

# **Příprava strukturovaných biopolymerních povrchů a studium jejich interakce s buňkami**

Bc. Karolína Kocourková

---

Diplomová práce  
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství polymerů  
akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Karolína Kocourková**  
Osobní číslo: **T17295**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Příprava strukturovaných biopolymerních povrchů a studium jejich interakce s buňkami**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracujte literární rešerši na dané téma.
2. Připravte povrchově porézní substráty na bázi hedvábných proteinů a proveďte jejich charakterizaci.
3. U vybraných typů povrchů prostudujte jejich vliv na chování kultivovaných buněk.
4. Výsledky práce přehledně diskutujte a zhodnoťte.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. **Wrzecionko, E.; Minařík, A.; et al., Variations of Polymer Porous Surface Structures via the Time-Sequenced Dosing of Mixed Solvents, ACS Applied Materials & Interfaces 2017, 9(7).**
2. **Temenoff, J.S.; Biomaterials: The Intersection of Biology and Materials Science, Rice University, 2009, ISBN-13-978013009701**
3. **Munoz-Bonilla, A.; et al.; Towards Hierarchically ordered Functional Porous Polymeric Surfaces Prepared by the Breath Figures Approach, Prog. Polym. Sci. 2017, 39(3), 510-554.**
4. **Aigner, T. B.; et al.; Biomedical Applications of Recombinant Silk-Based Materials, Advanced Materials, 2018, 30(19).**

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Antonín Minařík, Ph.D.**

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

**2. ledna 2019**

Termín odevzdání diplomové práce:

**14. května 2019**

Ve Zlíně dne 18. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*

doc. Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně .....

.....

---

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

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

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

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

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihledne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

Byly studovány možnosti využití metody sekvenovaného dávkování směsi dobrého a špatného rozpouštědla pro modifikaci biopolymerního povrchu. Zvolený přístup byl aplikován pro texturizaci filmů na bázi hedvábného proteinu *Bombyx mori* fibroinu. Experimenty ukázaly, že typ vznikající textury na povrchu filmu lze ovlivnit nejen úpravou procesních parametrů dávkování směsných roztoků, ale je nezbytné brát v úvahu výchozí sekundární strukturu *B. mori* fibroinu ve formě filmu. Bylo zjištěno, že kontrolou přechodů mezi amorfni strukturou SILK I a semi-krystalickou strukturou SILK II v kombinaci s nastavením modifikačních parametrů lze připravit specifické nano- a mikro-texturované povrchy, které rozdílně podmiňují chování kultivovaných buněčných kultur.

Klíčová slova: hedvábný protein, fibroin, povrch, fázová separace, nano- a mikro-textura, buňky

## ABSTRACT

Possibilities of using the method of time-sequenced dosing of mixture of good and poor solvent to modify the biopolymer surface have been studied. This approach was applied to the texturization of silk protein films based on *Bombyx mori* fibroin. Experiments showed that the type of texture formed on the film surface can be influenced not only by adjusting the process parameters of the mixed solution dosing, but it is necessary to consider the initial secondary structure of *B. mori* fibroin in the form of a film. It has been found that by controlling the transitions between the SILK I amorphous structure and the SILK II semi-crystalline structure in combination with modifying parameters, specific nano- and micro-textured surfaces can be prepared that differentiate the behaviour of cultured cells.

Keywords: silk protein, fibroin, surface, phase separation, nano- and micro-texture, cells

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Ing. Antonínu Minaříkovi, Ph.D. za vedení a cenné rady nejen při zpracování diplomové práce, ale v průběhu celého studia.

Dále děkuji Dr. Martinu Humeníkovi z Univerzity Bayreuth za věnovaný čas a odborné konzultace týkající se problematiky proteinů.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala Ing. Markétě Kadlečkové za spolupráci při experimentech, Ing. Eriku Wrzecionkovi za veškerou pomoc a mé rodině za trpělivost a podporu po celou dobu studia.

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

*„Při pozorování dává náhoda přednost připraveným myslím“*

Louis Pasteur

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 HEDVÁBNÝ PROTEIN</b> .....	<b>12</b>
1.1 HEDVÁBÍ V NATIVNÍM STAVU.....	12
1.1.1 Zvláknovací proces .....	12
1.1.2 Stavba vlákna .....	13
1.2 REGENEROVANÉ HEDVÁBÍ.....	14
1.2.1 Zpracování fibroinu.....	15
1.2.2 FTIR analýza.....	16
1.2.3 Změna konformace.....	17
<b>2 APLIKACE</b> .....	<b>19</b>
2.1 FUNKCIONALIZACE.....	19
2.2 INTERAKCE S BUŇKAMI .....	20
2.3 DEGRADACE.....	20
2.4 BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE .....	21
<b>3 FIBROINOVÉ FILMY</b> .....	<b>22</b>
3.1 PŘÍPRAVA TEXTUROVANÝCH HEDVÁBNÝCH FILMŮ .....	23
3.1.1 Lyofilizace.....	23
3.1.2 Patterning .....	24
3.1.3 Fázová separace .....	25
3.1.4 Metoda breath figures .....	26
3.2 VLIV POVRCHOVÉ TEXTURY NA CHOVÁNÍ BUNĚK.....	27
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>30</b>
<b>4 POPIS EXPERIMENTU</b> .....	<b>31</b>
4.1 MATERIÁLY .....	31
4.2 PŘÍPRAVA FIBROINOVÝCH FILMŮ .....	31
4.3 MODIFIKACE POVRCHU FILMU METODOU ČASOVĚ SEKVENOVANÉ FÁZOVÉ SEPARACE.....	32
4.4 CHARAKTERIZACE POVRCHU.....	35
4.4.1 FTIR .....	35
4.4.2 Profilometr .....	35
4.4.3 AFM .....	35
4.4.4 Buněčná adheze a proliferace.....	35
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>37</b>



5.1	PŘÍPRAVA FIBROINOVÝCH FILMŮ V SILK I STAVU .....	39
5.2	MODIFIKACE FIBROINOVÝCH FILMŮ V SILK I STAVU .....	40
5.3	PŘÍPRAVA FIBROINOVÝCH FILMŮ V ČÁSTEČNĚ TRANSFORMOVANÉM STAVU.....	41
5.4	MODIFIKACE FIBROINOVÝCH FILMŮ V ČÁSTEČNĚ TRANSFORMOVANÉM STAVU .....	42
5.5	PŘÍPRAVA FIBROINOVÝCH FILMŮ VE STAVU SILK II.....	45
5.6	MODIFIKACE FIBROINOVÝCH FILMŮ VE STAVU SILK II .....	46
5.7	STABILITA TEXTUR A STUDIUM INTERAKCE S BUŇKAMI .....	53
5.7.1	Stabilita filmů ve stavu SILK II po modifikaci.....	53
5.7.2	Buněčná proliferace na strukturalizovaných filmech.....	56
5.8	PŘÍPRAVA POVRCHŮ S KOMBINOVANOU FORMOU MIKRO- A NANO-TEXTUR A SELEKTIVNĚ ZNAČENÝCH POVRCHŮ .....	61
<b>ZÁVĚR .....</b>		<b>62</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>		<b>63</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>		<b>73</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>		<b>74</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>		<b>78</b>

## ÚVOD

Hedvábná vlákna produkovaná bourcem morušovým (*Bombyx mori*) jsou po staletí užívána jako šicí materiál v lékařství. Jejich historie v oblasti textilního zpracování však sahá mnohem dál. A to až do doby 3000 let př. n. l., kdy je datováno zavedení chovu bource morušového v Číně, přičemž tajemství přípravy hedvábí dokázali Číňané držet více jak 2000 let.

Navzdory rozvíjejícímu se trhu s umělými vlákny produkce hedvábí stále roste z důvodů unikátních vlastností materiálu a vývoje nových zpracovatelských postupů. Z toho plyne zvětšení okruhu možných aplikací, a to zejména v oblasti bioinženýrství. Vlákna fibroinu vykazují srovnatelnou biokompatibilitu s dalšími běžně užívanými biomateriály, jako je například kyselina polymléčná nebo kolagen.

Současně s intenzivním vývojem v oblasti technologického zpracování a bioinženýrství dochází také k detailnímu studiu syntézy hedvábí v přírodě a rozvoji biomimetických přístupů přípravy vláken se strukturou a vlastnostmi co nejbližšími nativnímu hedvábí. K biomimetickým přístupům lze přiřadit také úpravu morfologie fibroinového povrchu s cílem vytvořit specifické textury podporující adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk.

Teoretická část práce zahrnuje seznámení se strukturou nativního hedvábného vlákna a jeho syntézou v přírodě. Dále je popsána příprava regenerovaného hedvábí, možnosti řízení konformačních přechodů a jejich analýza. Literární rešerše dále poskytuje náhled do dosavadních poznatků o přípravě a možnostech texturizace fibroinových filmů zejména pro aplikace v oblasti tkáňového inženýrství.

Jedním z nových přístupů vedoucích k texturizaci polymerního povrchu je časově sekvenované dávkování směsi dobrého a špatného rozpouštědla na rotující substrát. Úvod experimentální části práce je věnován popisu této techniky, která je aplikována při přípravě texturizovaných povrchů fibroinových filmů. Diskuze výsledků se zabývá vlivem výchozí sekundární struktury fibroinu a modifikačních parametrů na vznik mikro- a nano-textury porézního charakteru. Dále je na vybraných typech struktur studováno chování kultivovaných buněk.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 HEDVÁBNÝ PROTEIN

Hedvábí je tvořeno dvěma typy proteinů, fibroinem a sericinem, které jsou syntetizovány epiteliálními buňkami ve speciálních žlázách organismů třídy *Arachnida* a larvami organismů řádu *Lepidoptera* zahrnujícího motýly a můry. Nejvýznamnější hedvábí z hlediska výzkumu a průmyslového zpracování je produkováno larvami bource morušového *Bombyx mori* a pavouky tvořícími kruhové síť rodu *Araneidae* [1].

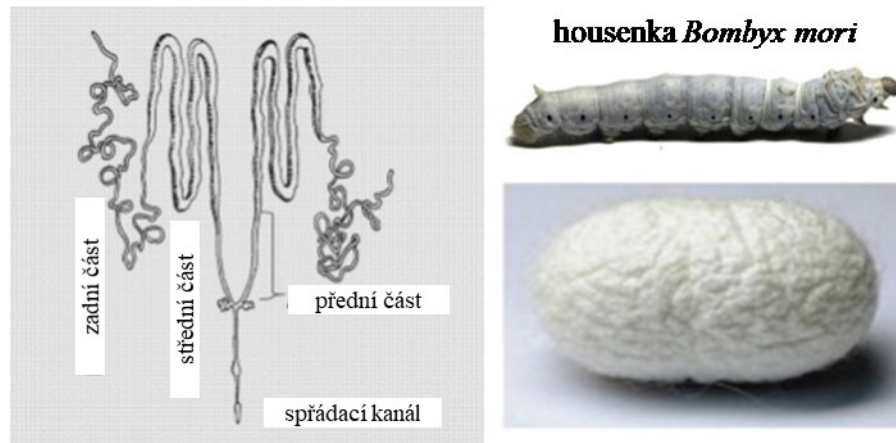
### 1.1 Hedvábí v nativním stavu

V případě hedvábí produkovaného bourcem morušovým se hedvábný zvláknovací orgán skládá ze dvou žláz umístěných laterálně v těle larvy (obr. 1). Každá žláza se skládá z přední, střední a zadní části. Jednotlivé hedvábné proteiny jsou syntetizovány v příslušných částech hedvábné žlázy a v kapalném stavu jsou skladovány v její dutině. Tekutý obsah je po dovršení posledního larválního stádia vylučován tryskou a vlivem specifických biochemických a mechanických podmínek dochází ke zvláknování a tvorbě kokonu, přičemž tento proces trvá 2 až 5 dní [2].

#### 1.1.1 Zvláknovací proces

Tvorba hedvábného vlákna funguje na principu suchého zvláknování z vodného roztoku fibroinu [3; 4; 5]. V průběhu procesu mění fibroin sekundární strukturu z rozpustné konformace náhodného klubka a  $\alpha$ -šroubovice na stabilní semi-krystalickou formu s převahou  $\beta$ -skládaných listů. Transformační přechod nastává v reakci na pH gradient, množství vody v roztoku a působící smykové síly [6]. Hedvábné proteiny se v dutině žlázy nachází ve vysokých koncentracích. V zadní části hedvábné žlázy je fibroin syntetizován v koncentraci cca 12 hm. %, pH prostředí je 6,9 a fibroin se zde nachází ve formě gelu. Po přesunutí do střední hedvábné žlázy se koncentrace zvýší na 25 hm. % a pH klesá na 5,2. Na vstupu do přední části žlázy přechází směs na sol-gel formu při pH 5,0. V přední části hedvábné žlázy je konečné pH 4,8 a fibroin se následkem fázové separace způsobené hydrofilně-hydrofobní blokovou strukturou proteinu seskupí do konfigurace podobné micelám s anizotropními vlastnostmi tekutých krystalů [3; 4; 5; 7]. Charakter tekutých krystalů ovlivňuje proudění molekul a jejich orientaci podél osy průtoku během transportu skrz spřádací kanál. Voda v roztoku plní funkci lubrikačního činidla a udržuje fibroin v metastabilním stavu, čímž brání předčasně krystali-

zaci. Finální transformace a stabilizace sekundární struktury je indukována klesajícím množstvím vody v roztoku směrem k výstupu žlázy a smykovým napětím generovaným pohybem hlavy larvy bource morušového [3; 4; 5].



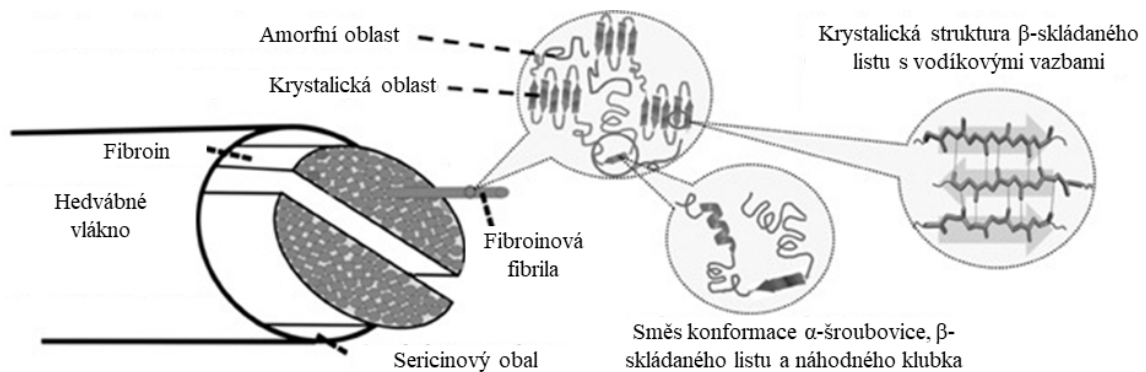
Obr. 1: Zvlákňovací orgán bource morušového a kokon z nativního hedvábí [8]

### 1.1.2 Stavba vlákna

Schématický náčrt nativního fibroinového vlákna je znázorněn na obr. 2. Jedno vlákno přírodního hedvábí obsahuje dvě fibroinová jádra obalená ochranným sericinovým povlakem, který zároveň plní funkci adheziva [9]. Fibroin se skládá z lehkého a těžkého polypeptidového řetězce. Molární hmotnost těžkého vlákna je přibližně 390 kDa, lehkého vlákna 26 kDa [10; 11; 12]. Cystein na C-konci těžkého vlákna se podílí na tvorbě komplexu s lehkým vláknem přes disulfidovou vazbu. Komplex těžkého a lehkého vlákna je dále nekovaletně vázán glykoproteinem P25 v poměru 6:1 a prostřednictvím hydrofobních interakcí tvoří základní micelární jednotku během zvlákňovacího procesu [13; 14; 15].

Největší zastoupení v primární sekvenci aminokyselin těžkého vlákna má glycin (43-46 %), alanin (25-30 %) a serin (12 %). Dále přibližně 5 % tvoří tyrosin, 2 % valin a v menším množství kyselina asparagová, fenylalanin, glutamová kyselina, threonin, isoleucin, leucin, prolin, arginin, lysin a histidin [8]. Těžké vlákno se skládá ze 12 hydrofobních domén oddělených 11 hydrofilními doménami. Hydrofobní domény jsou tvořeny repetitivními aminokyselinovými sekvencemi Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser, případně je serin nahrazen tyrosinem [16]. Vysoký obsah glycinu umožňuje konformační variabilitu, které se projevuje polymorfním chováním fibroinu. Dominantní sekundární struktura se mění v závislosti na vnějších podmínkách [17]. Repetitivní bloky jsou schopné tvořit krystalickou strukturu tvořenou antiparalelními  $\beta$ -skládanými listy prostřednictvím intramolekulárních a intermolekulárních

interakcí [18; 19; 20]. Hydrofilní části jsou tvořené nerepetitivními sekvencemi obsahujícími asparagovou kyselinu, arginin nebo lysin. Představují amorfní oblasti fibroinu a umožňují stáčení řetězce při krystalizaci během zvláknovacího procesu a udává elasticitu nově vznikajícího vlákna [8; 21; 22].



Obr. 2: Schematické znázornění struktury přírodního hedvábného vlákna [23]

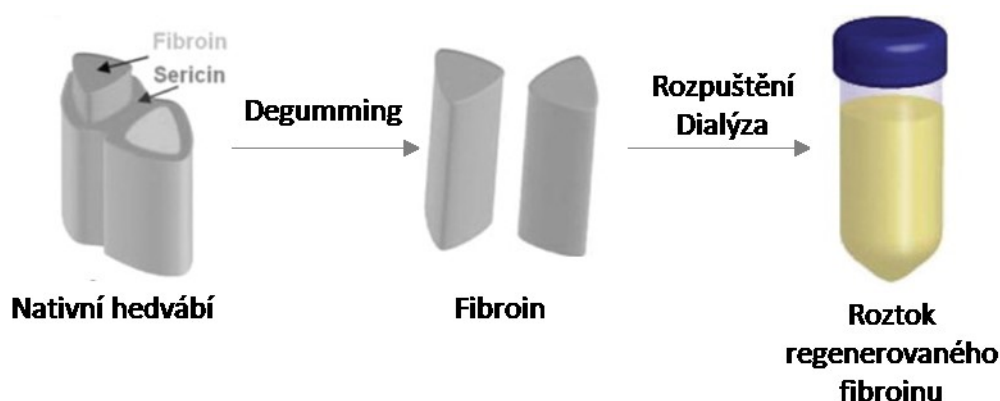
Hydrofobní charakter krystalických oblastí spolu s vodíkovými vazbami zapříčiňuje vysokou nerozpustnost ve vodě, zředěných kyselinách a zásadách a ve většině organických rozpouštědel [4; 24]. Rovněž poskytuje materiálu dobré mechanické vlastnosti – modul pružnosti 5 GPa, pevnost 400 MPa [16].

## 1.2 Regenerované hedvábí

Fibroin bource morušového je z přírody získáván z kokonů nebo z odpadu textilní výroby ve formě velmi pevných vláken odolných většině rozpouštědel [25]. Aby bylo možné s ním pracovat, je třeba jej vyčistit a převést do zpracovatelné formy. Procesem čištění a rozpouštění přírodních vláken je získáno regenerované hedvábí. Regenerovaný fibroin již není obalen sericinem. Mechanické vlastnosti regenerovaného hedvábí jsou ve srovnání s přírodními vlákny výrazně horší a to z důvodu strukturálních změn a částečné denaturace během znovuzpracování [26]. Při složitém rozpouštěcím procesu je štěpen na směs polypeptidových fragmentů o velikosti přibližně 100 kDa, přičemž výsledný stupeň degradace závisí na použitém rozpouštědle a procesních podmínkách [27]. Výsledkem regenerace fibroinu je roztok, ze kterého lze připravit různé morfologie jako vlákna, hydrogely, filmy, 3D scaffoldy [28]. Jedním z důvodů užití fibroinu jako technického materiálu je jeho schopnost konformačních přechodů v reakci na vnější podmínky, která zůstává zachována i u regenerovaného hedvábí [29].

### 1.2.1 Zpracování fibroinu

Při zpracování přírodního hedvábí je nutné v první řadě odstranit z materiálu sericin, a to procesem zvaným „degumming“ (obr. 3). Odstranění sericinu se provádí varem v roztoku uhličitanu sodného. Pomocí roztoků iontových sloučenin lze rozrušit vodíkové vazby a tím převést fibroin do roztoku. Pro rozpouštění promytých vláken zbavených sericinu je vhodný 1-butyl-3-methylimidazolium chlorid nebo vodný roztok bromidu lithného. Bromid lithný je nejčastěji užívaným rozpouštědlem z toho důvodu, že neindukuje konformační přechody a fibroin v něm zůstává ve formě náhodného klubka. Vysokou výtěžnost při rozpouštění poskytuje například směs chloridu vápenatého, ethanolu a vody [27]. Volbou rozpouštědla lze ovlivnit mechanismus rozpouštění, stupeň hydrolyzy, schopnost gelovatění, formování filmu nebo tendenci regenerovaného fibroinu ke konformačním přechodům [28; 30]. Následná dialýza odstraní z roztoku nežádoucí ionty. Získaný vodný roztok regenerovaného fibroinu poté může být již zpracován do požadované formy nebo lyofilizován. Lyofilizací je získána houbovitá porézní hmota, kterou je možné delší dobu skladovat a před zpracováním opětovně rozpustit například v hexafluoroisopropanolu (HFIP) nebo kyselině mravenčí [26].



Obr. 3: Schéma zpracování fibroinu [8]

Konformační přechody fibroinu lze řídit nejen během procesu rozpouštění, ale i po vytvoření nové morfologie. Fibroin se v suché atmosféře nachází ve stavu SILK I, kde převládá amorfní konformace  $\alpha$ -šroubovice. Při kontaktu s vodou nebo methanolem dochází k přeskupení fibroinových řetězců do konformace  $\beta$ -skládaných listů a fibroin přechází do semi-krytalického stavu SILK II [31; 32; 33]. Pomalou krystalizací mající za následek vznik mechanicky pevnějších materiálů lze zajistit ošetřením vodou při procesu „water annealing“ [34]. Naopak vystavení tohoto proteinu methanolu vede k velmi rychlé krystalizaci (v řádu minut) [28]. Transformace lze docílit i zvýšením teploty nebo mechanickým namáháním.

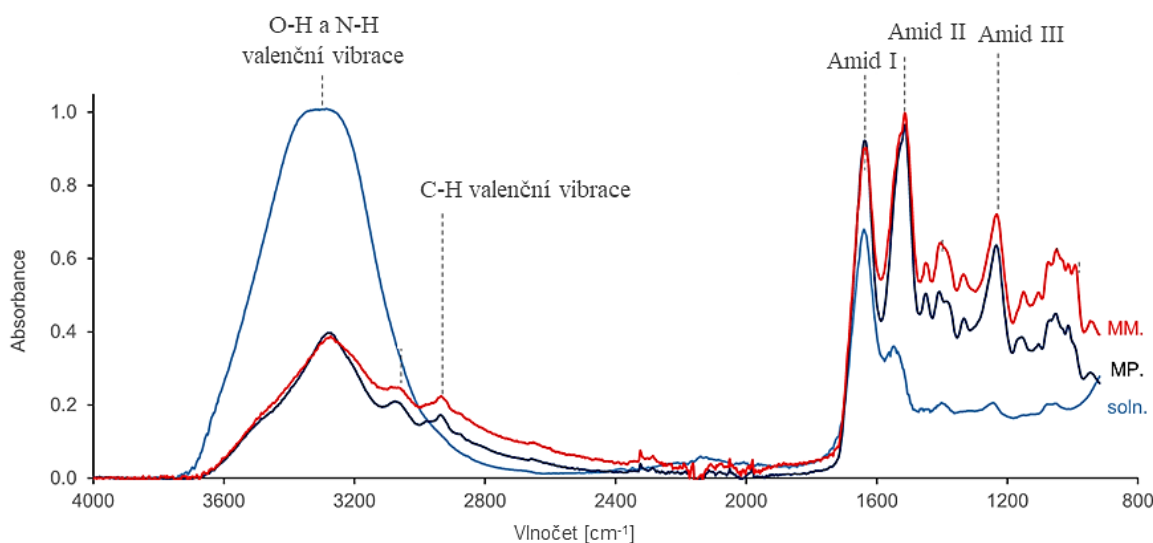
Semi-kryštalický fibroin se stává opět nerozpustným ve vodě a ve většině organických rozpouštědel. Míra kryštalinity ovlivňuje kromě rozpustnosti a mechanických vlastností i rychlost degradace [35] a termální stabilitu, která je v rozmezí 170 – 190 °C [29].

Zejména v oblasti zvlákňovacích procesů se v současné době intenzivně vyvíjí biomimetické přístupy vycházející z detailního studia zvlákňovacího procesu v přírodě [5; 36]. Jedním z přístupů, který se snaží napodobit přirozený způsob zvlákňování, je založen na tvorbě emulze s micelárními strukturami ve vodném roztoku rekonstituovaného hedvábí [4].

### 1.2.2 FTIR analýza

Infračervená spektroskopie představuje účinnou metodu pro analýzu složení a struktury proteinů [17]. Pro spektrum fibroinového proteinu jsou charakteristické pásy pro skupiny Amid I absorbující v oblasti 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$ , Amid II absorbující v oblasti 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$  a Amid III absorbující v 1400-1200  $\text{cm}^{-1}$ . Pás Amidu I je dán valenčními vibracemi skupin CO a CN. Vibrace Amidu I jsou výrazně ovlivněny sekundární strukturou proteinu a pevností vodíkových vazeb, proto je pro studium konformačních přechodů fibroinu stěžejní sledovat změny ve vibračních stavech tohoto amidu. Pás pro Amid II je kombinací deformačních vibrací NH skupin a valenčních vibrací CN skupin. Absorbance v této oblasti je rovněž ovlivněna sekundární strukturou, avšak závislost není tak přímočará. Oblast Amidu III je nejméně vhodná pro analýzu sekundární struktury fibroinu z důvodu variabilních příspěvků vibrací hlavního a postranních řetězců [37; 38; 39]. Na obr 4. je znázorněno spektrum fibroinového filmu s charakteristickými skupinami Amid I, II a III. Absorbance mezi 3200 a 3600  $\text{cm}^{-1}$  odpovídá valenčním vibracím skupin OH a NH a nepřilíš výrazné maximum kolem 2900  $\text{cm}^{-1}$  je přisuzováno alifatickým CH valenčním vibracím [40].





Obr. 4: FTIR spektrum nativního *Bombyx mori* fibroinu v roztoku (křivka soln.) a ve formě filmu (křivky MP. a MM.) [40]

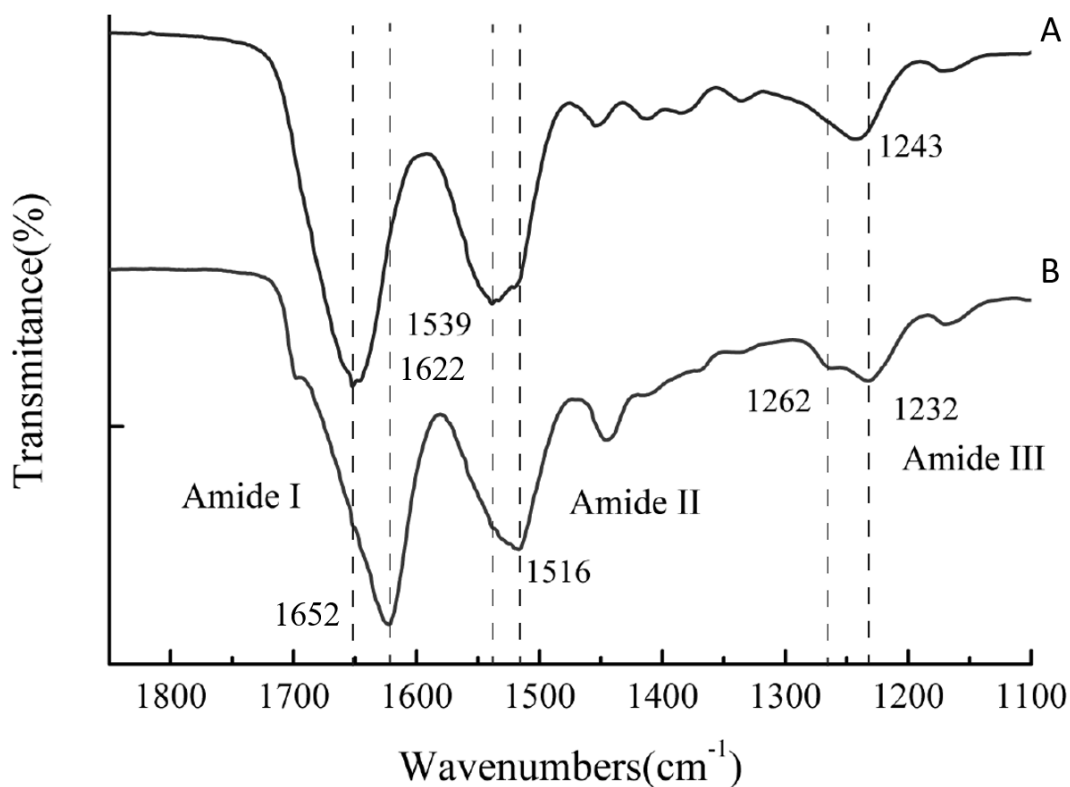
### 1.2.3 Změna konformace

Pokud se fibroin nachází v konformaci náhodného klubka nebo  $\alpha$ -šroubovice, je rozpustný ve vodě. Tato struktura je amorfní a nazývá se SILK I. Vlivem fyzikálních nebo chemických podmínek, např. ošetření alkoholem, vodou, zahřátím nebo mechanickým namáháním, dochází ke změně struktury s nárůstem podílu  $\beta$ -skládaných listů a fibroin se stává nerozpustným ve vodě a většině organických rozpouštědel. Semi-krystalický stav s maximálním podílem  $\beta$ -skládaných listů se nazývá SILK II [41].

Přechod konformace z náhodného klubka na  $\beta$ -skládaný list nastává v důsledku přeuspořádání vodíkových vazeb mezi peptidovými řetězci a má charakter agregace závislé na nukleaci. Výše zmíněná FTIR analýza byla použita ke sledování konformačního přechodu regenerovaných fibroinových filmů ošetřených různě koncentrovaným roztokem ethanolu v D<sub>2</sub>O (těžká voda). Rychlost konformačního přechodu je dána konkurenčními mechanismy rozpadu stávajících a budování nových vodíkových vazeb. Z této skutečnosti plyne závislost konformační změny na podílu vody a ethanolu v roztoku. Voda způsobuje botnání fibroinového filmu a usnadňuje pohyb segmentů řetězců fibroinu. Pokud je tedy obsah vody v roztoku ethanolu nízký, je film jen nepatrně nabotnalý, pohyb fibroinových řetězců je omezen a v průběhu sledovaného období nedochází ke změně konformace. Při vysokém obsahu vody jsou však vodíkové vazby stabilizující film zničeny a molekuly vody se váží na hydrofilní skupiny polypeptidových vláken. Koncentrace ethanolu mezi 70-80 % má za následek

dostatečný pohyb segmentů, ale ne tak výraznou volnost, proto je umožněn rychlý vznik nových vodíkových vazeb [42].

Maxima v oblastech  $1648\text{-}1654\text{ cm}^{-1}$  pro Amid I a  $1535\text{-}1542\text{ cm}^{-1}$  pro Amid II indikují konformaci SILK I [43]. Na obr 5. je znázorněno spektrum hedvábného fibroinu před a po ošetření ethanolem. U spektra neošetřeného fibroinu je přítomná typická konformace náhodných klubek a  $\alpha$ -šroubovice s maximy  $1652$  a  $1539\text{ cm}^{-1}$ . Maxima v  $1610\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ ,  $1695\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  a  $1510\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$  značí konformaci SILK II. Ošetření ethanolem indukuje transformaci sekundární struktury s charakteristickým posunem maxim na  $1622$  a  $1516\text{ cm}^{-1}$  pro Amid I a II, který je způsoben vznikem  $\beta$ -skládaných listů [44]. Malý výstupek v oblasti kolem  $1700\text{ cm}^{-1}$  je dle některých studií přisuzován rovněž struktuře  $\beta$ -skládaného listu [45], nebo tzv.  $\beta$ -turns, což jsou oblasti způsobující změnu směru peptidového řetězce [17].



Obr. 5: ATR-FTIR spektrum hedvábného fibroinu A) před ošetřením a B) po ošetření ethanolem [44]

## 2 APLIKACE

Materiály na bázi hedvábí byly v uplynulém desetiletí rozšířeny z oblasti textilního průmyslu do stále rostoucího množství aplikací v biomedicínských a technologických směrech. Jako šicí materiál je v medicíně hedvábí užíváno již po staletí, v současnosti jsou však předmětem intenzivních studií další aplikační možnosti, jako je hojení ran, cílená doprava léčiv nebo 3D matrice pro tkáňové inženýrství [46]. Hedvábí dosahuje srovnatelné biokompatibility jako jiné běžně užívané biomateriály, například kolagen nebo kyselina polymléčná [47]. Nespornou výhodou jsou však mechanické vlastnosti hedvábí plynoucí z jeho struktury a polymorfního charakteru, stejně jako chemismus postranních řetězců umožňující navázání růstových faktorů a adhezivních skupin. V neposlední řadě je možná genetická úprava proteinu [48; 49]. Hedvábný biomateriál vykazuje biokompatibilitu *in vitro* i *in vivo*. Navzdory dobrým mechanickým vlastnostem však podléhá degradaci, která závisí na obsahu krystalické struktury. V současné době je cílem kontrola regeneračních a degračních mechanismů, modifikace a funkcionalizace na více úrovních a tvorba multifunkčních, hierarchických a heterogenních struktur [29], hlavní otázkou však zůstává, jak co nejvíce napodobit přirozenou strukturu nativního hedvábí [46].

### 2.1 Funkcionalizace

Chemická modifikace aminokyselin hedvábného proteinu poskytuje novou generaci biomateriálů. Funkcionalizace má vliv na proliferaci buněk, toxicitu, stabilitu, imunogenicitu, biodegradabilitu a biologickou aktivitu [50]. Filmy z hedvábného proteinu vykazují nízkou adhezi pro určité typy buněk, funkcionalizací krátkými peptidovými řetězci ji však lze podpořit. Příkladem je peptid RGD (Arg-Gly-Asp), který je možné použít k modifikaci řady polymerů [51]. Sekvence RGD interaguje s integriny, což je skupina membránových receptorů, a významně zlepšuje adhezi zejména fibroblastů [52; 53]. Modifikace pomocí hirudin peptidu zvyšuje antitrombogenní vlastnosti fibroinového filmu a brání koagulaci při užití na cévní náhrady [54]. Pro regeneraci nervové tkáně jsou produkovány injektovatelné hydrogely z fibroinu s imobilizovaným peptidem IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val), což je derivát lamininu, složky extracelulární matrix napomáhající růstu nervových buněk [55]. Funkcionalizace je dále možná pomocí organických ligandů, které dávají materiálu antibiotické nebo fluorescenční vlastnosti, biokompatibilních a biodegradovatelných přírodních i syntetických polymerů podporujících buněčnou adhezi, případně poskytujících materiálu vodivé vlastnosti, nebo minerálních látek měnících mechanické vlastnosti [50].

## 2.2 Interakce s buňkami

Kromě mechanických a strukturních vlastností pro konkrétní typ aplikace je důležitá biologická reakce na hedvábí v *in vivo* prostředí zahrnující imunitní a zánětlivou reakci, degradaci, remodelaci tkáně a vaskularizaci. Hedvábný protein v těle vyvolává mírné zánětlivou odpověď, která klesá během několika týdnů po implantaci. Obecně platí, že implantáty s delší dobou degradace implantované do měkkých tkání vyvolávají výraznější imunitní odezvy než implantáty tvrdých tkání degradující v krátkém časovém horizontu. Důležitým faktorem také je, že hedvábí v organismu neindukuje mineralizaci tkáně. Vzhledem k jeho degradačním vlastnostem je umožněna vaskularizace, prorůstání a případně kompletní náhrada nativní tkání. Stupeň remodelace nebo specifické buněčné chování může být modulováno přidáním růstových nebo jiných signalizačních faktorů. Aktivace zánětlivé odpovědi je v některých případech žádoucí, protože vede k rychlejší degradaci a remodelaci implantátu. Navzdory tomu, že hedvábí umožňuje adhezi, proliferaci i diferenciaci buněk, pro některé aplikace je zapotřebí výraznější buněčná interakce, než samotné hedvábí poskytuje [56].

Studie biokompatibility hedvábných filmů byly provedeny s mezenchymálními kmenovými buňkami *in vitro* a *in vivo*. Při sledování zánětlivé odpovědi na polymerní filmy *in vivo* a *in vitro* poskytují fibroinové filmy ve srovnání s filmy kolagenovými a filmy z kyseliny polymléčné příznivější výsledky. Při *in vitro* testech byla buněčná proliferace na fibroinovém filmu ve srovnání s filmem kolagenním výrazně vyšší [57].

## 2.3 Degradace

Degradace hedvábného proteinu je velmi pomalá a závisí na mnoha faktorech – sekundární struktuře fibroinu, způsobu zpracování a morfologii produktu, místu implantace v organismu. Jako protein je fibroin citlivý na degradaci proteolytickými enzymy, jako je například chymotrypsin nebo aktináza. Prvním krokem biologického odbourání je adsorpce enzymů na biomateriál, k čemuž je nutné, aby enzym na povrchu našel vazebné domény. Poté následuje štěpení, jehož konečným produktem jsou aminokyseliny snadno absorbovatelné v *in vivo* prostředí [32].

Degradaci je možné řídit obsahem krystalického podílu v materiálu a mnoho studií uvádí, že s rostoucím množstvím  $\beta$ -skládaných listů v materiálu se prodlužuje degradace [58; 59]. V některých případech však může dojít k přesnému opaku. Je prokázáno, že nejdříve degradují hydrofilní bloky fibroinu. Pokud však vlivem procesních podmínek jsou ve struktuře

utvořeny slabší interakce mezi hydrofilními a hydrofobními oblastmi, po odbourání hydrofilních částí se hydrofobní krystalické oblasti stanou volnými částicemi a uvolní se do roztoku, což vede k podobné i vyšší rychlosti úbytku hmotnosti ve srovnání s fibroinem v SILK I stavu. Ačkoliv z některých studií plyne, že podíl stabilní struktury v materiálu hraje klíčovou nebo téměř jedinou roli v rychlosti degradace, je třeba brát v úvahu podmínky zpracování materiálu, podmínky indukující změny při konformačních přechodech a množství a charakter interakcí uplatněných ve struktuře proteinu [43].

Pro zvýšení odolnosti vůči degradaci lze systém síťovat. Jako síťovadlo pro přípravu ve vodě nerozpustného fibroinového materiálu při zachování pružnosti může sloužit například poly(ethylenglykol) diglycidyl ether (PEG-DE) [60].

## 2.4 Biomedicínské aplikace

V současné době je v běžné klinické praxi užíváno chirurgické pletivo SERI Surgical Scaffold určené pro rekonstrukci břišní stěny a aplikace v plastické chirurgii [61], dále hedvábné chirurgické nitě [46] a oděvy pro léčbu dermatologických onemocnění [62], zejména atopické dermatitidy [63]. Klinické studie probíhají například u hedvábných filmů určených k hojení ran [64] a perforací ušního bubínku [65]. Preklinické studie se zabývají širokým spektrem materiálů založených na hedvábí v různých formách a morfologiích. Příkladem jsou 3D porézní hedvábné scaffoldy, elektrostaticky zvlákněvané materiály, hydrogely, částice a filmy. Samoorganizovaná hedvábná nanovlákná ve formě hydrogelu s řízenou tuhostí byla použita pro simulaci nanostruktury a mechanických vlastností extracelulární matrix centrální nervové tkáně, přičemž nervové kmenové buňky na těchto površích preferovaly neuronovou diferenciaci [66]. Při studiu řízeného uvolňování léčiv se užívají s výhodou hedvábné filmy, a to z důvodu kontrolovatelné krystalizace. Kinetiku uvolnění léčiva lze sledovat jako funkci molekulové hmotnosti léčiva a krystalinity nosného filmu [67]. V kombinaci s kyselinou polymléčnou (PLA) byl vytvořen kompozitní scaffold pro účely jaterního tkáňového inženýrství složený z PLA matrice s fibrinovými mikročásticemi. Fibroinové mikročástice zlepšily adhezi i proliferaci buněčné linie lidského hepatocelulárního karcinomu jater ve srovnání s čistými PLA scaffoldy [68]. Hierarchické makro/mikro-porézní struktury lze připravit pomocí fázové separace v kombinaci s loužením parafínu. Takto připravené kompozitní scaffoldy poskytují kontrolovatelnou velikost pórů a vysokou porozitu, která podporuje přichycení buněk a jejich proliferaci [69].

### 3 FIBROINOVÉ FILMY

Filmy představují zajímavou třídu materiálů s širokými aplikačními možnostmi a snadným zpracovatelským procesem. Z toho důvodu se také jedná o nejčastěji užívanou formu při studiu hedvábného fibroinu z hlediska strukturalizace, funkcionalizace nebo studia interakce s buňkami. Fibroinové filmy mohou být odlévány z vodného roztoku nebo z roztoků příslušných organických rozpouštědel. V roztoku fibroin preferuje konformaci náhodného klubka nebo šroubovicovou strukturu v závislosti na použitém rozpouštědle. Výslednou konformaci ve filmu ovlivňují podmínky sušení a následné chemické nebo fyzikální ošetření [70].

Zpracovatelské procesy fibroinových filmů zahrnují odlévání, tisk, elektrostatické zvlákňování, elektrodepozici, spin-coating a máčení. Filmy mohou být odlévány z vodného roztoku, z roztoku kyseliny nebo iontové kapaliny a jejich formování je dáno odpařením rozpouštědla [71; 72]. Zvolené rozpouštědlo ovlivňuje sekundární strukturu fibroinu, přičemž fluorovaná rozpouštědla (HFIP) indukují  $\alpha$ -šroubovicovou strukturu a naopak kyselina mravenčí nebo voda zapříčiňují vyšší obsah  $\beta$ -skládaných listů. Filmy s  $\alpha$ -šroubovicovou strukturou je třeba dodatečně stabilizovat. Vodními parami stabilizované filmy ukazují více uspořádanou sekundární strukturu než filmy stabilizované methanolem. Ty rovněž mají vyšší schopnost adsorbovat vodu a dosahují vyšší propustnosti pro kyslík [71]. Způsob ošetření methanolem (koncentrace methanolu a délka působení) má vliv nejen na uspořádání fibroinu, ale i na drsnost povrchu filmu [73].

Pro rozšíření aplikačních možností zejména z hlediska zvýšení rychlosti degradace a zvýšení elasticity jsou zkoumány možnosti přípravy fibroinových filmů stabilních ve vodě, avšak s redukováným obsahem krystalické konformace  $\beta$ -skládaných listů. Jedním z přístupů je příprava koncentrovaného (8 % w/w) vodného roztoku fibroinu a následné kontrolované "žihání" vodou (water-based annealing). Takto ošetřené filmy degradují rychleji ve srovnání s tradičními filmy stabilizovanými methanolem [45]. Dalším způsobem je velmi pomalé sušení filmů odléváných z 7,5% (w/w) vodného roztoku, které rovněž vykazují rychlejší enzymatickou degradaci a také lepší mechanické vlastnosti, zejména tažnost. Pomalé sušení dává systému dostatek času na samoorganizaci fibroinu a tvorbu mikrostruktur složených z nanovláken zlepšujících stabilitu ve vodě [74].

Dále proces opakované lyofilizace a rozpouštění nanovláken fibroinu vede k přípravě ve vodě stabilních struktur, které se paradoxně vyskytují v amorfním stavu. Přítomnost hedvábných nanovláken ve výchozím roztoku výrazně zlepšuje stabilitu hedvábného scaffoldu

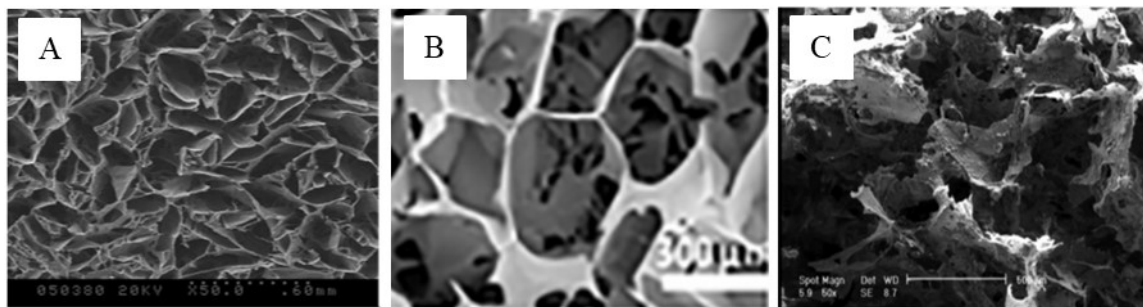
ve vodě (úbytek hmotnosti 12 % po 24 h ve srovnání s úplným rozpuštěním lyofilizovaného scaffoldu bez nanovláken), přičemž nerozpustnost se zvyšuje s počtem cyklů rozpuštění a opětovné lyofilizace (po 3 cyklech lze pozorovat úbytek hmotnosti 8 %). Přestože se dle autorů jedná o jemnější proces pro získání nerozpustného hedvábného scaffoldu z hlediska absence organických rozpouštědel běžně užívaných při stabilizaci fibroinu, ošetření methanolem stále zajišťuje vyšší stabilitu ve vodném prostředí (úbytek hmotnosti pouze o 2 %) [75]. Nanovlákná fibroinu se formují v roztoku samoorganizačním procesem při pomalém zvyšování koncentrace na 25 až 30 % (w/w) [76].

### 3.1 Příprava texturovaných hedvábných filmů

Cílená texturizace polymerního povrchu přináší danému materiálu nové užité vlastnosti spojené nejen s nárůstem jeho specifického povrchu. Takto upravené materiály nachází využití ve spoustě aplikačních odvětví, včetně elektroniky nebo biotechnologií.

#### 3.1.1 Lyofilizace

Jedním ze způsobů přípravy porézní fibroinové matrice je proces lyofilizace. Pomocí této metody lze připravovat 3D porézních scaffoldy a texturované filmy z fibroinového roztoku naneseného na nosné destičky. Tyto filmy s tloušťkou 0,5 mm, průměrem pórů 50 až 100  $\mu\text{m}$  a pórovitostí 70 až 90 % jsou vhodné pro studium angiogeneze [77]. Při lyofilizaci roztoku regenerovaného fibroinu dochází k tvorbě lamelární morfologie, která omezuje aplikaci scaffoldu v tkáňovém inženýrství. Pokud se do regenerovaného roztoku přidají hedvábná nanovlákná vytvořena procesem pomalé koncentrace fibroinového roztoku, dochází k omezení tvorby lamelárních struktur [75]. V kombinaci s želatinou a hydroxyapatitem lze připravit lyofilizací směsi kompozitní scaffoldy s vhodnou velikostí pórů a lepšími mechanickými a biologickými vlastnostmi [78]. Příklady jednotlivých struktur jsou uvedeny na obr. 6.



Obr. 6: Příklady porézních textur připravených lyofilizací fibroinového roztoku A) ve formě filmu odlévaného na destičku [77], B) s obsahem fibroinových nanovláken ve výchozím roztoku [75], C) kompozitní scaffold s želatinou a hydroxyapatitem [77]

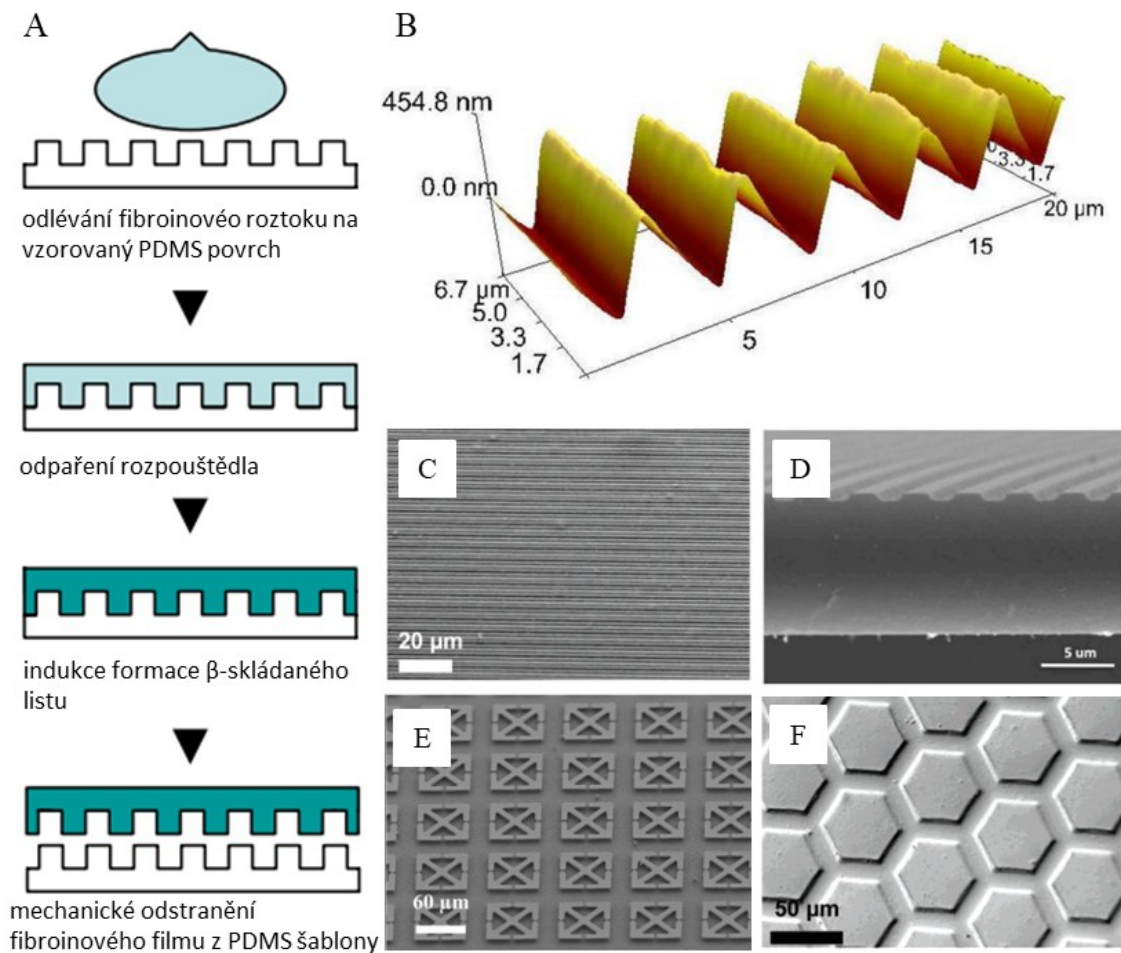
### 3.1.2 Patterning

Nejužívanější metodou pro přípravu mikro- a nano-texturovaných povrchů je tzv. “patterning“ založený na modelování velké plochy fibroinového filmu pomocí prefabrikovaných šablon. Pro aplikace v detekčních a senzorických systémech existuje možnost zakomponování kovových prvků v mikro a nano měřítku do proteinové matrice. V práci F. G. Omenetta a kol. byl na křemíkovou destičku s fotolitograficky generovanou texturou ze zlata nebo stříbra nanosen vodný fibroinový roztok. Fibroin se při sušení váže na kovové prvky na povrchu křemíku v důsledku přítomnosti cysteinových a tyrosinových zbytků ve fibroinu a uplatnění thiolových vazeb nebo interakcí oxidů s hydroxylovými skupinami aminokyselin. Přenesený kovový vzor na hedvábný filmech po odloupení ze šablony poskytuje masku pro následný krok reaktivního iontového leptání (obr. 7 E) [79].

Řada studií byla provedena za použití mikro-drážkované šablony z polydimethylsiloxanu (PDMS), příklady struktur jsou uvedeny na obr 7. Proces zahrnuje přípravu PDMS substrátu s požadovanou texturou odléváním roztoku PDMS na optickou mřížku s požadovanou roztečí drážek nebo na křemíkový podklad s definovanou drážkovanou strukturou generovanou fotolitograficky a iontovým leptáním [80] a následným vytvrzením. Na PDMS substrát poté mohou být odlévány nebo nanášeny metodou spin-coatingu [81] fibroinové roztoky v koncentraci odvíjející se od požadované tloušťky filmu. Před odstraněním z PDMS substrátu je nutné provést stabilizační krok zahrnující ošetření methanolem nebo vodními parami [82; 83; 84].

Alternativou PDMS šablony je užití TEM mřížky, která je umístěna na povrch hedvábného roztoku na skleněném nebo křemíkovém substrátu. Po vysušení a stabilizaci methanolem se mřížka odstraní a zanechá na fibroinovém filmu hexagonální texturu (obr. 7 F) [81].





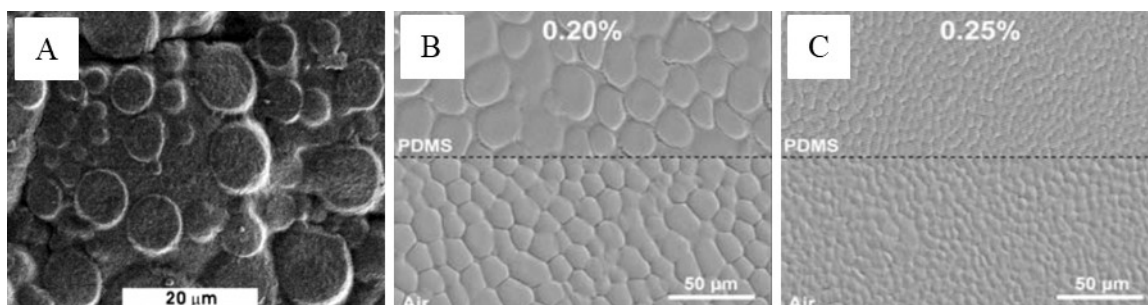
Obr. 7: Texturování filmu metodou patterning A) proces přípravy drážkovaného fibroinového filmu odléváním na PDMS šablonu, B) až D) příklady drážkovaných fibroinových filmů [82; 83; 84], E) leptaný fibroinový film s kovovým vzorem [79], F) Fibroinový film texturovaný TEM mřížkou [81]

### 3.1.3 Fázová separace

Fázová separace do definovaných mikrostruktur byla pozorována u směsi fibroinu a polyethylenoxidu (PEO). Mikrostruktury získané ze směsi o různých poměrech mezi jednotlivými složkami mají jednotnou velikost a tvar, PEO může být ze systému snadno extrahován vodou, následkem čehož dochází k tvorbě matrice s definovanou pórovitostí a zvýšenou drsností povrchu [85].

Koncentrace PEO ve směsi, stejně jako způsob stabilizace vysušeného filmu, ovlivňuje povrchovou topografii. Zatímco ve výše zmíněné studii byly filmy s PEO stabilizovány methanolem, v práci D. L. Kaplana a kol. byly filmy ošetřeny „žiháním“ vodou. Povrchové útvary

byly formovány po vymytí PEO ve vodní lázni. Příklady textur generovaných na povrchu fibroinu fázovou separací PEO jsou uvedeny na obr. 8 [83].

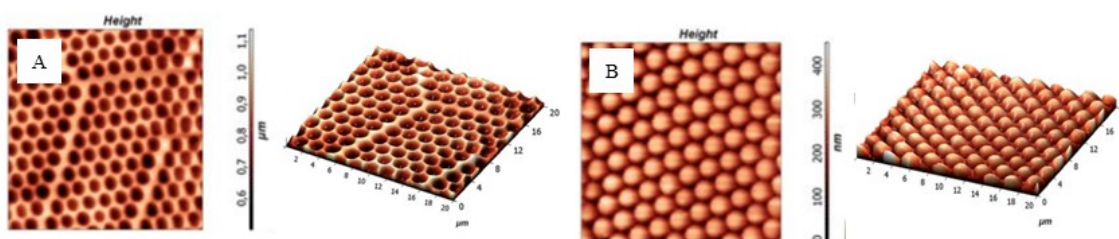


Obr. 8: Příklady textur generovaných fázovou separací PEO a fibroinového roztoku (A) filmy stabilizovány methanolem [85], B) a C) filmy stabilizovány vodní parou [83]

### 3.1.4 Metoda breath figures

Metoda breath figures je rychlá a levná metoda, kterou lze připravit homogenní hexagonálně tvarované póry s kontrolovanou velikostí pórů a její distribucí na povrchu. Klíčovými kroky jsou odlévání polymerního roztoku při vysoké vlhkosti, kondenzace kapiček vody na studeném povrchu odpařujícího se polymerního roztoku a organizace kapiček do uspořádané hexagonální mřížky tvořící pórovitý vzor po odpaření vody [86]. Odpařováním rozpouštědla může dojít ke koalescenci kapiček vody za vzniku neuspořádaných struktur s širokou distribucí velikosti pórů [87].

V literatuře je diskutována aplikace breath figures na fibroinový substrát. Pro generování porézní struktury na povrchu je však u této metody nezbytná nerozpustnost materiálu ve vodě, což fibroin v amorfni konformaci nesplňuje. Proto je tato možnost zavržena a jako alternativa se nabízí příprava šablon z polydimethylsiloxanu (PDMS) a polymethylmetakrylátu (PMMA) pomocí breath figures, na které byl následně odléván fibroinový roztok. Fibroinový film poté získá specifickou povrchovou texturu šablony (obr. 9) [88].

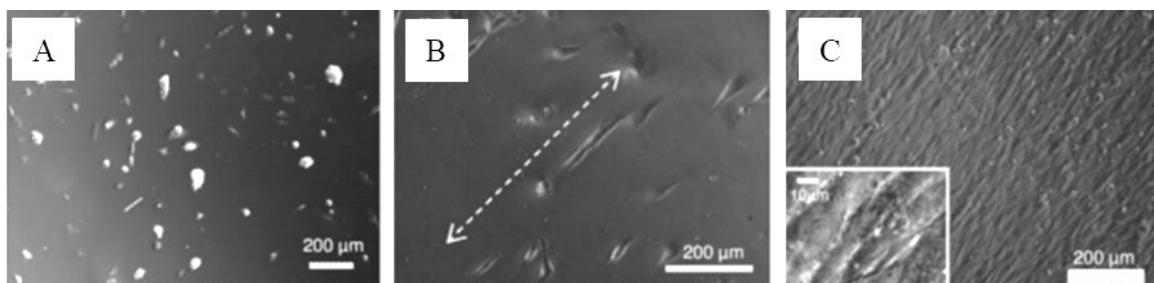


Obr. 9: A) Vzorované filmy založené na technice breath figures A) fibroinový film s mikro-dutinami, B) fibroinový film s mikro-výstupky [88]

### 3.2 Vliv povrchové textury na chování buněk

Topografie povrchu, který přichází do styku s biologickým prostředím, je důležitým faktorem ovlivňujícím několik buněčných funkcí – adhezi, proliferaci, morfologii a tkáňové uspořádání. Vzájemné interakce závisí nejen na typu materiálu, ale také na typu buňky, přičemž obecně lze říct, že převažuje lepší adheze buněk na zdrsňený povrch z důvodu většího specifického povrchu a tím pádem zvětšení kontaktní plochy mezi povrchem substrátu a buňkou. Existují však i výjimky a zatím co osteoblasty preferují drsné povrchy, adheze fibroblastů je lepší na hladkých substrátech [89].

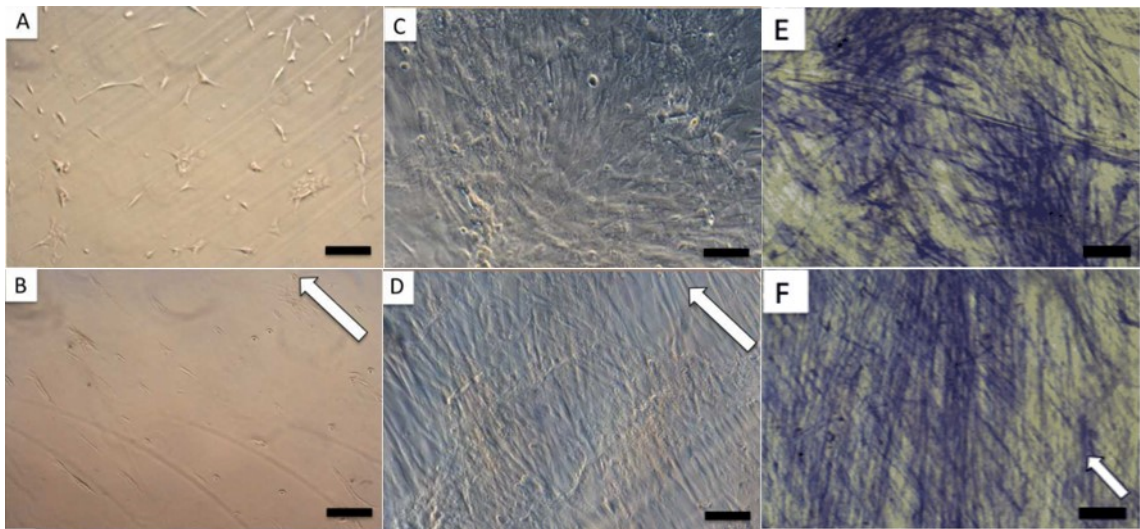
Drážkované fibroinové filmy představují vhodný povrch pro studium orientace buněk při proliferaci v oblasti inženýrství orientovaných tkáňových struktur včetně nervové, svalové, kosterní nebo rohovkové tkáně. Orientace lidských rohovkových fibroblastů (obr. 10) na filmech s drážkami hlubokými v rozmezí od 37 do 342 nm a 445 až 3580 nm širokými je výraznější na hlubších a užších drážkách. Roli hraje také morfologie tvarovaných rýh. Asymetrické drážky trojúhelníkového tvaru kombinující strmý a mírný sklon stěn představují vhodné kontaktní vedení pro orientaci buněk [84]. Drážkovaný fibroinový povrch byl rovněž použit pro studium rohovkových epitelálních buněk, přičemž byl prokázán vliv různě geometricky vzorovaných povrchů na adhezi buněk a vývoj cytoskeletu [80].



Obr. 10: Proliferace lidských rohovkových fibroblastů A) na hladkém fibroinovém filmu po 2 dnech, B) na drážkovaném povrchu po 2 dnech, C) na drážkovaném filmu po 2 týdnech (bílá šipka znázorňuje směr drážkování na fibroinovém filmu) [84]

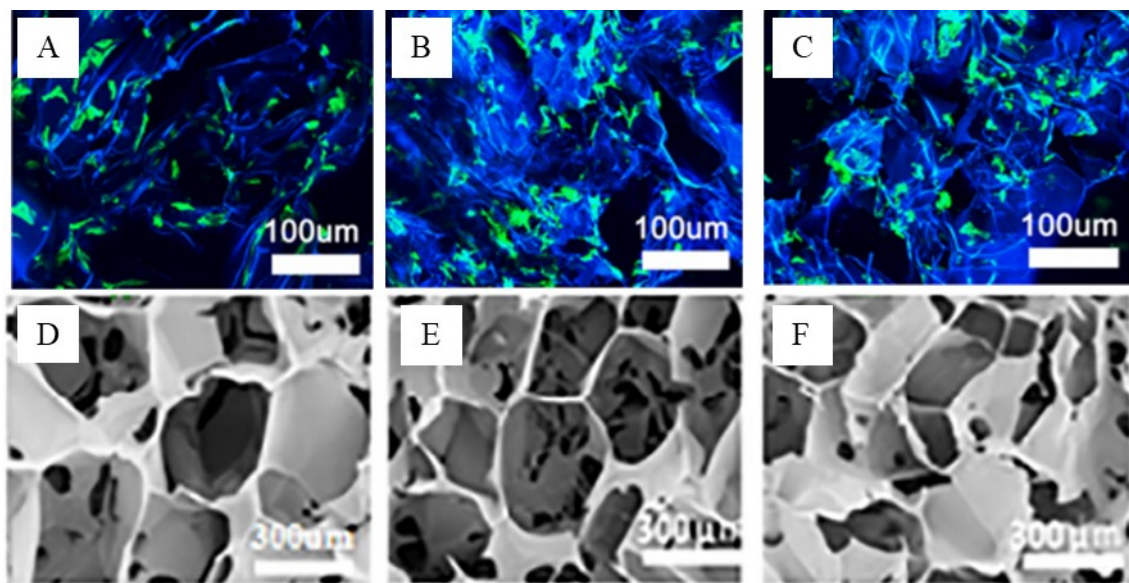
Drážkovaná morfologie nosného fibroinového substrátu podporuje orientaci a osteogenní diferenciaci a zároveň indukuje lamelární vyrovnání mesenchymálních kmenových buněk (obr. 11). Zajímavé je, že druhá vrstva diferencovaných buněk kultivovaných po dobu 28 dní na drážkovaných fibroinových filmech byla rovněž orientovaná, ale v určitém stupni rotace vůči první vrstvě (obr. 11 F). Tato organizace jednotlivých orientovaných vrstev je charakteristická právě v nativní lamelární kostní tkáni. Jako nejefektivnější z hlediska orientace

buněk byly ve studii D. L. Kaplana a kol. vyhodnoceny drážky s hloubkou ( $515 \pm 16$ ) nm a šířkou ( $3597 \pm 89$ ) nm [82].



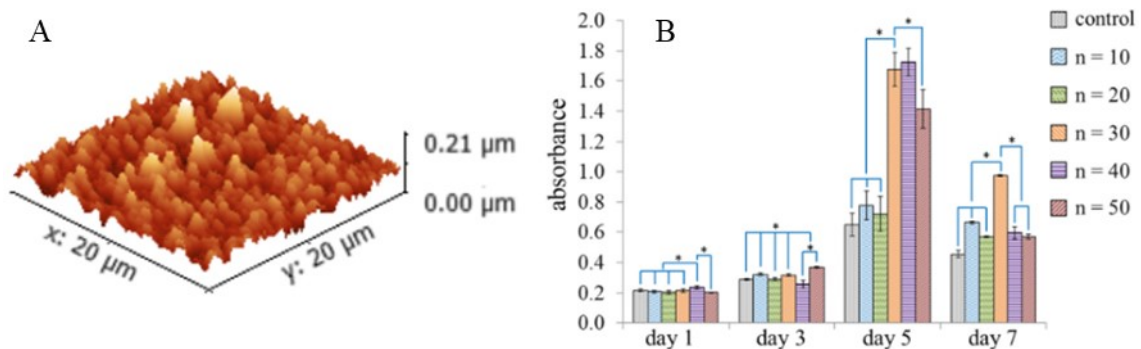
Obr. 11: Buněčná kultivace na hladkých fibroinových filmech (A, C, E) a na drážkovaných filmech (B,D,F) 2 dny (A, B), 16 dní (C, D) a 28 (E, F) dní po naočkování (bílé šipky znázorňují směr drážkování na fibroinovém filmu) [82]

Co se týká vlivu sekundární struktury fibroinu na chování buněk, proliferace je výrazně lepší na stabilních strukturách v SILK I konformaci. Ze studií vyplývá, že redukce struktury  $\beta$ -skládaného listu spolu se specifickou topografií tvořenou nanovláknky podporuje buněčnou adhezi a proliferaci (obr. 12) [75].



Obr. 12: A) – C) buněčná proliferace po 12 dnech na lyofilizaci generovaných porézních strukturách: D) bez nanofilament po ošetření methanolem, E) a F) s nanofilamenty v SILK I konformaci [75]

Proliferace osteoblastů byla sledována na vícevrstevných filmech z poly(diallyldimethylamonium chloridu) (PDDA), hedvábného fibroinu a kolagenu připravených depozicí vrstvou po vrstvě. S rostoucím počtem střídajících se vrstev (0-50) dochází k nárůstu drsnosti povrchu s Rz v rozmezí 34 až 360 nm. Na obr. 13 je ukázka strukturovaného povrchu vícevrstevných filmů a proliferace osteoblastů na filmech s různým počtem vrstev. Z výsledků je zřejmé, že osteoblasty byly životaschopné na všech typech filmů do 3. dne, 5. den dochází k výraznému nárůstu pro filmy s větším počtem vrstev, 7. den naopak k poklesu životnosti buněk u všech typů filmů [90].



Obr. 13: A) Strukturovaný povrch vícevrstevného kompozitního filmu, B) srovnání proliferace osteoblastů na filmech s různým počtem vrstev [90]

Chování buněk na fibroinových filmech s voštinovou strukturou není známo, obecně však tato struktura ovlivňuje buněčné interakce v závislosti na velikosti a četnosti pórů na povrchu polymeru. Polystyrenové kopolymerní filmy s texturou připravenou technikou breath figures s velikostí pórů blízkou 3  $\mu\text{m}$  zlepšují buněčnou adhezi [91]. Podobný závěr plyne i ze studie J. R. McMillana a kol. zabývající se proliferací lidských keratinocytů a fibroblastů na poréz- ních filmech z  $\epsilon$ -kaprolaktamu. Filmy s póry velkými 3-5  $\mu\text{m}$  vykazovaly nejvyšší úroveň adheze. Velikost pórů 3  $\mu\text{m}$  umožňuje komunikaci mezi buňkami a difúzi živin kulturačního média [92].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 POPIS EXPERIMENTU

Cílem experimentu bylo generovat strukturu na povrchu fibroinových filmů pomocí metody časově sekvenované fázové separace, popsané níže. Byly sledovány nejen procesní parametry modifikace a jejich vliv na výslednou strukturu, ale také výchozí stav fibroinu a možnosti jeho řízené transformace ze SILK I do SILK II. Následně byly vybrané struktury podrobeny proliferačním testům.

### 4.1 Materiály

Regenerovaný *Bombyx mori* fibroin v lyofilizované formě byl připraven na Univerzitě Bayreuth. Výchozí surovina byla zbavena sericinu varem v 0,02 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Po propláchnutí vodou byla hmota rozpuštěna v roztoku LiBr při zvýšené teplotě (60 °C) po dobu 4 h. Po rozpuštění byly nežádoucí ionty odstraněny dialýzou. Po centrifugaci a filtraci byl vytěžený fibroin lyofilizován a následně rozpouštěn v HFIP na koncentraci 2 % (w/v).

Fibroinové filmy byly připraveny odléváním 450 µl 2% roztoku do polystyrenových Petriho misek (TPP Techno Plastic Products AG) o průměru 3,4 cm, sterilizované radiací a bez obsahu pyrogenů, DNA/RNA a DNase/RNase.

Jako rozpouštědlo byl v experimentu použit hexafluoroisopropanol p.a. (HFIP); 99 % (abcr GmbH) a součástí modifikačního roztoku byl dimethylsulfoxid p.a. (DMSO); 99,99 % (VWR Chemicals).

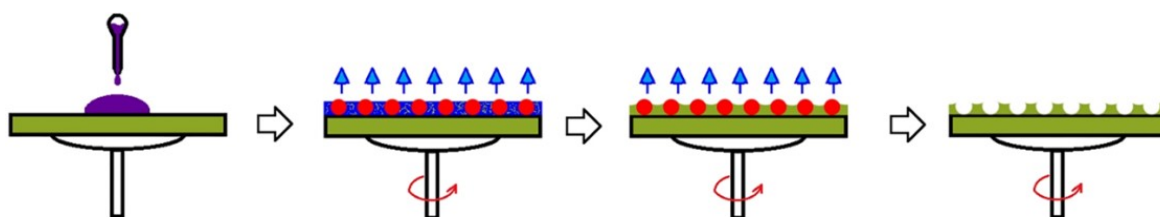
Ostatní chemické látky byly zakoupeny v p.a. čistotě od firmy Sigma Aldrich.

### 4.2 Příprava fibroinových filmů

Fibroinové filmy byly odlévány z 2% roztoku v HFIP a sušeny v atmosféře proudícího dusíku po dobu 12 h, přičemž v takto připravených filmech se fibroin nacházel v konformaci SILK I. Následně byly filmy umístěny do klimakomory s definovanou vlhkostí (60 %) nebo do par methanolu, čímž byla zajištěna transformace sekundární struktury. Na filmech v rozdílných stupních transformace fibroinu byly následně generovány specifické “porézní“ povrchové textury metodou časově sekvenované fázové separace.

### 4.3 Modifikace povrchu filmu metodou časově sekvenované fázové separace

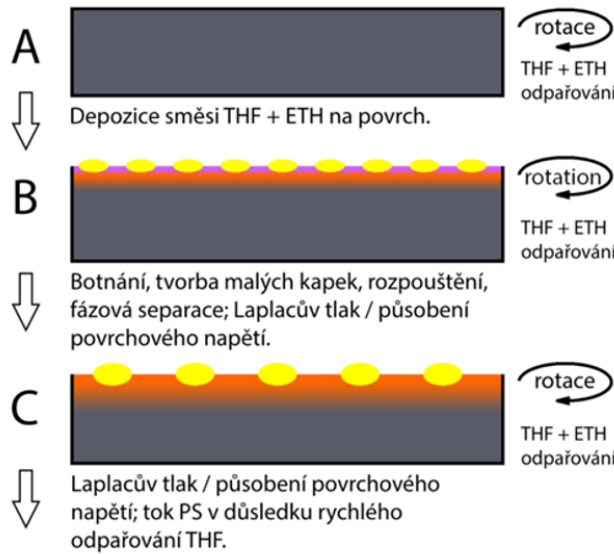
Technika, kterou byly v experimentální části diplomové práce připravovány specifické textury porézního charakteru na povrchu fibroinového filmu, je založena na časově sekvenovaném dávkování směsi dobrého a špatného rozpouštědla na rotující povrch (schéma na obr. 14). Tento způsob modifikace doposud nebyl aplikován na biopolymerní povrch včetně fibroinu. Metoda byla popsána A. Minaříkem, E. Wrzecionkem a kol. na rotujícím polystyrenovém povrchu. Proces funguje na principu fázové separace. Té je dosaženo odléváním dobrého rozpouštědla botnajícího povrch substrátu a špatného rozpouštědla, které je separováno na povrchu a umožňuje formování povrchu mechanismem podobným breath figures. Při strukturalizaci povrchu touto metodou hraje roli celá řada fyzikálních proměnných (povrchové napětí, Laplaceův tlak, mezifázové napětí, proudění vyvolané rychlým odpařováním rozpouštědla). Vznik porézní textury je popsán na obr. 15. Procesními parametry zahrnujícími poměr jednotlivých složek v dávkovaném roztoku, velikost a četnost dávek a frekvence dávkování nebo rychlost otáček lze řídit výslednou topografií povrchu co do počtu a velikosti pórů (obr. 16) a následně studovat buněčné interakce s těmito povrchy. Při volbě modifikační směsi je stěžejní mísitelnost všech složek a také výrazně vyšší rychlost odpařování dobrého rozpouštědla ve srovnání s rozpouštědlem špatným. Pro modifikaci polystyrenového povrchu byl zvolen tetrahydroxyfuran (THF) jako dobré rozpouštědlo a 2-ethoxy ethanol (ETH) jako špatné rozpouštědlo [93].



Obr. 14: Schéma dávkování směsi rozpouštědel na rotující substrát s generovanou porézní texturou



### Krok 1.

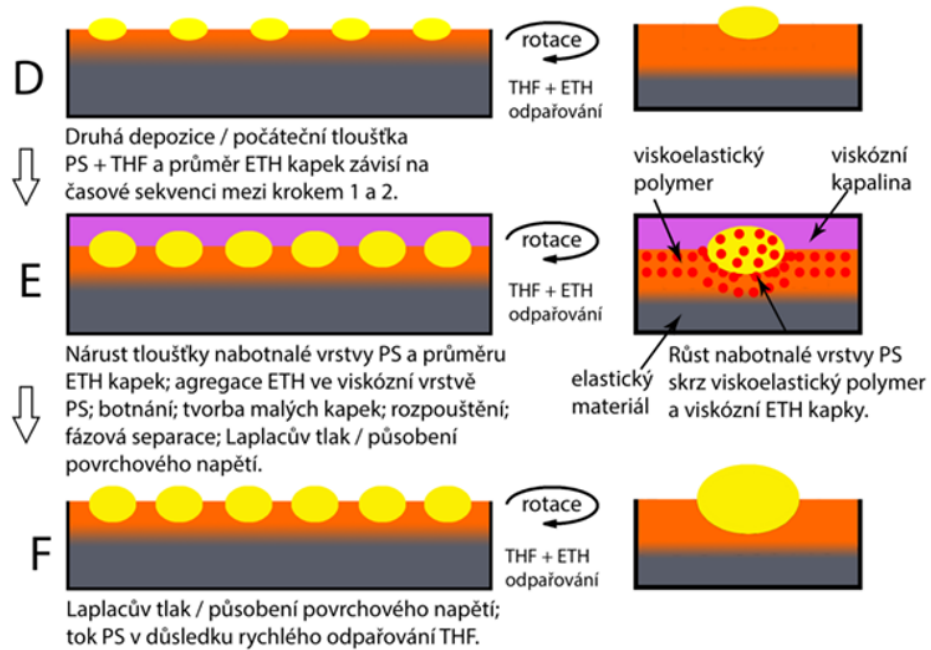


### Legenda:

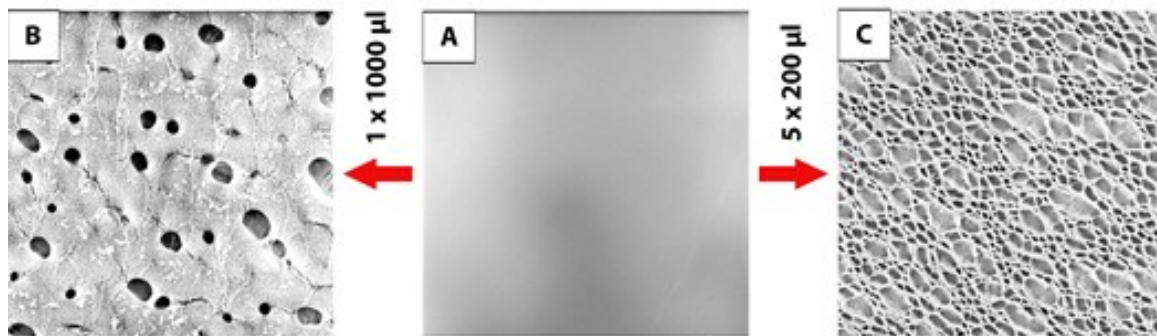
-  PS
-  THF + ETH
-  PS + THF
-  ETH
-  THF

THF - Tetrahydrofuran  
ETH - 2-Ethoxyethanol  
PS - Polystyren

### Krok 2.



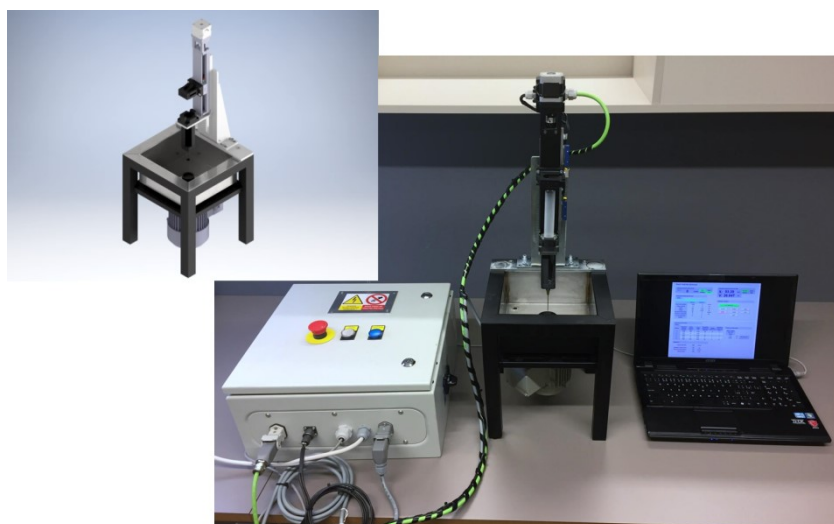
Obr. 15: Schéma vývoje mikro-porézní textury na PS povrchu sekvenovaným dávkováním dobrého a špatného rozpouštědla [93]



Obr. 16: Změny v textuře polystyrenového povrchu způsobené dávkováním malých objemů směsi rozpouštědel: A) PS povrch, B) povrch modifikovaný jednou dávkou směsi, C) povrch modifikovaný 5 dávkami směsi [93]

Pro účely texturizace povrchů bylo použito zařízení sestaveno na Ústavu fyziky a materiálového inženýrství FT UTB, viz Obr. 17.

Povrch fibroinového filmu byl modifikován dávkováním směsi dobrého (HFIP) a špatného (DMSO) rozpouštědla a vody v poměru 7:0,2:4. Použitý poměr rozpouštědel byl zvolen na základě optimalizačních experimentů provedených v rámci disertační práce E. Wrzecionka. Vyhledávání nejvhodnějšího poměru komponent ve směsném roztoku nebylo předmětem této práce. Ostatními sledovanými procesními parametry byly otáčky vzorku v rozsahu 1500 až 2400 otáček/min, objem dávkovaného roztoku v intervalu 100 až 300 µl, perioda dávkování 10 až 13 s a počet opakujících se dávek v rozmezí 10 až 40.



Obr. 17: Zařízení na přípravu texturovaných filmů metodou postupného dávkování směsných roztoků na rotující vzorek

## 4.4 Charakterizace povrchu

U připravovaných povrchů byly charakterizovány změny v povrchové topografii pomocí mechanického a optického profilometru a AFM, pro zpracování dat byly použity programy Gwyddion, verze 2.53 a ImageJ, verze 1.6\_0\_24. Stupeň transformace fibroinu byl sledován pomocí FTIR. Buněčná proliferace byla vyhodnocena pomocí optického mikroskopu a na základě životnosti buněk detekované činidlem alamarBlue.

### 4.4.1 FTIR

Analýza sekundární konformace fibroinu byla provedena pomocí FTIR spektrometru – Nicolet iS5 technikou ATR s Ge krystalem. Při měření bylo provedeno 32 skenů v rozlišení  $4\text{ cm}^{-1}$  v rozsahu  $400\text{ až }4000\text{ cm}^{-1}$ .

### 4.4.2 Profilometr

Topografické změny povrchu byly charakterizovány mechanický profilometrem Dektak XT (Bruker) s diamantovým hrotem s poloměrem křivosti  $2,5\text{ }\mu\text{m}$  a přítlakem  $5\text{ mg}$ . Měření na optickém profilometru ContourGT-K (Bruker) bylo provedeno s použitím bílého světla a čočky se zvětšením 20x. Vyhodnocení drsnosti bylo provedeno podle normy ISO 4287.

### 4.4.3 AFM

Detailní topografické změny byly charakterizovány pomocí mikroskopu skenující sondou, Dimension ICON (Bruker). Měření byla prováděna rychlostí skenování  $0,7\text{ Hz}$  s rozlišením  $512\times 512$  pixelů v pokleповém režimu při pokojové teplotě ve vzduchu. Byla použita sonda s rezonanční frekvencí  $70\text{ kHz}$  a konstantou tuhosti  $0,4\text{ N/m}$  (ScanAsyst-Air, Bruker).

### 4.4.4 Buněčná adheze a proliferace

Na vybraných texturovaných površích byla sledována proliferace 4 typů buněk: myších embryonálních fibroblastů (BALB/3T3), keratinocytů (HaCaT), myoblastů (C2C12) a pre-osteoblastů (MC3T3-E1). Před *in vitro* testováním byly vzorky sterilizovány UV-zářením po dobu 1 h. Pro kultivaci osteoblastů bylo použito médium  $\alpha$ -MEM s obsahem 10 % telecího séra a 0,1 % Gentamicinu, pro ostatní typy buněk médium DMEM s obsahem 10 % telecího séra, 1 % Glutaminu a 0,1 % Gentamicinu. Buňky byly naneseny na sterilní

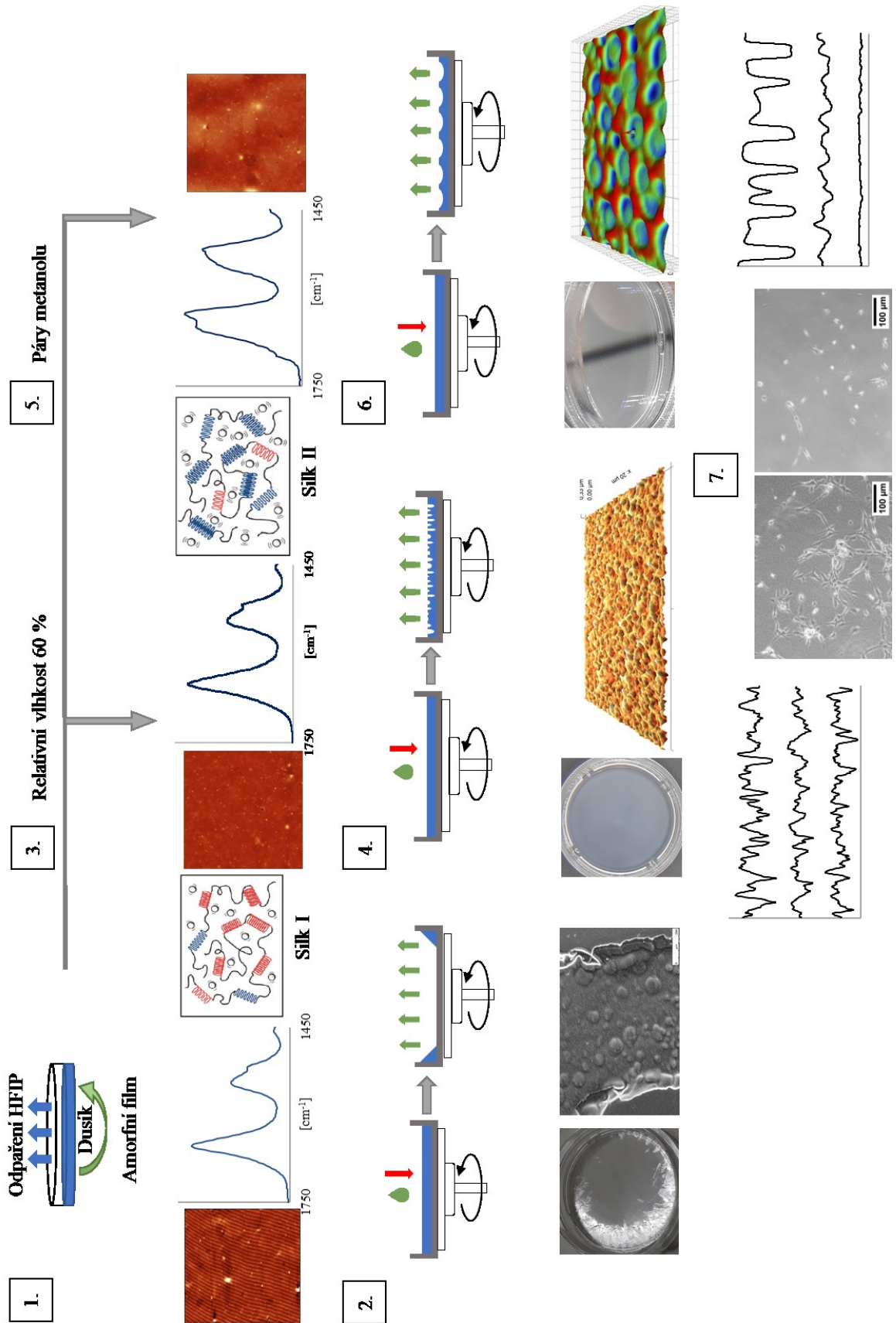
texturované povrchy v počátečním množství 5000 buněk/cm<sup>-2</sup> (22 500 buněk/ml). Buněčná proliferace byla hodnocena po 24, 48 a 72 h testem alamarBlue.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Bylo zvoleno několik postupů přípravy strukturovaných filmů a tomu odpovídajících metod charakterizace. Metodou FTIR byly sledovány konformační přechody ve fibroinových filmech. Získaná data poukazují na vliv výchozí sekundární struktury materiálu na formování pórů na povrchu filmu. Jsou diskutovány způsoby sušení filmů a následného ošetření parami methanolu nebo umístěním do klimakomory s definovanou vlhkostí za účelem kontroly strukturních změn v proteinovém systému.

Z důvodu výrazně rozdílné členitosti upravených povrchů byly zvoleny dvě metody pro analýzu topografických změn, mikroskopie atomárních sil pro nanometrové struktury a optická a mechanická profilometrie pro plošně větší útvary o rozměrech 10 a více mikrometrů.

Na obr. 18 je znázorněno schéma postupu prováděných experimentů a analýz. První dva kroky se týkají přípravy fibroinového filmu v amorfním stavu a jeho následné modifikace, která vedla ke smývání filmu ke krajům misky. Body 3 a 4 popisují částečnou transformaci fibroinového filmu ošetřením zvýšenou vlhkostí okolního prostředí a jeho následnou modifikaci s generováním struktur v nano-měřítku. Body 5 a 6 se týkají převedení filmů do SILK II stavu ošetřením methanolem a modifikace s tvorbou textury v mikro-měřítku. Bod 7 zobrazuje proliferační testy na vybraných filmech a jejich stabilitu ve vodném prostředí a methanolu. V následujících podkapitolách budou jednotlivé experimentální kroky a jejich výsledky podrobněji diskutovány.

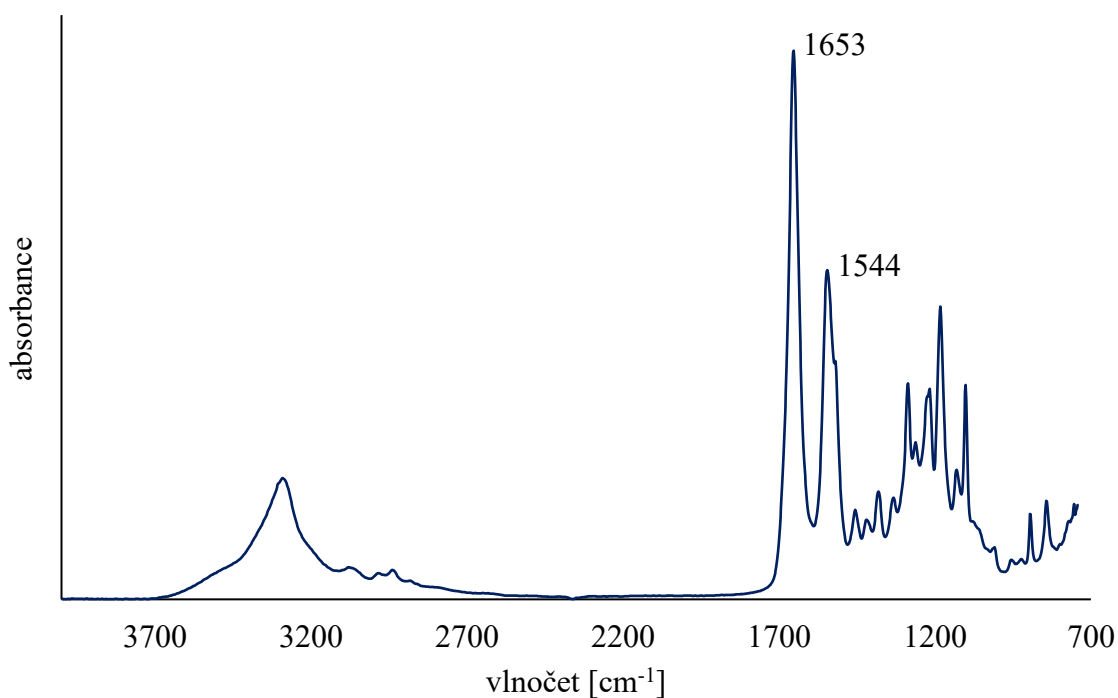


Obr. 18: Schéma experimentálního postupu

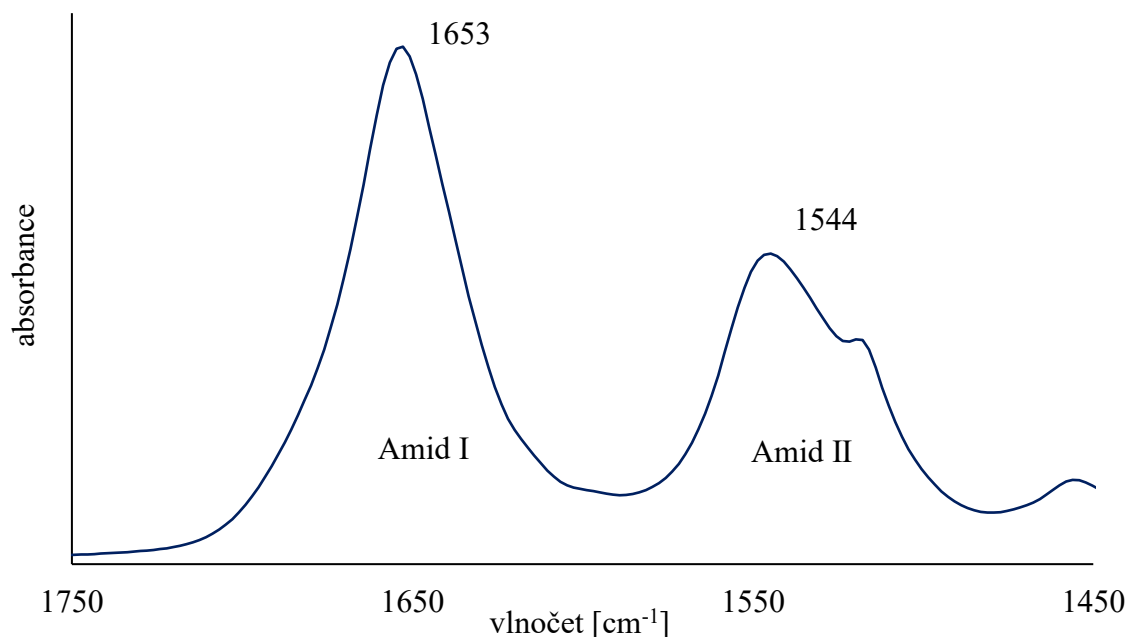
## 5.1 Příprava fibroinových filmů v SILK I stavu

Jak bylo popsáno výše, fibroinové filmy v základním stavu SILK I byly připraveny odléváním 450  $\mu\text{l}$  2% (w/v) fibroinového roztoku v HFIP do polystyrenových misek. Misky byly umístěny v exikátoru s řízeným průtokem dusíku, kde byly filmy sušeny po dobu 12 h. Převládající amorfnní konformace fibroinu byla zajištěna absencí vlhkosti v okolním prostředí při sušení a zvoleným rozpouštědlem HFIP [71].

Ověření sekundární konformace bylo provedeno pomocí FTIR. Na obr. 19 je znázorněno základní spektrum fibroinového filmu shodné s výsledky prezentovanými v literatuře [40]. Pás Amidu I v oblasti 1600 – 1700  $\text{cm}^{-1}$  s maximem 1653  $\text{cm}^{-1}$  a pás Amidu II v oblasti 1510 – 1580  $\text{cm}^{-1}$  s maximem 1544  $\text{cm}^{-1}$  odpovídají konformaci SILK I. Ve spektru je možné nalézt oblasti charakteristické pro konkrétní aminokyseliny, při sledování konformačních přechodů v sekundární struktuře jsou však dostačující právě výše zmíněné pásy pro Amid I a II, v detailu na obr. 20.



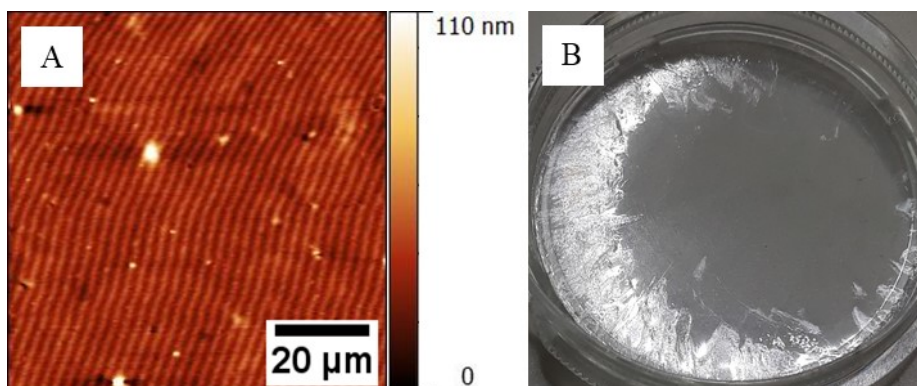
Obr. 19: FTIR spektrum fibroinového filmu odlévaného z 2% (w/v) roztoku v HFIP a sušeného 12 h v atmosféře protékajícího dusíku (rozsah absorbance 0-0,13)



Obr. 20: FTIR spektrum zobrazující charakteristické pásy Amidu I a II

## 5.2 Modifikace fibroinových filmů v SILK I stavu

Topografie amorfních filmů byla zobrazena mikroskopem atomárních sil. Amorfní nestabilní filmy jsou však měkké a lepivé, je proto velmi obtížné zobrazit jejich povrch bez artefaktů (obr. 21 A). Během řady experimentů nebylo možné optimalizovat postup pro generování homogenní textury na amorfním filmu. Při pokusech s různými poměry ve složení modifikačního roztoku a procesními podmínkami dávkování směsi docházelo k částečnému až úplnému smývání fibroinu z povrchu misky způsobené dobrou rozpustností fibroinu v amorfním stavu v HFIP i ve vodě (obr. 21 B).

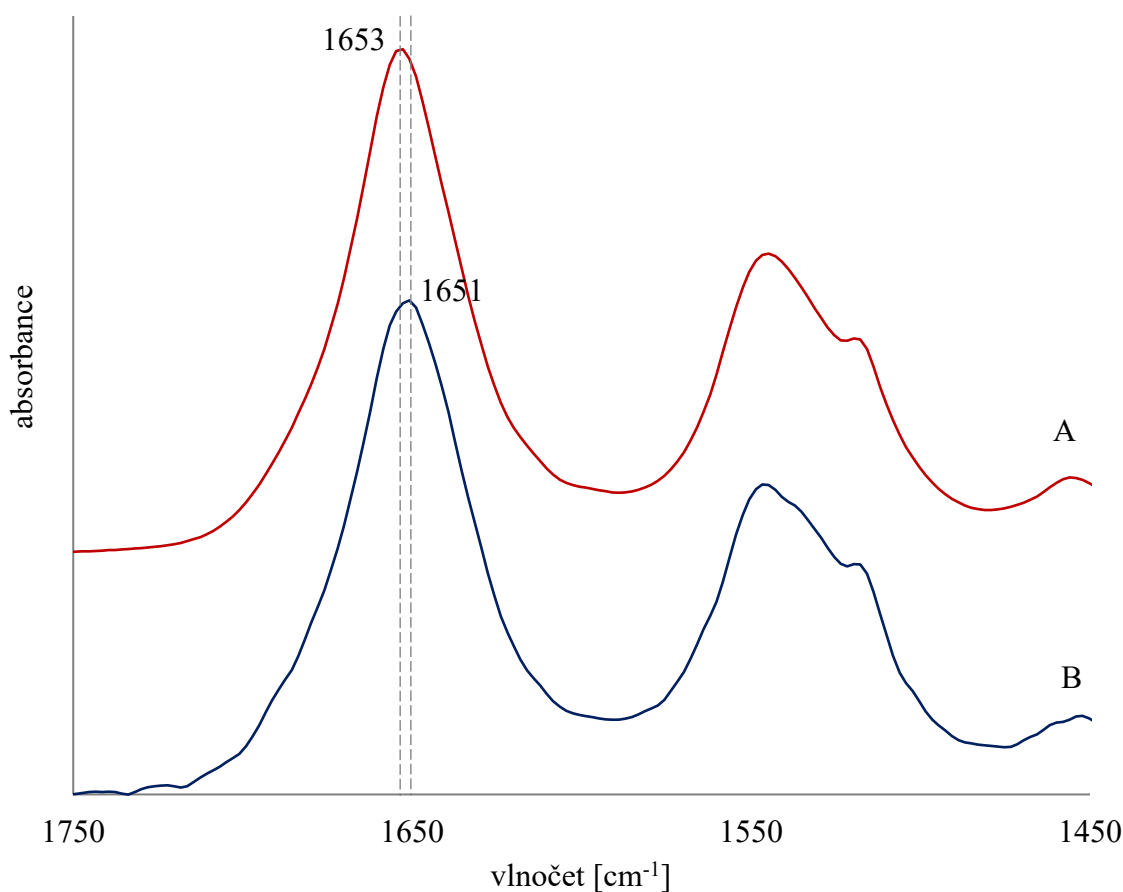


Obr. 21: A) AFM zobrazení povrchu amorfního fibroinového filmu, B) fotka částečně rozpuštěného fibroinového filmu smytého ke krajům PS misky



### 5.3 Příprava fibroinových filmů v částečně transformovaném stavu

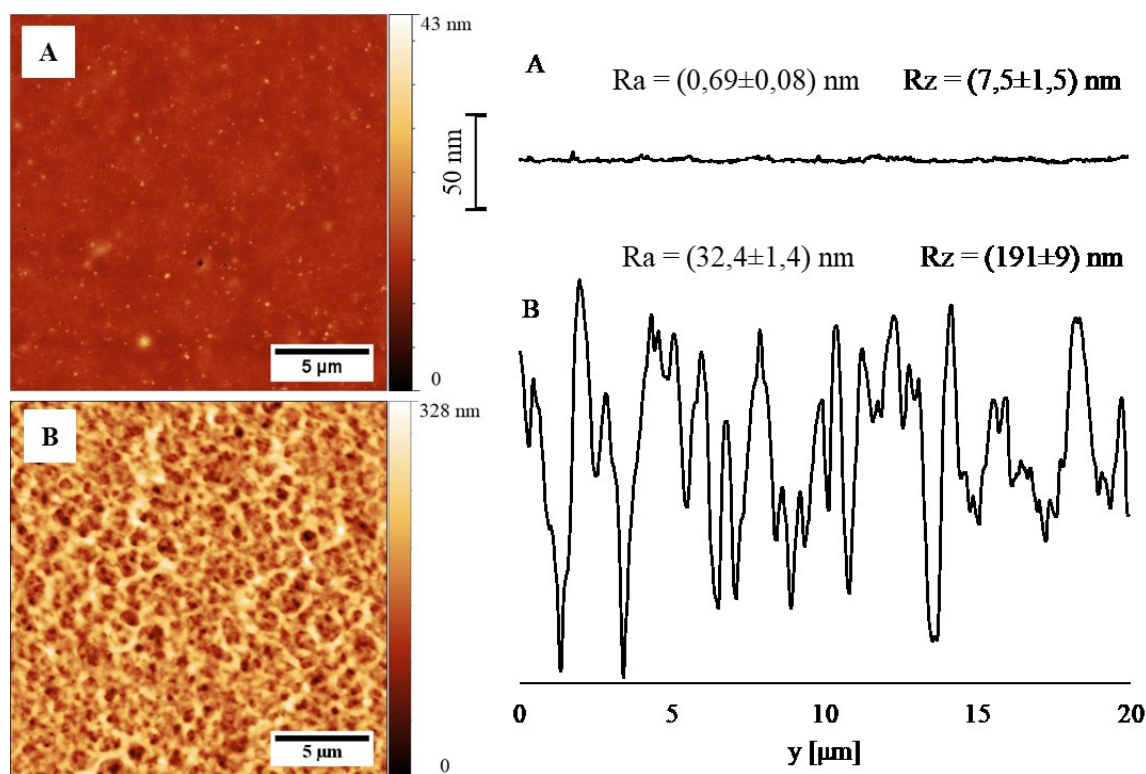
Z důvodu nestability amorfních filmů při aplikaci modifikační směsi bylo třeba indukovat mírnou změnu konformace. K tomu bylo zvoleno umístění filmů sušených v inertní atmosféře do klimakomory s kontrolovanou vlhkostí 60 % po dobu 48 h. Na obr. 22 jsou znázorněna FTIR spektra neošetřených filmů a filmů ošetřených pomocí definované vlhkosti. Po umístění do 60% vlhkosti došlo k posunu maxima Amidu I z  $1653\text{ cm}^{-1}$  na  $1651\text{ cm}^{-1}$ . I přes nevýraznou změnu ve FTIR spektru byly pozorovány výrazně lepší výsledky modifikace, kdy pomocí několika kombinací procesních parametrů byla na povrchu fibroinu generována textura v nano-měřítku viz následující podkapitola.



Obr. 22: FTIR spektrum fibroinových filmů sušených 12 h v průtoku dusíku A) v konformaci SILK I, B) s částečnou transformací indukovanou umístěním do vlhkosti 60 % na 48 h při teplotě  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  (rozsah absorbance jednotlivých spekter 0-0,13)

#### 5.4 Modifikace fibroinových filmů v částečně transformovaném stavu

Při modifikaci fibroinových filmů v částečně transformovaném stavu indukovaném umístěním do kontrolované vlhkosti 60 % byla aplikována směs dobrého rozpouštědla HFIP, špatného rozpouštědla DMSO a vody v poměru 7:0,2:4. Změna textury povrchu po sekvencovaném dávkování směsi rozpouštědel na povrch rotujícího filmu s částečně transformovanou sekundární strukturou je znázorněna pomocí AFM na obr. 23. Obr. 23 A zobrazuje povrch semi-transformovaného filmu před modifikací. Největší výška profilu Rz činí  $(7,5 \pm 1,5)$  nm a průměrná aritmetická úchylka Ra  $(0,69 \pm 0,08)$  nm. Povrch po modifikaci na obr. 23 B vykazuje výrazné změny v textuře, kdy parametr Rz dosahuje  $(191 \pm 9)$  nm a parametr Ra vzrostl na  $(32,4 \pm 1,4)$  nm.



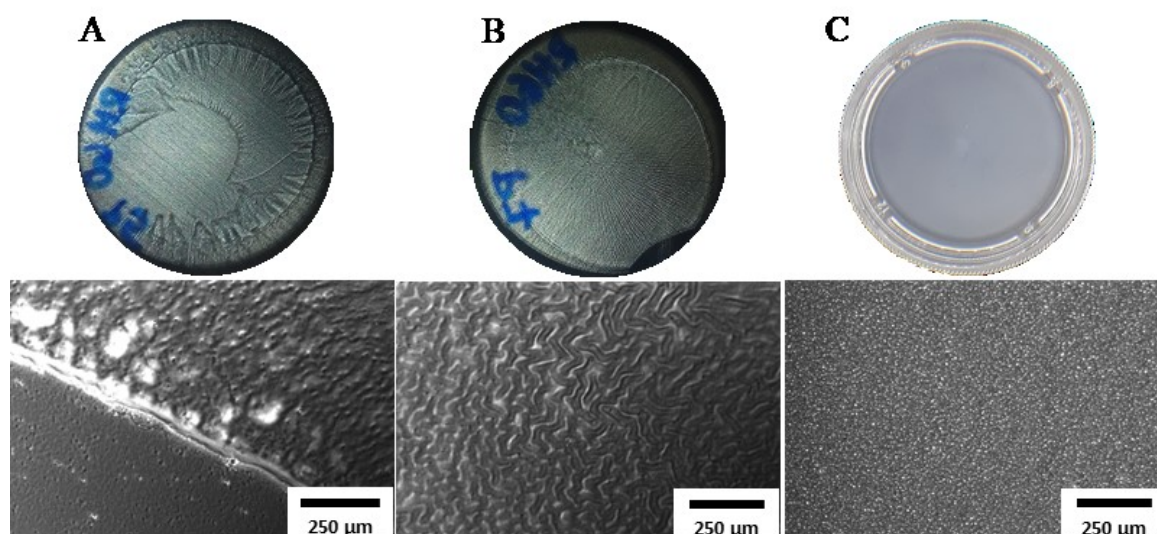
Obr. 23: Změna povrchové textury a profily fibroinových filmů sušených 24 h v průtoku dusíku a částečně transformovaných při vlhkosti 60 % A) před modifikací, B) po modifikaci; snímky pořízeny pomocí AFM

Pro daný poměr složek ve směsném roztoku byly optimalizovány procesní parametry jeho depozice na povrch upravovaného fibroinového filmu. Příklady vybraných testovacích procesních parametrů jsou uvedené v tab. 1. U některých postupů docházelo opět ke smývání proteinového filmu nebo ke generování nehomogenní textury na povrchu, příkladem jsou postupy 1 a 2 (obr. 24 A a B). Stěžejní roli v těchto případech hraje zřejmě krátký časový

interval (5 s) mezi dávkami. Postupy 3 až 5 vedou ke generování specifické textury porézniho charakteru, jejíž vznik se projevuje homogenním zamlžením povrchu filmu, které je detekovatelné okem (obr. 24 C).

Tab. 1: Vybrané testovací postupy přípravy texturovaného povrchu pro částečně transformované fibroinové filmy

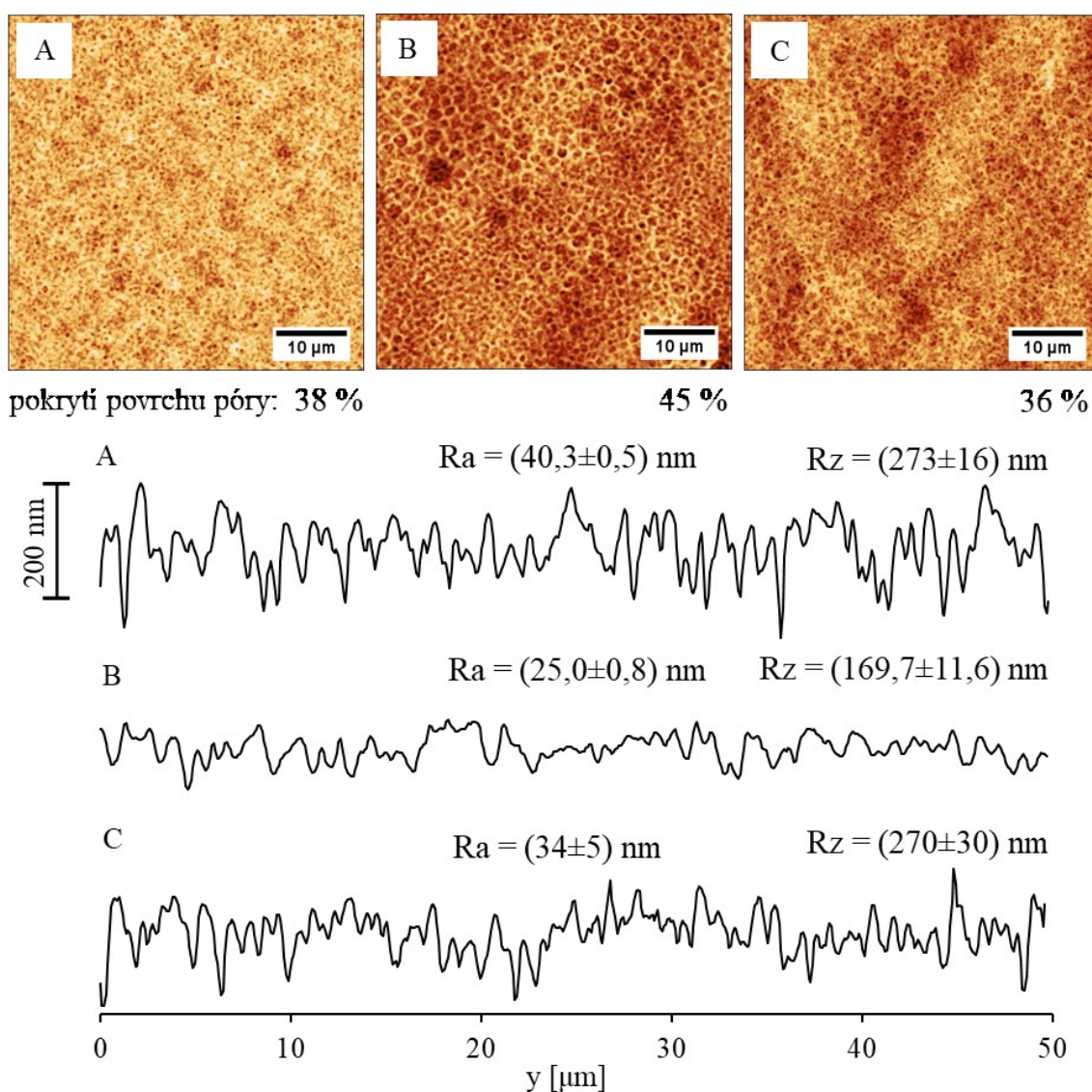
postup	otáčky/min	počet dávek	dávkovaný objem [μl]	interval mezi dávkami [s]
1	2400	20	100	5
2	2400	10	200	5
3	1500	40	100	10
4	1500	20	300	10
5	1500	20	300	13



Obr. 24: Fotky filmů po modifikaci a obrázky z optického mikroskopu pro postupy A) 1, B) 2, C) 3 uvedené v tab. 1

Na obr. 25 jsou srovnávány textury generované postupy 3 až 5 uvedenými v tab. 1. Topografie povrchu byla změřena pomocí AFM. U všech postupů byly zvoleny otáčky 1500/min. Postup 3 zahrnoval 40 dávek směsi o objemu 100 μl v intervalu 10 s. Po tomto postupu činilo pokrytí plochy póry 38 %, parametr  $R_z$  dosahuje  $(273 \pm 16)$  nm a  $R_a$   $(40,3 \pm 0,5)$  nm. Snížení počtu dávek a zvýšení jejich objemu bylo aplikováno při postupu 4, kdy výsledkem je vyšší pokrytí plochy póry (45 %), ale nižší parametry drsnosti. Z obrázku 25 B rovněž plyne, že

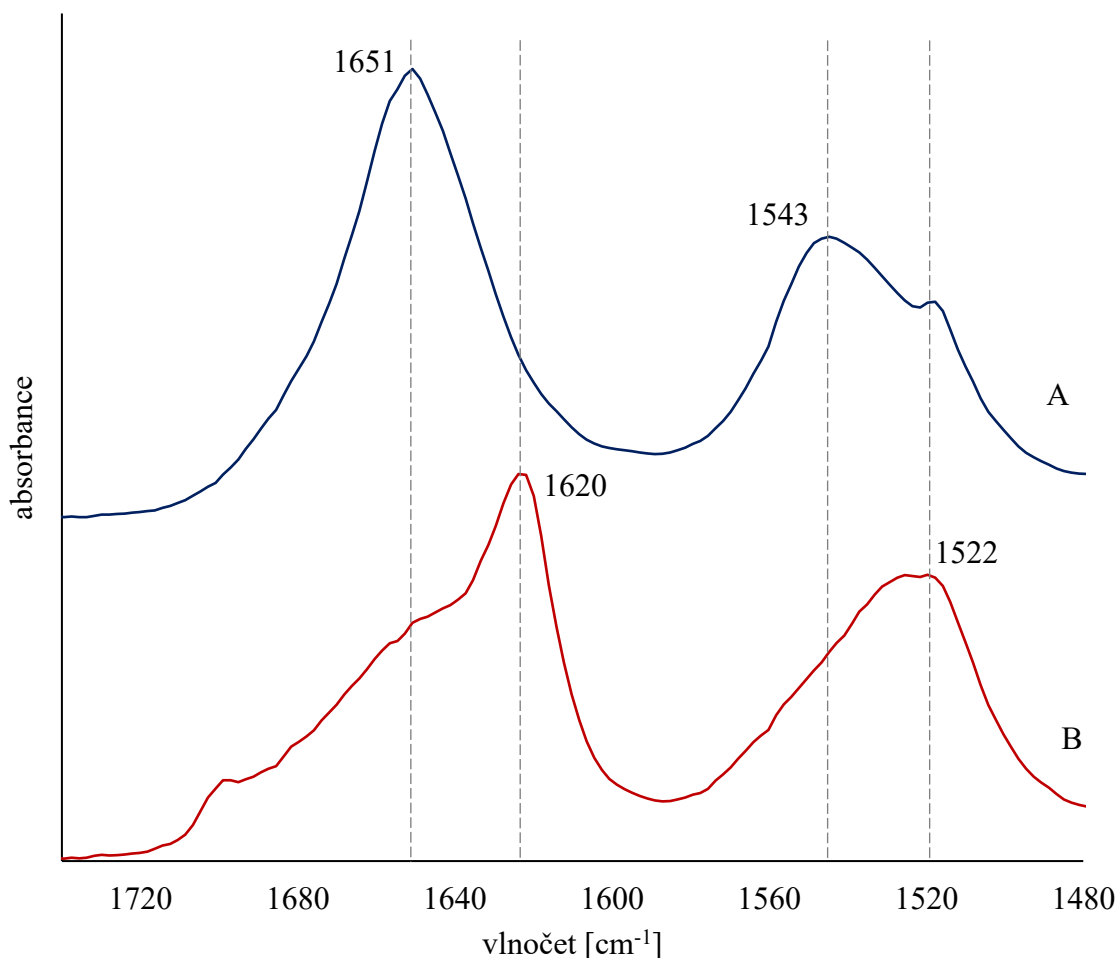
velikost porézních útvarů je více heterogenní ve srovnání s postupem 3 na obr. 25 A. Při postupu 5 byl prodloužen interval mezi jednotlivými dávkami na 13 s. Parametry drsnosti jsou podobné, jako u postupu 3, stejně jako procentuální pokrytí plochy póry. Lze konstatovat, že na semi-transformovaném povrchu lze zvolenou metodou reprodukovatelně generovat velmi jemnou texturu vykazující menší odchylky v drsnosti v závislosti na zvolených procesních parametrech. Z hlediska reprodukovatelnosti a homogenního pokrytí povrchu byl jako neoptimálnější vyhodnocen postup 4, textura získaná tímto postupem byla rovněž použita při studiu buněčné proliferace.



Obr. 25: Texturované povrchy modifikovaných filmů s částečnou transformací fibroinu, A) až C) postupy 3 až 5 z tab. 1; snímky pořízeny pomocí AFM

Na obr. 26 je znázorněn posun ve FTIR spektru, ke kterému dochází během procesu texturizace. Maximum pásu Amid I se posunuje z  $1651 \text{ cm}^{-1}$  na hodnotu  $1620 \text{ cm}^{-1}$  a maximum

pásu Amid II se posunuje z 1543 na 1522  $\text{cm}^{-1}$ , což značí přítomnost konformace  $\beta$ -skládaného listu. Na přítomnost konformace  $\beta$ -turn ukazuje výstupek v 1695  $\text{cm}^{-1}$ . Modifikační roztok obsahuje vodu, která plní funkci změkčovadla a usnadňuje pohyb segmentů řetězců. Přesto, že HFIP samotné neindukuje transformaci sekundární struktury fibroinu na  $\beta$ -skládaný list, voda během procesu strukturalizace zapříčiňuje zároveň krystalizaci fibroinového filmu [37].

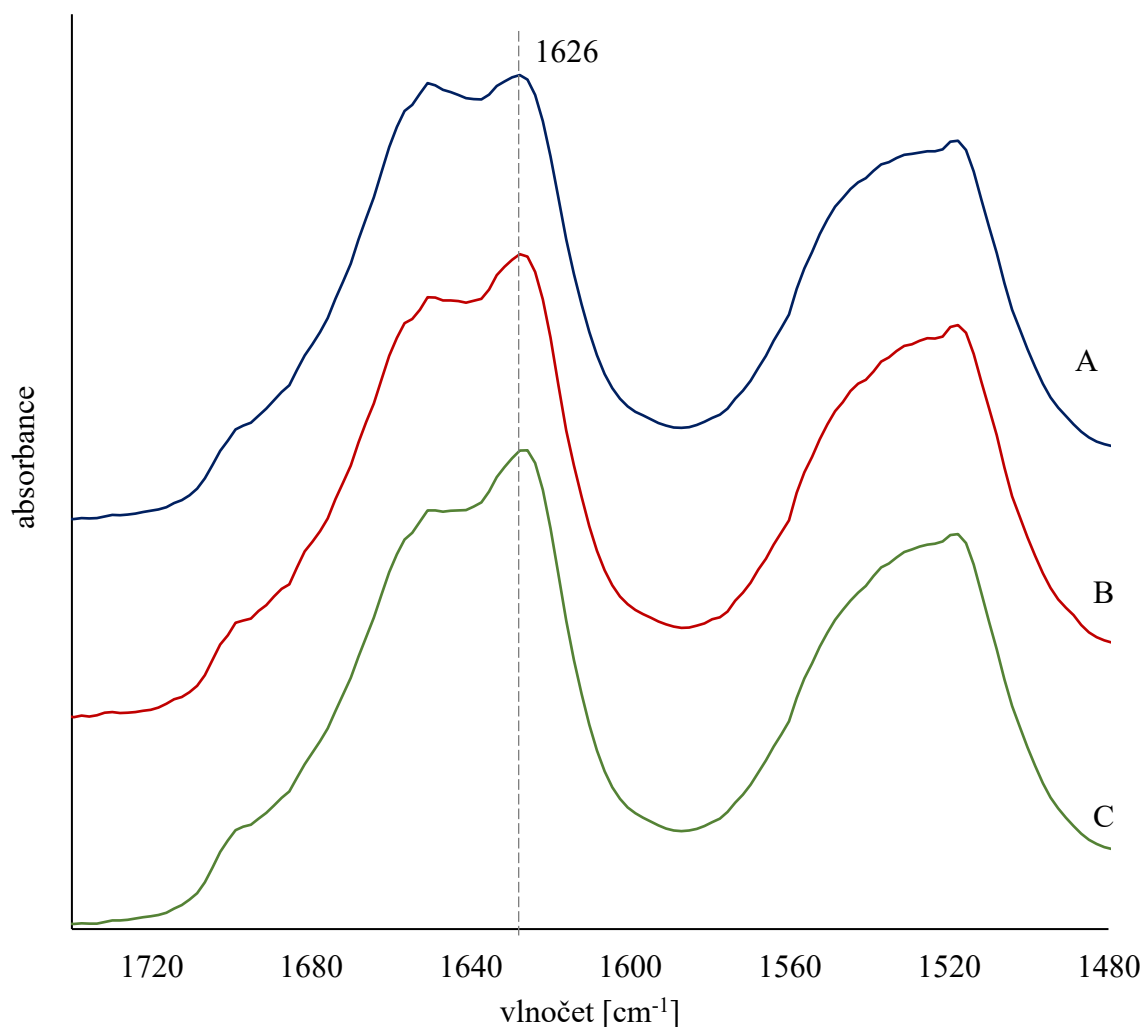


Obr. 26: FTIR spektrum fibroinového filmu sušeného v dusíkové atmosféře a částečně transformovaného v 60% vlhkosti A) před modifikací a B) po modifikaci (rozsah absorbance jednotlivých spekter 0-0,09)

## 5.5 Příprava fibroinových filmů ve stavu SILK II

Pro indukci krystalizace fibroinu a převedení do stavu s převahou konformace  $\beta$ -skládaného listu byly filmy vysušené v inertní dusíkové atmosféře umístěny do exikátoru s atmosférou nasycenou parami methanolu. Po 24 h působení methanolu dochází k posunu maxima

Amidu I na hodnotu  $1626\text{ cm}^{-1}$  (obr. 27A-C) z původních  $1653\text{ cm}^{-1}$  (obr. 20). Tato hodnota již zůstává neměnná i po 48 h působení par methanolu, dochází však k poklesu ramena v oblasti kolem  $1647\text{ cm}^{-1}$ , které značí zbytkovou SILK I konformaci. Po působení methanolu 72 h zůstává spektrum neměnné (obr. 27 C).

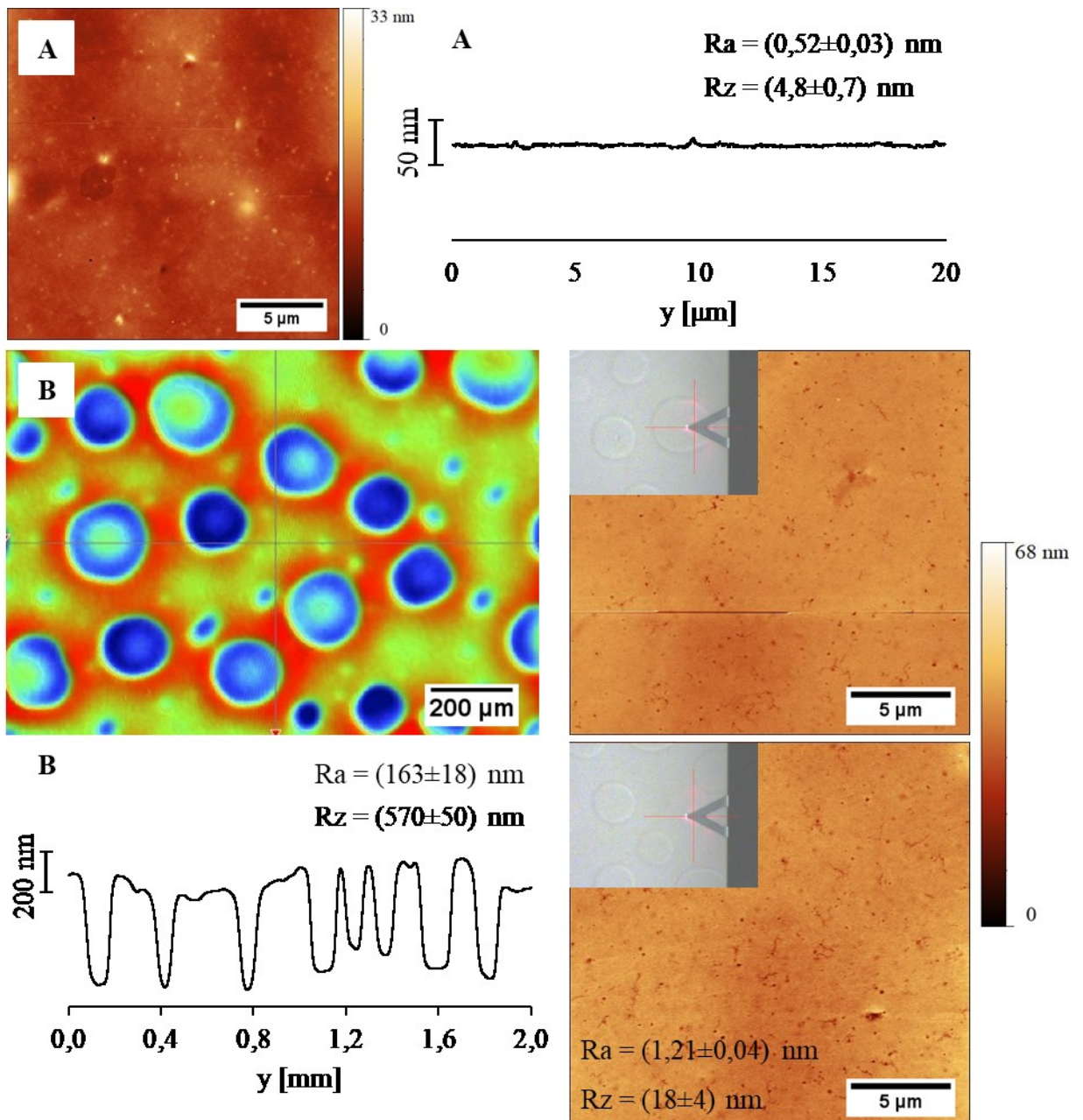


Obr. 27: Srovnání FTIR spekter fibroinových filmů ošetřených parami methanolu po dobu A) 24, B) 48 a C) 72 h (rozsah absorbance jednotlivých spekter 0-0,09)

## 5.6 Modifikace fibroinových filmů ve stavu SILK II

Z experimentálních pozorování vyplynulo, že fibroinové filmy v SILK II konformaci jsou stabilní z hlediska jejich náchylnosti ke smývání z povrchu PS misky. Vznikající textury měly však na první pohled jiný charakter. Nezpůsobovaly zamlžení filmu, ale na povrchu byly okem pozorovatelné prohlubně s kruhovým průřezem. Na obr. 28 A je opět pomocí

AFM vyobrazen povrch transformovaného filmu před modifikací, parametry drsnosti jsou srovnatelné s povrchem semi-transformovaného filmu na obr. 23 A. Příklad generované textury změřené optickým profilometrem je na obr. 28 B, spolu s profilovým řezem a parametry drsnosti. Pomocí AFM bylo zjištěno, že povrch uvnitř a vně póru je stejný. Nicméně vzhledem k nemodifikovanému povrchu vzrostly parametry drsnosti a povrch jeví známky popraskání.



Obr. 28: Povrchová textura fibroinových filmů sušených 24 h v průtoku dusíku a transformovaných v methanolu 48 h A) před modifikací, B) po modifikaci; snímky pořízeny pomocí AFM a profilometru

Modifikace fibroinových filmů ve stavu SILK II byla opět provedena několika postupy, z nichž vybrané jsou uvedeny v tab. 2. Optimalizační procesy probíhaly s cílem dosáhnout co nejvíce homogenního pokrytí filmu povrchovou mikro-porézní texturou.

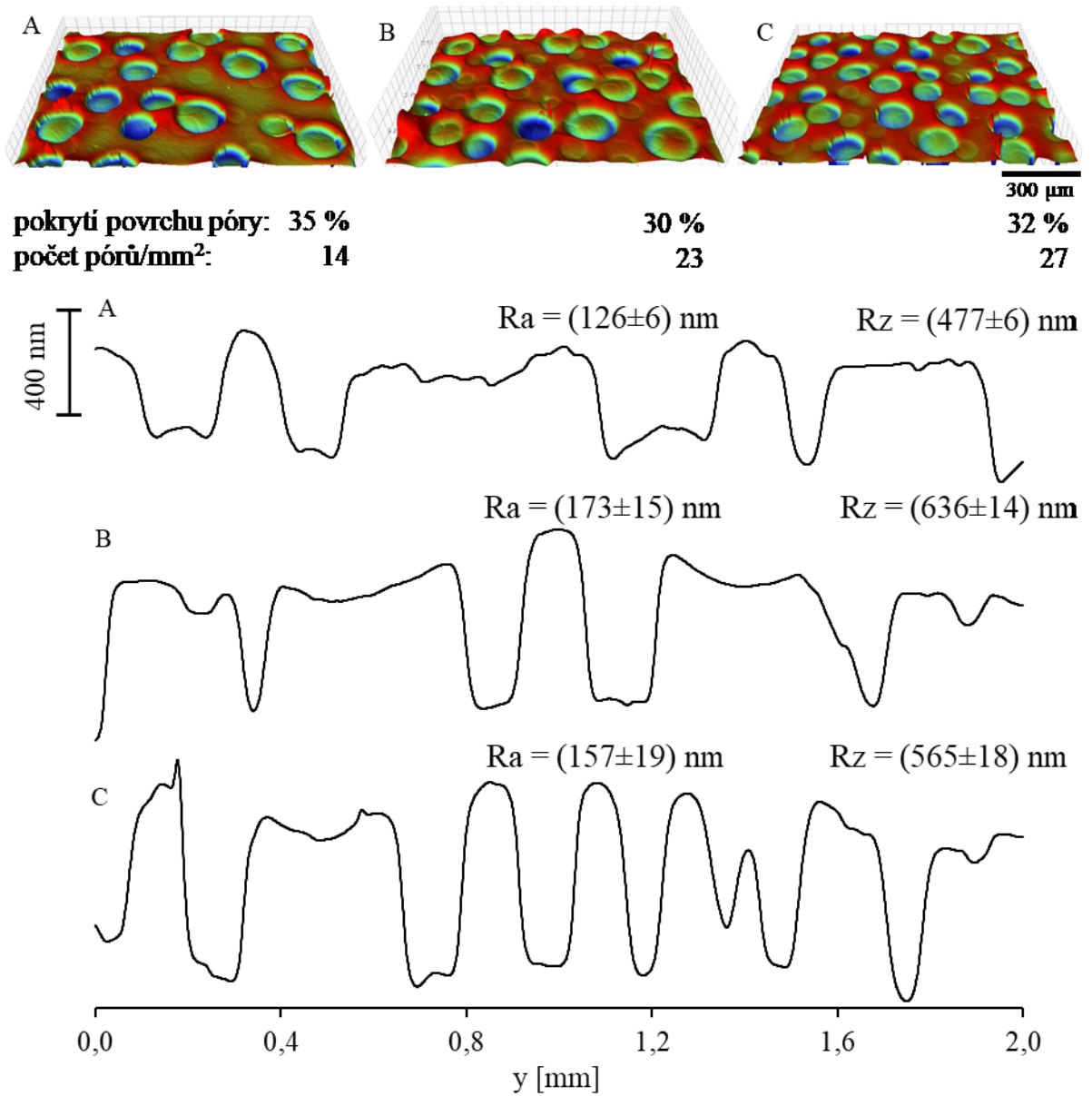
Tab. 2: Vybrané testovací postupy přípravy texturovaného povrchu fibroinových filmů ve stavu SILK II

postup	otáčky/min	počet dávek	dávkovaný objem [ $\mu$ l]	interval mezi dávkami [s]
1	2400	10	200	5
2	1500	10	200	5
3	1500	10	300	5

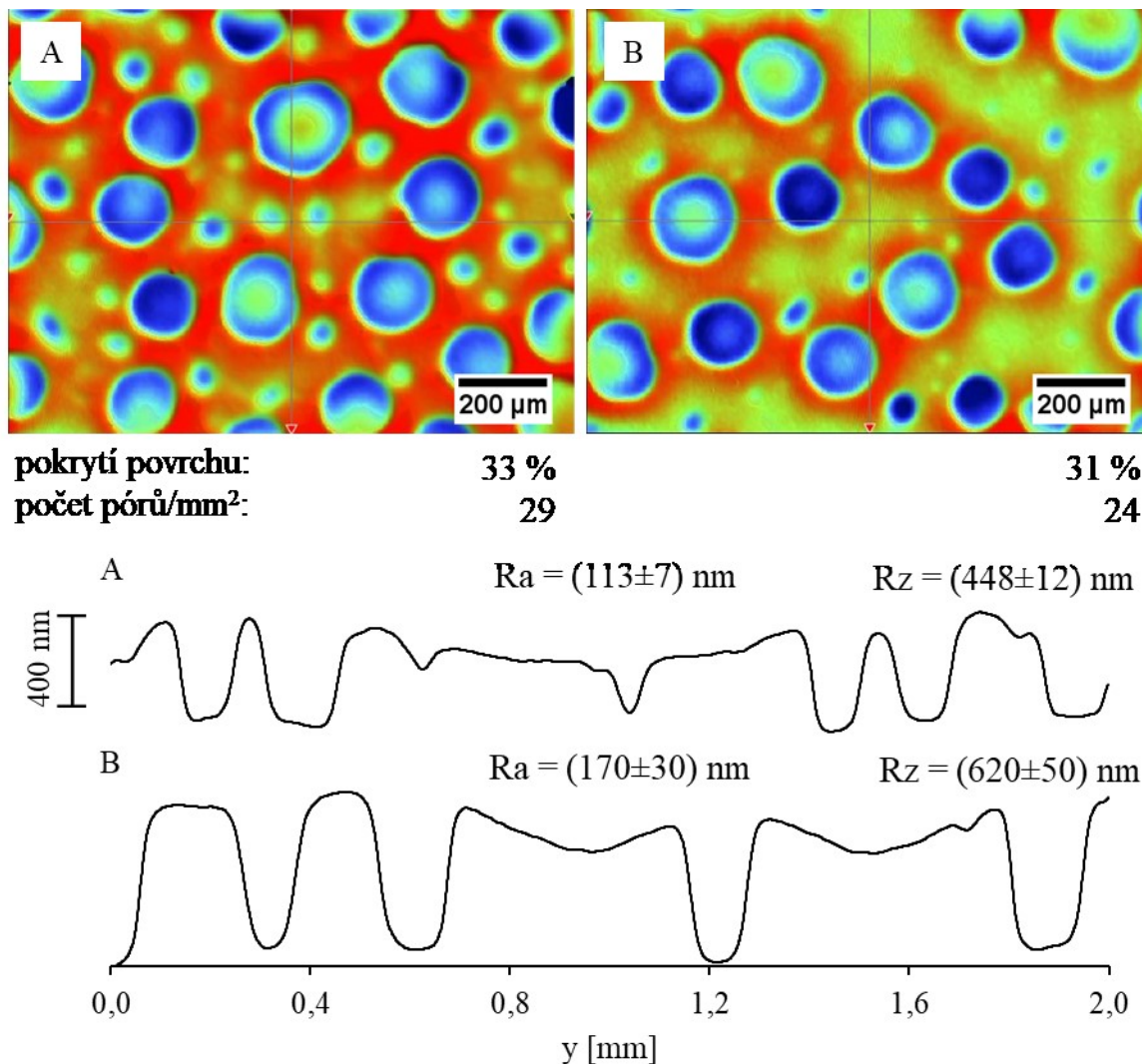
Postupem 1 byly generovány textury na filmech transformovaných v parách methanolu po dobu 24, 48 a 72 h a jejich srovnání je uvedeno na obr. 29. Na první pohled je patrný trend nárůstu počtu pórů na povrchu a současně snížení jejich průměru. Parametry drsnosti se pohybují přes maximum u vzorků transformovaných 48 h. Ve srovnání s texturami na semi-transformovaných filmech parametr Ra dosahuje hodnot nad 100 nm a parametr Rz se pohybuje kolem 500 nm. Průměrná plocha póru činí  $(14 \pm 3) \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ , čemuž odpovídá průměr jednoho póru přibližně 150  $\mu\text{m}$ .

Na obr. 30 jsou vyhodnoceny textury na filmech transformovaných v methanolu 48 h a modifikovaných postupy 2 (obr. 30 A) a 3 (obr. 30 B). V obou případech byly otáčky při modifikaci 1500/min, lišily se pouze objemem dávkované směsi při počtu dávek 10. Při zvýšení objemu dávky došlo ke snížení počtu pórů na povrchu filmu, a naopak vzrostl parametr Rz z 477 na 565 nm.



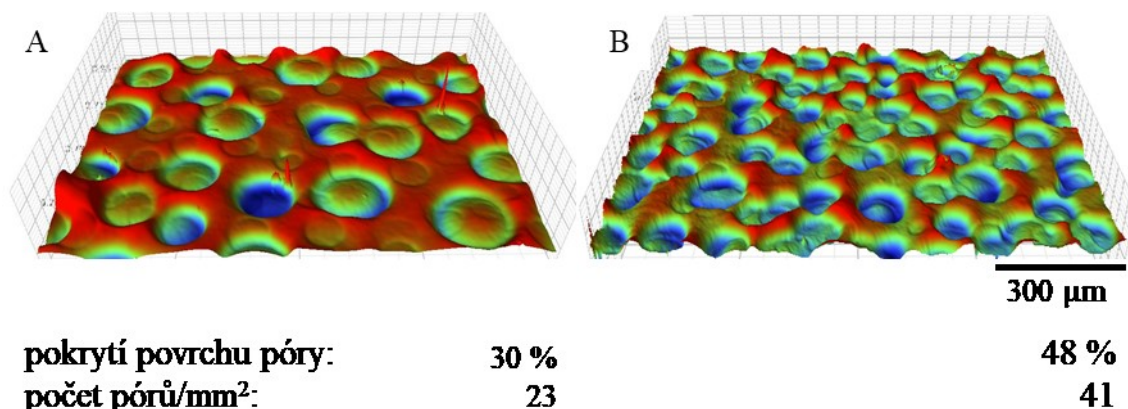


Obr. 29: Fibroinové filmy transformované v methanolu po dobu A) 24 h, B) 48 h a C) 72 h se strukturami generovanými postupem 1 (tab. 2); 3D obrázky pořízeny optickým profilometrem, profilové řezy pořízeny kontaktním profilometrem



Obr. 30: Fibroinové filmy transformované v methanolu po dobu 48 h se strukturami generovanými postupy A) 2 a B) 3 (tab. 2); 2D obrázky pořízeny optickým profilometrem, profilové řezy pořízeny kontaktním profilometrem

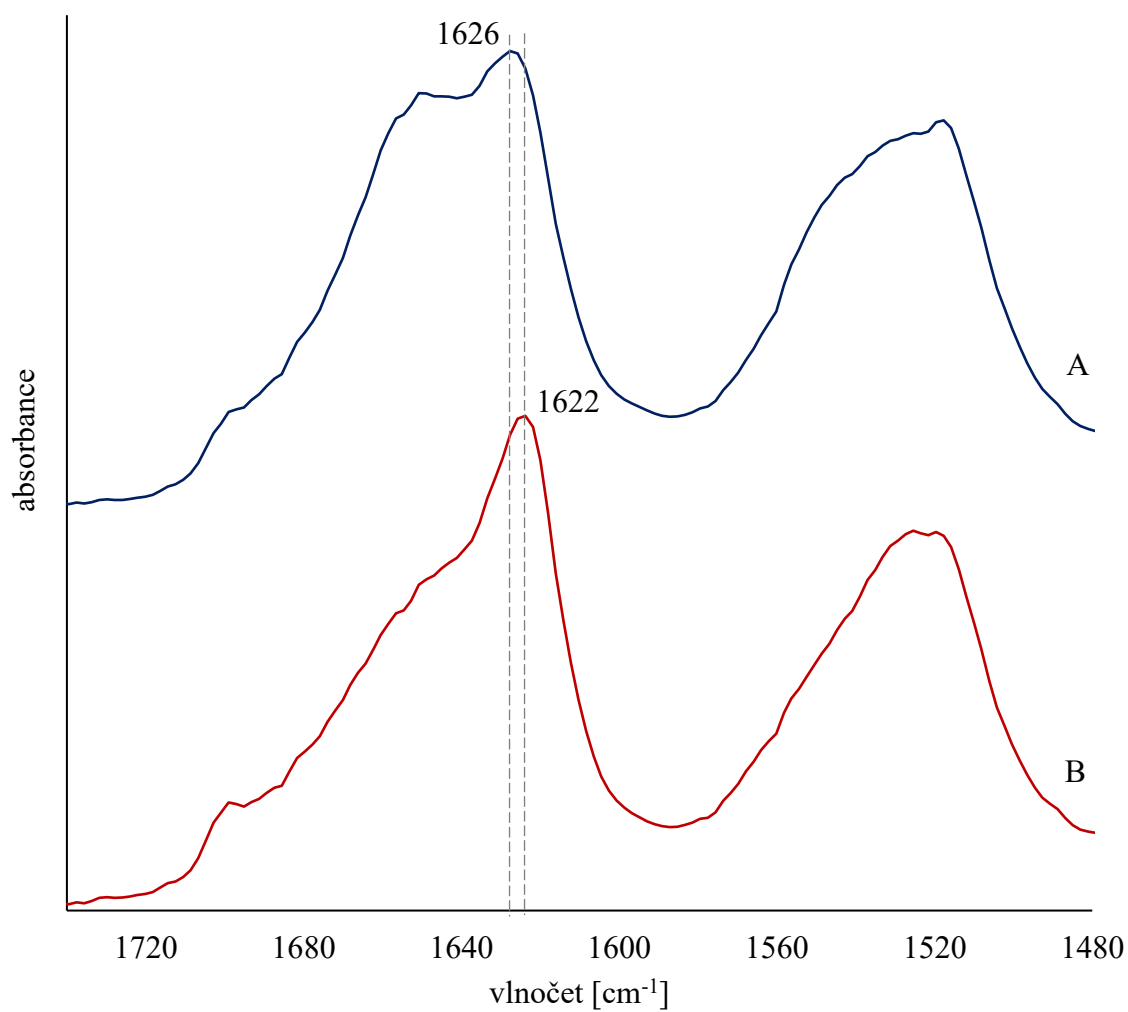
Pro ověření vlivu množství DMSO v modifikačním roztoku byla připravena směs HFIP, DMSO a vody v poměru 7:0,6:4. Modifikace touto směsí s trojnásobným množstvím DMSO byla provedena postupem 1 (tab 2.) na filmech transformovaných v methanolu po dobu 48 h. Výsledky z profilometrických měření jsou na obr. 31 B. Ve srovnání s obr. 31 A se počet pórů na mm<sup>2</sup> téměř zdvojnásobil, pokrytí povrchu póry se zvýšilo ze 30 % na 48 %.



Obr. 31: Fibroinový film transformovaný v methanolu po dobu 48 h se strukturami generovanými postupem 1 (tab. 2) A) se směsí HFIP, DMSO a vody v poměru 7:0,2:4, B) se směsí HFIP, DMSO a vody v poměru 7:0,6:4; snímky pořízeny optickým profilometrem

Z hlediska změn ve FTIR spektrech pro výše diskutované systémy se při ošetření methanolem před modifikací po 48 h spektrum již neměnilo, po modifikaci došlo k mírnému posunu maxima Amidu I na  $1622\text{ cm}^{-1}$  a výraznému snížení ramena v oblasti kolem  $1647\text{ cm}^{-1}$  (obr.32). Tento jev je opět přisuzován přítomností vody v modifikačním roztoku.

Experimenty na filmech transformovaných v methanolu opět ukazují, že sekundární struktura má dominantní vliv na typ generované textury. Ačkoliv změna procesních parametrů způsobuje drobné odchylky v parametrech drsnosti nebo v počtu pórů, hlavní rysy textury zůstávají stejné, a to v závislosti na výchozím stavu fibroinového filmu.



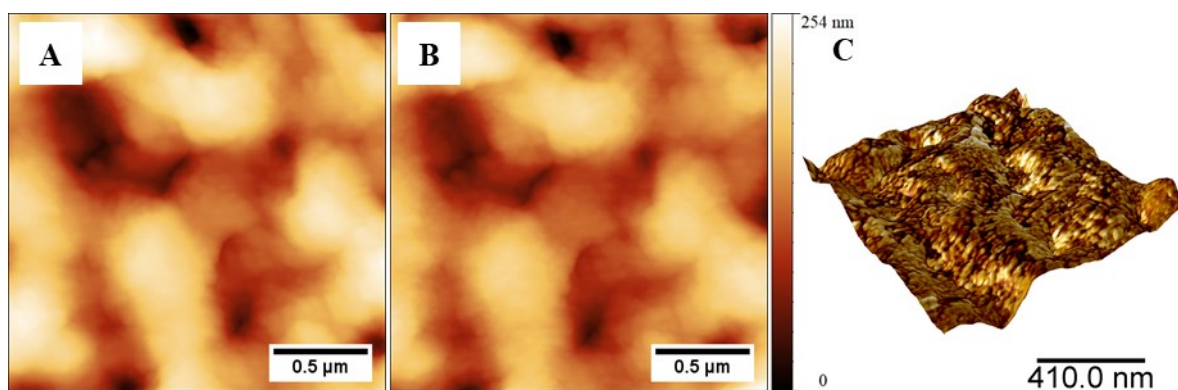
Obr. 32: FTIR spektrum fibroinového filmu sušeného v dusíkové atmosféře a transformovaného 48 h v methanolu A) před modifikací a B) po modifikaci (rozsah absorbance jednotlivých spekter 0-0,10)

## 5.7 Stabilita textur a studium interakce s buňkami

Pro dosažení maximálního stupně transformace s nejvyšším možným obsahem  $\beta$ -skládaného listu ve struktuře byly filmy vybrané na proliferační testy umístěny na 24 h do par methanolu. Tento krok byl proveden za účelem stabilizace připravených mikro- a nano-texturovaných povrchů tak, aby byly generované struktury pokud možno co nejstabilnější ve vodném prostředí kultivačního média. Nicméně na základě experimentů bylo zjištěno, že struktury na filmech z methanolu se po ošetření methanolem stále mění. Proto byly provedeny testy stálosti obou typů textur v methanolu a ve vodě, kdy na vzorky s nano-porézní texturou bylo nanášeno 1,5 ml methanolu nebo vody po dobu 1 a 5 dní a na vzorky s mikro-porézní strukturou bylo nanášeno 1,5 ml methanolu nebo vody po dobu 1 dne (jak vyplývá z níže uvedených výsledků, 5 den v tomto případě nemá smysl).

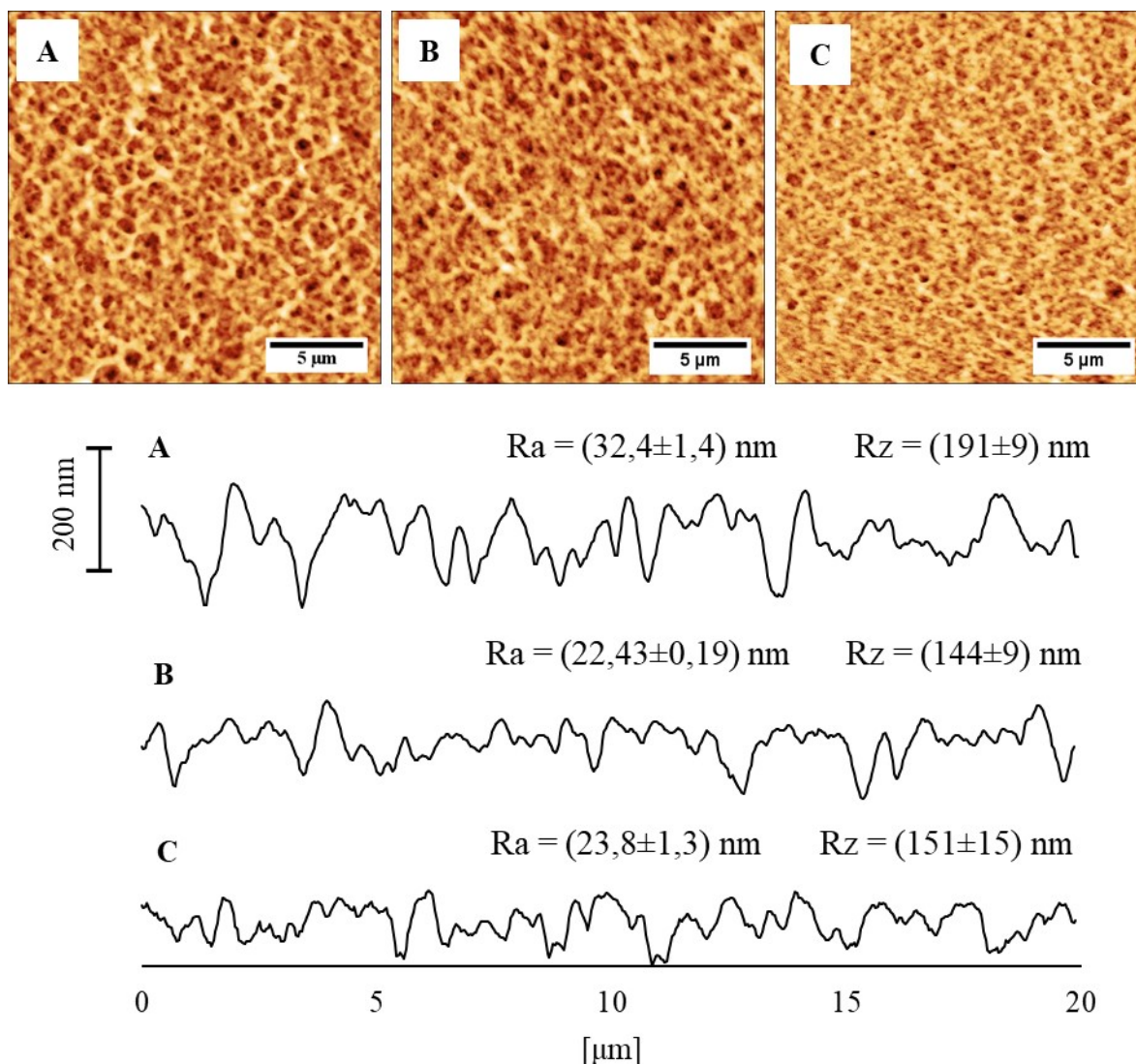
### 5.7.1 Stabilita filmů ve stavu SILK II po modifikaci

Nano-porézní textura na filmech před modifikací transformovaných v 60% vlhkosti zůstala po 24 h v parách methanolu nezměněná, což dokazují detailní snímky z AFM na obr. 33, kdy bylo měřeno totožné místo před a po působení methanolu.



Obr. 33: Detail nano-porézní textury A) před aplikací methanolu, B) po působení par methanolu 1 den C) 3D struktura s daty z fázového kontrastu AFM; snímky pořízeny pomocí AFM.

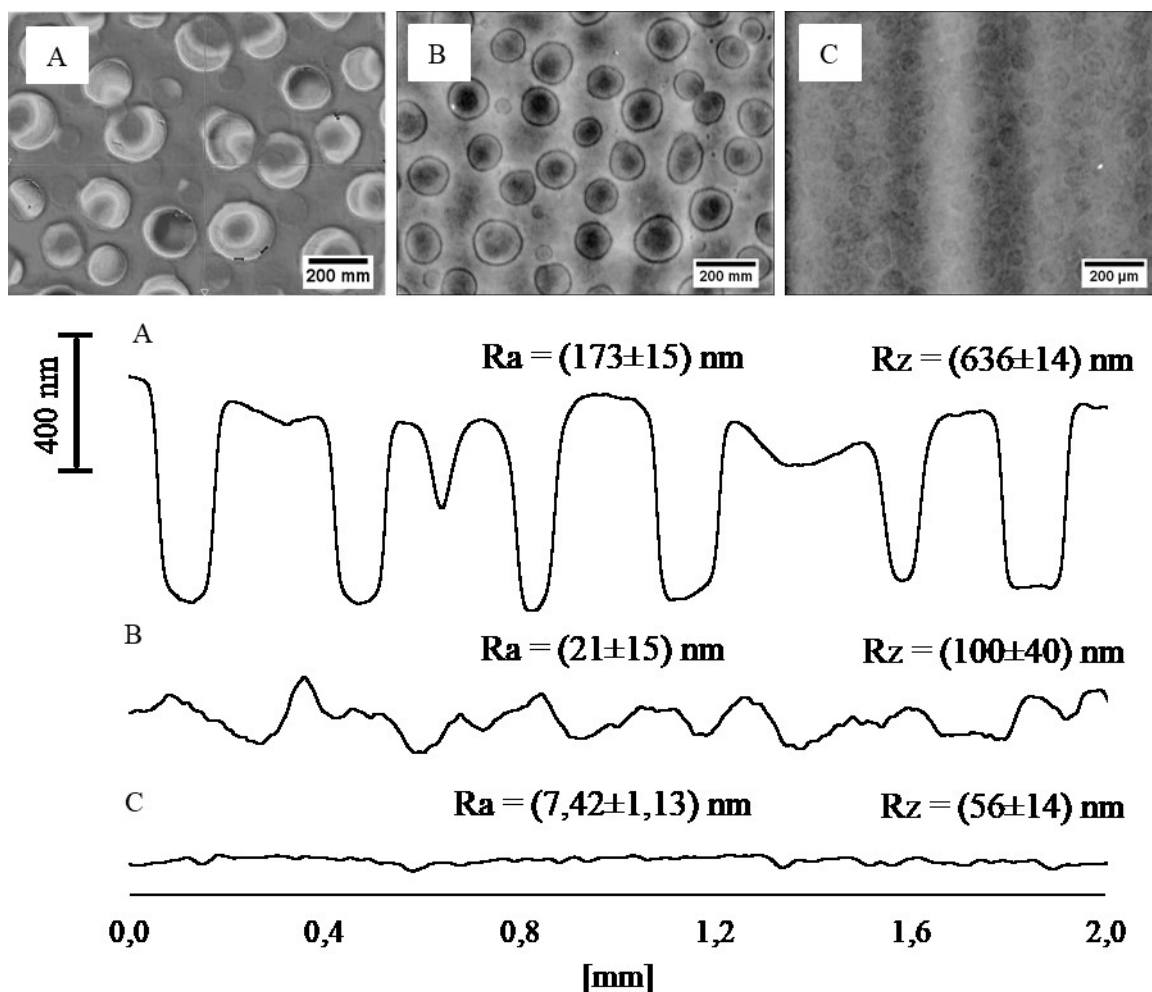
Po aplikaci methanolu přímo na vzorek po dobu 5 dní zůstává pokrytí povrchu nano-texturou zachováno, dochází však k poklesu parametrů drsnosti, Rz ze 191 na 144 nm, Ra z 32 na 22 nm. Po 5 dnech ve vodě parametry drsnosti klesají podobně, jako po ošetření methanolem (obr. 34).



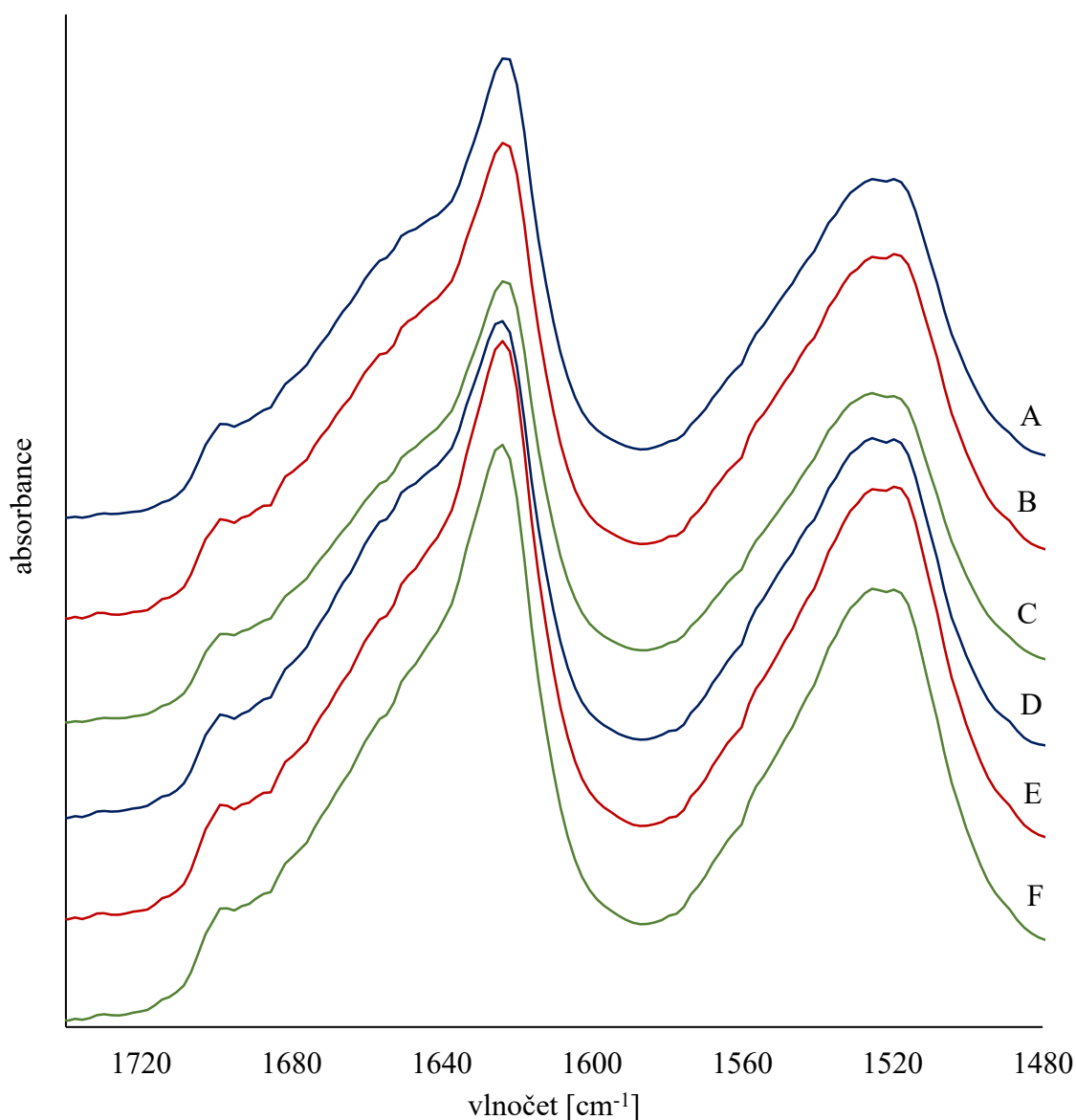
Obr. 34: Stabilita nano-porézní textury generované na semi-transformovaných filmech postupem 3 (tab. 1): A) srovnávací vzorek, B) po působení methanolu 5 dní C) po působení vody 5 dní; snímky pořízeny pomocí AFM

U mikro-porézních textur došlo k výrazným topografickým změnám už po 1 dni po nanesení methanolu i vody. Ošetření methanolem vyvolává pokles parametru  $R_z$  z 636 na 100 nm, na optickém profilometru však ještě byly na některých místech obtížně detekovatelné obrysy původní textury (obr. 35 B). Po 1 dni ve vodě textura téměř zmizela (35 C) a parametr  $R_z$  klesl na 56 nm. Botnání povrchu ve vodném prostředí se dá očekávat z důvodu schopnosti fibroinu adsorbovat vodu. Stejně tak je v literatuře vysvětlena vyšší míra adsorpce vody na filmech ošetřených před modifikací methanolem [71]. U těchto filmů však vyvolává podobné účinky i působení methanolu. Tento jev by vysvětlovala dodatečná stabilizace, změny v sekundární struktuře a tím vyvolané změny topografické. Z FTIR měření provedených

v jednotlivých krocích testu stability však plyne, že ke změně sekundární struktury fibroinu po modifikaci již nedochází (obr. 36).



Obr. 35: Stabilita mikro-porézní textury generované na filmech ve stavu SILK II postupem 1 (tab. 2): A) srovnávací vzorek, B) po působení methanolu 1 den C) po působení vody 1 den; snímky pořízeny pomocí optického profilometru, profily pomocí kontaktního profilometru



Obr. 36: FTIR spektra fibroinových filmů před modifikaci transformovaných při RH 60 % A) po modifikaci, B) po ošetření methanolem, C) po ošetření vodou a transformovaných parami methanolu D) po modifikaci, E) po ošetření methanolem, F) po ošetření vodou (rozsah absorbance jednotlivých spekter 0-0,10)

### 5.7.2 Buněčná proliferace na strukturalizovaných filmech

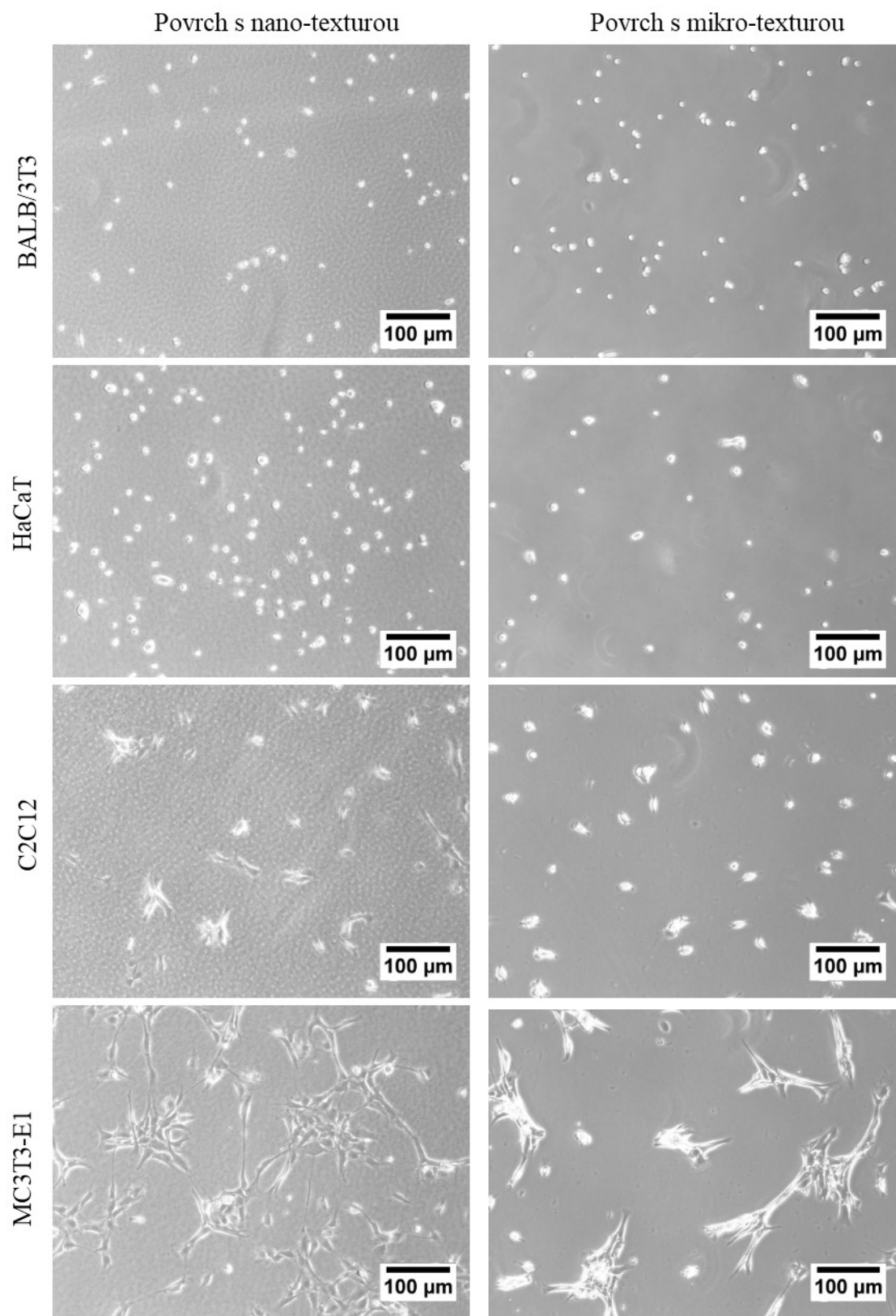
Buněčná proliferace byla provedena na dvou výše popsáných typech textur. Nano-porézní struktura byla připravena postupem 3 uvedeným v tabulce 1, mikro-porézní textura byla připravena postupem 1 v tabulce 2. Filmy byly sterilizovány UV zářením, aby nedocházelo ke změnám struktur před nanesením buněk. Proliferace buněk byla sledována po dobu 4 dní.



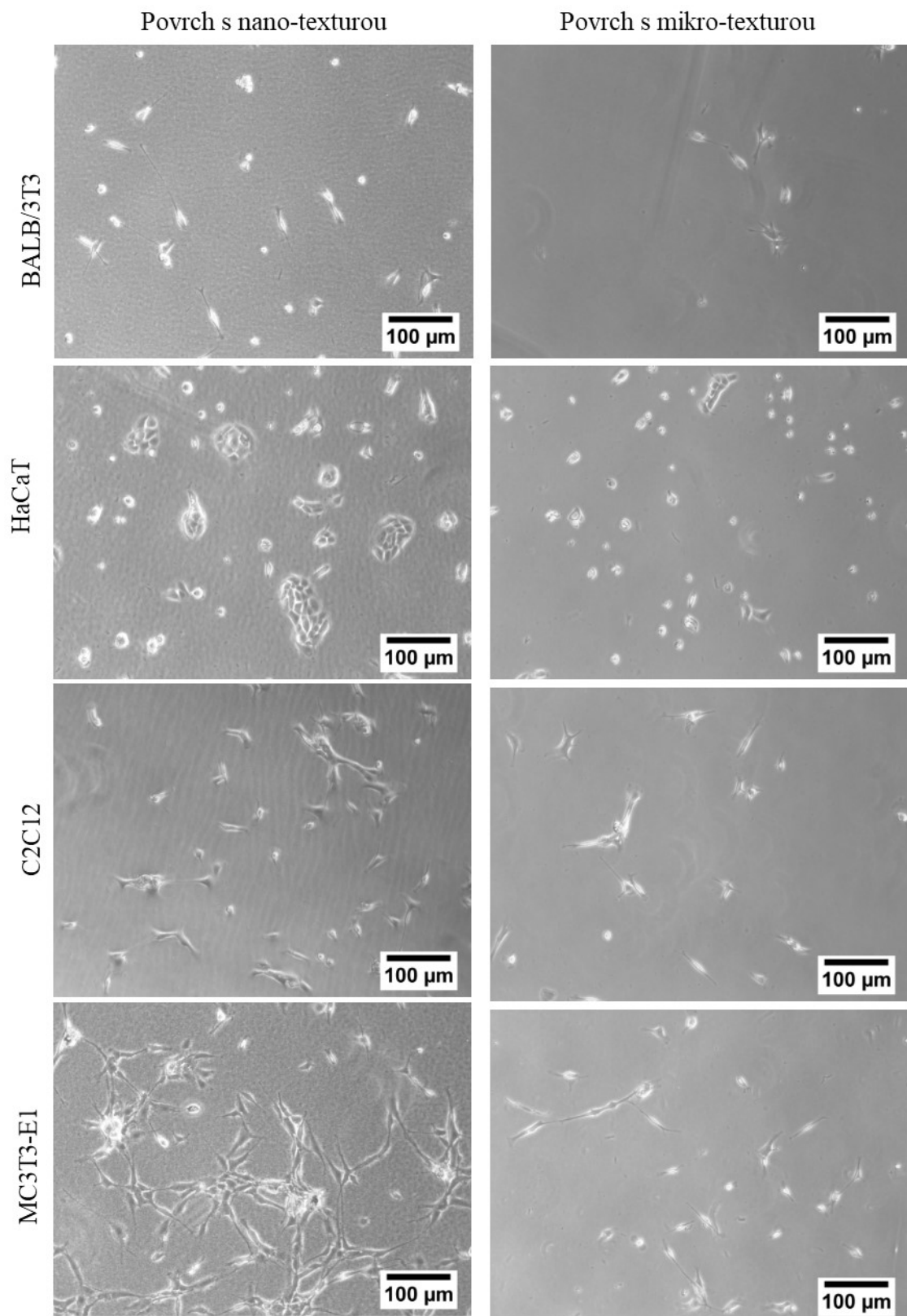
Nano-póry ve vodném prostředí po tuto dobu zůstávají neměnné. U mikro-pórů však dochází ke změnám textury, proto je posuzován vliv této textury na adhezi buněk, v průběhu proliferačního testu je film považován za rovný.

Růst buněk na vybraných texturách byl pozorován pomocí optického mikroskopu. Na obr. 37 jsou snímky pořízené 1. den proliferace, na obr. 38 jsou snímky pořízené 4. den proliferace. Nejvýraznější rozdíl je pozorovatelný u osteoblastů (MC3T3-E1), které dle literatury preferují k adhezi a proliferaci drsnější povrchy [94], a dále u keratinocytů (HaCaT). Fibroblasty (BALB 3T3) vykazují podobné chování na obou typech povrchů, je to z toho důvodu, že fibroblasty mají nedostatečnou adhezi k drsným povrchům [95]. Myoblasty (C2C12) preferují při proliferaci kombinaci nízké povrchové drsnosti a vysoké tuhosti substrátu, proto je na nano-porézní textuře srovnatelná s druhým typem povrchu [96].

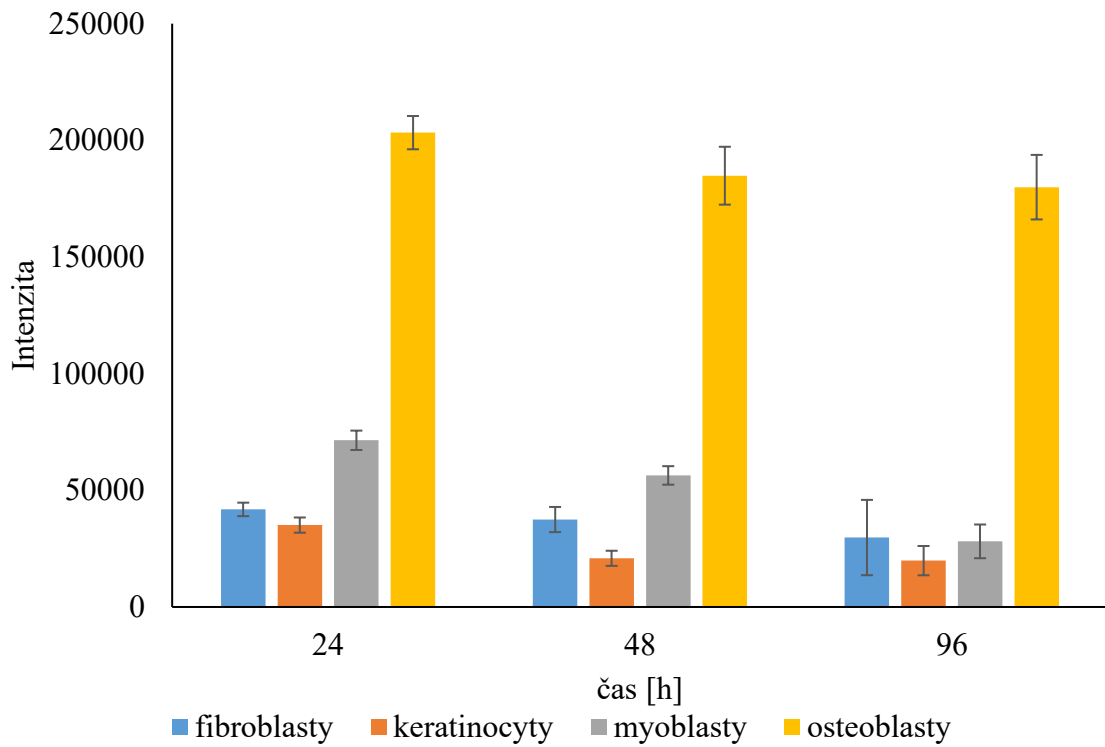
Proliferační testy byly vyhodnoceny na základě životnosti buněk detekované činidlem alamarBlue. Na obr. 39 je znázorněna proliferace na nano-texturovaných površích zaznamenaná v intervalech 24, 48 a 96 h. Zjištěné výsledky odpovídají poznatkům z literatury [94; 95; 96]. Osteoblasty vykazují dobrou adhezi k povrchu, která je výrazně vyšší ve srovnání s výsledky proliferace na mikro-texturovaných površích na obr. 40. Keratinocyty na nano-porézních strukturách sice po 4. dni proliferace vytvářely typické buněčné útvary (obr. 37), ale na základě vyhodnocení pomocí alamarBlue nebyla adheze tak výrazná, jako pro osteoblasty. Přesto však byla vyšší, než u mikro-porézní textury. V případě myoblastů a fibroblastů je také možné pozorovat rozdíly v chování na různých typech povrchů, avšak nedá se říct, že by nano-texturovaný povrch výrazně zlepšoval jejich adhezi a následnou proliferaci.



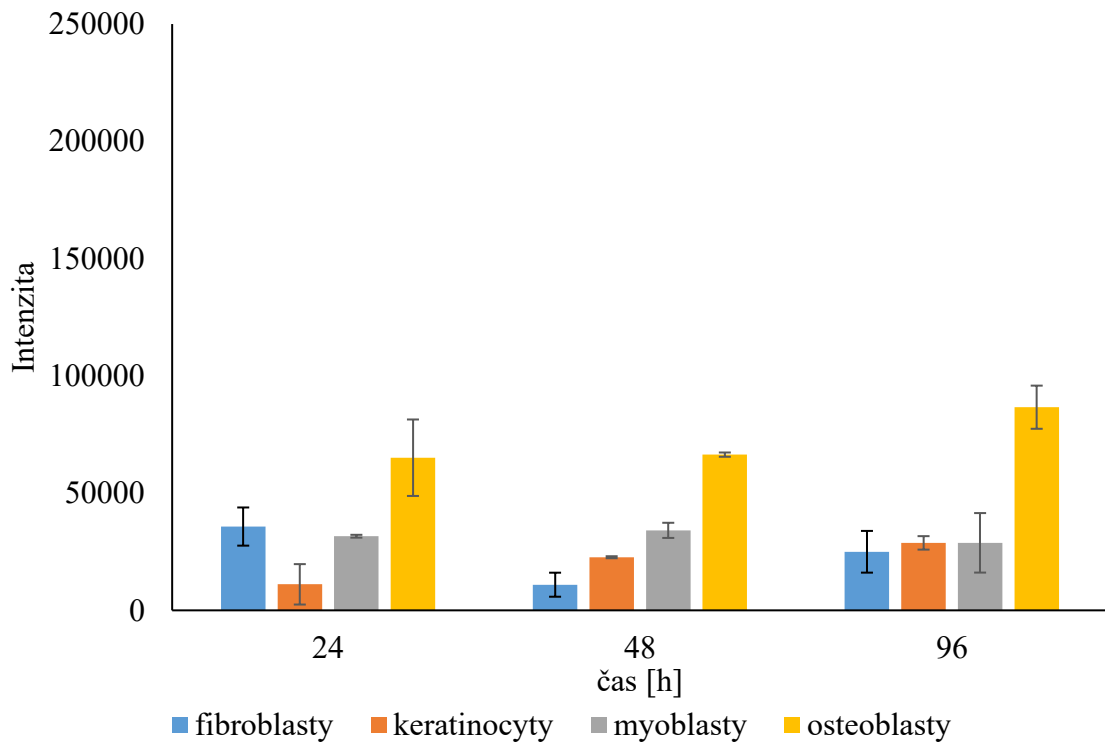
Obr. 37: Snímky z optického mikroskopu pořízené 1. den proliferace na nano- a mikro-texturovaných površích



Obr. 38: Snímky z optického mikroskopu pořízené 4. den proliferace na nano- a mikro-texturovaných površích



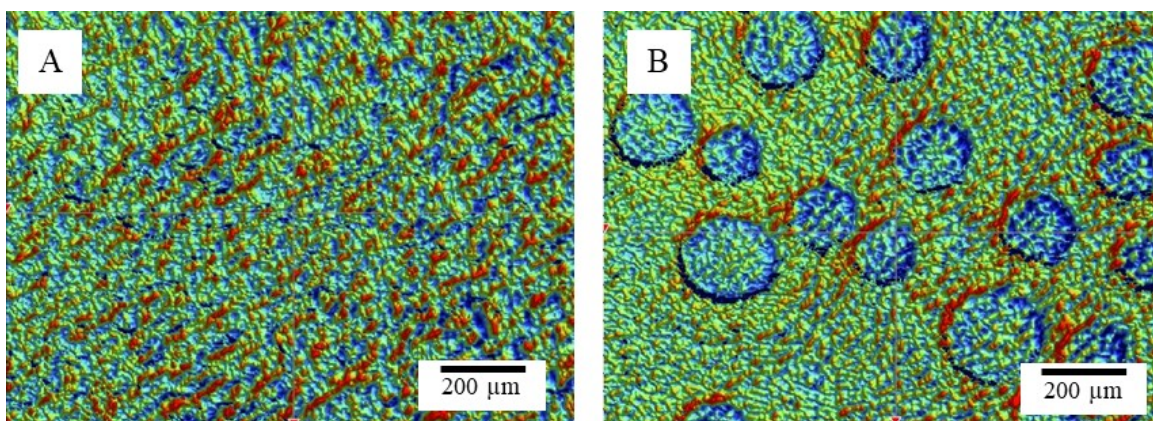
Obr. 39: Životnost buněk na nano-texturovaném povrchu vyjádřená intenzitou fluorescence činidla alamarBlue



Obr. 40: Životnost buněk na mikro-texturovaném povrchu vyjádřená intenzitou fluorescence činidla alamarBlue

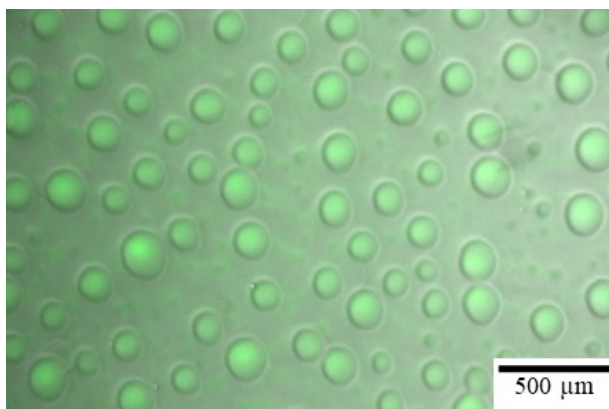
## 5.8 Příprava povrchů s kombinovanou formou mikro- a nano-textur a selektivně značených povrchů

Použitá metoda umožňuje přípravu povrchů s kombinovanou texturou, kdy na modifikovaný film s nano-texturou (obr. 41 A) bylo naneseno množství methanolu potřebné k pokrytí povrchu, které na něm bylo ponecháno do odpaření. Po tomto kroku následovala další modifikace, po které bylo možné na nano-struktuře pozorovat vytvoření kruhových mikro prohlubní (obr. 41 B).



Obr. 41: Filmy s kombinovanou strukturou: A) nano-textura po 1. modifikaci B) kombinovaná textura po 2. modifikaci

Pozornost v budoucím výzkumu bude věnována selektivnímu značení fibroinových povrchů RGD peptidem. Na obr. 42 je ukázka selektivně značeného fibroinového filmu metodou dávkování směsí rozpouštědel s obsahem fluoresceinu, který může být při užití příslušného linkeru nahrazen RGD peptidem. Takto upravené povrchy by mohly sloužit k lokalizované buněčné proliferaci.



Obr. 42: Fibroinové filmy s vytvořenou mikro-texturou selektivně značené fluoresceinem

## ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byly studovány možnosti přípravy texturovaných materiálů na bázi hedvábného proteinu a jejich vliv na chování kultivovaných buněk. Specifické povrchové textury v proteinových filmech byly generovány pomocí metody sekvenovaného dávkování směsi rozpouštědel. Z dřívějších studií bylo zjištěno, že charakter vznikajících povrchových struktur je do jisté míry ovlivněn nastavením procesních parametrů modifikace jako je rychlost rotace vzorků, počet dávek, objem jednotlivých dávek, prodleva mezi dávkami a vlastním složením modifikačních roztoků. Z experimentálních výsledků této práce vyplynulo, že kromě procesních parametrů a složení směsného roztoku hraje klíčovou roli sekundární struktura fibroinu. V závislosti na stávající konformaci fibroinu v modifikovaném filmu vznikají rozdílné povrchové mikro- a nano-textury spojené s rozdílnými mechanismy jejich vzniku.

U částečně transformovaných filmů dochází k velmi malému posunu ve FTIR spektru, což indikuje přítomnost malého podílu krystalických struktur tvořených fibroinem v konformaci  $\beta$ -skládaného listu. Toto malé množství však stačí ke stabilizaci a zpevnění filmu během modifikace natolik, že nedochází ke smývání celého filmu, vyjma amorfního podílu. To vysvětluje také výraznější posun ve FTIR spektru po modifikaci ve srovnání s modifikovanými filmy s výchozí konformací SILK II. Filmy transformované v methanolu v SILK II konformaci obsahují podíl krystalické složky natolik vysoký, že již nedochází k vymývání amorfního podílu, ale k deformaci povrchu, kdy povrchová vrstva filmu je částečně rozpuštěna působením směsi HFIP a vody a následným vtlačení kapiček DMSO vznikají povrchové útvary, které v některých případech svou velikostí a nepravidelným tvarem odpovídají koalescenci kapek DMSO na povrchu.

Z proliferačních testů plyne, že některé typy buněk preferují nano-texturovaný povrch s vyšší drsností ve srovnání s povrchy s plošně většími útvary kruhového průřezu. Tento typ povrchů bude v budoucnu studován zejména z hlediska stabilizace. Dále budou studovány možnosti přípravy hierarchicky strukturovaných materiálů modifikovaných pomocí dalších typů proteinů a fluorescenčních značek.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] C. Vepari, D. Kaplan, Silk as a biomaterial, *Progress in Polymer Science*, vol. 32 (2007) 991-1007.
- [2] D. Naskar, R. Barua, A. Ghosh, S. Kundu, Introduction to silk biomaterials, *Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, (2014) 3-40.
- [3] F. Vollrath, D. Knight, Liquid crystalline spinning of spider silk, *Nature*, vol. 410 (2001) 541-548.
- [4] H. Jin, D. Kaplan, Mechanism of silk processing in insects and spiders, *Nature*, vol. 424 (2003) 1057-1061.
- [5] T. Asakura, K. Umemura, Y. Nakazawa, H. Hirose, J. Higham, D. Knight, Some Observations on the Structure and Function of the Spinning Apparatus in the Silkworm *Bombyx mori*, *Biomacromolecules*, vol. 8 (2007) 175-181.
- [6] M. Andersson, J. Johansson, A. Rising, Silk Spinning in Silkworms and Spiders, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17 (2016) 1-14.
- [7] C. Foo, E. Bini, J. Hensman, D. Knight, R. Lewis, D. Kaplan, Role of pH and charge on silk protein assembly in insects and spiders, *Applied Physics A*, vol. 82 (2006) 223-233.
- [8] L. Koh, Y. Cheng, C. Teng, Y. Khin, X. Loh, S. Tee, M. Low, E. Ye, H. Yu, Y. Zhang, M. Han, Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials, *Progress in Polymer Science*, vol. 46 (2015) 86-110.
- [9] C. Zhou, F. Confalonieri, M. Jacquet, R. Perasso, Z. Li, J. Janin, Silk fibroin: Structural implications of a remarkable amino acid sequence, *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, vol. 44 (2001) 119-122.
- [10] T. Asakura, K. Okushita, M. Williamson, Analysis of the Structure of *Bombyx mori* Silk Fibroin by NMR, *Macromolecules*, vol. 48 (2015) 2345-2357.
- [11] K. Sprague, *Bombyx mori* silk proteins. Characterization of large polypeptides, *Biochemistry*, vol. 14 (2002) 925-931.

- [12] E. Johnston, Y. Miyagi, J. Chuah, K. Numata, M. Serban, Interplay between Silk Fibroin's Structure and Its Adhesive Properties, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 4 (2018) 2815-2824.
- [13] K. Tanaka, N. Kajiyama, K. Ishikura, S. Waga, A. Kikuchi, K. Ohtomo, T. Takagi, S. 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*, vol. 1432 (1999) 92-103.
- [14] S. Inoue, K. Tanaka, F. Arisaka, S. Kimura, K. Ohtomo, S. Mizuno, Silk Fibroin of *Bombyx mori* Is Secreted, Assembling a High Molecular Mass Elementary Unit Consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6: 6, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275 (2000) 40517-40528.
- [15] Y. Shen, M. Johnson, D. Martin, Microstructural Characterization of *Bombyx mori* Silk Fibers, *Macromolecules*, vol. 31 (1998) 8857-8864.
- [16] C. Zhou, Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene, *Nucleic Acids Research*, vol. 28 (2000) 2413-2419.
- [17] D. Wilson, R. Valluzzi, D. Kaplan, Conformational Transitions in Model Silk Peptides, *Biophysical Journal*, vol. 78 (2000) 2690-2701.
- [18] R. Marsh, R. Corey, L. Pauling, An investigation of the structure of silk fibroin, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 16 (1955) 1-34.
- [19] Y. Takahashi, M. Gehoh, K. Yuzuriha, Structure refinement and diffuse streak scattering of silk (*Bombyx mori*), *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 24 (1999) 127-138.
- [20] D. Kaplan, Fibrous proteins—silk as a model system, *Polymer Degradation and Stability*, vol. 59 (1998) 25-32.
- [21] E. Bini, D. Knight, D. Kaplan, Mapping Domain Structures in Silks from Insects and Spiders Related to Protein Assembly, *Journal of Molecular Biology*, vol. 335 (2004) 27-40.



- [22] R. Rajkhowa, X. Hu, T. Tsuzuki, D. Kaplan, X. Wang, Structure and Biodegradation Mechanism of Milled Bombyx mori Silk Particles, *Biomacromolecules*, vol. 13 (2012) 2503-2512.
- [23] V. Volkov, A. Ferreira, A. Cavaco-Paulo, On the Routines of Wild-Type Silk Fibroin Processing Toward Silk-Inspired Materials: A Review, *Macromolecular Materials and Engineering*, vol. 300 (2015) 1199-1216.
- [24] E. Sashina, A. Bochek, N. Novoselov, D. Kirichenko, Structure and solubility of natural silk fibroin, *Russian Journal of Applied Chemistry*, vol. 79 (2006) 869-876.
- [25] N. Jaramillo-Quiceno, C. Álvarez-López, A. Restrepo-Osorio, Structural and thermal properties of silk fibroin films obtained from cocoon and waste silk fibers as raw materials, *Procedia Engineering*, vol. 200 (2017) 384-388.
- [26] K. Cao, Y. Liu, S. Ramakrishna, Recent Developments in Regenerated Silk Fiber, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 17 (2017) 8667-8682.
- [27] G. Cheng, X. Wang, S. Tao, J. Xia, S. Xu, Differences in regenerated silk fibroin prepared with different solvent systems: From structures to conformational changes, *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 132 (2015) n/a-n/a.
- [28] J. Nam, Y. Park, Morphology of regenerated silk fibroin: Effects of freezing temperature, alcohol addition, and molecular weight, *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 81 (2001) 3008-3021.
- [29] Z. Zhou, S. Zhang, Y. Cao, B. Marelli, X. Xia, T. Tao, Engineering the Future of Silk Materials through Advanced Manufacturing, *Advanced Materials*, vol. 30 (2018) 1-26.
- [30] H. Cho, C. Ki, H. Oh, K. Lee, I. Um, Molecular weight distribution and solution properties of silk fibroins with different dissolution conditions, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 51 (2012) 336-341.
- [31] T. Asakura, A. Kuzuhara, R. Tabeta, H. Saito, Conformational characterization of Bombyx mori silk fibroin in the solid state by high-frequency carbon-13 cross polarization-magic angle spinning NMR, x-ray diffraction, and infrared spectroscopy, *Macromolecules*, vol. 18 (1985) 1841-1845.

- [32] Y. Cao, B. Wang, Biodegradation of Silk Biomaterials, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 10 (2009) 1514-1524.
- [33] D. Rockwood, R. Preda, T. Yücel, X. Wang, M. Lovett, D. Kaplan, Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin, *Nature Protocols*, vol. 6 (2011) 1612-1631.
- [34] X. Hu, K. Shmelev, L. Sun, E. Gil, S. Park, P. Cebe, D. Kaplan, Regulation of Silk Material Structure by Temperature-Controlled Water Vapor Annealing, *Biomacromolecules*, vol. 12 (2011) 1-11.
- [35] D. Ebrahimi, O. Tokareva, N. Rim, J. Wong, D. Kaplan, M. Buehler, Silk—Its Mysteries, How It Is Made, and How It Is Used, *ACS BIOMATERIALS SCIENCE & ENGINEERING*, vol. 1 (2015) 864-876.
- [36] S. Ling, Z. Qin, C. Li, W. Huang, D. Kaplan, M. Buehler, Polymorphic regenerated silk fibers assembled through bioinspired spinning, *Nature Communications*, vol. 8 (2017) 1-12.
- [37] X. Hu, D. Kaplan, P. Cebe, Dynamic Protein–Water Relationships during  $\beta$ -Sheet Formation, *Macromolecules*, vol. 41 (2008) 3939-3948.
- [38] A. Barth, C. Zscherp, What vibrations tell about proteins, *Quarterly Reviews of Biophysics*, vol. 35 (2002) 369-430.
- [39] P. Monti, G. Freddi, A. Bertoluzza, N. Kasai, M. Tsukada, Raman Spectroscopic Studies of Silk Fibroin from *Bombyx Mori*, *Journal of Raman Spectroscopy*, 29 (1998) 297-304.
- [40] P. Laity, S. Gilks, C. Holland, Rheological behaviour of native silk feedstocks, *Polymer*, vol. 67 (2015) 28-39.
- [41] H. Jin, S. Fridrikh, G. Rutledge, D. Kaplan, Electrospinning *Bombyx mori* Silk with Poly(ethylene oxide), *Biomacromolecules*, vol. 3 (2002) 1233-1239.
- [42] X. Chen, Z. Shao, D. Knight, F. Vollrath, Conformation transition kinetics of *Bombyx mori* silk protein, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 68 (2007) 223-231.

- [43] Q. Lu, B. Zhang, M. Li, B. Zuo, D. Kaplan, Y. Huang, H. Zhu, Degradation Mechanism and Control of Silk Fibroin, *Biomacromolecules*, vol. 12 (2011) 1080-1086.
- [44] G. Shen, X. Hu, G. Guan, L. Wang, M. Matsusaki, Surface Modification and Characterisation of Silk Fibroin Fabric Produced by the Layer-by-Layer Self-Assembly of Multilayer Alginate/Regenerated Silk Fibroin, *PLOS ONE*, vol. 10 (2015) 1-19.
- [45] H. Jin, J. Park, V. Karageorgiou, U. Kim, R. Valluzzi, P. Cebe, D. Kaplan, Water-Stable Silk Films with Reduced  $\beta$ -Sheet Content, *Advanced Functional Materials*, vol. 15 (2005) 1241-1247.
- [46] C. Holland, K. Numata, J. Rnjak-Kovacina, F. Seib, The Biomedical Use of Silk: Past, Present, Future, *Advanced Healthcare Materials*, vol. 8 (2019).
- [47] G. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, D. Kaplan, Silk-based biomaterials, *Biomaterials*, vol. 24 (2003) 401-416.
- [48] Y. Wang, F. Wang, S. Xu, R. Wang, W. Chen, K. Hou, C. Tian, F. Wang, L. Yu, Z. Lu, P. Zhao, Q. Xia, Genetically engineered bi-functional silk material with improved cell proliferation and anti-inflammatory activity for medical application, *Acta Biomaterialia*, vol. 86 (2019) 148-157.
- [49] S. Sofia, M. McCarthy, G. Gronowicz, D. Kaplan, Functionalized silk-based biomaterials for bone formation, *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH*, 54 (2001) 139-148.
- [50] J. Chen, H. Venkatesan, J. Hu, Chemically Modified Silk Proteins, *Advanced Engineering Materials*, vol. 20 (2018).
- [51] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond, *Biomaterials*, vol. 24 (2003) 4385-4415.
- [52] S. Wohlrab, S. Müller, A. Schmidt, S. Neubauer, H. Kessler, A. Leal-Egaña, T. Scheibel, Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins, *Biomaterials*, vol. 33 (2012) 6650-6659.

- [53] E. Ruoslahti, RGD AND OTHER RECOGNITION SEQUENCES FOR INTEGRINS, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 12 (1996) 697-715.
- [54] Q. Wang, F. Tu, Y. Liu, Y. Zhang, H. Li, Z. Kang, Y. Yin, J. Wang, The effect of hirudin modification of silk fibroin on cell growth and antithrombogenicity, *Materials Science and Engineering: C*, vol. 75 (2017) 237-246.
- [55] W. Sun, T. Incitti, C. Migliaresi, A. Quattrone, S. Casarosa, A. Motta, Viability and neuronal differentiation of neural stem cells encapsulated in silk fibroin hydrogel functionalized with an IKVAV peptide, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 11 (2017) 1532-1541.
- [56] A. Thurber, F. Omenetto, D. Kaplan, In vivo bioresponses to silk proteins, *Biomaterials*, vol. 71 (2015) 145-157.
- [57] L. Meinel, S. Hofmann, V. Karageorgiou, C. Kirker-Head, J. McCool, G. Gronowicz, L. Zichner, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, D. Kaplan, The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo, *Biomaterials*, vol. 26 (2005) 147-155.
- [58] Y. Hu, Q. Zhang, R. You, L. Wang, M. Li, The Relationship between Secondary Structure and Biodegradation Behavior of Silk Fibroin Scaffolds, *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. 2012 (2012) 1-5.
- [59] R. Horan, K. Antle, A. Collette, Y. Wang, J. Huang, J. Moreau, V. Volloch, D. Kaplan, G. Altman, In vitro degradation of silk fibroin, *Biomaterials*, vol. 26 (2005) 3385-3393.
- [60] J. Wang, Y. Wei, H. Yi, Z. Liu, D. Sun, H. Zhao, Cytocompatibility of a silk fibroin tubular scaffold, *Materials Science and Engineering: C*, vol. 34 (2014) 429-436.
- [61] M. Jewell, B. Bengtson, E. Mortarino, W. Daunch, The development of SERI (R) Surgical Scaffold, an engineered biological scaffold, *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1358 (2015) 44-55.
- [62] K. Thomas, L. Bradshaw, T. Sach, J. Batchelor, S. Lawton, E. Harrison, R. Haines, A. Ahmed, H. Williams, Silk garments plus standard care compared with standard care for treating eczema in children: A randomised, controlled, observer-blind, pragmatic trial (CLOTHES Trial), *PLOS Medicine*, vol. 14 (2017) 1-23.

- [63] G. Stinco, F. Piccirillo, F. Valent, A Randomized Double-Blind Study to Investigate the Clinical Efficacy of Adding a Non-Migrating Antimicrobial to a Special Silk Fabric in the Treatment of Atopic Dermatitis, *Dermatology*, vol. 217 (2008) 191-195.
- [64] W. Zhang, L. Chen, J. Chen, L. Wang, X. Gui, J. Ran, G. Xu, H. Zhao, M. Zeng, J. Ji, L. Qian, J. Zhou, H. Ouyang, X. Zou, Silk Fibroin Biomaterial Shows Safe and Effective Wound Healing in Animal Models and a Randomized Controlled Clinical Trial, *Advanced Healthcare Materials*, vol. 6 (2017).
- [65] J. Lee, D. Kim, H. Park, J. Jeong, Y. Yeon, V. Kumar, S. Bae, J. Lee, B. Moon, C. Park, A prospective cohort study of the silk fibroin patch in chronic tympanic membrane perforation, *The Laryngoscope*, vol. 126 (2016) 2798-2803.
- [66] S. Bai, W. Zhang, Q. Lu, Q. Ma, D. Kaplan, H. Zhu, Silk nanofiber hydrogels with tunable modulus to regulate nerve stem cell fate, *Journal of Materials Chemistry B Materials for biology and medicine*, 2 (2014) 6590–6600.
- [67] S. Hofmann, C. Wong Po Foo, F. Rossetti, M. Textor, G. Vunjak-Novakovic, D. Kaplan, H. Merkle, L. Meinel, Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery, *Journal of Controlled Release*, vol. 111 (2006) 219-227.
- [68] Q. Lv, K. Hu, Q. Feng, F. Cui, C. Cao, Preparation and characterization of PLA/fibroin composite and culture of HepG2 (human hepatocellular liver carcinoma cell line) cells, *Composites Science and Technology*, vol. 67 (2007) 3023-3030.
- [69] L. Du, W. Li, Z. Jiang, L. Wang, D. Kong, B. Xu, M. Zhu, Hierarchical macro/microporous silk fibroin scaffolds for tissue engineering, *Materials Letters*, vol. 236 (2019) 1-4.
- [70] D. Huemmerich, U. Slotta, T. Scheibel, Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins, *Applied Physics A*, vol. 82 (2006) 219-222.
- [71] C. Borkner, M. Elsner, T. Scheibel, Coatings and Films Made of Silk Proteins, *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 6 (2014) 15611-15625.
- [72] B. Kundu, R. Rajkhowa, S. Kundu, X. Wang, Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 65 (2013) 457-470.

- [73] E. Servoli, D. Maniglio, A. Motta, R. Predazzer, C. Migliaresi, Surface Properties of Silk Fibroin Films and Their Interaction with Fibroblasts, *Macromolecular Bioscience*, vol. 5 (2005) 1175-1183.
- [74] Q. Lu, X. Hu, X. Wang, J. Kluge, S. Lu, P. Cebe, D. Kaplan, Water-insoluble silk films with silk I structure, *Acta Biomaterialia*, vol. 6 (2010) 1380-1387.
- [75] Z. Zhengshi, D. Zhaozhao, H. Jiwei, Q. Jianzhong, S. Yixin, Z. Feng, Z. Baoqi, Green process to prepare water-insoluble silk scaffolds with silk I structure, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 117 (2018) 144-151.
- [76] G. Lu, S. Liu, S. Lin, D. Kaplan, Q. Lu, Silk porous scaffolds with nanofibrous microstructures and tunable properties, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 120 (2014) 28-37.
- [77] L. Bai, D. Wu, J. Xu, H. Liu, On model of angiogenesis and the mechanism in porous silk fibroin films, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 22 (2011) 927-933.
- [78] A. Teimouri, M. Azadi, R. Emadi, J. Lari, A. Chermahini, Preparation, characterization, degradation and biocompatibility of different silk fibroin based composite scaffolds prepared by freeze-drying method for tissue engineering application, *Polymer Degradation and Stability*, vol. 121 (2015) 18-29.
- [79] K. Tsioris, H. Tao, M. Liu, J. Hopwood, D. Kaplan, R. Averitt, F. Omenetto, Rapid Transfer-Based Micropatterning and Dry Etching of Silk Microstructures, *Advanced Materials*, vol. 23 (2011) 2015-2019.
- [80] B. Lawrence, Z. Pan, A. Liu, D. Kaplan, M. Rosenblatt, Human corneal limbal epithelial cell response to varying silk film geometric topography in vitro, *Acta Biomaterialia*, vol. 8 (2012) 3732-3743.
- [81] M. Gupta, S. Khokhar, D. Phillips, L. Sowards, L. Drummy, M. Kadakia, R. Naik, Patterned Silk Films Cast from Ionic Liquid Solubilized Fibroin as Scaffolds for Cell Growth, *Langmuir*, vol. 23 (2007) 1315-1319.

- [82] L. Tien, E. Gil, S. Park, B. Mandal, D. Kaplan, Patterned Silk Film Scaffolds for Aligned Lamellar Bone Tissue Engineering, *Macromolecular Bioscience*, vol. 12 (2012) 1671-1679.
- [83] B. Lawrence, F. Omenetto, K. Chui, D. Kaplan, Processing methods to control silk fibroin film biomaterial features, *Journal of Materials Science*, vol. 43 (2008) 6967-6985.
- [84] E. Gil, S. Park, J. Marchant, F. Omenetto, D. Kaplan, Response of Human Corneal Fibroblasts on Silk Film Surface Patterns, *Macromolecular Bioscience*, vol. 10 (2010) 664-673.
- [85] H. Jin, J. Park, R. Valluzzi, P. Cebe, D. Kaplan, Biomaterial Films of Bombyx Mori Silk Fibroin with Poly(ethylene oxide), *Biomacromolecules*, vol. 5 (2004) 711-717.
- [86] P. Escalé, L. Rubatat, L. Billon, M. Save, Recent advances in honeycomb-structured porous polymer films prepared via breath figures, *European Polymer Journal*, vol. 48 (2012) 1001-1025.
- [87] A. Muñoz-Bonilla, M. Fernández-García, J. Rodríguez-Hernández, Towards hierarchically ordered functional porous polymeric surfaces prepared by the breath figures approach, *Progress in Polymer Science*, vol. 39 (2014) 510-554.
- [88] F. Galeotti, A. Andicsova, S. Yunus, C. Botta, Precise surface patterning of silk fibroin films by breath figures, *Soft Matter*, vol. 8 (2012) 4815-4821.
- [89] D. Wise, *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*, Marcel Dekker, New York, 1995.
- [90] S. Nawae, J. Meesane, N. Muensit, C. Daengngam, Layer-by-layer self-assembled films of silk fibroin/collagen/poly (diallyldimethylammonium chloride) as nucleating surface for osseointegration to design coated dental implant materials, *Materials & Design*, vol. 160 (2018) 1158-1167.
- [91] L. Li, C. Chen, J. Li, A. Zhang, X. Liu, B. Xu, S. Gao, G. Jin, Z. Ma, Robust and hydrophilic polymeric films with honeycomb pattern and their cell scaffold applications, *Journal of Materials Chemistry*, vol. 19 (2009) 2789-2796.

- [92] J. McMillan, M. Akiyama, M. Tanaka, S. Yamamoto, M. Goto, R. Abe, D. Sawamura, M. Shimomura, . Shimizu, Small-Diameter Porous Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Films Enhance Adhesion and Growth of Human Cultured Epidermal Keratinocyte and Dermal Fibroblast Cells, *Tissue Engineering*, vol. 13 (2007) 789-798.
- [93] E. Wrzecionko, A. Minařík, P. Smolka, M. Minařík, P. Humpolíček, P. Rejmontová, A. Mráček, M. Minaříková, L. Grundělová, Variations of Polymer Porous Surface Structures via the Time-Sequenced Dosing of Mixed Solvents, vol. 9 (2017) 6472-6481.
- [94] C. Wu, M. Chen, T. Zheng, X. Yang, F. Liu, Effect of surface roughness on the initial response of MC3T3-E1 cells cultured on polished titanium alloy, *Bio-Medical Materials and Engineering*, vol. 26 (2015) 155-164.
- [95] A. Bourkoula, V. Constantoudis, D. Kontziampasis, P. Petrou, S. Kakabakos, A. Tserepi, E. Gogolides, Roughness threshold for cell attachment and proliferation on plasma micro-nanotextured polymeric surfaces: the case of primary human skin fibroblasts and mouse immortalized 3T3 fibroblasts, *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 49 (2016) 1-10.
- [96] X. Hu, S. Park, E. Gil, X. Xia, A. Weiss, D. Kaplan, The influence of elasticity and surface roughness on myogenic and osteogenic-differentiation of cells on silk-elastin biomaterials, *Biomaterials*, vol. 32 (2011) 8979-8989.
- [97] S. Ling, Z. Qin, C. Li, W. Huang, D. Kaplan, M. Buehler, Polymorphic regenerated silk fibers assembled through bioinspired spinning, *Nature Communications*, vol. 8 (2017) 1-12.



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

Gly	Glycin
Ala	Alanin
Ser	Serin
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HFIP	Hexafluoroisopropanol
D <sub>2</sub> O	Těžká voda
RGD	Tripeptid obsahující arginin (R), glycin (G) a asparagovou kyselinu (D)
Arg	Arginin
Asp	Asparagová kyselina
IKVAV	Peptid složený ze sekvence Ile-Lys-Val-Ala-Val
Ile	Isoleucin
Lys	Lysin
Val	Valin
PEG-DE	Poly (ethylenglykol) diglycidyl ether
PLA	kyselina polymléčná
TEM	Transmisní elektronový mikroskop
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEO	Polyethylenoxid
PDDA	Poly (diallyldimethylamonium chlorid)
LiBr	Bromid lithný
DMSO	Dimethylsulfoxid
AFM	Mikroskop atomárních sil

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Zvlákňovací orgán bource morušového a kokon z nativního hedvábí [8] .....</i>	13
<i>Obr. 2: Schematické znázornění struktury přírodního hedvábného vlákna [23] .....</i>	14
<i>Obr. 3: Schéma zpracování fibroinu [8] .....</i>	15
<i>Obr. 4: FTIR spektrum nativního Bombyx mori fibroinu v roztoku (křivka soln.) a ve formě filmu (křivky MP. a MM.) [40] .....</i>	17
<i>Obr. 5: ATR-FTIR spektrum hedvábného fibroinu A) před ošetřením a B) po ošetření ethanolem [44] .....</i>	18
<i>Obr. 6: Příklady porézních textur připravených lyofilizací fibroinového roztoku A) ve formě filmu odlévaného na destičku [77], B) s obsahem fibroinových nanovláken ve výchozím roztoku [75], C) kompozitní scaffold s želatinou a hydroxyapatitem [77] .....</i>	24
<i>Obr. 7: Texturování filmu metodou patterning A) proces přípravy drážkovaného fibroinového filmu odléváním na PDMS šablonu, B) až D) příklady drážkovaných fibroinových filmů [82; 83; 84], E) leptaný fibroinový film s kovovým vzorem [79], F) Fibroinový film texturovaný TEM mřížkou [81] ...</i>	25
<i>Obr. 8: Příklady textur generovaných fázovou separací PEO a fibroinového roztoku (A) filmy stabilizovány methanolem [85], B) a C) filmy stabilizovány vodní parou [83] .....</i>	26
<i>Obr. 9: A) Vzorované filmy založené na technice breath figures A) fibroinový film s mikro-dutinami, B) fibroinový film s mikro-výstupky [88] .....</i>	26
<i>Obr. 10: Proliferační lidských rohovkových fibroblastů A) na hladkém fibroinovém filmu po 2 dnech, B) na drážkovaném povrchu po 2 dnech, C) na drážkovaném filmu po 2 týdnech (bílá šipka znázorňuje směr drážkování na fibroinovém filmu) [84] .....</i>	27
<i>Obr. 11: Buněčná kultivace na hladkých fibroinových filmech (A, C, E) a na drážkovaných filmech (B,D,F) 2 dny (A, B), 16 dní (C, D) a 28 (E, F) dní po naočkování (bílé šipky znázorňují směr drážkování na fibroinovém filmu) [82] .....</i>	28
<i>Obr. 12: A) – C) buněčná proliferace po 12 dnech na lyofilizací generovaných porézních texturách: D) bez nanofilament po ošetření methanolem, E) a F) s nanofilamenty v SILK I konformaci [75] .....</i>	28

- Obr. 13: A) Strukturovaný povrch vícevrstvého kompozitního filmu, B) srovnání proliferace osteoblastů na filmech s různým počtem vrstev [90] .....29
- Obr. 14: Schéma dávkování směsi rozpouštědel na rotující substrát s generovanou porézní texturou.....32
- Obr. 15: Schéma vývoje mikro-porézní textury na PS povrchu sekvenovaným dávkováním dobrého a špatného rozpouštědla [93] .....33
- Obr. 16: Změny v textuře polystyrenového povrchu způsobené dávkováním malých objemů směsi rozpouštědel: A) PS povrch, B) povrch modifikovaný jednou dávkou směsi, C) povrch modifikovaný 5 dávkami směsi [93] .....34
- Obr. 17: Zařízení na přípravu texturovaných filmů metodou postupného dávkování směsných roztoků na rotující vzorek .....34
- Obr. 18: Schéma experimentálního postupu.....38
- Obr. 19: FTIR spektrum fibroinového filmu odlévaného z 2% (w/v) roztoku v HFIP a sušeného 12 h v atmosféře protékajícího dusíku (rozsah absorbance 0-0,13)..39
- Obr. 20: FTIR spektrum zobrazující charakteristické pásy Amidu I a II .....40
- Obr. 21: A) AFM zobrazení povrchu amorfního fibroinového filmu, B) fotka částečně rozpuštěného fibroinového filmu smytého ke krajům PS misky .....40
- Obr. 22: FTIR spektrum fibroinových filmů sušených 12 h v průtoku dusíku A) v konformaci SILK I, B) s částečnou transformací indukovanou umístěním do vlhkosti 60 % na 48 h při teplotě 24 °C (rozsah absorbance jednotlivých spekter 0-0,13) .....41
- Obr. 23: Změna povrchové textury a profily fibroinových filmů sušených 24 h v průtoku dusíku a částečně transformovaných při vlhkosti 60 % A) před modifikací, B) po modifikaci; snímky pořízeny pomocí AFM .....42
- Obr. 24: Fotky filmů po modifikaci a obrázky z optického mikroskopu pro postupy A) 1, B) 2, C) 3 uvedené v tab. 1 .....43
- Obr. 25: Texturované povrchy modifikovaných filmů s částečnou transformací fibroinu, A) až C) postupy 3 až 5 z tab. 1; snímky pořízeny pomocí AFM.....44
- Obr. 26: FTIR spektrum fibroinového filmu sušeného v dusíkové atmosféře a částečně transformovaného v 60% vlhkosti A) před modifikací a B) po modifikaci (rozsah absorbance jednotlivých spekter 0-0,09).....45
- Obr. 27: Srovnání FITR spekter fibroinových filmů ošetřených parami methanolu po dobu A) 24, B) 48 a C) 72 h (rozsah absorbance jednotlivých spekter 0-0,09) 46

- Obr. 28: Povrchová textura fibroinových filmů sušených 24 h v průtoku dusíku a transformovaných v methanolu 48 h A) před modifikací, B) po modifikaci; snímky pořízeny pomocí AFM a profilometru .....47
- Obr. 29: Fibroinové filmy transformované v methanolu po dobu A) 24 h, B) 48 h a C) 72 h se strukturami generovanými postupem 1 (tab. 2); 3D obrázky pořízeny optickým profilometrem, profilové řezy pořízeny kontaktním profilometrem ...49
- Obr. 30: Fibroinové filmy transformované v methanolu po dobu 48 h se strukturami generovanými posty A) 2 a B) 3 (tab. 2); 2D obrázky pořízeny optickým profilometrem, profilové řezy pořízeny kontaktním profilometrem.....50
- Obr. 31: Fibroinový film transformovaný v methanolu po dobu 48 h se strukturami generovanými postupem 1 (tab. 2) A) se směsí HFIP, DMSO a vody v poměru 7:0,2:4, B) se směsí HFIP, DMSO a vody v poměru 7:0,6:4; snímky pořízeny optickým profilometrem.....51
- Obr. 32: FTIR spektrum fibroinového filmu sušeného v dusíkové atmosféře a transformovaného 48 h v methanolu A) před modifikací a B) po modifikaci (rozsah absorbance jednotlivých spekter 0-0,10).....52
- Obr. 33: Detail nano-porézní textury A) před aplikací methanolu, B) po působení par methanolu 1 den C) 3D struktura s daty z fázového kontrastu AFM; snímky pořízeny pomocí AFM. ....53
- Obr. 34: Stabilita nano-porézní textury generované na semi-transformovaných filmech postupem 3 (tab. 1): A) srovnávací vzorek, B) po působení methanolu 5 dní C) po působení vody 5 dní; snímky pořízeny pomocí AFM.....54
- Obr. 35: Stabilita mikro-porézní textury generované na filmech ve stavu SILK II postupem 1 (tab. 2): A) srovnávací vzorek, B) po působení methanolu 1 den C) po působení vody 1 den; snímky pořízeny pomocí optického profilometru, profily pomocí kontaktního profilometru .....55
- Obr. 36: FTIR spektra fibroinových filmů před modifikací transformovaných při RH 60 % A) po modifikaci, B) po ošetření methanolem, C) po ošetření vodou a transformovaných parami methanolu D) po modifikaci, E) po ošetření methanolem, F) po ošetření vodou (rozsah absorbance jednotlivých spekter 0-0,10).....56
- Obr. 37: Snímky z optického mikroskopu pořízené 1. den proliferace na nano- a mikro-texturovaných površích.....58

<i>Obr. 38: Snímky z optického mikroskopu pořízené 4. den proliferace na nano- a mikro-texturovaných površích.....</i>	<i>59</i>
<i>Obr. 39: Životnost buněk na nano-texturovaném povrchu vyjádřená intenzitou fluorescence činidla alamarBlue.....</i>	<i>60</i>
<i>Obr. 40: Životnost buněk na mikro-texturovaném povrchu vyjádřená intenzitou fluorescence činidla alamarBlue.....</i>	<i>60</i>
<i>Obr. 41: Filmy s kombinovanou strukturou: A) nano-textura po 1. modifikaci B) kombinovaná textura po 2. modifikaci .....</i>	<i>61</i>
<i>Obr. 42: Fibroinové filmy s vytvořenou mikro-texturou selektivně značené fluoresceinem.....</i>	<i>61</i>

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1: Vybrané testovací postupy přípravy texturovaného povrchu pro částečně transformované fibroinové filmy.....	43
Tab. 2: Vybrané testovací postupy přípravy texturovaného povrchu fibroinových filmů ve stavu SILK II .....	48