁKNA.....	21
3.3 VLASTNOSTI.....	22
3.3.1 Mechanické vlastnosti	23
3.3.2 Biokompatibilita.....	23
3.3.3 Degradace.....	24
3.3.4 Rozpustnost	24
3.4 APLIKACE.....	25
3.4.1 Hedvábné filmy	25
3.4.2 Hedvábné hydrogely	26
3.4.3 Netkané podložky.....	26
3.4.4 Porézní houby.....	26
4 3D TISK HEDVÁBNÉHO PROTEINU.....	27
4.1 MATERIÁLY VHODNÉ PRO TISK S FIBROINEM.....	27
4.1.1 Anorganické materiály	27
4.1.2 Přírodní polymery	28
4.1.3 Syntetické polymery.....	30
5 SMĚSI HEDVÁBNÉHO PROTEINU S POLYKAPROLAKTONEM.....	33
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	34

6	MATERIÁLY A METODY	35
6.1	POPIS EXPERIMENTU.....	35
6.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	35
6.3	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	35
6.3.1	Bio 3D tiskárna	35
6.3.2	Digitální mikroskop	35
6.3.3	Skenovací elektronový mikroskop.....	36
6.3.4	Mikroskop atomárních sil	36
6.3.5	Konfokální mikroskop	36
6.3.6	FTIR	36
6.4	IZOLACE FIBROINU	36
6.5	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ PRO TISK	38
6.6	PARAMETRY TISKU PŘIPRAVENÝCH ROZTOKŮ.....	39
7	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	40
7.1	TISK SMĚSI PCL A BMF S DOBRÝM ROZPOUŠTĚDLEM	40
7.2	VLIV KONCENTRACE FIBROINU VE SMĚSI S PCL.....	42
7.3	TISK SMĚSI PCL A BMF SE ŠPATNÝM ROZPOUŠTĚDLEM	48
7.4	FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ TIŠTĚNÝCH STRUKTUR.....	50
	ZÁVĚR	52
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	53
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	61
	SEZNAM OBRÁZKŮ	62
	SEZNAM TABULEK.....	64

ÚVOD

Přírodní hedvábí je produkováno slinnými žlázami larev motýla bource morušového (*Bombyx mori*). Z hedvábí si larva vytváří kokony s velice dobrými mechanickými vlastnostmi a odolností proti řadě rozpouštědel. Hedvábné vlákno se získává rozvinutím kokonu, který může mít v extrémních případech délku až 1 km. Využití hedvábných vláken sahá hluboko do minulosti, kdy se začalo používat jako materiál v textilním průmyslu a později jako šicí materiál v lékařství.

V současné době je hojně diskutováno užití hedvábí v oblasti tkáňového inženýrství, regenerativní medicíny a nanotechnologií. Hedvábný protein je biokompatibilní, jeho biodegradaci lze do jisté míry řídit a má vynikající mechanické vlastnosti dané sekvencí aminokyselin a sekundárním uspořádáním proteinu. Tato specifická struktura, zejména pak přechod konformace do krystalické sekundární struktury β -skládaného listu pod vlivem působení mechanického namáhání, komplikuje zpracování řadou technik, zejména metodou 3D tisku.

Aditivní výroba, neboli 3D tisk, představuje nadějnou techniku ve vývoji tkáňových náhrad. Tisknutelnost materiálu a následná stabilita výtisku závisí na mnoha mechanických a reologických vlastnostech, stejně tak výsledná akceptovatelnost materiálu buňkami se odvíjí od jeho biokompatibility. Pro dosažení optimálních vlastností jsou proto vytvářeny směsi různých materiálů, kdy jedna složka slouží jako matrice a zlepšuje zpracovatelnost a druhá následně zlepšuje mechanické a biologické vlastnosti výtisku.

Teoretická část práce předkládá stručný náhled do aditivní výroby se zaměřením na 3D extruzní tisk, jelikož tato metoda byla používána v praktické části. Další část práce je věnována rozdělení biomateriálů a zejména hedvábnému proteinu, jeho struktuře, vlastnostem a možnostem zpracování. V poslední části teoretické práce jsou uvedeny možnosti 3D tisku fibroinu ve směsi s jinými materiály se zaměřením na směsi hedvábného proteinu s polykaprolaktonem s ohledem na experimentální část práce.

Cílem experimentální části bylo připravit polymerní směsi na bázi hedvábného proteinu. Pro přípravu těchto směsí byl vybrán polykaprolakton vzhledem k dobré rozpustnosti v použitém rozpouštědle a snadné zpracovatelnosti metodou 3D tisku. Z připravených polymerních roztoků byly tištěny mřížky, které byly následně charakterizovány mikroskopickými technikami a byl vyšetřován vliv fibroinu v PCL matrici na jejich povrchovou texturu.

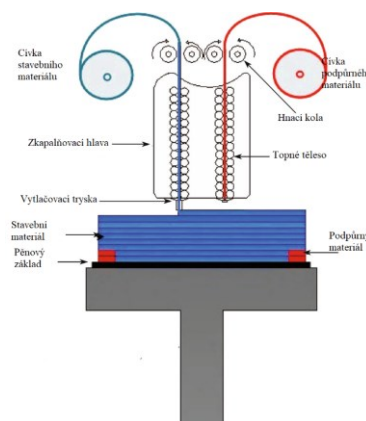
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 3D TISK

3D tisk je technika aditivní výroby (AM), pomocí níž lze vytvářet celou řadu složitých a definovaných geometrických struktur v třídimenzionálním provedení. Jedná se o velice široký a hojně užívaný pojem, u kterého je vždy nutné zohlednit, v jakém kontextu je definován. První zmínka o 3D tiskové technologii se datuje do roku 1986, kdy Charles Hull použil proces stereolitografie. Obecně je princip 3D tisku založený na postupném tisku jednotlivých vrstev materiálu na sebe. 3D tisk se vyvíjel dlouhou dobu a jeho hlavní výhodou je zjednodušení výrobních a logistických procesu a minimalizace vstupních materiálů. Po vytvoření této metody se zprvu používal ve velké míře v architektuře a designu při výrobě estetických a funkčních prototypů. V posledních 10 letech nachází 3D tisk uplatnění ve velké spoustě odvětví. Vytvářejí se nejen prototypy, ale i hotové výrobky určené k přímé aplikaci [1]. Pomocí 3D tisku lze vyrábět materiály o rozměrech v mikro až makro měřítku. Každé měřítko má své limity, pokud tiskneme v mikroměřítku, tak zde jsme do značné míry omezeni na rozlišení a povrchové úpravy, které vyžadují použití dalších technik následného zpracování. Mezi techniky následného zpracování patří například slinování [2].

1.1 FDM

FDM neboli Fused Deposition Modeling je technologie vyvinutá začátkem 90. let 20. století v USA. Jedná se o jednu z nejčastěji užívaných technologií aditivní výroby, jelikož poskytuje funkční prototypy z různých polymerních materiálů a umožňuje vytvářet velmi rozsáhlé geometrické díly podle navržených modelů například v programu CAD (Computer Aided Design). Princip této metody spočívá v tom, že materiál ve formě struny roztavený do kapalné formy je vytlačovaný tryskou, udávající průřez geometrie a vznikající model je tvořen vrstva po vrstvě. Zjednodušené schéma této metody lze vidět na obrázku 1.

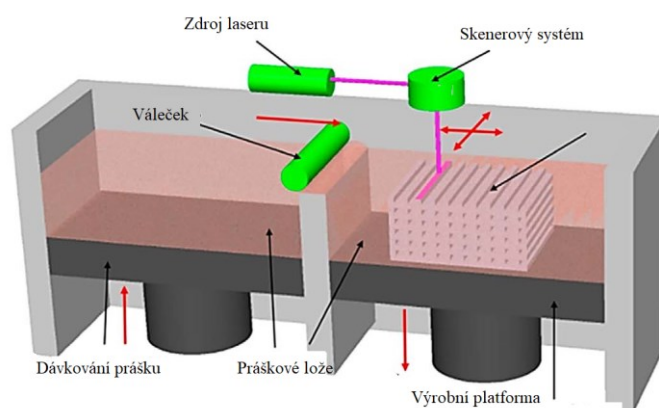


Obr. 1: Princip metody 3D tisku FDM [3]

Tisk metodou FDM je ovlivňován celou řadou parametrů, jejichž nedostatečná optimalizace má za následek zhoršenou kvalitu tisku. Hlavními parametry ovlivňujícími kvalitu výsledného výrobku jsou tloušťka vrstvy, šířka a úhel rastru a vzduchové mezery v tavenině. Výhodou této metody je poměrně nízká výrobní cena produktů a vysoká výrobní rychlost. Mezi nevýhody patří horší mechanické vlastnosti výtisků, a omezený počet použitelných materiálů, jelikož ne všechny polymery se pro tuto metodu hodí. Aby byl zajištěn proces vytlačování, musí být polymerní materiál ve formě struny. Nejužívanějšími materiály pro zpracování touto technikou jsou například akrylonitril butadien styren nebo polykarbonát [3].

1.2 SLS, SLM

SLS (Selective Laser Scattering) je technologie aditivní výroby spočívající ve spékání práškového materiálu v tenkých vrstvách pomocí natavení laserovým paprskem. Každá vrstva prášku se vždy navrství na vrstvu předchozí a následuje spojování všech vrstev do té doby, dokud nevznikne konečný 3D výrobek. Náhled na princip metody je na obrázku 2.



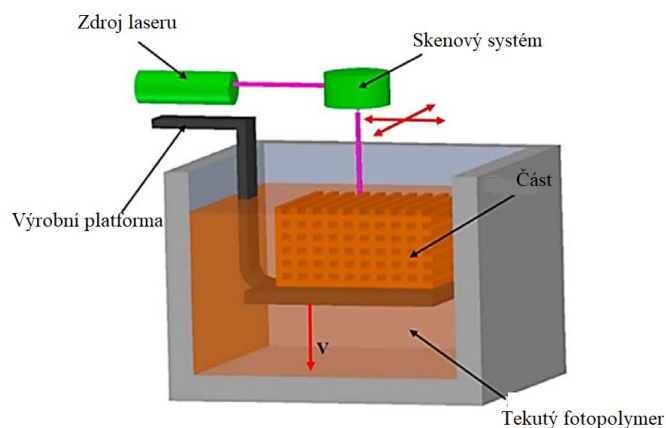
Obr. 2: Princip metody 3D tisku fúze v prášku [4]

Nadbytečný prášek lze odstranit pomocí vakua a následně je možno provést další zpracovatelské kroky, jako je potahování, infiltrace, nebo slinování. Rozhodujícím faktorem pro tuto metodu, je velikost a distribuce částic zpracovaného prášku [5]. Omezení laseru je takové, že ho lze použít pro prášky, které mají poměrně nízkou teplotu slinování. Při vyšší teplotě slinování se doporučuje použít tekuté pojivo. Tato metoda zahrnuje 2 základní postupy. Pomocí selektivního laserového slinování lze zpracovat velkou spoustu polymerů a kovů. Velmi vhodný polymer pro tuto metodu je polykaprolakton. Prášky nejsou zcela roztavené a zvýšená lokální teplota povrchu zrn způsobuje slinutí prášku na molekulární úrovni. Obdobnou technikou je SLM (Selective Laser Melting), kde dochází k úplnému

roztavení prášku. Tento postup je vhodný jen pro určité kovy a polymery. Kovy vhodné pro tuto metodu jsou ocel a hliník. Mezi vhodné polymery lze zařadit polyamid. Tato metoda umožňuje dosažení velmi dobrých mechanických vlastností [6]. Mezi hlavní výhody metod slinování prášku patří zejména velmi vysoká kvalita tisku a dobré rozlišení, díky čemuž lze vytisknout variabilní a mnohdy i složité struktury. Bohužel mezi nevýhody patří pomalá a nákladná výroba [5].

1.3 SLA

Jednou z nejstarších metod 3D tisku je stereolitografie (SLA). Tato metoda používá k iniciaci řetězové reakci na vrstvě pryskyřice nebo roztok monomeru UV světlo. Monomery obsahují epoxidovou, nebo akrylovou skupinu patřící mezi tzv. UV aktivní a po radikalizaci se ihned změni na polymerní řetězec. Po proběhnutí polymerní reakce pryskyřice ztuhne, díky čemuž udrží následující vrstvy. Na obrázku 3 je znázorněno schéma principu metody.



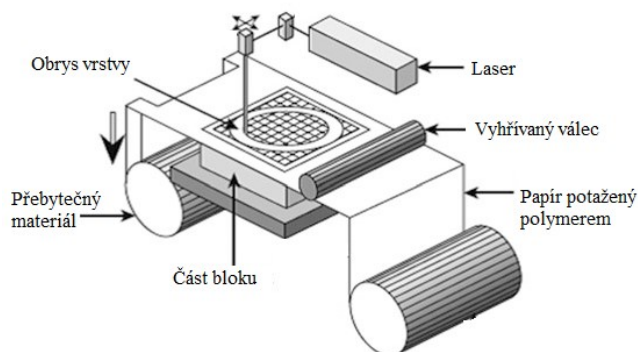
Obr. 3: Princip metody 3D tisku stereolitografie [4]

Po dokončení tisku se veškerá nezreagovaná pryskyřice odstraní. U složitějších struktur je doporučeno provést ještě další úkony, jako je např. fotovytvrzování nebo ohřev, aby bylo dosaženo požadovaných mechanických vlastností [7]. Mezi výhody patří velmi dobrá kvalita vytištěných struktur, které dosahují rozlišení od 10 μm . Mezi nevýhody patří složitá kinetika reakce a tím pádem je tato metoda časově náročná [4].

1.4 LOM

Principem metody LOM (Laminated Object Manufacturing) je laminování a řezání materiálu po vrstvách. Existují 2 postupy, jak lze vrstvy řezat, a to pomocí mechanické

řezačky nebo laseru. Jestliže jsou vrstvy dohromady spojeny, tak je tato metoda vhodná pro lepení keramik a kovových materiálů. Popis metody je na obrázku 4.

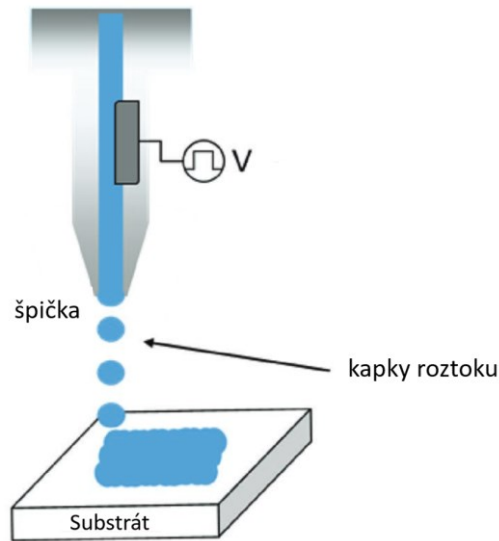


Obr. 4: Princip metody 3D tisku výroby laminovaných předmětů [8]

Druhý postup, u kterého naopak vrstvy nejsou spojeny, se téměř vůbec nepoužívá. Metodu 3D tisku založené na výrobě laminovaných předmětů lze použít pro širokou škálu materiálů, ale každý materiál vyžaduje různé následné zpracování (vysokoteplotní ošetření), aby bylo dosaženo požadovaných vlastností. Tato metoda má velkou řadu uplatnění ve slévárenství, výrobě papíru a elektroniky. Mezi výhody patří nízká výrobní cena a vyšší rychlost výroby. Nevýhoda je, že v drtivé většině případů je u této metody nutnost dalšího následného opracování, protože bez těchto operací je kvalita povrchu výrobku velmi nízká [8].

1.5 Ink-Jet

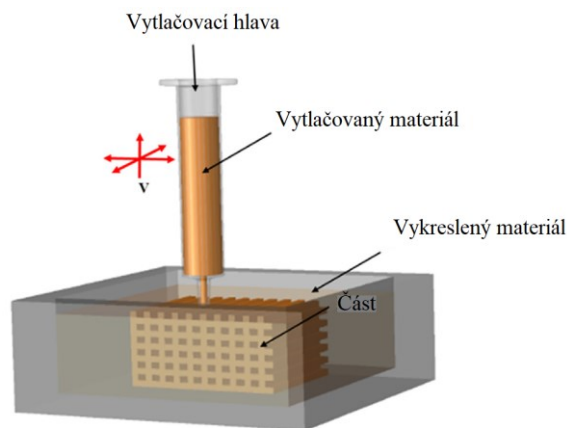
Mezi hlavní metody aditivní výroby aplikované v tkáňovém inženýrství patří Ink-Jet tisk. U této metody se materiál ukládá ve formě kapiček přes vstřikovací trysku [9]. Vytvořené kapičky vytváří celistvý vzor, který postupně tuhne. Schéma metody je na obrázku 5. [10]



Obr. 5: Princip metody Ink-Jet tisku [10]

1.6 Extruzní tisk

Princip extruzního tisku je založen na postupném vytlačování viskózního materiálu (roztoku nebo hydrogelu) z vytlačovací hlavy, která se pohybuje ve třech rozměrech, přičemž podložka zůstává v průběhu tisku nehybná. Na této podložce se postupně spojuje vytlačovaný materiál metodou vrstva po vrstvě. Na obrázku 6 je znázorněn princip metody.



Obr. 6: Princip extruzního tisku [4]

Vytištěný materiál tuhne buď odpařením rozpouštědla nebo vytvrzením. Vytvrzovací reakce mohou být provedeny dvěma způsoby. Buď pomocí dávkování dvou reaktivních složek pomocí směšovací trysky, nebo lze síťování indukovat teplem nebo UV zářením [11]. Důležitou roli, na výslednou kvalitu vytištěných materiálů, hraje samotná viskozita roztoku a rychlost nanášení vykreslovacího materiálu na desku. Hlavní výhodou tohoto principu je velmi dobrá flexibilita a jednoduchost spočívající v nadávkování materiálu přímo do stříkačky a možnost použití široké škály polymerních materiálů, ovšem nevýhodou je, že

použití hodně viskózního materiálu je nutné použití vysokého tlaku vytlačovací hlavy a celková manipulace při dávkování s viskózním materiálem do stříkačky je velmi složitá [12].

2 BIOMATERIÁLY

Historie vývoje biomateriálů se datuje do doby 200 let před našim letopočtem, kdy první kovové dentální implantáty použili Egypťané. K velkému pokroku ve tvorbě biomateriálů došlo po 2. světové válce, kdy se začaly vyvíjet nové syntetické polymerní materiály (Polyamid 6.6, PA6.6.). Jako jedny z prvních aplikací pokročilejších biomateriálů lze zmínit například umělé kyčle nebo cévní implantáty. Vývoj materiálů pro biologické aplikace je oborově velmi rozsáhlý a zasahuje do velké řady oblastí, jako je například biologie, medicína nebo materiálové inženýrství. Souhrnně se toto multidisciplinární odvětví nazývá tkáňovým inženýrstvím [13]. V poslední době se prodlužuje stáří populace, což je jedna z klíčových motivací pro vývoj stále nových biomateriálů.

Dle definice biomateriálu se jedná o materiál, který dokáže existovat v organismu po nějakou dobu, aniž by ho poškodil a částečně nebo úplně nahrazuje poškozenou tkáň. Důležitou vlastností biomateriálů je biokompatibilita, což je schopnost materiálu vykonávat určité funkce v hostujícím systému bez vyvolání negativní odezvy. Existují 3 základní postupy, kterými lze odezvu organismu na testovaný materiál sledovat. *In vitro* (ve skle, např. petriho miska), *In vivo* (živé organismy), nebo *In silico* (počítačové modelové systémy). Odmítnutí biomateriálu organismem vede zejména k zánětu projevujícím se bolestí a zvýšenou teplotou, a může vést až k rakovinnému bujení. Tyto negativní odpovědi organismu můžeme do jisté míry ovlivnit tvarem implantátu, typem materiálu a rovněž povrchovými a vlastnostmi [14].

2.1 Kovy

Kovy řadíme mezi krystalické materiály (pravidelné uspořádání atomů podle určitého pravidla v prostoru). Jedná se o anorganické materiály (materiál, který neobsahuje ve své struktuře uhlík), které jsou vázané nesměrovými kovovými vazbami, které navíc ještě obsahují vysoce mobilní elektrony. Kovy nalézají na trhu s biomateriály velmi velké uplatnění zejména v ortopedii. Většina kovů existuje v zemské kůře v minerální formě. Kovy se velmi často používají ve formě oxidů. Nejznámějším kovovým biomateriálem je titan, ovšem v poslední době se můžeme setkat například i s hořčíkem, jelikož nevyvolává téměř žádné negativní odezvy organismu. Mezi nevýhody kovů řadíme hlavně korozi a opotřebení, což má za následek vyvolání negativních projevů organismu, jako je alergická reakce. K odstranění problémů s biokompatibilitou a korozí lze odstranit patřičně vhodnou úpravou povrchu, jako je pokrytí povrchu keramikou nebo polymerem [15].

2.2 Keramiky

Keramiky jsou taky materiály, které ve své struktuře neobsahují uhlík, ovšem oproti kovům jsou vázané iontovou vazbou mezi elektron donorovým (dárce) a elektron akceptorovým (příjemce) elementem. Keramiky dále rozdělujeme do dalších dvou kategorií podle samotné struktury. Může se jednat o krystalickou, nebo amorfní keramiku. Jestliže keramika je amorfní, tak hovoříme o sklu, která jsou velmi tvrdá a odolná proti stárnutí. Velkou nevýhodou keramiky mající amorfní strukturu je její velká křehkost, proto při implantaci nové tkáně je nutnost tuto nevýhodu brát v potaz a často se vytváří kompozity na bázi keramiky. V tkáňovém inženýrství se keramiky používají hlavně jako implantáty pro ortopedické účely. Podobně jako u kovů se keramiky v drtivé většině vyskytují v oxidech. Mezi nejznámější keramický oxid můžeme zařadit oxid hlinitý, oxid křemičitý a sůl keramiky z fosforečnanu vápenatého [16].

2.3 Polymerní materiály

Jedná se o organické materiály (obsahují ve své vazbě uhlík), které se skládají z mnoha dlouhých opakujících se řetězců spojených směrovými kovalentními vazbami. Celá řada polymerů se vyznačuje velmi dobrou biokompatibilitou, která je ovlivněna funkčními skupinami, chemickou strukturou nebo molární hmotností daného polymeru. Obecně většina polymerů se vyznačuje nadměrnou elasticitou a nižší pevností. V tkáňovém inženýrství se polymer může používat například jako náhrada kardiovaskulárního systému [17].

Molekula polymeru může mít molekulovou hmotnost až 200 000 Da. Jednotlivé makromolekuly mohou být buď lineární, rozvětvené, nebo zesíťované. Jestliže použijeme dva různé druhy monomerů vznikne nám kopolymer, který dále může mít uspořádání statistické, alternující, nebo sledové. U polymerů se můžeme setkat s chemickými vazbami, které nazýváme jako primární a patří sem vazba kovalentní, kovová, koordinační a iontová. Mezi sekundární vazby patří vodíkové můstky, kohezní energie, dipólové, indukované a disperzní síly. Polymery vytvářejí různé sterické izomerie, které se liší podle rozložení substituentu. Pokud je substituent na jedné straně roviny, ve které leží řetězec, hovoříme o izotaktické izomerii. Pokud se rozložení střídá nad a pod rovinou hovoříme o izotaktické izomerii, V poslední řadě, pokud je rozložení nahodilé, izomerie se jmenuje ataktická. Polymery se vyskytují ve dvou stavech. Amorfní stav je charakteristický neuspořádanou konformací. U krystalických polymerů se vždy vyskytuje alespoň malá část amorfní fáze, proto je můžeme dále rozdělit na amorfní a semi (částečně) krystalické [14].

2.3.1 Přírodní polymery

Mezi přírodní polymerní materiály patří kyselina hyaluronová, alginát, chitosan, fibrin nebo kolagen. Tyto materiály jsou v tkáňovém inženýrství studovány pro ortopedické náhrady i pro náhrady měkkých tkání. Mezi výhody přírodních polymerních materiálů patří zejména vysoká biokompatibilita, vlastnosti a složení podobné složkám extracelulární matrix v živých organismech. Bohužel velkou nevýhodou je problém se získáváním těchto materiálů z přírodních zdrojů a s tím spojená vysoká variabilita vlastností a dále následné procesy samotné úpravy, izolace a purifikace, které jsou velmi složité v závislosti na typu materiálu [18]. Mezi přírodní polymery dále patří hedvábné proteiny. Tyto materiály jsou v přírodě produkovány pavouky nebo larvami bource morušového [19].

2.3.2 Syntetické polymery

Mezi syntetickými polymery lze zmínit zástupce polyolefinů (polyetylen), styrenových (polystyren), vinylových (polivinylydenfluorid), akrylových (polymethylmethakrylát), speciálních (kyselina polymléčná) polymerů atd. a jejich kopolymery [20]. Mezi významného zástupce syntetických termoplastů patří polykaprolakton ze skupiny biologicky odbouratelných polyesterů. Polykaprolakton se vyrábí iontovou polymerací ϵ -kaprolaktonu. Jedná se o pevnou látku, která se vyskytuje nejčastěji ve formě bílých peciček, které jsou netoxické a elektricky nevodivé [21]. U syntetických polymerních materiálů lze alespoň do značné míry poupravit výsledné fyzikální a chemické vlastnosti, jako je například biodegradace. Výhodou syntetických polymerních materiálů je především poměrně snadná purifikace a sterilizace. U většiny polymerů je velmi snadná výroba ve velkých objemech a následná úprava do požadovaného tvaru pro potřebnou aplikaci a celkově tyto materiály mají dobré mechanické vlastnosti. Syntetických polymerních materiálů je o poznání více než přírodních. Značnou nevýhodou oproti přírodním polymerním materiálům je zde často nedostatečná biokompatibilita [20].

2.4 Kompozity

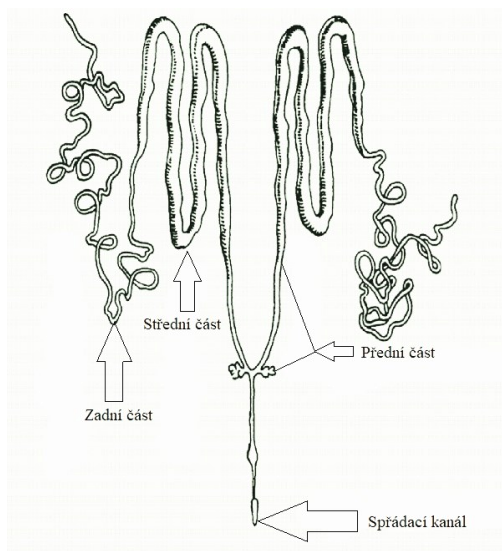
Za kompozit označujeme takový materiál, který je složený většinou ze dvou a více rozdílných složek za účelem vhodné kombinace vlastností, které jednotlivé složky kompozitu neposkytují. Jako příklad kompozitu lze uvést kombinaci keramiky s aditivem ve formě polymeru. Samotná keramika je málo tvárná, ale po přidání vhodného aditiva dojde ke zlepšení pevnosti a houževnatosti [13].

3 FIBROIN

Fibroin je druh proteinu v hedvábném vláknu produkovaném larvami bource morušového. Kromě fibroinu obsahuje přírodní hedvábné vlákno ještě protein sericin a další nízkomolekulární látky. Po odstranění sericinu a nízkomolekulárních látek se z přírodního hedvábí stává regenerované hedvábí, které obsahuje pouze fibroin. Proces odstranění sericinu se nazývá degumming. Obecně vlákna přírodního původu jsou většinou složena z nejrůznějších kombinací různých polymerů a cukrů. Přírodní hedvábí je produkováno například motýly, nebo pavouky. Produkce hedvábí u pavouků je složitější než u výše zmíněného bource morušového. Pavouci mají 7 různých hedvábných žláz a každá žláza produkuje odlišný materiál pro různé účely. Larva bource morušového produkuje jeden typ hedvábného vlákna za účelem ochrany larvy při metamorfóze [22].

3.1 Proces zvlákňování

Přírodní hedvábný protein, který je produkován larvami bource morušového, vzniká v přírodě procesem zvaným zvlákňování. K produkci hedvábí dochází v symetrickém párovém orgánu znázorněném na obr. 7.



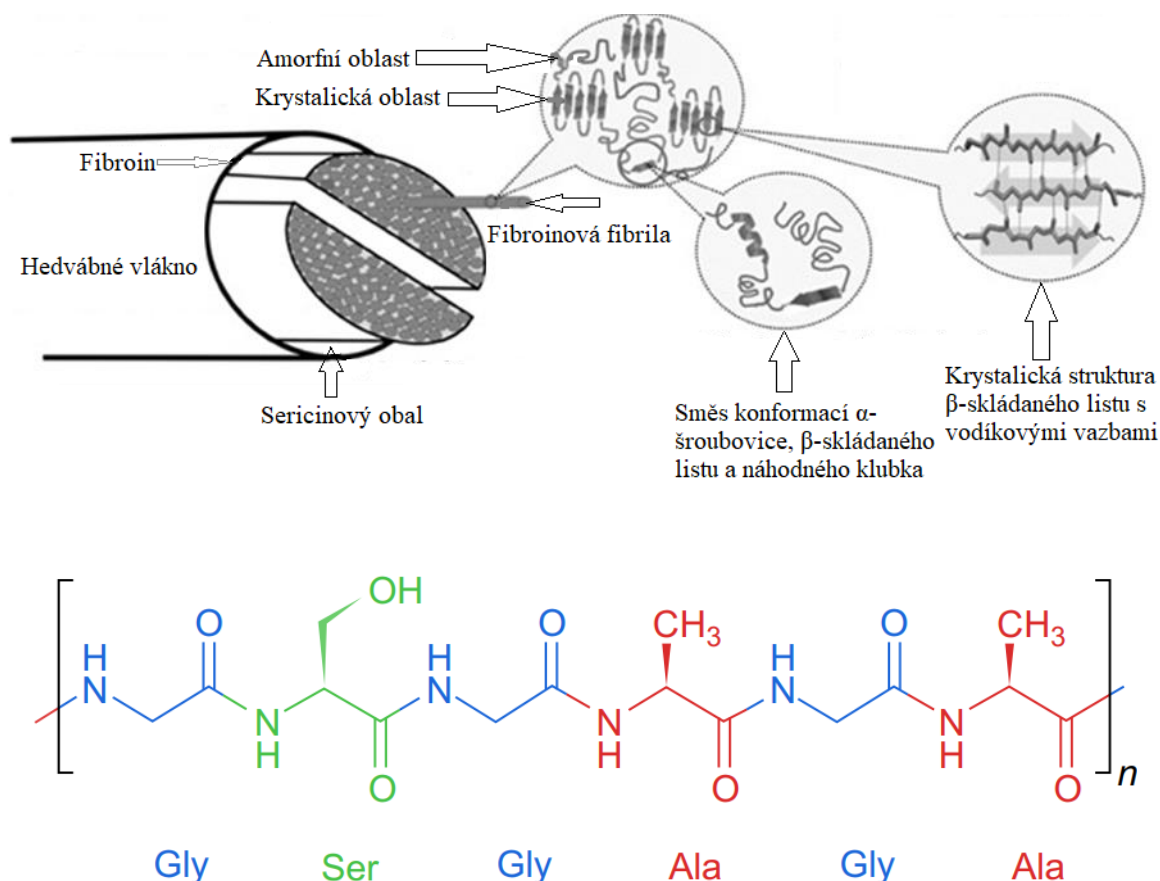
Obr. 7: Schéma hedvábné žlázy [23]

Žláza se skládá ze zadní, střední, přední části a v poslední řadě ze spřádacího kanálu. V jednotlivých částech hedvábné žlázy dochází k syntéze a zakoncentrování jednotlivých hedvábných proteinů [24].

Během samotného procesu zvlákňování dochází ke změně sekundární struktury, kdy původně rozpustná konformace náhodného klubka, která obsahuje α -šroubovice (SILK I) se mění na semi-krystalickou formu, kde převládají β -skládané listy (SILK II) [25]. Důležitým jevem je zde vznik pH gradientu, díky němuž dochází ke změnám struktury. V zadní části párového orgánu dochází k fibroinové syntéze o koncentraci kolem 12 hm. %. V tomto místě je má roztok nejvyšší pH, které se pohybuje kolem hodnoty 6,9, a fibroin má strukturu gelu. Fibroin se přesouvá střední žlázy, kde dochází k syntéze druhého proteinu, sericinu. Zde rovněž dochází k zakoncentrování fibroinu a ke snížení pH na hodnotu 5,2. Ke změně struktury z gelu na sol-gel dochází u vstupu do přední části žlázy, pH je přibližně 5,0. Nejnižší pH je v samotné přední části, a to ještě o 2 desetiny nižší, než je u vstupu k přední žlázy. Dochází zde k postupnému zužování přední žlázy z původních 400 μm na 50 μm . Fibroin se přeskupí do struktury micel s anizotropními vlastnostmi tekutých krystalů [26]. Na výstupu dochází k dalšímu úbytku vody v roztoku [27]. Příčina tohoto snižování obsahu vody v roztoku je rostoucí koncentrace vápenatých iontů v každé části párového orgánu žlázy [28]. Po proběhnutí syntézy vodný roztok hedvábných proteinů vylučován tryskou a pomocí specifických pohybů housenky je tvořeno samotné zvlákňování spojené s přechodem sekundární konformace hedvábí na stabilní β -skládaný list a vznik kokonu. Tento celý postup je ovlivněn vlivy prostředí, proto délka tohoto procesu nelze jednoznačně určit, ale v nejrychlejších případech může být kokon vytvořen již po necelých dvou dnech, v opačném případě tento proces může být i třikrát delší [24].

3.2 Stavba vlákna

Složení přírodního hedvábného vlákna je znázorněno na obrázku 8. Vlákno obsahuje dvě fibroinová jádra, která jsou obalená ochranným sericinovým obalem. Sericin je adhezivní protein, který drží vlákna pohromadě a v průběhu tvorby vlákna zabraňuje předčasné transformaci do krystalické konformace β -skládaného listu. Samotný fibroin obsahuje těžký a lehký polypeptidový řetězec, přičemž molární hmotnost lehkého řetězce je kolem 26 kDa. Těžký řetězec má molární hmotnost 390 kDa. Řetězce jsou navzájem propojeny jednou disulfidickou vazbou na C-konci těžkého řetězce. Ve fibroinové fibrile se nachází krystalická (β -sheet) a amorfní (α -helix) oblast [29].



Obr. 8: Nahoře schéma přírodního hedvábného vlákna [30], dole primární struktura fibroinu [31]

Těžký řetězec obsahuje 11 krátkých hydrofilních oblastí, které se skládají z 31 různých aminokyselin a 12 hydrofobních bloků. Struktura těžkého řetězce se velmi podobá struktuře blokovému kopolymeru [32]. Komplex lehkého a těžkého řetězce je nekovalentně vázán glykoproteinem P25 v poměru 6:1. Základní micelární jednotka vznikající během procesu zvlákňování je formována hydrofobními interakcemi [33]. Primární strukturu makromolekuly fibroinu tvoří především aminokyseliny glycin, alanin a serin (obr. 8) [31]. Díky této vlastnosti je u hydrofobní domény zajištěna velmi dobrá konformační variabilita a fibroin tak může vykazovat známky polymorfního chování. S hydrofilní doménou se setkáme u amorfni oblasti, která umožňuje stáčení řetězce při krystalizaci během procesu zvlákňování a díky vodíkovým vazbám je dosaženo nerozpustnosti ve vodě a některých kyselinách [34].

3.3 Vlastnosti

U hedvábného proteinu je velmi důležité rozeznávat, zda je posuzován přírodní hedvábný protein, nebo již upravený (degumovaný) regenerovaný hedvábný protein, jelikož

vlastnosti se diametrálně odlišují. Přírodní hedvábné vlákno má především velmi dobré mechanické vlastnosti, jelikož vlákno obsahuje hydrofobní a hydrofilní řetězce, které jsou uspořádány do krystalické sekundární struktury β -skládaného listu. Další velmi vlastností přírodního vlákna je taky velmi dobrá houževnatost díky existenci semi-amorfní matrice [35]. U regenerovaného hedvábného proteinu jsou vlastnosti výrazně odlišné, z důvodu odstranění jednoho ze dvou proteinů, sericinu. Při odstranění sericinu dochází ke změně zejména molekulové hmotnosti, tím pádem dochází k častějšímu přechodu do konformace β -skládaného listu, což je jeden z negativních jevů, který ovlivňuje samotnou manipulaci s fibroinem [36]. Izolovaný hedvábný protein je křehký. Ve srovnání například s kolagenem má však až 500krát větší Youngův modul pružnosti [23].

3.3.1 Mechanické vlastnosti

Důležitou roli u mechanických vlastností hraje molekulová hmotnost makromolekuly, která se skládá z aminokyselin. Aminokyseliny s vysokou molekulovou hmotností vytváří amorfní strukturu. Naproti tomu aminokyseliny s nízkou molekulovou hmotností vytváří krystalické struktury, díky kterým je dosažena velmi dobrá houževnatost. Výsledná velmi dobrá pevnost v tahu a modul pružnosti jsou zajištěny právě díky přítomnosti obou těchto struktur. Porovnání mechanických vlastností fibroinu s dalšími materiály je v uvedeno v tabulce 1 [23; 37; 31].

Tab. 1: Porovnání mechanických vlastností fibroinu s vybranými materiály [23; 37; 31]

Druh materiálu	Relativní prodloužení [%]	Pevnost v tahu [MPa]	Youngův modul pružnosti [GPa]
Fibroin	4-16	610-690	16
Kolagen	24-68	1-7,4	0,0018-0,046
Zesíťovaný kolagen	12-16	47-72	0,4-0,8
Vlna	50	200	0,5
Hedvábí z pavouka	27	1100	10
Kyselina polymléčná	3-10	15-150	2,7-4,1
PA 6.6	18	430-950	1,8-5
Kevlar	2,7	3600	130
Polypropylen	23	490	4,6

3.3.2 Biokompatibilita

Aby se dal vytvořený biomateriál použít na biomedicínské aplikace, musí být biokompatibilní [31]. Fibroin vyvolává v organismu mírnou zánětlivou odezvu srovnatelnou s kolagenem, nedochází však k tvorbě protilátek proti hedvábí. Zánětlivá reakce usnadňuje

degradaci hedvábí, což může být v některých případech prospěšné. Podpora adheze, proliferace, a diferenciací buněk na fibroinových substrátech není pro řadu aplikací dostačující, proto je možné fibroin modifikovat například pomocí růstových faktorů. [38].

3.3.3 Degradace

Degradace všech typů biomateriálů je důležitým parametrem, protože cílem implantace je většinou obnova plné tkáňové struktury a funkce *in vivo*. Konečná rychlost degradace scaffoldu by měla odpovídat rychlosti růstu tkání a je nejdůležitějším faktorem pro návrh tkáně [39]. Vlákná z hedvábného fibroinu si zachovávají více než 50 % svých mechanických vlastností téměř ještě další 2 měsíce po implantaci *in vivo*. Díky této přednosti jsou podle americké společnosti Food and Drug Administration (FDA) definovány jako téměř nedegradovatelný biomateriál [40]. U kyseliny polymléčné je pro porovnání rychlost degradace závislá na hydrolýze a složení polyesteru, podmínkách zpracování a čistotě. Degradace fibroinu probíhá pomocí proteáz a rychlost závisí na struktuře proteinu, mechanickém namáhání a biologických podmínkách v místě implantátu [41].

3.3.4 Rozpustnost

Pro zpracování do požadovaných morfologií je nutné fibroin rozpustit a regenerovat k získání čistého vodného roztoku fibroinu, který se používá pro celou řadu biomedicínských aplikací. Degumovaný fibroin je nerozpustný v běžných rozpouštědlech, jelikož má velkou krystalinitu. [31]. Na rozrušení struktury vedoucí k získání rozpustného fibroinu se používají např. tato rozpouštědla:

- Chaotropní soli: Ačkoliv se tato rozpouštědla používají často, mají i jistá omezení, protože například lithné soli musí být odstraněny pomocí dialýzy kvůli nutnosti získání netoxického materiálu a bohužel samotný proces extrakce pomocí bromidu lithného je časově náročný, jelikož trvá 4 dny a výsledný roztok musí být dialyzován, jinak by bromid lithný způsobil po 3 měsících degradaci. Mezi další rozpouštědla této kategorie lze zmínit chlorid vápenatý a dusičnan vápenatý.
- Fluorovaná organická rozpouštědla: Výhodou těchto rozpouštědel je, že na rozdíl od chaotropních solí neovlivňují strukturu regenerovaného hedvábného fibroinu. Mezi zástupce patří 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol nebo hydrát hexafluoroacetonu.

- Koncentrované kyseliny: Mají dobrou rozpustnost, ale bohužel peptidové vazby mezi aminokyselinami jsou během rozpouštění rozvolňovány, což způsobuje degradaci fibroinu. Mezi takové kyseliny patří kyselina mravenčí a fosforečná.
- Iontová rozpouštědla: Vliv na rozpustnost mají oba dva ionty, přičemž aniont větší. Rozpustnost je úměrná schopnosti iontů narušit vodíkové můstky a konformaci β -skládaného listu. Do této kategorie patří 1-ethyl-3-methylimidazolium nebo 1-butyl-3-methylimidazolium.
- N-methylmorfolin n-oxid (NMMO): jedná se o cyklický aminoxid N-NMMO, který je obnovitelný a zcela recyklovatelný.
- Směsi rozpouštědel: Lze kombinovat 2 různé látky, např. chlorid vápenatý a kyselinu mravenčí. Protein se po rozpuštění velmi podobá nativnímu hedvábí. Fólie vytvořené pomocí této metody mají velkou pevnost a pružnost [42; 31].

3.4 Aplikace

V minulém století bylo přírodní hedvábné vlákno používáno jako šicí materiál. V dnešní době přírodní vlákno již nemá kromě textilního průmyslu velké využití. V posledních letech však nalézá uplatnění v tkáňovém inženýrství izolovaný regenerovaný fibroin. Takto upravený protein již je vhodný pro použití jako biomateriál v biomedicínských aplikacích [43]. Samotný materiál se špatně zpracovává kvůli transformaci sekundární struktury, proto se často kombinuje s vhodným aditivem, například ke zlepšení viskozity, nebo doby gelovatění. [44]. Díky velkoprodukcí je na celém světě k dispozici 400 000 tun suchých kokonů bource morušového. Vlákna se v první řadě musí rozpustit a následně zpracovat do požadované formy materiálu. Z připravených roztoků fibroinu lze vytvořit celou řadu různých druhů materiálů pro biomedicínské aplikace [45].

3.4.1 Hedvábné filmy

Fólie z hedvábného fibroinu lze odlévat ze systémů organických a vodných rozpouštědel. Hedvábné filmy připravené na bázi vodného roztoku hedvábného fibroinu vykazují propustnost pro kyslík a vodní páru, která je závislá na poměru struktur SILK I a SILK II [46]. Pomocí 50 % methanolu lze vyvolat změnu struktury hedvábí, přičemž výsledná struktura závisí na délce trvání působení methanolu. Změny ve výsledné struktuře se projevují na odlišných mechanických a degradačních vlastnostech fólií [47]. Nanovrstvy hedvábného fibroinu lze taky vytvořit z vodného roztoku metodou vrstva po vrstvě. Tyto

ultratenké filmy jsou velmi stabilní, jelikož obsahují hydrofobní interakce [48]. Buněčnou adhezi k povrchu lze podpořit tvorbou povrchové mikrotextury. Jednou z možností texturizace povrchu je tvorba filmu ze směsi hedvábí s polyethylenoxidem (PEO) [49]. Takto vytvořené filmy jsou vhodné pro aplikace při hojení ran a regeneraci kostní tkáně [50].

3.4.2 Hedvábné hydrogely

Hydrogely jsou trojrozměrné polymerní sítě, které jsou fyzikálně odolné vůči bobtnání ve vodných roztocích, ve kterých se nerozpouštějí. Hydrogely na bázi hedvábného fibroinu byly připraveny z vodného roztoku hedvábného fibroinu, který tvoří strukturu β -sheet. í [51]. Hedvábné hydrogely lze použít například pro enkapsulaci růstových faktorů při regeneraci kostní tkáně [52].

3.4.3 Netkané podložky

Jedná se o dobré biomateriály díky velké ploše a hrubší topografii pro uchycení buněk. Hedvábný fibroin se používá k výrobě netkaných hedvábných podložek ze znovu zpracovaných přírodních hedvábných vláken nebo pomocí elektrostatického zvlákňování. Tyto podložky byly připraveny rozpuštěním přírodních hedvábných vláken v kyselině mravenčí s přísadkou chloridu vápenatého. Tyto netkané textilie vykazují dobrou biokompatibilitu při *in vivo* testech [53].

3.4.4 Porézní houby

Porézní houbovité scaffoldy umožňují v tkáňovém inženýrství dobrou proliferaci, uchycení buněk a migraci živin a metabolitů a jsou vhodné opět pro vývoj náhrad kostních tkání. Byly použity regenerované a vodné roztoky hedvábného fibroinu při přípravě porézních hub, které byly vytvořeny pomocí porogenu, lyofilizace a plynové pěny. Houbičky na bázi rozpouštědla byly připraveny za použití chloridu sodného, nebo cukru [54].

4 3D TISK HEDVÁBNÉHO PROTEINU

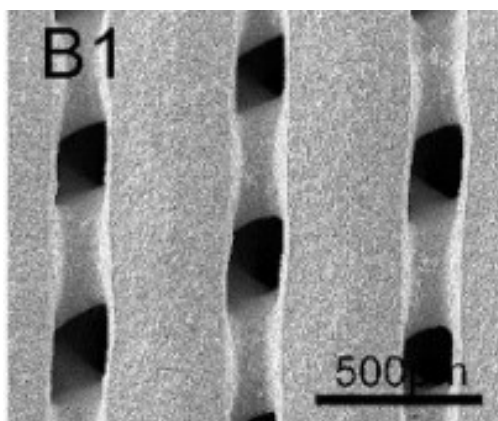
Použití 3D tisku pro zpracování bílkovin je v současné době jedním z nejvýznamnějších způsobů, jak vytvořit konstrukce s přesně definovanými rozměry. 3D tištěné proteinové scaffoldy mají pro medicínské aplikace velký význam [55]. Tisknutelnost hedvábného proteinu je komplikována přechodem do sekundární struktury β -skládaného listu pod vlivem působení smykových sil. Rovněž mechanické vlastnosti výtisků z čistého regenerovaného fibroinu nejsou pro řadu aplikací dostačující. Z tohoto důvodu je nezbytné upravit složení tiskového materiálu a proces tisku tak, aby bylo vůbec možné danou strukturu vytisknout a následně taky získat požadované vlastnosti vytištěného materiálu [56]. Zlepšení mechanických vlastností nám umožní lepší kvalitu tisku, tudíž po smíchání hedvábí s další vhodnou látkou byla umožněna tisknutelnost materiálu v rozumné kvalitě. Dalším důležitým měřítkem v tom, zda bude materiál vhodný k tisku a jaké budou jeho vlastnosti po tisku je konečná viskozita roztoku, se kterou bývá často velký problém. Nejvýznamnějšími takto vytvořenými materiály jsou různé hydrogely [57]. Existují i možnosti, které nevyžadují nutnost použití přídavných aditiv kompenzující nedostatky hedvábí [58], ovšem tyto techniky nejsou moc využívány z důvodu časově nebo finančně náročné, případně neposkytují konstrukce v požadované přesnosti.

4.1 Materiály vhodné pro tisk s fibroinem

4.1.1 Anorganické materiály

Hydroxyapatit

Biomateriál na bázi hydroxyapatitu a hedvábného fibroinu se v biomedicínských aplikacích používá pro vývoj náhrad kostní tkáně. Přírodní kost patří mezi kompozitní materiál, která obsahuje určitý podíl organické a anorganické matrice. Anorganická matrice obsahuje právě hydroxyapatit, a proto tento materiál zlepšuje regeneraci kostí [59]. Hedvábný fibroin obsahuje aminokyseliny a karbonylové skupiny. Díky specifickým vlastnostem hedvábného fibroinu nám aminokyseliny umožňují rychlejší zahojení zlomenin a karbonylové skupiny výrazně ovlivňují samotnou mineralizaci pomocí hydroxyapatitu [60]. Ve studii Huang et al. byly navrženy trojrozměrné tištěné porézní scaffoldy na bázi biomineralizovaného hydroxyapatitu v kombinaci s hedvábným fibroinem a alginátem ve funkci pojiva, obr. 9 [61].

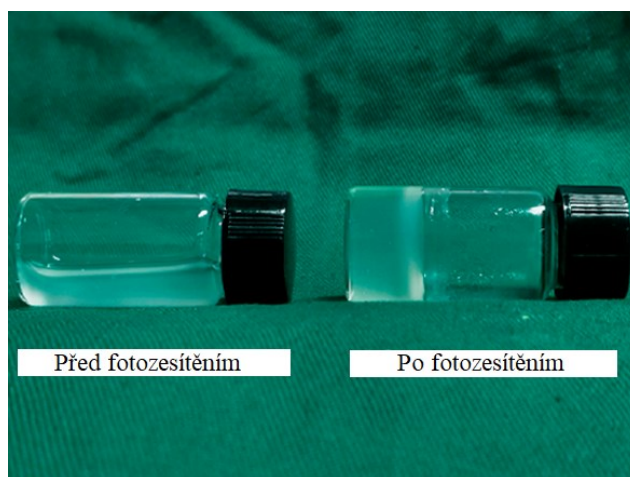


Obr. 9: 3D tištěný scaffold na bázi fibroinu a hydroxyapatitu [61]

4.1.2 Přírodní polymery

Kyselina hyaluronová

Metakrylát kyseliny hyaluronové je přírodní lineární glykosaminoglykan, který se skládá z opakujících se disacharidových jednotek [62]. Samotný fibroin bez použití tohoto aditiva je velmi křehký a díky vlastnostem metakrylátu kyseliny hyaluronové lze křehkost scaffoldů eliminovat, zároveň metakrylovaná kyselina hyaluronová umožňuje fotozesítnění směsi za vzniku hydrogelu (obr. 10), vhodného pro zpracování metodou 3D tisku [63].

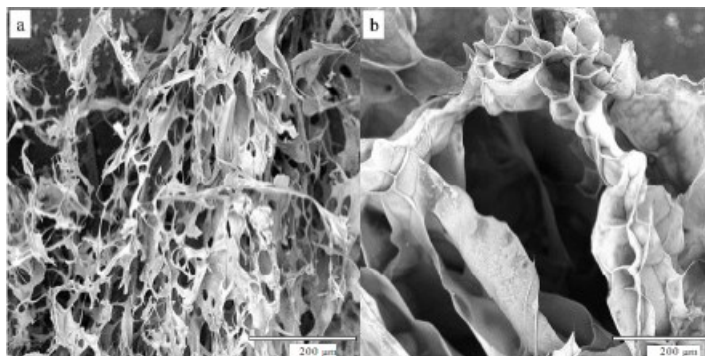


Obr. 10: Porovnání hydrogelů před a po fotozesítnění pod UV světlem [63]

Alginát

Jak bylo zmíněno výše, alginát funguje při tisku jako pojivo, je snadno deformovatelný a dobře tisknutelný. Zároveň je biokompatibilní a snadno biodegradovatelný [64]. Pomocí smíchání alginátu a hedvábného fibroinu bylo dosaženo poměrně vysoké rychlosti gelovatění, což je jedním z hlavních důvodů kombinování těchto dvou materiálů. Pomocí

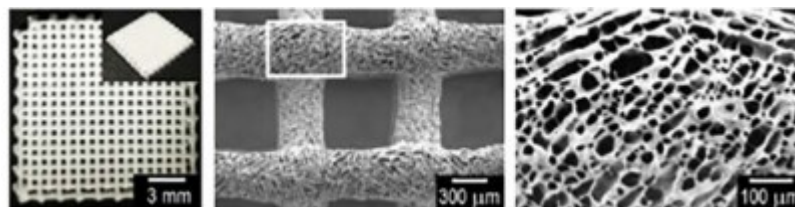
chelatačních činidel lze do jisté míry dále upravit strukturu výsledných materiálů. Na obrázku 11 byla pozorována změna ve struktuře materiálů, které byly opatřeny chelatačními činidly [65].



Obr. 11: Snímky ze SEM a) materiál neopatřený chelatačními činidly b) materiál opatřený pomocí chelatačních činidel [65]

Kolagen

Pro regeneraci kostní tkáně je vhodnou kombinací fibroin s kolagenem. Existují různé typy kolagenů, z nichž je nejvíce využíván kolagen typu I. Jedná se o protein ze savčích tkání [66]. Samotný kolagen pro regeneraci kostní tkáně není příliš vhodný, vzhledem ke své nízké mechanické pevnosti, fibroin ve směsi však vytvoří dostatečnou strukturální podporu pro růst buněk. [67]. Na obr. 12 je znázorněna tištěná mřížka na bázi kolagenu a fibroinu [68].

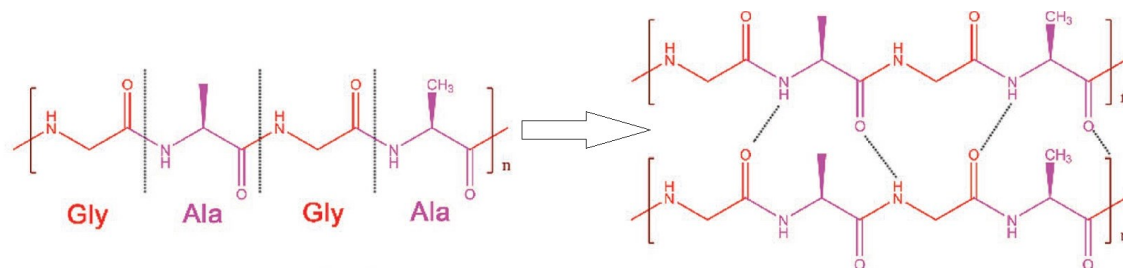


Obr. 12: Scaffold 3D tištěné směsi kolagenu s fibroinem [68]

Želatina

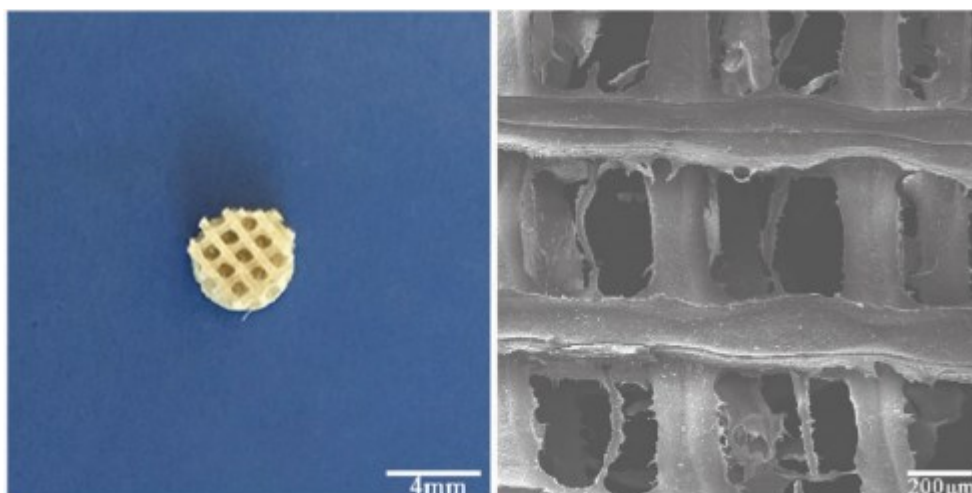
Částečným derivátem kolagenu je želatina, která má poměrně malou antigenicitu a velmi dobrou biokompatibilitu. Samotná želatina vzhledem ke své velmi rychlé degradaci a malé pevnosti představuje nevhodný materiál pro 3D tisk, ale po smíchání s hedvábným fibroinem lze dosáhnout velmi dobrých vlastností vytvořených scaffoldů [69]. Ke směsi lze přidat bioaktivní aditiva, jako afinitní peptid fungující jako bariéra pro krevní sraženinu [70]. Ve studii Rodriguez et al. byl navržen postup, jak zlepšit cytotoxicitu hydrogelů na bázi želatiny a fibroinu způsobovanou zbytkovými síťovacími činidly jejich náhradou

polyethylenglykolem [71]. Mechanické vlastnosti těchto scaffoldů lze následně zlepšit transformací sekundární struktury fibroinu na konformaci mechanicky pevnějšího β -skládaného listu [72]. Schéma konformačního přechodu je znázorněno na obrázku 13 [70].



Obr. 13: Schéma reakce struktury hedvábného fibroinu β -listu pomocí úpravy etanolem [70]

Scaffoldy na bázi fibroinu a želatiny (obr. 14) představují vhodnou kombinaci materiálů pro regeneraci chrupavčité tkáně [70].

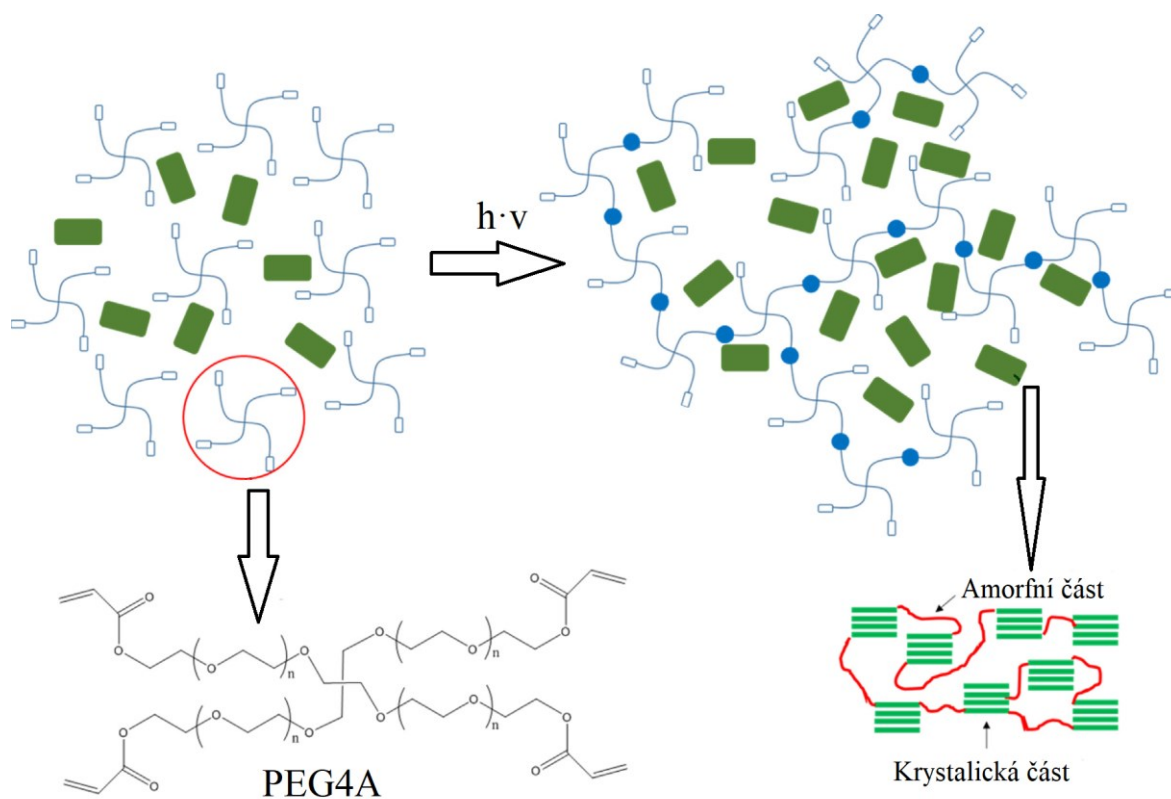


Obr. 14: Tištěný scaffold na bázi fibroinu a želatiny [70]

4.1.3 Syntetické polymery

Polyethylenglykol

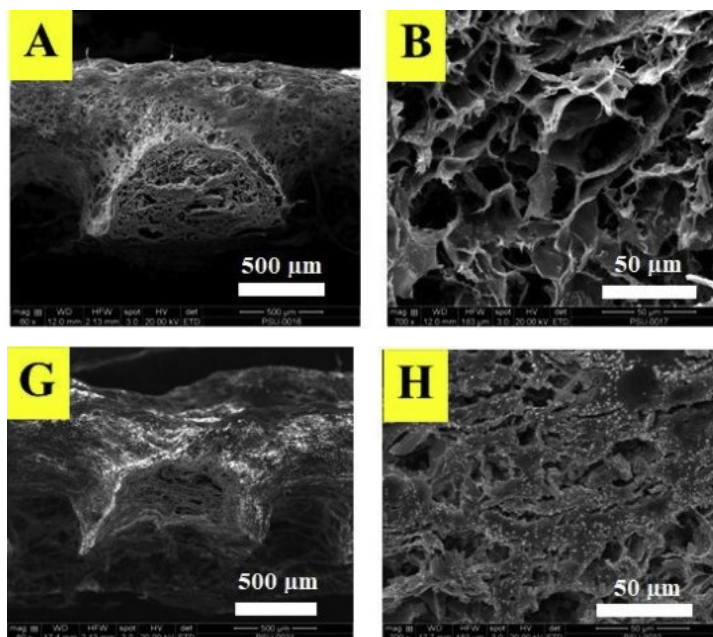
Pro přípravu umělé kůže se vyvíjí kompozitní hydrogely na bázi fibroinu s polyethylenglykolem. Pro vytvoření komplexní struktury kůže byly při buněčných testech fibroblasty tištěny přímo v hydrogelu a keratinocyty byly kultivovány na povrchu hydrogelu. Schématické znázornění struktury PEG4A v kombinaci s hedvábným fibroinem je na obrázku 15. Tyto hydrogely byly při tisku stabilizovány fotosíťováním. [73]



Obr. 15: Fotozesíťovaný PEG4A obsahující hedvábný fibroin [73]

Polyvinylalkohol

Pro tvorbu hydrogelu pro náhradu ušní chrupavky je vhodná kombinace hedvábného fibroinu a polyvinylalkoholu [74]. Dále byly vyvíjeny tištěné scaffoldy na bázi fibroinu a polyvinylalkoholu v kombinaci s alginátem (obr. 16) pro náhrady kostní tkáně. Alginát ve směsi simuluje texturu kostní tkáně, polyvinylalkohol plní funkci pojivových komponent extracelulární matrix, fibroin slouží jako strukturální protein v matrici [75].



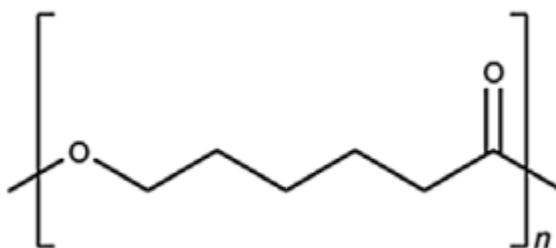
Obr. 16: Řez morfologií tištěného scaffoldu na bázi polyvinylalkoholu a alginátu (A, B) a polyvinylalkoholu, alginátu a hedvábného proteinu (G, H) [75]

Takto vytvořené materiály měly velmi dobrou schopnost vázat vodu k poskytnutí vhodného prostředí k růstu chondrocytů. Mezi nejdůležitější parametry, které ovlivňují výsledné struktury, byl botnací poměr, velikost pórů, výsledná morfologie a tepelné a chemické vlastnosti. Velkou předností tohoto hydrogelu byla dobrá mechanická pevnost. Hedvábný protein v kombinaci s polyvinylalkoholem během *in vivo* testů nevyvolává téměř žádnou imunitní odezvu [76].

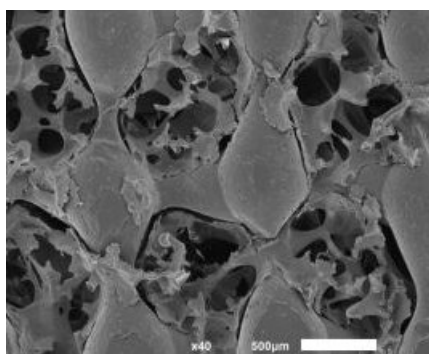
Dalším syntetickým polymerem, který lze použít pro přípravu směsí s fibroinem je polykaprolakton. Vzhledem k náplni experimentální části práce bude této oblasti věnována samostatná následující kapitola.

5 SMĚSI HEDVÁBNÉHO PROTEINU S POLYKAPROLAKTONEM

Polykaprolakton patří do skupiny polyesterů a jedná se o biodegradabilní syntetický polymerní materiál [21]. Schematický vzorec polykaprolaktonu je uveden na obr. 17 [77]. Směs fibroinu a polykaprolaktonu se využívá například při vývoji implanovatelných podpůrných destiček pro léčbu zlomenin [78]. Cengiz et al. ve své studii navrhli scaffoldy z 3D tištěného PCL, kdy póry v tištěné mřížce byly vyplněny fibroinem po namočení výtisku do proteinového roztoku, výsledná struktura viz obr. 18 [79].



Obr. 17: Vzorec polykaprolaktonu [77]



Obr. 18: Vytvořené scaffoldy s PCL a hedvábným fibroinem [79]

Mikrostrukturální analýza potvrdila, že propojení fibroinu a polykaprolaktonu bylo úspěšné. Hedvábný fibroin zajišťuje velmi dobré botnavé vlastnosti, vytvořené kompozitní struktury podporují adhezi, proliferaci a metabolickou aktivitu [79].

Mikročástice hedvábí v matrici polykaprolaktonu mají vliv zejména na biologické a degradační vlastnosti materiálu [80]. Výraznější vliv na zlepšení mechanických vlastností kompozitu má fibroin ve formě mikrovláken získaných hydrolýzou nativních vláken a to díky zachovanému velkému poměru β -skládaných listů. Pevnost PCL matrice vyztužené fibroinovými mikrovláknami odpovídá kosterní tkáni, k jejíž regeneraci jsou i díky osteokonduktivitě fibroinu tyto kompozity vhodné [81].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 MATERIÁLY A METODY

6.1 Popis experimentu

Cílem experimentální části práce byla příprava polymerních směsí s obsahem hedvábného proteinu a jejich zpracování metodou 3D tisku. Jako polymerní matrice byl zvolen polykaprolakton, představující materiál vhodný pro zpracování 3D tiskem i pro kombinaci s hedvábným proteinem [82]. Inkorporace fibroinu do PCL matrice vede ke zlepšení mechanických vlastností a buněčné adheze [80]. Tištěné mřížky byly připravovány extruzním tiskem z roztoku těchto dvou polymerů v hexafluoroisopropanolu a byly sledovány změny v povrchové struktuře mřížky v závislosti na obsahu hedvábného proteinu ve směsi. Dále byly studovány strukturní změny ve výtiscích způsobené přidávkem špatného rozpouštědla do směsi.

6.2 Použité chemikálie

Pro tisk mřížek byl použit syntetický polymer polykaprolakton (Mn 80 000 kDa, Sigma Aldrich) v kombinaci s hedvábným proteinem z kokonů bource morušového (dodány Univerzitou Bayreuth). V průběhu izolace proteinu byl použit uhličitan sodný a bromid lithný (Sigma Aldrich). Pro přípravu roztoků byl použit hexafluoroisopropanol p.a. (HFIP); 99 % (abcr GmbH), dimethylsulfoxid p.a. (DMSO); 99,99% (VWR Chemicals). Vybrané mřížky byly fluorescenčně značeny pomocí fluorescein isothiokyanát dextran (FITCD, Mw 59 000 – 77 000, Sigma-Aldrich).

6.3 Použité přístroje

6.3.1 Bio 3D tiskárna

Tisk mřížek byl proveden pomocí 3D biotiskárny Bio X (Cellink). Tiskárna nabízí možnost tisku pomocí různých typů tiskových hlav, v této práci byla aplikována tisková hlava pneumatická. Jednotlivé parametry tisku (tloušťka jehly, tvar mřížky, rychlost tisku, tlak, teplota) byly nastaveny přímo v softwaru tiskárny, mřížky byly tištěny podle STL souboru z databáze tiskárny.

6.3.2 Digitální mikroskop

Na zaznamenání celkového tvaru mřížky byl použit digitální mikroskop Dino-Lite Edge AM4815ZT vyrobený společností Dino-Lite.

6.3.3 Skenovací elektronový mikroskop

Morfologie povrchu mřížky byla zaznamenána pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) Phenom Pro(Phenom World). Vzorčky byly upevněny na terčík pomocí oboustranné uhlíkové pásky a pokoveny směsí paladia a zlata po dobu 60 s v argonovém plazmatu. Snímky byly pořizovány se zvětšením 500×, 1000× a 4000× při urychlovacím napětí 10 kV.

6.3.4 Mikroskop atomárních sil

Topografie jednotlivých výtisků byla charakterizována pomocí mikroskopu atomárních sil (AFM) Dimension ICON (Bruker). Tato charakterizační mikroskopická metoda využívá ke skenování povrchu sondy, přičemž výsledný obraz je získáván na základě silových interakcí mezi hrotem sondy a atomy na povrchu vzorku. Rychlost skenování byla 0,5 Hz s rozlišením 512 x 512 pixelů, měření probíhalo při pokojové teplotě na vzduchu s využitím poklepového režimu. Pro měření byla použita sonda s rezonanční frekvencí 70 kHz a konstantou tuhosti 0,4 N/m (ScanAsyst-Air, Bruker). Obrazová analýza byla provedena v programu Gwyddion, verze 2.55, a ImageJ, verze 1.6_0_24.

6.3.5 Konfokální mikroskop

Fluorescenčně značené mřížky byly zobrazeny pomocí konfokálního mikroskopu Fluoview FV3000 (Olympus). Použité barvivo mělo excitační vlnovou délku 490 nm a emisní vlnovou délku 520 nm.

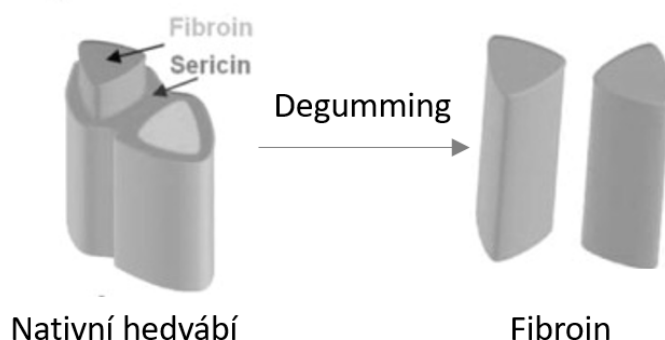
6.3.6 FTIR

Analýza materiálového složení mřížek byla provedena pomocí FTIR spektrometru od společnosti Nicolet iS5 využívající techniku ATR s Ge krystalem. Na měření bylo použito 32 skenů v rozlišení 4 cm⁻¹ a rozsahu 400 až 4000 cm⁻¹.

6.4 Izolace fibroinu

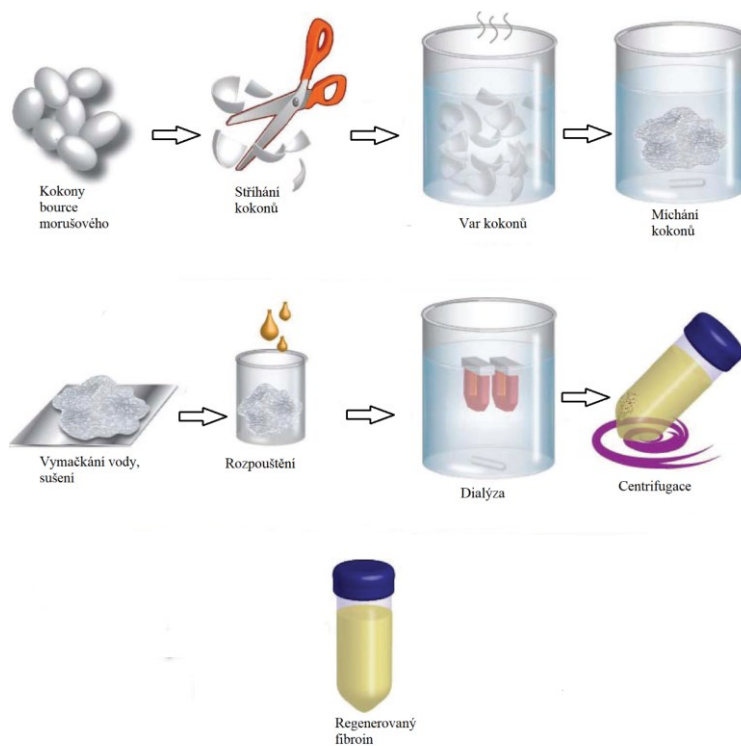
Existují různé přístupy pro izolaci fibroinu z kokonů [36; 83; 84]. Zvolené procesní parametry mají posléze vliv na vlastnosti získaného proteinu, proto je důležité k dosažení správných vlastností zvolit jeden postup a ten zcela korektně dodržet. V této práci byl s menšími úpravami následován postup dle D. L. Kaplana, schematicky znázorněn na obr. 19 [35]. Hedvábné vlákno obsahuje 2 typy proteinů, fibroin a sericin. Aby bylo hedvábí vhodné pro biomedicínské aplikace, musí se nejprve izolovat z kokonů bource morušového

procesem zvaným degumming, při kterém dochází k odstranění sericinu. Výsledek degummingu je schematicky znázorněn na obr. 19.



Obr. 19: Schéma odstranění sericinu [23]

Pro odstranění sericinu byly nastříhané kokony (obr. 20) vařeny v 0,02M vodném roztoku Na_2CO_3 po dobu 1 h. Výtěžnost byla obvykle kolem 3,5 g fibroinu na 5 g kokonů, což s ohledem na nečistoty v surovém materiálu odpovídá přibližně obsahu 75 hm. % fibroinu v hedvábném vláknu [85]. Následně byla získaná fibroinová vlákna opakovaně proplachována ultračistou vodou a sušena přes noc při 50 °C. Následovalo rozpouštění fibroinu v 9,3M LiBr, kdy na 1 g fibroinu byly použity 4ml LiBr. Fibroin se rozpouštěl v LiBr po dobu 4 h při 60 °C. Následně byl LiBr z roztoku odstraněn pomocí dialýzy proti vodě (6 výměn vody v průběhu 48 h).



Obr. 20: Schéma izolace fibroinu [35]

Pro odstranění zbylých nečistot z vodného roztoku fibroinu byla provedena centrifugace při 9000 rpm, 4 °C, 2x po 20 minutách. Vodné roztoky byly následně lyofilizovány. Lyofilizovaný fibroin (obr. 21) lze dále opětovně rozpouštět a zpracovávat do požadovaných morfologií, zároveň se lyofilizací prodlouží doba skladovatelnosti.



Obr. 21: Vlevo vstupní surovina ve formě kokonů, vpravo lyofilizovaný fibroin

6.5 Příprava roztoků pro tisk

BMF i PCL byly rozpouštěny zvlášť v HFIP po dobu cca 6 h na třepačce při pokojové teplotě. HFIP bylo zvoleno z toho důvodu, že dobře rozpouští oba zpracovávané polymery. Tyto roztoky byly následně smíchány dohromady, hmotnostní poměry mezi BMF a PCL

byly zvoleny 1:10, 1:5, 1:2,5 a 1:2,3. Objem rozpouštědla byl volen tak, aby výsledný poměr mezi pevným podílem a rozpouštědlem byl 1:6 a 1:9 (g : ml).

Špatné rozpouštědlo DMSO bylo přidáváno k výchozím roztokům v poměru 0,01 ml DMSO na 1g roztoku PCL nebo připravené směsi BMF-PCL.

V případě fluorescenčního značení roztoku byl FITCD rozpouštěn v DMSO v poměru 1:150 (mg : μ l). Fluorescenčně značený DMSO (F-DMSO) byl poté přidáván ke směsi BMF a PCL v poměru 0,03 ml F-DMSO na 1 ml směsného roztoku BMF-PCL.

6.6 Parametry tisku připravených roztoků

Tisk mřížek byl proveden mikroextruzí z roztoku pomocí pneumatické hlavy na 3D biotiskárně. Rozměr vytištěných mřížek byl 10x10x0,3 mm s hustotou vnitřní výplně 15 %. Pro všechny tištěné mřížky byla použita kónická špička o průměru 25G (0,26mm). Rychlost tisku se pohybovala v rozmezí 3-10 mm·s⁻¹, tlak 30-100 kPa. Tyto parametry byly nastavovány s ohledem na vlastnosti daného roztoku. Tisk probíhal při pokojové teplotě tiskové hlavy i tiskové podložky.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

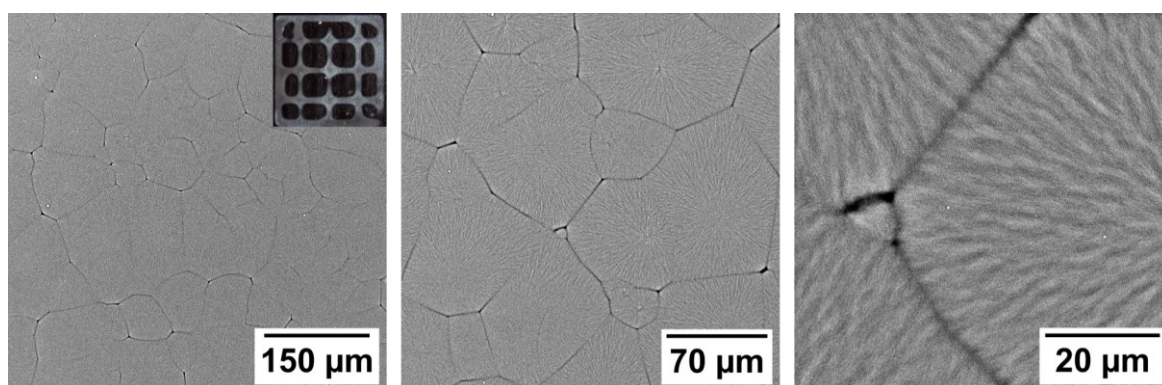
7.1 Tisk směsi PCL a BMF s dobrým rozpouštědlem

Pro tisk čistého PCL byly připraveny roztoky z PCL a HFIP v poměru 1:9 g/ml. Struktura povrchu mřížky z čistého PCL je znázorněna pomocí SEM na obr. 22. Lze pozorovat vznik sférolitů, jejichž struktura je srovnatelná s literaturou [86].

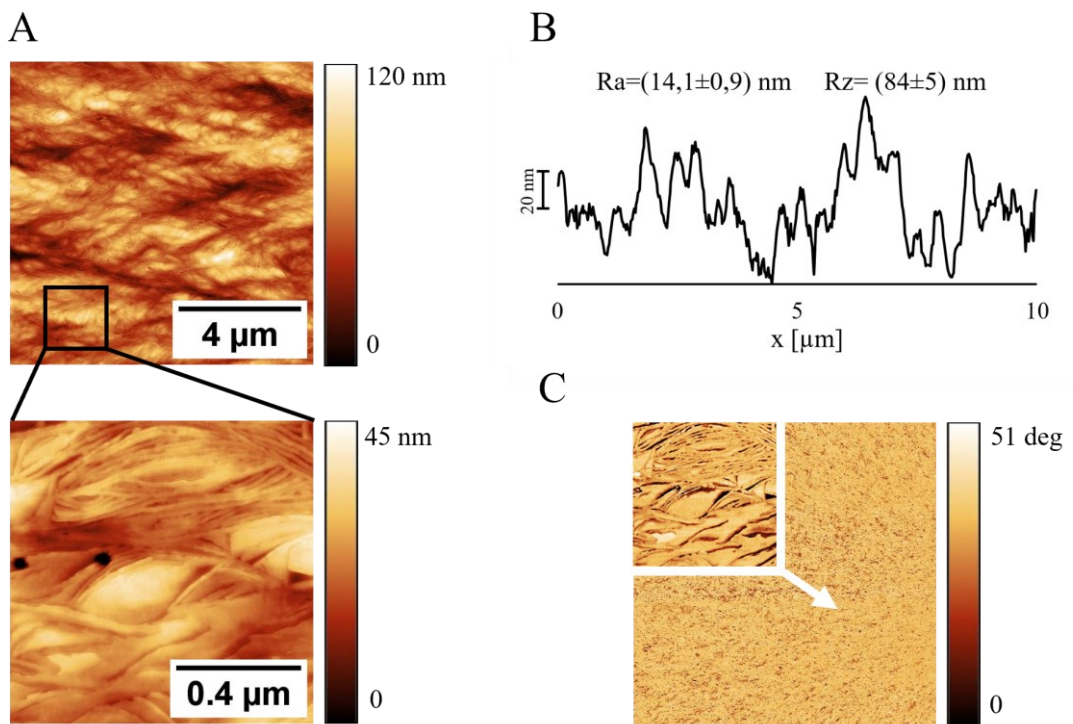
Na obrázku 23 je znázorněna pomocí AFM povrchová textura sférolitu ve výtisku z čistého PCL s detailním snímkem uspořádání lamel. U profilového řezu na obr. 23 B je uvedena nejvyšší výška profilu $Rz=(84\pm5)$ nm a průměrná aritmetická úchylka $Ra=(14,1\pm0,9)$ nm.

Po přidavku BMF k PCL lze pozorovat v povrchové morfologii výtisku výrazné změny. Na obr. 24 jsou znázorněny SEM snímky výtisku z roztoku BMF a PCL v poměru 1:2,3. V první řadě si lze všimnout, že ve srovnání s čistým PCL (obr. 22) došlo ke zmenšení vzniklých sférolitů přibližně o polovinu. Dále lze na povrchu pozorovat četné částice, které jsou pravděpodobně tvořeny agregovaným fibroinem. Podobné částice lze sledovat v řezu tištěných struktur na bázi fibroinu a polyvinylalkoholu ve studii Sangkert et al., obr. 17. [75]

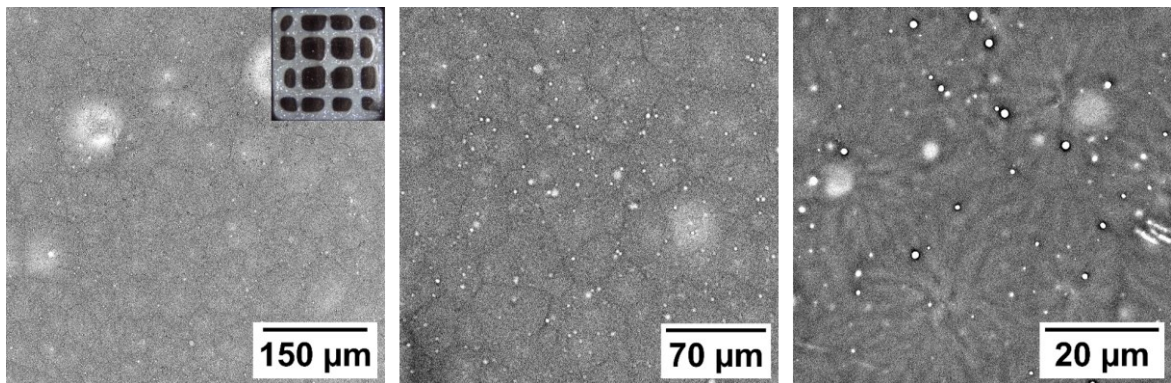
Na obrázku 25 je znázorněna detailní struktura tohoto povrchu, přičemž lze pozorovat na obr. 25 A změnu v uspořádání lamel sférolitu a rovněž na obr. 25 C ve fázi jsou zřetelné částice v PCL matici. Zároveň došlo ve srovnání s čistým PCL ke zmenšení parametrů drsnosti, $Rz=(61\pm3)$ nm a $Ra=(8,8\pm0,6)$ nm.



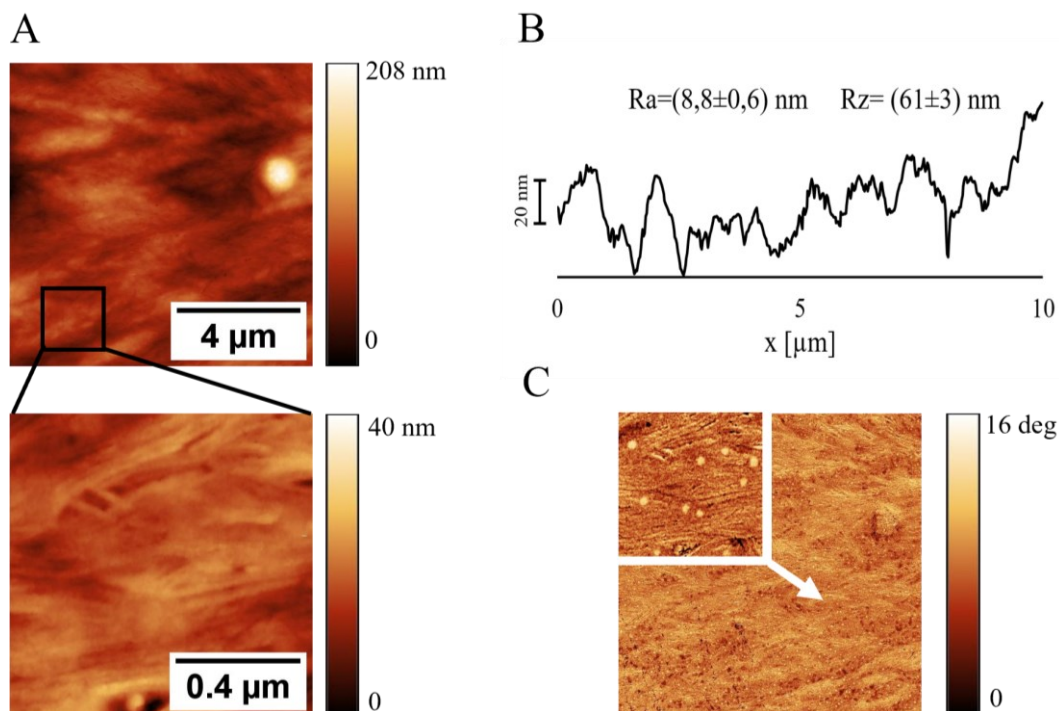
Obr. 22: SEM snímky povrchu vytištěné mřížky z čistého roztoku PCL s HFIP; náhled celé mřížky na snímku vlevo



Obr. 23: AFM snímek povrchu vytištěné mřížky z čistého roztoku PCL s HFIP, A) topografie, B) profilový řez, C) fázový kontrast měřených ploch



Obr. 24: SEM snímky povrchu vytištěné mřížky z roztoku BMF a PCL s HFIP; náhled celé mřížky na snímku vlevo

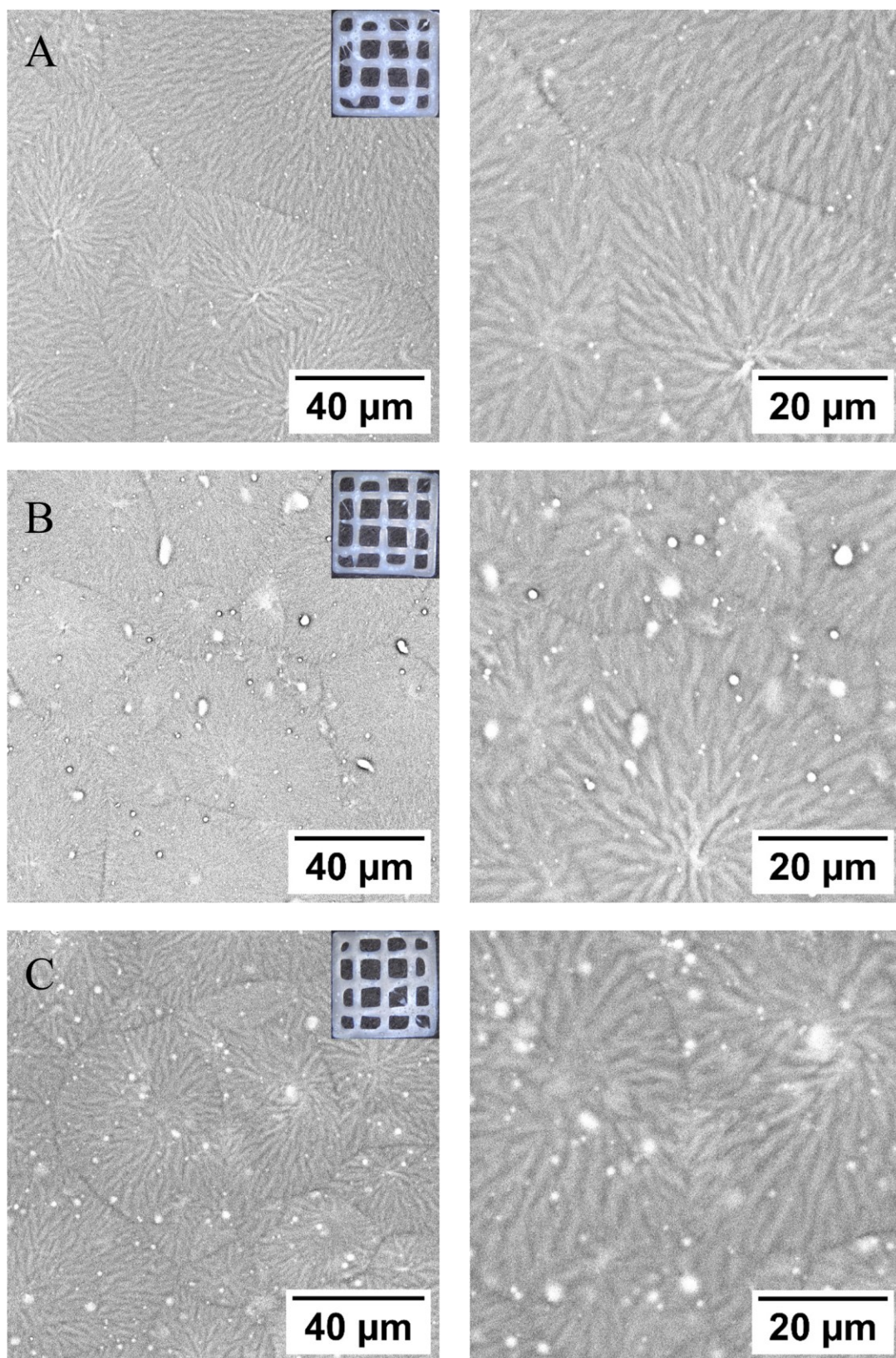


Obr. 25: AFM snímek povrchu vytištěné mřížky z roztoku BMF a PCL s HFIP, A) topografie, B) profilový řez, C) fázový kontrast měřených ploch

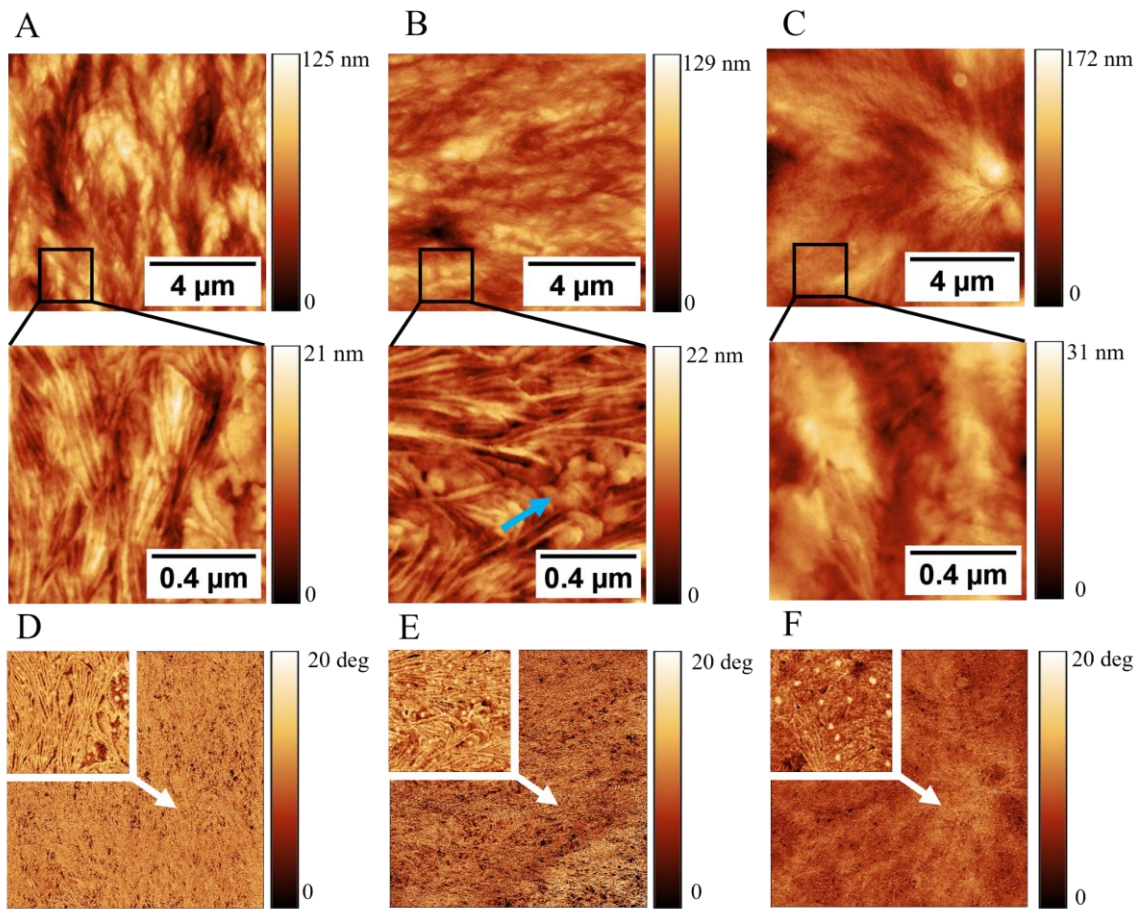
7.2 Vliv koncentrace fibroinu ve směsi s PCL

Pro názorné zobrazení vlivu přítomnosti fibroinu v tištěné směsi na výslednou strukturu byly vytištěny 3 mřížky s obsahem BMF a PCL v poměrech 1:10, 1:5 a 1:2,5. SEM snímky těchto povrchů jsou na obr. 26. Se zvyšujícím se podílem BMF ve směsi lze pozorovat zmenšující se sférolity PCL a zároveň nárůst počtu částic v matrici.

Na obr. 27 je znázorněna povrchová textura pomocí AFM u stejných vzorků, jež byly popsány na obr. 26. Lze pozorovat, že s rostoucí koncentrací fibroinu ve směsi dochází k narušení orientovaného uspořádání lamel PCL sférolitů. Objevující se změny ve struktuře jsou vyznačeny modrou šipkou v detailu u obr. 27 B. Částice fibroinu v PCL matrici lze pozorovat opět ve fázi na obr. 27 D-F.



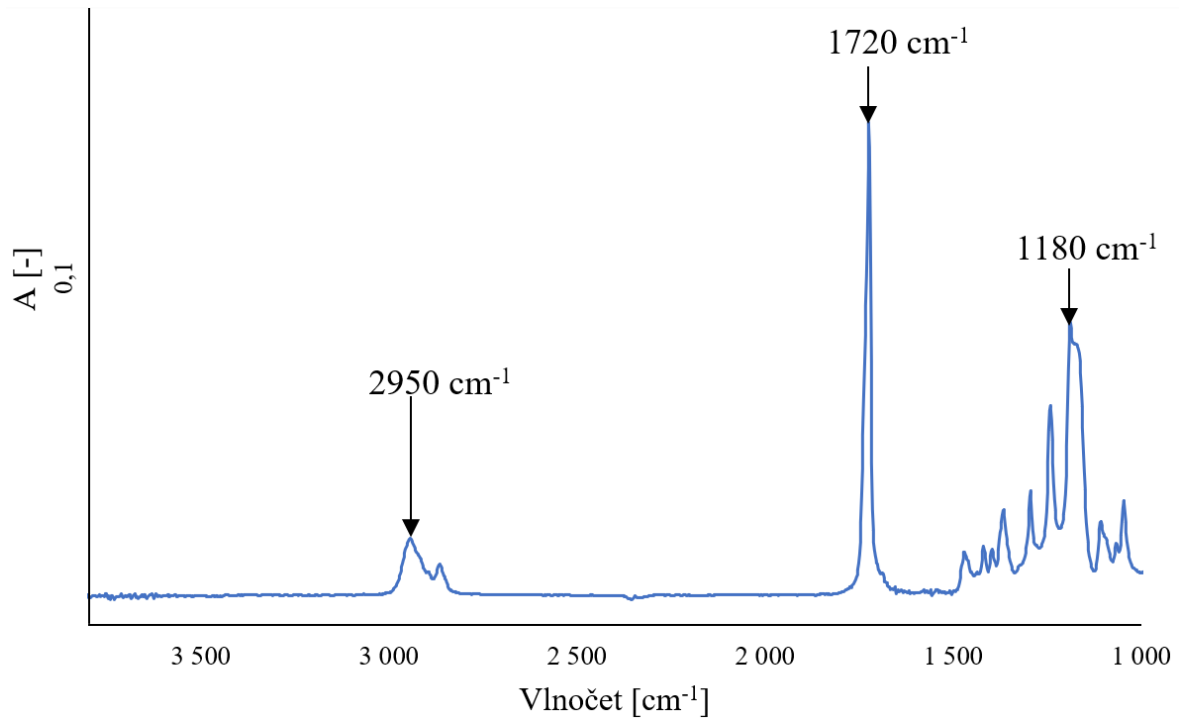
Obr. 26: SEM snímky povrchu vytištěné mřížky z roztoku BMF a PCL s HFIP v poměru BMF : PCL: A) 1:10, B) 1:5, C) 1:2,5; ; náhled celých mřížek na snímcích vlevo



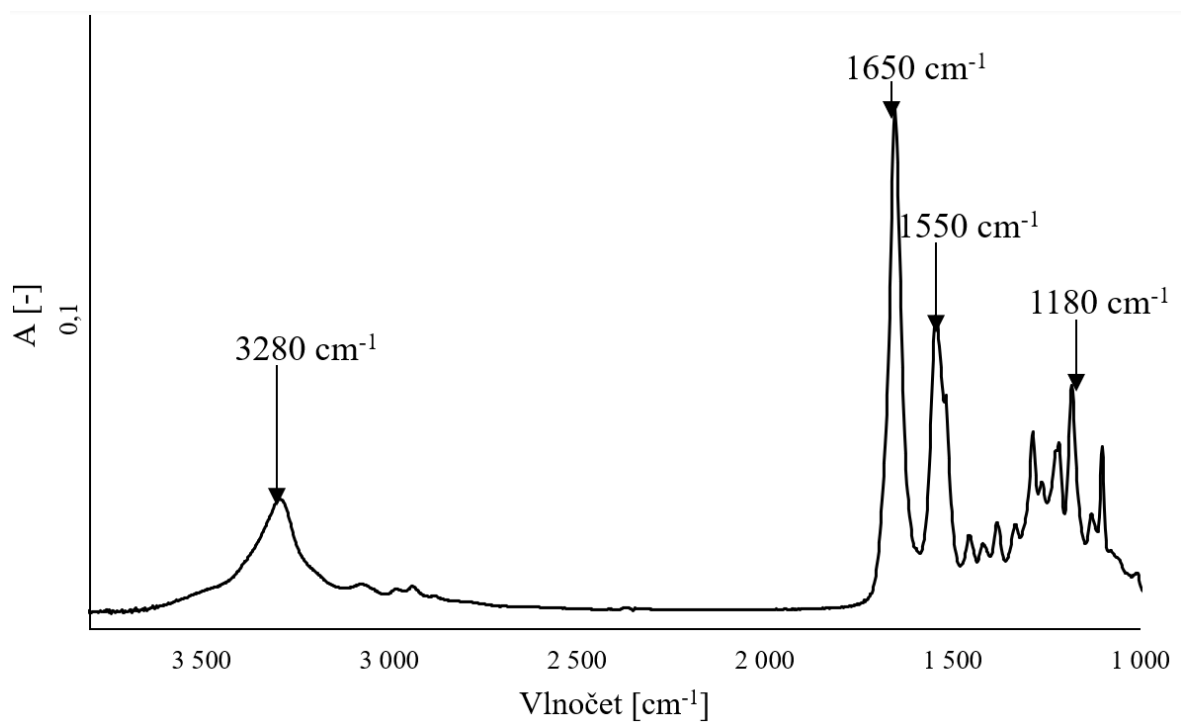
Obr. 27: AFM snímky povrchu vytištěné mřížky z roztoku BMF a PCL s HFIP v poměru BMF : PCL: A) 1:10, B) 1:5, C) 1:2,5; D) – F) fázový kontrast měřených ploch pro dané koncentrace BMF

Z měřených ploch byly opět získány profilové řezy znázorněné na obr. 28. Z analýzy povrchu plyne, že s rostoucím obsahem fibroinu ve vzorku dochází ke snížení parametrů drsnosti a mění se celkový profil povrchu.

fibroinu, se nachází na vlnočtech 1650 cm^{-1} (Amid I), 1550 cm^{-1} (Amid II) a 1180 cm^{-1} (Amid III) [88].

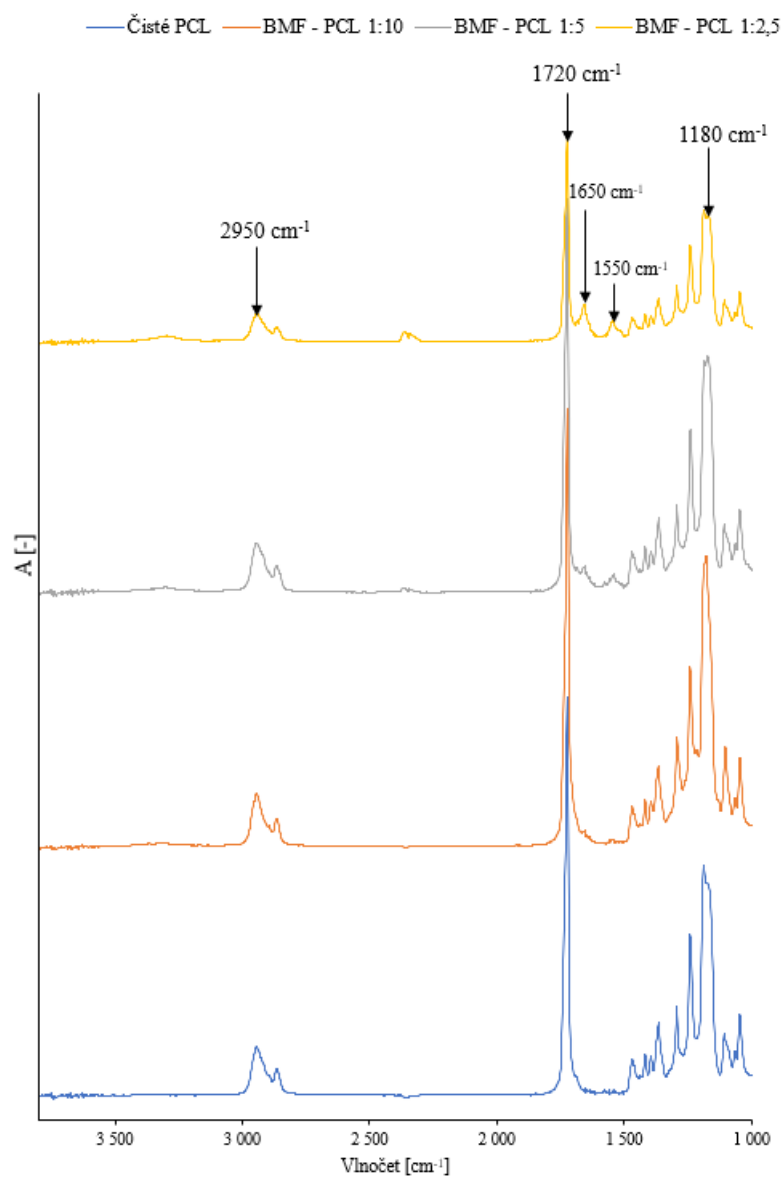


Obr. 29: FTIR spektrum u čistého PCL



Obr. 30: FTIR spektrum u čistého BMF

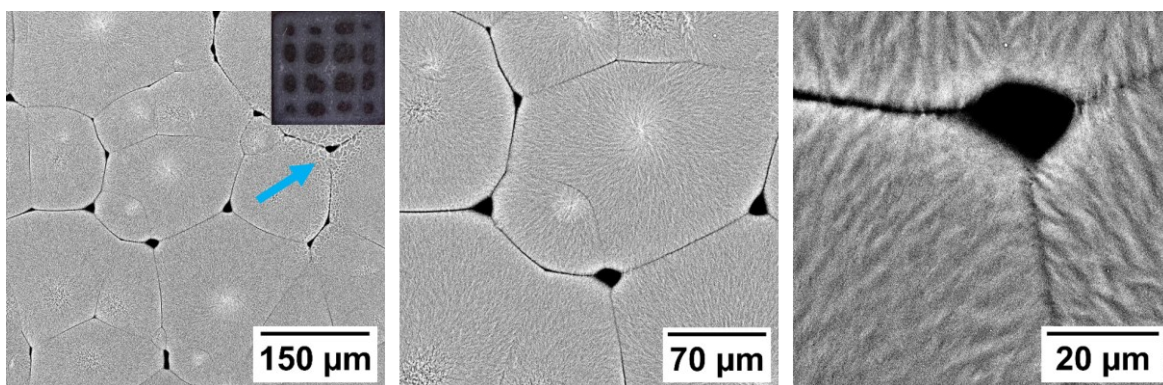
Na obr. 31 je srovnání FTIR spekter čistého PCL s výtisky s rostoucí koncentrací fibroinu. S rostoucím podílem BMF v roztoku lze u vytištěných mřížek pozorovat postupný nárůst charakteristických píků pro fibroin v oblasti 1650 cm^{-1} (Amid I) a 1550 cm^{-1} (Amid II).



Obr. 31: FTIR spektrum u čistého PCL a BMF s rostoucí koncentrací

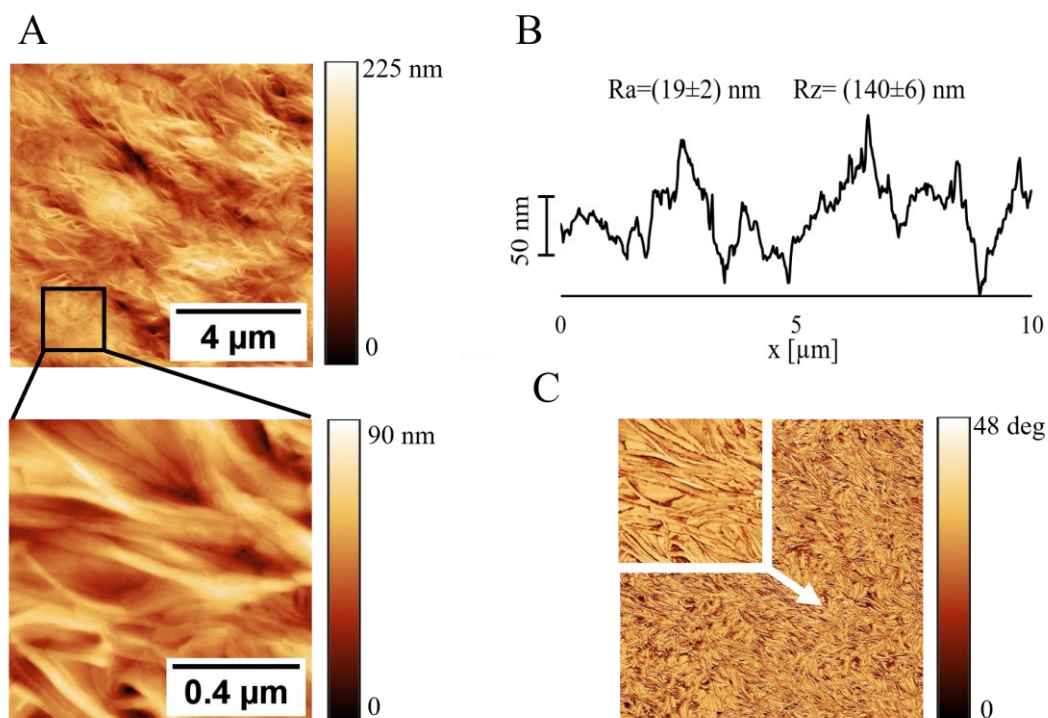
7.3 Tisk směsi PCL a BMF se špatným rozpouštědlem

Za účelem změny povrchové topografie výtisků vlivem fázové separace byly připraveny roztoky polymerů s dobrým a špatným rozpouštědlem. Na obr. 32 je pomocí SEM znázorněna struktura roztoku PCL s HFIP v poměru 1:9 s přídavkem DMSO. Lze si všimnout, že vlivem špatného rozpouštědla dochází ke vzniku prohlubní mezi PCL sférolity. Při fázové separaci se dobré rozpouštědlo HFIP odpařuje rychleji, než špatné rozpouštědlo DMSO. To tudíž zůstává ve směsi delší dobu a narušuje poté strukturu matrice [89]. Velikost sférolitů ve srovnání s PCL pouze v dobrém rozpouštědle (obr. 22) zůstává zachována. Na některých místech kolem okrajů sférolitů také dochází ke změně topografie povrchu, vyznačeno modrou šipkou na obr. 32. Při navazujícím výzkumu bude nutné zhodnotit vliv koncentrace DMSO ve směsi na tuto strukturu.



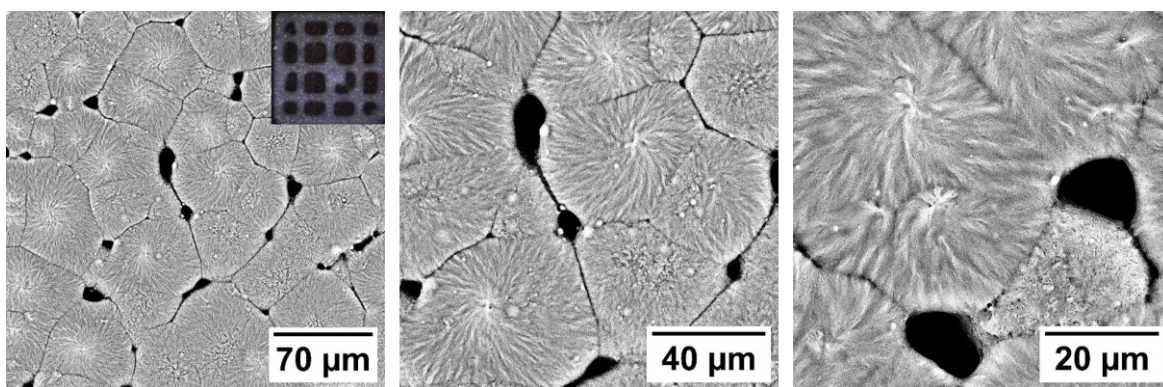
Obr. 32: SEM snímky povrchu vytištěné mřížky z roztoku PCL s HFIP a DMSO; ; náhled celé mřížky na snímku vlevo

Na obrázku 33 je pomocí AFM znázorněna povrchová textura tištěných struktur z roztoku PCL v HFIP s přídavkem špatného rozpouštědla. Ve srovnání s roztokem PCL bez špatného rozpouštědla (obr. 23) dochází ke zvýšení obou parametrů drsnosti (obr. 33 B) a tyto změny se projevují na vzhledu orientovaných struktur, obr. 33 A. Vlivem přídavku DMSO ke směsi se lamely tvořící sférolity zdají být separovanější. Z výsledků plyne, že špatné rozpouštědlo má vliv jak na mikroskopické uspořádání sférolitů PCL matrice, tak na uspořádání lamel ve sférolitu.



Obr. 33: AFM snímek povrchu vytištěné mřížky z roztoku PCL s HFIP a DMSO, A) topografie, B) profilový řez, C) fázový kontrast měřených ploch

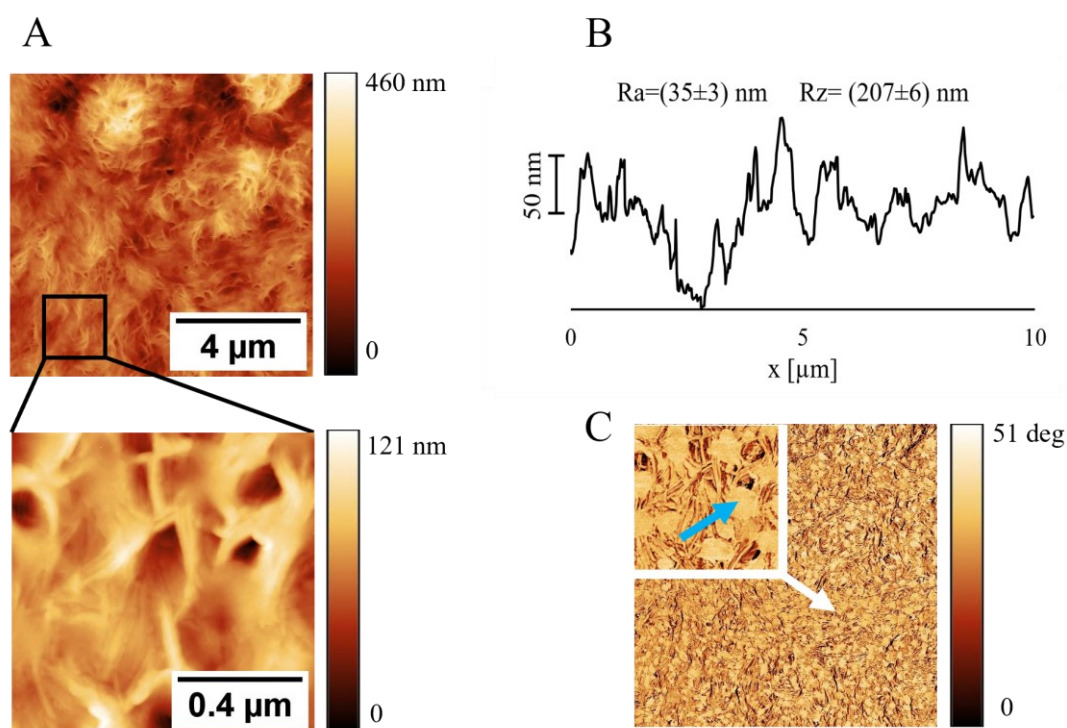
Při přidavku špatného rozpouštědla ke směsi BMF a PCL v poměru 1:2,3 rovněž dochází k tvorbě prohlubní mezi sférolity, jak je patrné ze SEM snímků na obr. 34. Dále lze pozorovat opět zmenšení sférolitu, stejně jako u obr. 24. Důležitá je zde absence fibroinových částic, lze však zaznamenat výraznější rozrušení struktury sférolitu.



Obr. 34: SEM snímky povrchu vytištěné mřížky z roztoku BMF a PCL s HFIP a DMSO; ; náhled celé mřížky na snímku vlevo

Na obr. 35 je znázorněna detailní topografie výtisků ze směsi BMF a PCL s příměsí špatného rozpouštědla. Ze srovnání s obr. 33 A plyne, že dochází k rozrušení orientovaného uspořádání lamel sférolitu a na povrchu vznikají prohlubně porézního charakteru. Ve

fázovém kontrastu na obr. 35 C lze rovněž zaznamenat absenci částic. Přídavkem DMSO je tedy potlačeno formování fibroinu do částic, ale dochází k výraznějšímu narušení orientovaného sférolitického uspořádání makromolekul PCL. Na obr. 35 C s fázovým kontrastem si lze všimnout ostrůvků mezi lamelami, která narušují orientované uspořádání (označeno modrou šipkou). Zajímavostí dále je, že oproti samotnému PCL s DMSO nyní došlo vlivem BMF ke zvýšení parametrů drsnosti (srovnání obr. 33 B a 35 B), přičemž v případě absence špatného rozpouštědla byl trend opačný (srovnání obr. 23 B a 25 B).



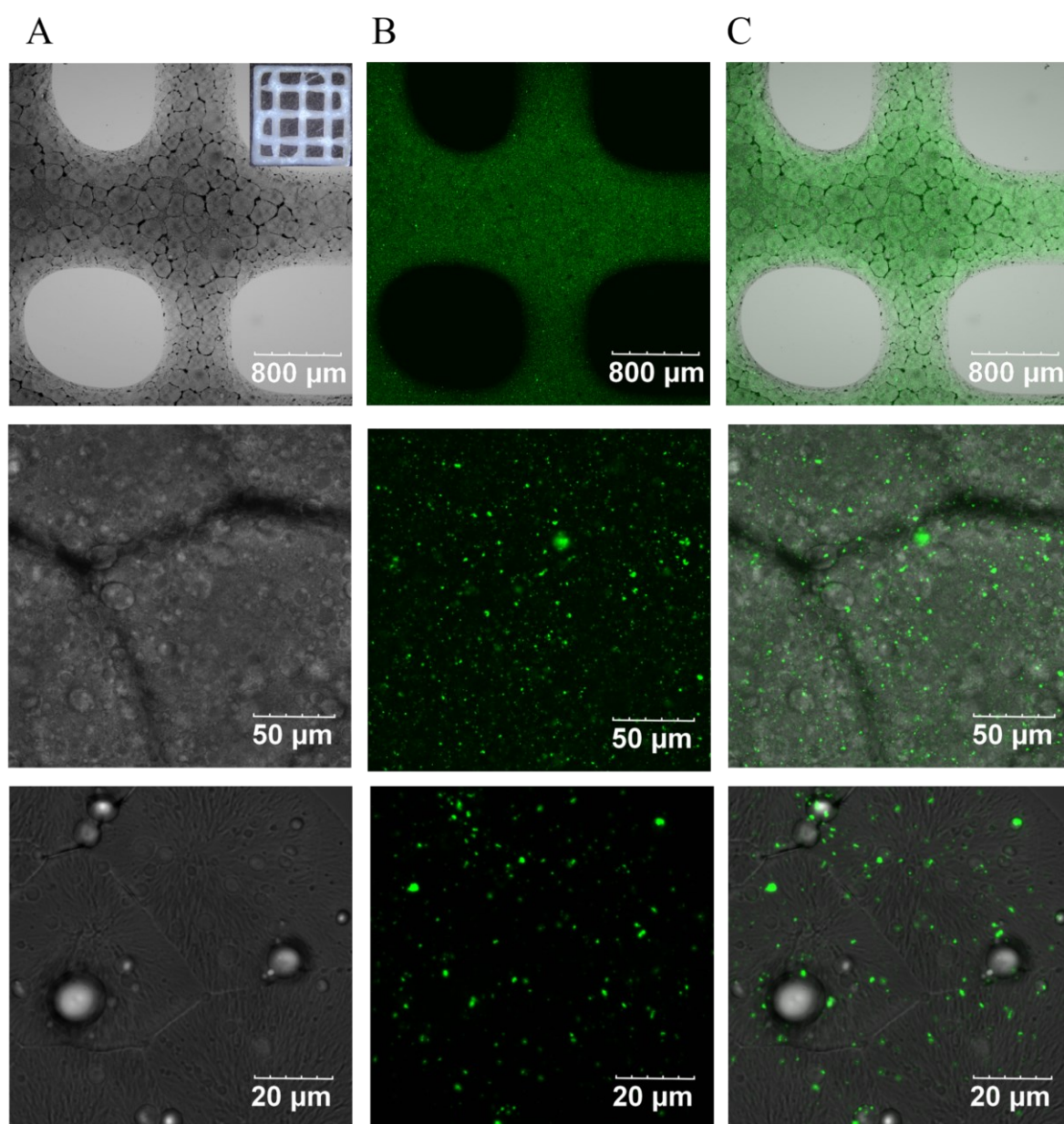
Obr. 35: AFM snímek povrchu vytištěné mřížky z roztoku BMF a PCL s HFIP a DMSO, A) topografie, B) profilový řez, C) fázový kontrast měřených ploch

Z provedených experimentů plyne, že po smíchání roztoku PCL a BMF dochází k agregování hedvábného proteinu do částic v nano až mikro rozměrech, kdy tyto částice mají za následek změnu uspořádání sférolitů PCL matrice. Přídavkem špatného rozpouštědla dochází vlivem fázové separace rovněž k rozrušení uspořádání matrice na více úrovních, zároveň se zdá, že DMSO ovlivňuje strukturu hedvábného proteinu v matrici.

7.4 Fluorescenční značení tištěných struktur

V poslední řadě byly provedeny experimenty s fluorescenčním značením fibroinu ve směsi s PCL s cílem nalézt možnost, jak odlišit tyto dvě složky směsi. Příprava fluorescenčně značeného roztoku je popsána v kapitole 6.4. Na obr. 36 jsou snímky z konfokálního

mikroskopu zobrazující tištěnou mřížku z roztoku BMF a PCL s přidavkem fluorescenčního barviva včetně špatného rozpouštědla. Na obrázcích lze pozorovat prohlubně mezi jednotlivými sférolity PCL a zároveň si lze všimnout svítících částic v matici. Ačkoliv velikost a distribuce barevných částic koreluje se SEM snímky znázorňujícími PCL v kombinaci s BMF, v současnosti nelze s určitostí říct, zda se jedná o preferenčně barvený hedvábný protein. Této oblasti bude věnována pozornost v budoucím výzkumu, stejně jako zkoumání vlivu koncentrace špatného rozpouštědla na topografii tištěných struktur a morfologii sférolitů.



Obr. 36: Snímky fluorescenčně značené tištěné mřížky pořízené pomocí konfokálního mikroskopu A) zobrazení v procházejícím světle, B) zobrazení ve fluorescenčním módu, C) složený obraz

ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byly studovány možnosti přípravy polymerních směsí s obsahem hedvábného proteinu a jejich zpracování pomocí 3D tisku. Z provedené rešerše a rovněž z provedených experimentů vyplynulo, že zpracování samotného hedvábného proteinu pomocí 3D tisku je vlivem sekundárních změn ve struktuře proteinu obtížné. Lze však využít jeho mechanické a biologické vlastnosti přidáním do jiného biomateriálu a tím optimalizovat vlastnosti výsledného výtisku z hlediska stability a biokompatibility. Jedním ze syntetických polymerů vhodných pro aplikace v tkáňovém inženýrství je polykaprolakton. Scaffoldy připravené z PCL a fibroinu podporují buněčnou adhezi i proliferaci.

V praktické části byly připraveny různé varianty roztoků na bázi hedvábného proteinu a polykaprolaktonu. V první řadě byly srovnány výtisky z čistého PCL a PCL ve směsi BMF, přičemž bylo zjištěno, že BMF tvoří v PCL matici částice, narušuje uspořádání sférolitů PCL a má tak zcela klíčový vliv na povrchovou strukturu výtisku. S narůstající koncentrací BMF ve směsi bylo možné sledovat postupné změny v uspořádání lamel sférolitů stejně jako narůstající množství fibroinových částic v matici.

Co se týká vlivu špatného rozpouštědla v roztoku na povrchovou texturu výtisku, bylo zjištěno, že špatné rozpouštědlo působí na strukturu výtisku na více úrovních - způsobuje vznik prohlubní mezi sférolity PCL a rovněž ovlivňuje i uspořádání lamel sférolitu. Na povrchu výtisku byly místy objeveny plochy s jamkovou povrchovou texturou, s vyšším podílem DMSO ve směsi by mohlo být dosaženo výrazněji porézní textury.

Hedvábný protein v polymerní matici má za následek nejen zlepšení mechanických vlastností a biokompatibility materiálu, ale rovněž může sloužit jako nosič pro biologicky aktivní látky a tím umožnit povrchovou modifikaci tištěných struktur [90]. Prvotní snahou bylo označit hedvábný protein pomocí fluorescenčního barviva, tato oblast bude však dále rozvíjena v budoucím výzkumu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] NGO, Tuan D., Alireza KASHANI, Gabriele IMBALZANO, Kate T.Q. NGUYEN a David HUI. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. *Composites Part B: Engineering*. 2018, **143**, 172-196. ISSN 13598368. Dostupné z: doi:10.1016/j.compositesb.2018.02.012
- [2] VAEZI, Mohammad, Hermann SEITZ a Shoufeng YANG. A review on 3D micro-additive manufacturing technologies. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*. 2013, **67**(5-8), 1721-1754. ISSN 0268-3768. Dostupné z: doi:10.1007/s00170-012-4605-2
- [3] MOHAMED, Omar A., Syed H. MASOOD a Jahar L. BHOWMIK. Optimization of fused deposition modeling process parameters: a review of current research and future prospects. *Advances in Manufacturing*. 2015, **3**(1), 42-53. ISSN 2095-3127. Dostupné z: doi:10.1007/s40436-014-0097-7
- [4] WANG, Xin, Man JIANG, Zuowan ZHOU, Jihua GOU a David HUI. 3D printing of polymer matrix composites: A review and prospective. *Composites Part B: Engineering*. 2017, **110**, 442-458. ISSN 13598368. Dostupné z: doi:10.1016/j.compositesb.2016.11.034
- [5] UTELA, Ben, Duane STORTI, Rhonda ANDERSON a Mark GANTER. A review of process development steps for new material systems in three dimensional printing (3DP). *Journal of Manufacturing Processes*. 2008, **10**(2), 96-104. ISSN 15266125. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmapro.2009.03.002
- [6] LEE, Hyub, Chin Huat Joel LIM, Mun Ji LOW, Nicholas THAM, Vadakke Matham MURUKESHAN a Young-Jin KIM. Lasers in additive manufacturing: A review. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing-Green Technology*. 2017, **4**(3), 307-322. ISSN 2288-6206. Dostupné z: doi:10.1007/s40684-017-0037-7
- [7] MELCHELS, Ferry P.W., Jan FEIJEN a Dirk W. GRIJPMMA. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*. 2010, **31**(24), 6121-6130. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.050
- [8] GIBSON, Ian, David ROSEN a Brent STUCKER. Sheet Lamination Processes. *Additive Manufacturing Technologies*. New York, NY: Springer New York, 2015, 219-244. ISBN 978-1-4939-2112-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-2113-3_9
- [9] DOU, Rui, Tianming WANG, Yunshan GUO, Brian DERBY a G. FRANKS. Ink-Jet Printing of Zirconia: Coffee Staining and Line Stability. *Journal of the American Ceramic Society*. 2011, **94**(11), 3787-3792. ISSN 00027820. Dostupné z: doi:10.1111/j.1551-2916.2011.04697.x
- [10] CHUNG, Seungjun, Kyungjune CHO a Takhee LEE. Recent Progress in Inkjet-Printed Thin-Film Transistors. *Advanced Science*. 2019, **6**(6). ISSN 2198-3844. Dostupné z: doi:10.1002/advs.201801445
- [11] BILLIET, Thomas, Mieke VANDENHAUTE, Jorg SCHELFHOUT, Sandra VAN VLIERBERGHE a Peter DUBRUEL. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials*. 2012, **33**(26), 6020-6041. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2012.04.050

- [12] MURPHY, Sean V a Anthony ATALA. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*. 2014, **32**(8), 773-785. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.2958
- [13] *Comprehensive Structural Integrity*. 1 st. Boston: Elsevier, 2003. ISBN 9780080490731.
- [14] *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 3 rd. Boston: Elsevier/Academic Press, 2013. ISBN 978-0-12-374626-9.
- [15] *Biomaterials: the Intersection of biology and materials science*. 1 st. New York: Prentice Hall, 2008. ISBN 01-300-9710-1.
- [16] O'BRIEN, Fergal J. *Materials Today*. 2011, **14**(3), 88-95. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X
- [17] *Biomaterials, artificial organs and tissue engineering*. 1 st. Cambridge: Woodhead, 2005. ISBN 18-557-3737-X.
- [18] *Tissue engineering*. 1 st. London: Academic, 2008. ISBN 978-012-3708-694.
- [19] *Chinese Silk: A Cultural History*. 1 st. Rutgers: University Press, 2004. ISBN 0813534461.
- [20] MA, P. *Biomaterials and regenerative medicine*. 1 st. Cambridge: Cambridge University Press, 2014. ISBN 978-1-107-01209-7.
- [21] PITJAMIT, Siwasit, Kittiya THUNSIRI, Wasawat NAKKIEW, Tunchanok WONGWICHAI, Peraphan POTHACHAROEN a Wassanai WATTANUTCHARIYA. The Possibility of Interlocking Nail Fabrication from FFF 3D Printing PLA/PCL/HA Composites Coated by Local Silk Fibroin for Canine Bone Fracture Treatment. *Materials*. 2020, **13**(7). ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma13071564
- [22] SEHNAL, František. Biotechnologies Based on Silk. *Insect Biotechnology*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011, 211-224. ISBN 978-90-481-9640-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-90-481-9641-8_11
- [23] KOH, Leng-Duei, Yuan CHENG, Choon-Peng TENG et al. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials. *Progress in Polymer Science*. 2015, **46**, 86-110. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2015.02.001
- [24] NASKAR, D., R.R. BARUA, A.K. GHOSH a S.C. KUNDU. Introduction to silk biomaterials. *Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Elsevier, 2014, 3-40. ISBN 9780857096999. Dostupné z: doi:10.1533/9780857097064.1.3
- [25] VOLLRATH, Fritz a David P. KNIGHT. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature*. 2001, **410**(6828), 541-548. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35069000
- [26] JIN, Hyoun-Joon a David L. KAPLAN. Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature*. 2003, **424**(6952), 1057-1061. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature01809
- [27] ASAKURA, Tetsuo, Kosuke UMEMURA, Yasumoto NAKAZAWA, Haruko HIROSE, James HIGHAM a David KNIGHT. Some Observations on the Structure and Function of the Spinning Apparatus in the Silkworm *Bombyx mori*. *Biomacromolecules*. 2007, **8**(1), 175-181. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm060874z

- [28] LING, Shengjie, Zhao QIN, Chunmei LI, Wenwen HUANG, David L. KAPLAN a Markus J. BUEHLER. Polymorphic regenerated silk fibers assembled through bioinspired spinning. *Nature Communications*. 2017, **8**(1). ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-017-00613-5
- [29] ZHOU, Cong-Zhao, Fabrice CONFALONIERI, Michel JACQUET, Roland PERASSO, Zhen-Gang LI a Joel JANIN. Silk fibroin: Structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 2001, **44**(2), 119-122. ISSN 0887-3585. Dostupné z: doi:10.1002/prot.1078
- [30] VOLKOV, Vadim, Ana V. FERREIRA a Artur CAVACO-PAULO. On the Routines of Wild-Type Silk Fibroin Processing Toward Silk-Inspired Materials: A Review. *Macromolecular Materials and Engineering*. 2015, **300**(12), 1199-1216. ISSN 14387492. Dostupné z: doi:10.1002/mame.201500179
- [31] WÖLTJE, M. a M. BÖBEL. Natural biodegradable medical polymers. *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers*. Elsevier, 2017, 351-376. ISBN 9780081003725. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100372-5.00012-X
- [32] HOLLAND, Chris, Keiji NUMATA, Jelena RNJAK-KOVACINA a F. Philipp SEIB. The Biomedical Use of Silk: Past, Present, Future. *Advanced Healthcare Materials*. 2019, **8**(1). ISSN 2192-2640. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201800465
- [33] TANAKA, Kazunori, Naoki KAJIYAMA, Kiyohide ISHIKURA, Shou WAGA, Aiko KIKUCHI, Kohei OHTOMO, Takashi TAKAGI a Shigeki MIZUNO. Determination of the site of disulfide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1999, **1432**(1), 92-103. ISSN 01674838. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-4838(99)00088-6
- [34] BINI, Elisabetta, David P KNIGHT a David L KAPLAN. Mapping Domain Structures in Silks from Insects and Spiders Related to Protein Assembly. *Journal of Molecular Biology*. 2004, **335**(1), 27-40. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2003.10.043
- [35] ROCKWOOD, Danielle N, Rucsanda C PREDA, Tuna YÜCEL, Xiaoqin WANG, Michael L LOVETT a David L KAPLAN. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nature Protocols*. 2011, **6**(10), 1612-1631. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2011.379
- [36] CHENG, Guotao, Xin WANG, Sijie TAO, Ju XIA a Shui XU. Differences in regenerated silk fibroin prepared with different solvent systems: From structures to conformational changes. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015, **132**(22), -. ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.41959
- [37] FEI, B. High-performance fibers for textiles. *Engineering of High-Performance Textiles*. Elsevier, 2018, 27-58. ISBN 9780081012734. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-101273-4.00002-0
- [38] THURBER, Amy E., Fiorenzo G. OMENETTO a David L. KAPLAN. In vivo bioresponses to silk proteins. *Biomaterials*. 2015, **71**, 145-157. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2015.08.039
- [39] *Principles of Tissue Engineering*. 3 rd. London: Elsevier Academic Press, 2007. ISBN 978-0123706157.

- [40] HORAN, Rebecca L., Kathryn ANTLE, Adam L. COLLETTE et al. In vitro degradation of silk fibroin. *Biomaterials*. 2005, **26**(17), 3385-3393. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.09.020
- [41] ARAI, Takayuki, Giuliano FREDDI, Riccardo INNOCENTI a Masuhiro TSUKADA. Biodegradation of Bombyx mori silk fibroin fibers and films. *Journal of Applied Polymer Science*. 2004, **91**(4), 2383-2390. ISSN 0021-8995. Dostupné z: doi:10.1002/app.13393
- [42] PHILLIPS, David M., Lawrence F. DRUMMY, Deborah G. CONRADY et al. Dissolution and Regeneration of Bombyx mori Silk Fibroin Using Ionic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*. 2004, **126**(44), 14350-14351. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja046079f
- [43] VEPARI, Charu a David L. KAPLAN. Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science*. 2007, **32**(8-9), 991-1007. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013
- [44] ARAMWIT, Pornanong, Sorada KANOKPANONT, Wanchai DE-EKNAMKUL a Teerapol SRICHANA. Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2009, **107**(5), 556-561. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiosc.2008.12.012
- [45] ZHANG, Yu-Qing. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotechnology Advances*. 2002, **20**(2), 91-100. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/S0734-9750(02)00003-4
- [46] CHIRILA, Traian V. Oxygen Permeability of Silk Fibroin Hydrogels and Their Use as Materials for Contact Lenses: A Purposeful Analysis. *Gels*. 2021, **7**(2). ISSN 2310-2861. Dostupné z: doi:10.3390/gels7020058
- [47] MINOURA, Norihiko, Masuhiro TSUKADA a Masanobu NAGURA. Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial. *Biomaterials*. 1990, **11**(6), 430-434. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/0142-9612(90)90100-5
- [48] WANG, Xianyan, Hyeon Joo KIM, Peng XU, Akira MATSUMOTO a David L. KAPLAN. Biomaterial Coatings by Stepwise Deposition of Silk Fibroin. *Langmuir*. 2005, **21**(24), 11335-11341. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la051862m
- [49] JIN, Hyoun-Joon, Jaehyung PARK, Regina VALLUZZI, Peggy CEBE a David L. KAPLAN. Biomaterial Films of Bombyx M ori Silk Fibroin with Poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules*. 2004, **5**(3), 711-717. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm0343287
- [50] SUGIHARA, Akira, Kikuya SUGIURA, Haruo MORITA et al. Promotive Effects of a Silk Film on Epidermal Recovery from Full-Thickness Skin Wounds. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 2000, **225**(1), 58-64. ISSN 0037-9727. Dostupné z: doi:10.1046/j.1525-1373.2000.22507.x
- [51] QI, Yu, Hui WANG, Kai WEI, Ya YANG, Ru-Yue ZHENG, Ick KIM a Ke-Qin ZHANG. A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Level Structures. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, **18**(3). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18030237
- [52] ZHANG, Wenjie, Xiuli WANG, Shaoyi WANG et al. The use of injectable sonication-induced silk hydrogel for VEGF165 and BMP-2 delivery for elevation of the maxillary sinus floor. *Biomaterials*. 2011, **32**(35), 9415-9424. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2011.08.047

- [53] DAL PRA, Ilaria, Giuliano FREDDI, Jasminka MINIC, Anna CHIARINI a Ubaldo ARMATO. De novo engineering of reticular connective tissue in vivo by silk fibroin nonwoven materials. *Biomaterials*. 2005, **26**(14), 1987-1999. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.06.036
- [54] NAZAROV, Rina, Hyoung-Joon JIN a David L. KAPLAN. Porous 3-D Scaffolds from Regenerated Silk Fibroin. *Biomacromolecules*. 2004, **5**(3), 718-726. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm034327e
- [55] TRUBY, Ryan L. a Jennifer A. LEWIS. Printing soft matter in three dimensions. *Nature*. 2016, **540**(7633), 371-378. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature21003
- [56] WŁODARCZYK-BIEGUN, Małgorzata K. a Aránzazu DEL CAMPO. 3D bioprinting of structural proteins. *Biomaterials*. 2017, **134**, 180-201. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2017.04.019
- [57] VISSER, Jetze, Ferry P.W. MELCHELS, June E. JEON et al. Reinforcement of hydrogels using three-dimensionally printed microfibrils. *Nature Communications*. 2015, **6**(1). ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms7933
- [58] JIANG, Jianjuan, Shaoqing ZHANG, Zhigang QIAN et al. Protein Bricks: 2D and 3D Bio-Nanostructures with Shape and Function on Demand. *Advanced Materials*. 2018, **30**(20). ISSN 0935-9648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201705919
- [59] LANGER, Robert a Joseph P. VACANTI. Tissue Engineering. *Science*. 1993, **260**(5110), 920-926. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.8493529
- [60] KONG, X.D., F.Z. CUI, X.M. WANG, M. ZHANG a W. ZHANG. Silk fibroin regulated mineralization of hydroxyapatite nanocrystals. *Journal of Crystal Growth*. 2004, **270**(1-2), 197-202. ISSN 00220248. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcrysgro.2004.06.007
- [61] HUANG, Ting, Chunquan FAN, Min ZHU, Yufang ZHU, Weizhong ZHANG a Lei LI. 3D-printed scaffolds of biomineralized hydroxyapatite nanocomposite on silk fibroin for improving bone regeneration. *Applied Surface Science*. 2019, **467-468**, 345-353. ISSN 01694332. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2018.10.166
- [62] BURDICK, Jason A. a Glenn D. PRESTWICH. Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Materials*. 2011, **23**(12), 41-56. ISSN 09359648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201003963
- [63] SUN, Muyang, Jin CHENG, Jiahao ZHANG et al. *Stepwise Cross-Linking of Fibroin and Hyaluronic for 3D Printing Flexible Scaffolds with Tunable Mechanical Properties*. 2021, **7**(3), 916-925. ISSN 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbomaterials.0c00368
- [64] JUNGST, Tomasz, Willi SMOLAN, Kristin SCHACHT, Thomas SCHEIBEL a Jürgen GROLL. Strategies and Molecular Design Criteria for 3D Printable Hydrogels. *Chemical Reviews*. 2016, **116**(3), 1496-1539. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.5b00303
- [65] COMPAAN, Ashley M., Kyle CHRISTENSEN a Yong HUANG. *Inkjet Bioprinting of 3D Silk Fibroin Cellular Constructs Using Sacrificial Alginate*. 2017, **3**(8), 1519-1526. ISSN 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbomaterials.6b00432
- [66] LI, Chunmei, Charu VEPARI, Hyoung-Joon JIN, Hyeon Joo KIM a David L. KAPLAN. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006, **27**(16), 3115-3124. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.022

- [67] ZHANG, Xiaohui, Michaela R. REAGAN a David L. KAPLAN. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009, **61**(12), 988-1006. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2009.07.005
- [68] LEE, Hyeongjin, Gi Hoon YANG, Minseong KIM, JaeYoon LEE, JunTae HUH a GeunHyung KIM. Fabrication of micro/nanoporous collagen/dECM/silk-fibroin biocomposite scaffolds using a low temperature 3D printing process for bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering: C*. 2018, **84**, 140-147. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.11.013
- [69] LIEN, Sio-Mei, Liang-Yu KO a Ta-Jen HUANG. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2009, **5**(2), 670-679. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2008.09.020
- [70] SHI, Weili, Muyang SUN, Xiaoqing HU et al. Structurally and Functionally Optimized Silk-Fibroin-Gelatin Scaffold Using 3D Printing to Repair Cartilage Injury In Vitro and In Vivo. *Advanced Materials*. 2017, **29**(29). ISSN 09359648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201701089
- [71] RODRIGUEZ, María J., Joseph BROWN, Jodie GIORDANO, Samuel J. LIN, Fiorenzo G. OMENETTO a David L. KAPLAN. Silk based bioinks for soft tissue reconstruction using 3-dimensional (3D) printing with in vitro and in vivo assessments. *Biomaterials*. 2017, **117**, 105-115. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2016.11.046
- [72] GIL, Eun S., Richard J. SPONTAK a Samuel M. HUDSON. Effect of β -Sheet Crystals on the Thermal and Rheological Behavior of Protein-Based Hydrogels Derived from Gelatin and Silk Fibroin. *Macromolecular Bioscience*. 2005, **5**(8), 702-709. ISSN 1616-5187. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.200500076
- [73] KWAK, Hojung, Sungchul SHIN, Hyunji LEE a Jinho HYUN. Formation of a keratin layer with silk fibroin-polyethylene glycol composite hydrogel fabricated by digital light processing 3D printing. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2019, **72**, 232-240. ISSN 1226086X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiec.2018.12.023
- [74] MOHAN, Neethu a Prabha D. NAIR. Polyvinyl alcohol-poly(caprolactone) Semi IPN scaffold with implication for cartilage tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2008, **84**(2), 584-594. ISSN 15524973. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.30906
- [75] SANGKERT, Supaporn, Suttatip KAMOLMATYAKUL, Michael GELINSKY a Jirut MEESANE. 3D printed scaffolds of alginate/polyvinylalcohol with silk fibroin based on mimicked extracellular matrix for bone tissue engineering in maxillofacial surgery. *Materials Today Communications*. 2021, **26**. ISSN 23524928. Dostupné z: doi:10.1016/j.mtcomm.2021.102140
- [76] LEE, Jung, Md. SULTAN, Soon KIM, Vijay KUMAR, Yeung YEON, Ok LEE a Chan PARK. Artificial Auricular Cartilage Using Silk Fibroin and Polyvinyl Alcohol Hydrogel. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, **18**(8). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18081707
- [77] BARTNIKOWSKI, Michal, Tim R. DARGAVILLE, Sašo IVANOVSKI a Dietmar W. HUTMACHER. Degradation mechanisms of polycaprolactone in the context of chemistry, geometry and environment. *Progress in Polymer Science*. 2019, **96**, 1-20. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2019.05.004

- [78] LAKSHMIPRIYA, S a N M IMAYATHAMIZHAN. Development of silk/polycaprolactone biocomposite for internal bone plate application. *Journal of Industrial Textiles*. 2021, **51**(1), 3-23. ISSN 1528-0837. Dostupné z: doi:10.1177/1528083719886052
- [79] CENGIZ, Ibrahim Fatih, Fatima Raquel MAIA, Alain DA SILVA MORAIS et al. Entrapped in cage (EiC) scaffolds of 3D-printed polycaprolactone and porous silk fibroin for meniscus tissue engineering. *Biofabrication*. 2020, **12**(2). ISSN 1758-5090. Dostupné z: doi:10.1088/1758-5090/ab779f
- [80] VYAS, Cian, Jun ZHANG, Øystein ØVREBø et al. 3D printing of silk microparticle reinforced polycaprolactone scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2021, **118**. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2020.111433
- [81] BOJEDLA, Sri Sai Ramya, Shibu CHAMEETTACHAL, Sriya YELESWARAPU, Mostafa NIKZAD, Syed H. MASOOD a Falguni PATI. Silk fibroin microfiber-reinforced polycaprolactone composites with enhanced biodegradation and biological characteristics. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2022, **110**(7), 1386-1400. ISSN 1549-3296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.37380
- [82] NAZEER, Muhammad Anwaar, Emel YILGOR a Iskender YILGOR. Electrospun polycaprolactone/silk fibroin nanofibrous bioactive scaffolds for tissue engineering applications. *Polymer*. 2019, **168**, 86-94. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2019.02.023
- [83] BUCCIARELLI, Alessio, Gabriele GRECO, Ilaria CORRIDORI, Nicola M. PUGNO a Antonella MOTTA. *A Design of Experiment Rational Optimization of the Degumming Process and Its Impact on the Silk Fibroin Properties*. 2021, **7**(4), 1374-1393. ISSN 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbiomaterials.0c01657
- [84] NAM, Jin a Young Hwan PARK. Morphology of regenerated silk fibroin: Effects of freezing temperature, alcohol addition, and molecular weight. *Journal of Applied Polymer Science*. 2001, **81**(12), 3008-3021. ISSN 0021-8995. Dostupné z: doi:10.1002/app.1751
- [85] PRASONG, S., S. YAOWALAK a S. WILAIWAN. Characteristics of Silk Fiber with and without Sericin Component: A Comparison between Bombyx mori and Philosamia ricini Silks. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2009, **12**(11), 872-876. ISSN 10288880. Dostupné z: doi:10.3923/pjbs.2009.872.876
- [86] YU, Chengtao, Qing XIE, Yongzhong BAO, Guorong SHAN a Pengju PAN. Crystalline and Spherulitic Morphology of Polymers Crystallized in Confined Systems. *Crystals*. 2017, **7**(5). ISSN 2073-4352. Dostupné z: doi:10.3390/cryst7050147
- [87] ELZEIN, Tamara, Mohamad NASSER-EDDINE, Christelle DELAITE, Sophie BISTAC a Philippe DUMAS. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004, **273**(2), 381-387. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2004.02.001
- [88] LAITY, P.R., S.E. GILKS a C. HOLLAND. Rheological behaviour of native silk feedstocks. *Polymer*. 2015, **67**, 28-39. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2015.04.049
- [89] KATSOGIANNIS, Konstantinos Alexandros G., Goran T. VLADISAVLJEVIć a Stella GEORGIADOU. Porous electrospun polycaprolactone (PCL) fibres by phase separation. *European Polymer Journal*. 2015, **69**, 284-295. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2015.01.028

- [90] HEINRITZ, Christina, Zan LAMBERGER, Karolína KOCOURKOVÁ, Antonín MINAŘÍK a Martin HUMENIK. DNA Functionalized Spider Silk Nanohydrogels for Specific Cell Attachment and Patterning. *ACS Nano*. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:10.1021/acsnano.1c11148

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PCL	Polykaprolakton
BMF	Bombyx mori fibroin
Na ₂ CO ₃	Uhličitan sodný
LiBr	Bromid lithný
DMSO	Dimethylsulfoxid
AFM	Mikroskop atomárních sil
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
HFIP	Hexafluoroizopropanol
FITCD	Fluorescein izothiokyanát dextran
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
Da	Dalton
hm. %	Hmotnostní procento
A	Absorbance

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Princip metody 3D tisku FDM [3]</i>	11
<i>Obr. 2: Princip metody 3D tisku fúze v prášku [4]</i>	12
<i>Obr. 3: Princip metody 3D tisku stereolitografie [4]</i>	13
<i>Obr. 4: Princip metody 3D tisku výroby laminovaných předmětů [8]</i>	14
<i>Obr. 5: Princip metody Ink-Jet tisku [10]</i>	15
<i>Obr. 6: Princip extruzního tisku [4]</i>	15
<i>Obr. 7: Schéma hedvábné žlázy [23]</i>	20
<i>Obr. 8: Nahoře schéma přírodního hedvábného vlákna [30], dole primární struktura fibroinu [31]</i>	22
<i>Obr. 9: 3D tištěný scaffold na bázi fibroinu a hydroxyapatitu [61]</i>	28
<i>Obr. 10: Porovnání hydrogelů před a po fotozesítnění pod UV světlem [63]</i>	28
<i>Obr. 11: Snímky ze SEM a) materiál neopatřený chelatačními činidly b) materiál opatřený pomocí chelatačních činidel [65]</i>	29
<i>Obr. 12: Scaffold 3D tištěné směsi kolagenu s fibroinem [68]</i>	29
<i>Obr. 13: Schéma reakce struktury hedvábného fibroinu β-listu pomocí úpravy etanolem [70]</i>	30
<i>Obr. 14: Tištěný scaffold na bázi fibroinu a želatiny [70]</i>	30
<i>Obr. 15: Fotozesíťovaný PEG4A obsahující hedvábný fibroin [73]</i>	31
<i>Obr. 16: Řez morfologií tištěného scaffoldu na bázi polyvinylalkoholu a alginátu (A, B) a polyvinylalkoholu, alginátu a hedvábného proteinu (G, H) [75]</i>	32
<i>Obr. 17: Vzorec polykaprolaktonu [77]</i>	33
<i>Obr. 18: Vytvořené scaffoldy s PCL a hedvábným fibroinem [79]</i>	33
<i>Obr. 19: Schéma odstranění sericinu [23]</i>	37
<i>Obr. 20: Schéma izolace fibroinu [35]</i>	38
<i>Obr. 21: Vlevo vstupní surovina ve formě kokonů, vpravo lyofilizovaný fibroin</i>	38
<i>Obr. 22: SEM snímky povrchu vytištěné mřížky z čistého roztoku PCL s HFIP; náhled celé mřížky na snímku vlevo</i>	40
<i>Obr. 23: AFM snímek povrchu vytištěné mřížky z čistého roztoku PCL s HFIP, A) topografie, B) profilový řez, C) fázový kontrast měřených ploch</i>	41
<i>Obr. 24: SEM snímky povrchu vytištěné mřížky z roztoku BMF a PCL s HFIP; náhled celé mřížky na snímku vlevo</i>	41
<i>Obr. 25: AFM snímek povrchu vytištěné mřížky z roztoku BMF a PCL s HFIP, A) topografie, B) profilový řez, C) fázový kontrast měřených ploch</i>	42
<i>Obr. 26: SEM snímky povrchu vytištěné mřížky z roztoku BMF a PCL s HFIP v poměru BMF : PCL: A) 1:10, B) 1:5, C) 1:2,5; ; náhled celých mřížek na snímcích vlevo</i>	43

<i>Obr. 27: AFM snímky povrchu vytištěné mřížky z roztoku BMF a PCL s HFIP v poměru BMF : PCL: A) 1:10, B) 1:5, C) 1:2,5; D) – F) fázový kontrast měřených ploch pro dané koncentrace BMF.....</i>	<i>44</i>
<i>Obr. 28: Profilové řezy povrchu mřížky z roztoku BMF a PCL s HFIP v poměru BMF : PCL: A) 1:10, B) 1:5, C) 1:2,5.....</i>	<i>45</i>
<i>Obr. 29: FTIR spektrum u čistého PCL.....</i>	<i>46</i>
<i>Obr. 30: FTIR spektrum u čistého BMF.....</i>	<i>46</i>
<i>Obr. 31: FTIR spektrum u čistého PCL a BMF s rostoucí koncentrací.....</i>	<i>47</i>
<i>Obr. 32: SEM snímky povrchu vytištěné mřížky z roztoku PCL s HFIP a DMSO; ; náhled celé mřížky na snímku vlevo.....</i>	<i>48</i>
<i>Obr. 33: AFM snímek povrchu vytištěné mřížky z roztoku PCL s HFIP a DMSO, A) topografie, B) profilový řez, C) fázový kontrast měřených ploch.....</i>	<i>49</i>
<i>Obr. 34: SEM snímky povrchu vytištěné mřížky z roztoku BMF a PCL s HFIP a DMSO; ; náhled celé mřížky na snímku vlevo.....</i>	<i>49</i>
<i>Obr. 35: AFM snímek povrchu vytištěné mřížky z roztoku BMF a PCL s HFIP a DMSO, A) topografie, B) profilový řez, C) fázový kontrast měřených ploch.....</i>	<i>50</i>
<i>Obr. 36: Snímky fluorescenčně značené tištěné mřížky pořízené pomocí konfokálního mikroskopu A) zobrazení v procházejícím světle. B) zobrazení ve fluorescenčním módu, C) složený obraz.....</i>	<i>51</i>

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Porovnání mechanických vlastností fibroinu s vybranými materiály [33;34]..... 23