

Směsi hedvábného proteinu a polykaprolaktonu, jejich zpracování a možné aplikace

Bc. Adam Trtek

Diplomová práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Adam Trtek
Osobní číslo: T22328
Studijní program: N0711A130023 Materiálové inženýrství a nanotechnologie
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Směsi hedvábného proteinu a polykaprolaktonu, jejich zpracování a možné aplikace

Zásady pro vypracování

- Vypracujte rešerši na zadané téma.
- Připravte směsi hedvábného proteinu a polykaprolaktonu za užití různých typů rozpouštědel.
- Z těchto směsí připravte filmy nebo 3D tištěné mřížky a sledujte závislost jejich mikroskopické struktury na podílu jednotlivých složek ve směsi.
- Připravené struktury charakterizujte pomocí dostupných mikroskopických technik.
- Výsledky přehledně zpracujte a proveďte diskuzi.

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

Seznam doporučené literatury:

1. A. Bharadwaz, A.C. Jayasuriya, Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration, *Mater. Sci. Eng. C*. 110 (2020) 110698. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110698>.
2. C. Vyas, J. Zhang, Ø. Øvrebo, B. Huang, I. Roberts, M. Setty, B. Allardyce, H. Haugen, R. Rajkhowa, P. Bartolo, 3D printing of silk microparticle reinforced polycaprolactone scaffolds for tissue engineering applications, *Mater. Sci. Eng. C*. 118 (2021) 111433. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111433>.
3. S. Homaeigohar, A.R. Boccaccini, Nature-Derived and Synthetic Additives to poly(ϵ -Caprolactone) Nanofibrous Systems for Biomedicine; an Updated Overview, *Front. Chem.* 9 (2022) 1–25. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.809676>.
4. M. Dadras Chomachayi, A. Jalali-arani, F.R. Beltrán, M.U. de la Orden, J. Martínez Urreaga, Biodegradable Nanocomposites Developed from PLA/PCL Blends and Silk Fibroin Nanoparticles: Study on the Microstructure, Thermal Behavior, Crystallinity and Performance, *J. Polym. Environ.* 28 (2020) 1252–1264. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01684-0>.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Karolína Kocourková, Ph.D.**
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Petr Smolka, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2024

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Diplomová práce zkoumá vliv hedvábného proteinu fibroinu na krystalickou strukturu polykaprolaktonu (PCL) a povrchovou morfologii filmů a 3D tištěných struktur připravených z jejich směsí pro aplikace v tkáňovém inženýrství. V teoretické části práce jsou popsány běžně používané materiály v této oblasti se zaměřením na PCL a fibroin. Experimentální práce je zaměřena na zpracování roztoků PCL a fibroinu v organickém rozpouštědle odléváním a 3D extruzním tiskem. Byl studován vliv rostoucího podílu fibroinu na krystalickou strukturu PCL, přičemž bylo zjištěno, že nižší podíl fibroinu ve směsi indukuje tvorbu specifické prstencové struktury PCL sférolitů. U 3D tištěných struktur byl sledován vliv rychlosti odpařování rozpouštědla na strukturu sférolitů. Působením alkoholu při vysychání výtisku bylo dosaženo tvorby texturovaného povrchu. Změny povrchové textury byly sledovány pomocí optické, elektronové mikroskopie a mikroskopie atomárních sil. Složení směsí bylo analyzováno pomocí infračervené spektroskopie a rentgenové difrakce.

Klíčová slova: polykaprolakton, hedvábný protein, krystalizace, strukturované povrchy, tkáňové inženýrství

ABSTRACT

Diploma thesis investigates the effect of the silk protein fibroin on the crystalline structure of polycaprolactone and the surface morphology of films and 3D printed structures prepared from these blends for tissue engineering applications. The theoretical part of the thesis describes the commonly used materials in this field with a focus on polycaprolactone and fibroin. The experimental work focuses on processing of PCL and fibroin solutions in an organic solvent by casting and 3D extrusion printing. The effect of increasing fibroin content on the crystalline structure of PCL was studied, and it was found that a lower fibroin content in the mixture induces the formation of a specific ring structure of PCL spherulites. For 3D printed structures, the effect of solvent evaporation rate on the spherulite structure was investigated. The application of alcohol during the drying of the print resulted in the formation of a textured surface. Changes in surface texture were monitored using optical, scanning electron and atomic force microscopy. The compositions of the blends were analyzed by infrared spectroscopy and X-ray diffraction.

Keywords: polycaprolactone, silk protein, crystallization, textured surfaces, tissue engineering

Rád bych na tomto místě poděkoval Ing. Karolíně Kocourkové, Ph.D. nejen za perfektní vedení diplomové práce, ale taky za cenné rady, trpělivost a čas, který mně věnovala. Další poděkování taky patří Ing. Davidu Jaškovi za pomoc při analýze krystalické struktury PCL.

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

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 POLYMERNÍ MATERIÁLY	13
1.1 HISTORIE.....	14
1.2 ROZDĚLENÍ POLYMERNÍCH MATERIÁLŮ.....	14
1.2.1 Rozdělení podle medicínské aplikace	15
1.2.2 Rozdělení podle interakce s organismem.....	16
1.2.3 Syntetické polymerní materiály	16
1.2.4 Přírodní polymerní materiály	16
1.3 STRUKTURA POLYMERU.....	20
1.3.1 Submolekulární struktura	20
1.3.2 Molekulární struktura.....	21
1.3.3 Nadmolekulární struktura.....	21
2 POLYKAPROLAKTON	23
2.1 SYNTÉZA.....	23
2.1.1 Reakční mechanismus	24
2.1.2 Katalyzátory	25
2.2 KRYSTALIZACE POLYKAPROLAKTONU	26
2.2.1 Klasické sférolity.....	28
2.2.2 Prstencové sférolity	28
2.3 CHARAKTERIZACE KRYSTALICKÉ STRUKTURY MATERIÁLU	30
2.4 BIODEGRADACE A BIODROPATIBILITA	30
2.5 VYUŽITÍ	31
2.5.1 Medicínské aplikace.....	31
2.5.2 Tkáňové inženýrství	31
3 HEDVÁBÍ BOURCE MORUŠOVÉHO	33
3.1 HEDVÁBÍ V NATIVNÍM STAVU	33
3.1.1 Vznik hedvábí v přírodě	33
3.1.2 Struktura vlákna	34
3.1.3 Konformační přechod.....	36
3.1.4 Charakterizace konformačního přechodu.....	37
3.2 REGENEROVANÉ HEDVÁBÍ	38
3.2.1 Zpracování.....	38
3.3 VYUŽITÍ	39
3.3.1 Regenerativní medicína.....	39
3.3.2 Fibroinová nanovlákna.....	40

3.3.3	Nanočástice	41
3.3.4	3D tisk	41
4	TEXTUROVANÉ POLYMERNÍ POVRCHY	42
4.1	FIBROINOVÉ FILMY	42
4.2	MODIFIKACE POVRCHU	43
4.2.1	Patterning.....	43
4.2.2	Fázová separace.....	44
4.2.3	Fázová inverze.....	45
4.3	RŮST BUNĚK NA TEXTUROVANÝCH SYSTÉMECH	46
4.4	SMĚSI PCL S FIBROINEM.....	47
II	PRAKTICKÁ ČÁST	49
5	CÍLE EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI PRÁCE.....	50
6	MATERIÁLY A METODY	51
6.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	51
6.2	PŘÍPRAVA VZORKŮ	51
6.2.1	Izolace hedvábného proteinu.....	51
6.2.2	Příprava roztoků	53
6.2.3	Metoda odlévání z roztoku.....	53
6.2.4	Extruzní 3D tisk	54
6.3	CHARAKTERIZACE VZORKŮ	55
6.3.1	Skenovací elektronový mikroskop.....	55
6.3.2	Mikroskop atomárních sil.....	56
6.3.3	Profilometrie.....	56
6.3.4	3D bio tiskárna	56
6.3.5	WAXS	56
6.3.6	FTIR	57
6.3.7	Optický digitální mikroskop.....	57
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	58
7.1	TEXTUROVANÉ FILMY NA BÁZI PCL A BMF	58
7.1.1	Struktura čistého PCL	58
7.1.2	PCL prstencové sférolity.....	61
7.1.3	Porézní BMF-PCL povrchy	66
7.1.4	Transformace sekundární struktury fibroinu.....	70
7.1.5	Stabilita BMF-PCL filmů ve vodě	78
7.2	3D TISK SMĚSÍ PCL A BMF	84
7.2.1	Vliv rychlosti sušení na topografii	85
7.2.2	Vliv vody a alkoholu na topografii	88
	ZÁVĚR.....	92
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	93

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	109
SEZNAM OBRÁZKŮ	110
SEZNAM TABULEK	113

ÚVOD

Tkáňové inženýrství je obor zaměřující se na vývoj funkčních náhrad nefunkčních nebo poškozených tkání. V tomto odvětví lze využít různé typy materiálů, které musí ovšem splňovat celou řadu podmínek jako je biokompatibilita nebo biodegradabilita. Materiály splňující kritéria pro interakci s nativní tkání se nazývají biomateriály.

Polykaprolakton je syntetický polymer, který patří do skupiny biodegradabilních alifatických polyesterů. Díky dobré zpracovatelnosti, mechanickým vlastnostem a biokompatibilitě je široce používán ve vývoji v oblasti tkáňového inženýrství. Jeho hydrofobní povaha však komplikuje buněčnou adhezi a pomalá degradace omezuje možné aplikace. Hedvábný protein izolovaný z kokonů bource morušového představuje z hlediska své chemické povahy vhodný materiál pro interakce s buňkami. Rovněž disponuje dobrými mechanickými vlastnostmi, jeho zpracovatelnost některými technikami, zejména aditivní výroby, je však komplikovaná. V kombinaci s polykaprolaktonem může být dosaženo optimálních zpracovatelských, strukturních a mechanických vlastností simulujících živou tkáň.

Teoretická část práce pojednává o rozdělení polymerních materiálů s důrazem zejména na vhodné materiály pro tkáňové inženýrství. Dále jsou popsány dva klíčové materiály pro experimentální část práce, polykaprolakton a fibroin. V případě polykaprolaktonu je popsána jeho krystalizace a možné formy strukturního uspořádání. Fibroin je popsán z hlediska zpracování a struktury se zaměřením na indukovanou změnu konformace. V poslední řadě jsou uvedeny vybrané stěžejní aplikace těchto dvou materiálů a účel jejich kombinování.

Cílem experimentální části bylo připravit a zpracovat polymerní roztoky polykaprolaktonu v kombinaci s hedvábným proteinem o různých poměrech. Z těchto roztoků byly následně připraveny filmy určeny ke studiu změn v krystalické struktuře polykaprolaktonu indukovaných přítomností fibroinu. Změny v krystalické struktuře byly studovány pomocí mikroskopických technik a rentgenové krystalografie. Vybrané směsi byly následně zpracovány 3D tiskem a byly pozorovány topografické změny v závislosti na koncentraci fibroinu ve směsi a způsobu sušení tištěných struktur.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYMERNÍ MATERIÁLY

Polymerní materiály se skládají z dlouhých opakujících se makromolekulárních řetězců o velké molekulové hmotnosti, které označujeme jako makromolekuly. Jednotlivé makromolekuly jsou mezi sebou vzájemně propleteny a tvoří tzv. konstituční jednotky [1]. Pojem makromolekula označuje strukturu kovalentně vázaných monomerů, které jsou složeny z více než tisíce atomů, jelikož při této velikosti vykazují jiné vlastnosti než původní monomer, zatímco výraz polymer je označení konkrétního typu makromolekuly [2]. Řetězce makromolekul jsou mezi sebou spojeny v takovém počtu, že se po přidání, nebo odebrání jedné, nebo menšího počtu konstitučních jednotek znatelně nezmění chemické a fyzikální vlastnosti tohoto materiálu. Polymery vznikají polymerací malých molekul, které nazýváme monomery, ze kterých podle počtu vznikají následně dimery, trimery. Polymerní materiály skládající se z jednoho druhu monomeru nazýváme homopolymery, zatímco při obsahu dvou, nebo více druhů monomerů je označujeme jako kopolymery. Příkladem homopolymeru lze zmínit například nejjednodušší polymer polyethylen, dále například polystyren nebo polybutadien. Mezi nejznámější zástupce kopolymerů patří ABS (Akrylonitril-butadien-styren), nebo SBS (Styren-butadien-styren). Důležitou roli ve vlastnostech polymerů hraje minimální molekulová hmotnost, přičemž minimální hodnota je často udávána na hranici $25\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Ačkoliv tato hodnota není pevná, je často považována za minimální molekulovou hmotnost pro dosažení dobrých fyzikálních a mechanických vlastností polymerů [3]. Z hlediska užitných vlastností polymerů je velmi důležité vzájemné uspořádání makromolekul. Tavenina polymeru je amorfní, tzn. že makromolekuly jsou neuspořádané. Když teplota tání klesne a dojde k tuhnutí, makromolekuly se buď uspořádají, pak nazýváme tyto polymery částečně krystalické, nebo se makromolekuly neorganizují, v tom případě neuspořádané makromolekuly tvoří amorfní strukturu. Mezi zástupce částečně krystalických polymerů, u kterých jsou makromolekuly lineární, lze zařadit například polypropylen (PP) a polyethylen (PE). Dalším charakteristickým znakem částečně krystalických polymerních výrobků je, že jsou ve většině případů neprůhledné. Mezi amorfní polymery, u kterých nejsou molekuly lineární, patří například polyvinylchlorid (PVC) a polystyren (PS) [4]. Polymerní materiály na základě svého složení vykazují širokou variabilitu fyzikálních vlastností, jako je nízká hustota, tuhost, vodivost, tvrdost a na druhé straně vysoká tepelná roztažnost nebo velké opotřebení. Výběr těchto materiálů a jejich aplikační rozsah je velmi široký [5].

1.1 Historie

Existuje několik důležitých milníků ve vývoji polymerů, které ovlivnily celý svět. Označení polymer vymyslel švédský chemik Berzelius v 19. století, kdy byl rovněž objeven první syntetický polymer, nitrocelulóza. Stěžejní byl objev bakelitu, který dokázal vědec Baekeland vytvořit v roce 1907 polykondenzací fenolu s formaldehydem. Toto datum lze považovat za jistý zlom, po kterém se o tento druh materiálu začala zajímat široká veřejnost. Polymery jsou od svého objevu jedním z nejrychleji se rozvíjejících materiálů z hlediska použití. Bylo to z velké části proto, že mohly levně nahradit původní materiály s dobrou reprodukovatelností. Vývoj pokračoval s výraznou expanzí během druhé světové války, a intenzivně probíhá až dodnes [6]. K české stopě ve vývoji polymerů lze zmínit jméno českého vynálezce a chemika Otty Wichterleho. Mezi jeho vynálezy patří měkké kontaktní čočky nebo polyamidové vlákno, které je známé pod obchodním názvem Silon. V současné době je velmi diskutovaným tématem degradace polymerů v přírodě a eliminace jejich jednorázového použití z hlediska ochrany životního prostředí. V budoucnu lze očekávat změny ve využití plastů spočívající v jejich redukci, jelikož jejich recyklace je poměrně nákladná a energeticky náročná [7].

1.2 Rozdělení polymerních materiálů

Polymerní materiály lze dělit podle velkého počtu kritérií. Zásadní je dělení podle teplotního chování na termoplasty a reaktoplasty. Charakteristickým znakem termoplastů je možnost opakovaného tavení a chlazení, které na rozdíl od reaktoplastů, které se vytvrzují zářením, případně teplem. Dalším charakteristickým rysem termoplastů je linearita makromolekul s dlouhými řetězci a velmi dobrou viskozitou. Nejznámější a nejjednodušší termoplast se nazývá polyethylen (PE), který se skládá z homopolymerů ethylenu. Reaktoplasty jsou zesíťované polymery s prostorovou sítí, která je tvořena konsolidací lineárního řetězce [8]. Dále lze polymery dělit například podle uspořádání makromolekul na semikrystalické a amorfni. V tavenině je uspořádání makromolekul náhodné a nepravidelné. Při snížení teploty se některé polymery uspořádávají do tzv. lamel během procesu krystalizace. Takové polymery označujeme jako semikrystalické, jelikož vždy obsahují alespoň část amorfni složky. Amorfni polymery při snižování teploty uspořádanou strukturu netvoří a jejich makromolekuly zůstávají neuspořádané. Podíl krystalické složky v polymeru se nazývá stupeň krystalinity. Dále lze polymery dělit například podle tvaru makromolekul na lineární, rozvětvené a zesíťované, případně podle druhu obsažených aditiv, nebo dle využití [9].

V této kapitole bude blíže popsáno dělení polymerních materiálů relevantní pro aplikace v medicíně a tkáňovém inženýrství.

1.2.1 Rozdělení podle medicínské aplikace

Polymerní materiály jsou poslední dobou velmi diskutované v oblasti biomedicíny a tkáňového inženýrství. Z medicínského hlediska lze polymerní materiály rozdělit například podle využití různých typů materiálu. Mezi nejznámější patří poměrně měkké materiály na bázi polyesterů, které se používají například pro náhrady cév. Dále lze zmínit poměrně tvrdší materiál, polyethylen, který se používá pro náhrady kolenních kloubů. V tab.1 je přehled vybraných materiálů, které se používají v medicínských aplikacích.

Tab. 1: Příklady polymerních materiálů a jejich aplikace v medicíně [10]

Materiál	Využití
Polyethylen	Kolenní klouby, kyčelní protézy, katetry, kardiostimulátory
Polyvinylchlorid	Segmenty jícnu, jaterní, ledvinové a plicní díly, obličejové protézy
Akryláty	Zubní protézy, kosti a klouby, sluchové součásti
Polymethylmethakrylát	Zlomeniny
Kyselina polymléčná	System pro transport léčiv
Polyestery	Cévy
Polysiloxany	Klouby prstů
Polyuretany	Biologicky rozložitelné stehy
Celofán	Dialyzační membrány

1.2.2 Rozdělení podle interakce s organismem

Prvním způsobem, jak mohou polymerní materiály s organismem interagovat je minimální interakce. V tomto případě se jedná o interní materiál, který v organismu plní funkci náhrady, aniž by specificky ovlivňoval biologické procesy v těle [11]. Druhým typem jsou bioaktivní materiály, jako jsou např. biodegradabilní polymery modifikované specifickými funkčními skupinami, které jsou následně určeny pro širokou škálu aplikací zahrnující různé implantáty, nosiče léčiv v tkáňovém inženýrství. Tyto materiály ovlivňují organismus v pozitivním smyslu a účastní se biologických procesů v těle [12].

1.2.3 Syntetické polymerní materiály

Syntetické polymery tvoří velmi početnou skupinu makromolekulárních látek, které se vyrábí umělou cestou. Jedná se většinou o organické sloučeniny, které se skládají z různých složitých a velkých makromolekul. Základem jsou dlouhé řetězce atomů uhlíku a vodíku, na které mohou být vázány další prvky (kyslík, dusík). Syntetické polymery se vyrábí tzv. polyreakcemi, mezi které patří polykondenzace, polymerace a polyadice. Tyto materiály se používají v tkáňovém inženýrství pro vývoj scaffoldů (tkáňových nosičů). Jejich značnou výhodou je, že jejich mechanické vlastnosti mohou být do jisté míry přizpůsobeny dané aplikaci, dále možnost výroby ve velkém množství a jejich dlouhodobá skladovatelnost. Nevýhodou je mnohdy nedostatečná biokompatibilita s lidským organismem [13]. Speciální skupinou jsou biodegradabilní syntetické polymery, které se po čase v organismu rozpadají. Zde patří například kyselina polymléčná a kyselina polyglykolová. K degradaci těchto polymerů dochází pomocí hydrolýzy esterových vazeb hlavního řetězce a jejich produkty odbourávání jsou součástí Krebsova metabolického cyklu. Z tohoto důvodu je možné tyto polymery resorbovat *in vivo*. Degradabilní polymery nachází uplatnění v tkáňovém inženýrství například v náhradách kůže nebo šlach. Jako další zástupce syntetických polymerů lze zmínit polykaprolakton, který bude blíže popsán ve druhé kapitole. Dále do skupiny speciálních syntetických polymerů patří například polyanhydridy, polyfosfoestery a samozřejmě zástupce polyolefinů a styrenových polymerů atd. [14].

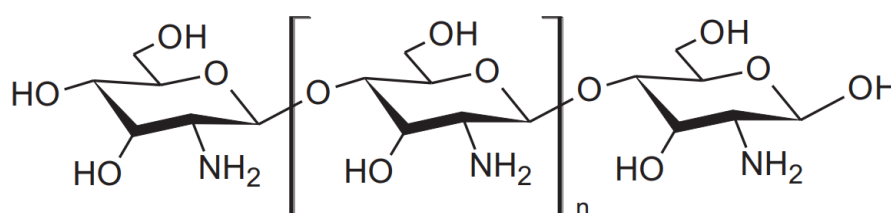
1.2.4 Přírodní polymerní materiály

Mezi přírodní polymery patří materiály polysacharidového a proteinového původu. Tyto materiály mají oproti výše zmíněným syntetickým materiálům lepší biokompatibilitu.

Ovšem nevýhodou může být v některých případech nutná izolace z přírodních zdrojů a s tím spojená nižší uniformita ve složení. Přírodních polymerních materiálů je o poznání méně než syntetických [15].

Chitosan

Do skupiny polysacharidů patří chitosan, který je druhý nejrozšířenější polysacharid vyskytující se převážně ve skořápkách koryšů a buněčné stěně hub. Jedná se o derivát chitinu. Chitosan se skládá z molekul glukosaminu, které jsou spojeny pomocí vazby $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidové vazby [16]. Schématické znázornění chitosanu je na obr. 1

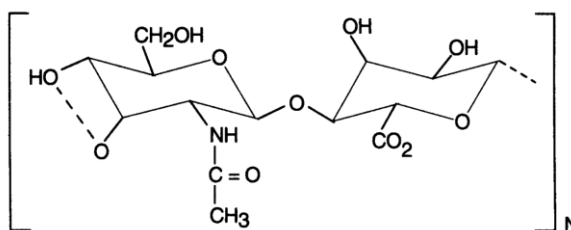


Obr. 1: Struktura chitosanu [16]

Chitosan obsahuje chemicky reaktivní funkční skupiny. V glukosaminových jednotkách chitosanového řetězce jsou přítomny primární aminové a sekundární hydroxylové skupiny [16]. Díky své dobré biokompatibilitě, netoxicitě a dobrým biodegradabilním vlastnostem se jedná o velmi dobrý biomateriál v oblasti biomedicíny. Dále je možné chitosan použít pro senzory, nebo při léčbě a diagnostice onkologických onemocnění [17; 18].

Hyaluronan

Hyaluronan, neboli sodná sůl kyseliny hyaluronové, se vyskytuje v epiteliálních, nervových a pojivových tkáních. Jedná se o kopolymer, který je složený z opakujících se monomerních jednotek kyseliny β -(1,4)-D-glukoronové a β -(1,3)-N-acetyl-D-glukosaminu. Skládá se z glykosaminoglykanu, který je tvořen řadou opakujících se disacharidových jednotek [19]. Schématické znázornění kyseliny hyaluronové je na obr. 2



Obr. 2: Struktura kyseliny hyaluronové [20]

Podle aplikace se volí optimální koncentrace a molekulová hmotnost kyseliny hyaluronové. Nemodifikovaná kyselina hyaluronová se používá například při léčbě kloubů. V regenerativní medicíně se kyselina hyaluronová používá ve formě různých filmů, vláken a hlavně hydrogelů [21].

Alginát

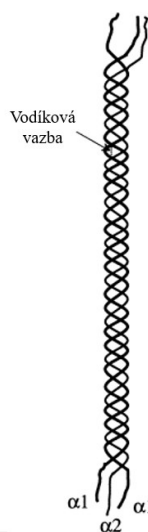
Jedná se o lineární přírodní polymer, který se vyskytuje především u hnědých mořských řas. Strukturou je alginát podobný blokovému kopolymeru, který se skládá z kyseliny α -L-guluronové a β -D-manuronové [22].

Síťování alginátu probíhá pomocí bivalentních kationtů (Ca^{2+}) ve vodném roztoku. Gelace a zesíťování probíhá díky výměně sodných iontů z guluronové kyseliny s bivalentními kationty [22].

Velkou výhodou alginátu je nízká toxicita. Další předností alginátu jsou dobrá biokompatibilita, biodegradabilita a velmi dobrá doba gelace. Využití nachází například jako nosič léčiv pro buněčnou enkapsulaci [23].

Kolagen

Kolagen patří do skupiny biopolymerů proteinového původu. Kolagen obsahuje pět tropokolagenových molekul, které jsou složeny z trojitě pravotočivé šroubovice, která obsahuje tři polypeptidové řetězce vzájemně spojenými pomocí vodíkových můstků [24]. Zjednodušená struktura kolagenu je na obr.3

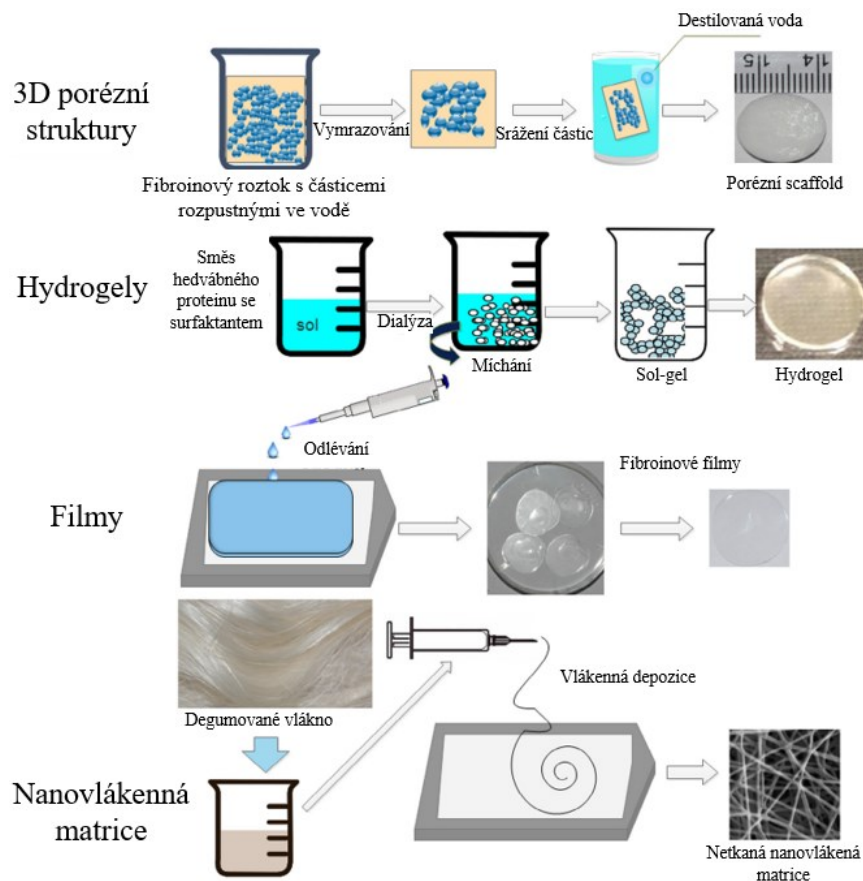


Obr. 3: Zjednodušená struktura kolagenu [25]

Jedná se o velmi dobrý materiál pro tkáňovém inženýrství. Využívá se pro tvorbu scaffoldů pro měkké tkáně, protože se ve velkém množství vyskytuje v extracelulární matrix pojivových tkání. Velkou výhodou kolagenu je vysoká bioaktivita a jeho velmi dobrá vlastnost podporující buněčnou adhezi. Nevýhodou kolagenu a obecně všech proteinů získaných ze zvířat je jejich potenciální imunogenita [26].

Hedvábí

Jedná se o vlákno produkované určitými druhy hmyzu, zejména larvami motýlů bource morušového (*Bombyx mori*) a různými druhy pavouků. Složení hedvábí se liší podle typu, ale obecně obsahuje různé bílkoviny a v menší míře lipidy a polysacharidy [27]. Hlavní konstrukční složka hedvábí je tvořena dvěma proteiny, fibroinem a sericinem, přičemž fibroin tvoří vláknitou část hedvábného vlákna, která jsou obklopena adhezivním sericinovým obalem, pomocí kterého vlákno drží pohromadě. Při získávání čistého fibroinu pro biomedicínské aplikace je ovšem sericin nezbytné odstranit. Hedvábné vlákno obsahuje kolem 75 hm.% fibroinu, množství odpadu při izolaci tedy není enormní. V tkáňovém inženýrství se fibroin využívá ve formě vláken, filmů, netkaných textilií, gelů a scaffoldů, díky velmi dobré biokompatibilitě, vysoké pevnosti a pomalé rychlosti degradace [28; 29]. Na obr. 4 je přehled možného uplatnění hedvábného proteinu v regenerativní medicíně. Dále bude blíže hedvábný protein popsán ve třetí kapitole.



Obr. 4: Aplikace hedvábného proteinu v regenerativní medicíně [27]

Ve srovnání s výše uvedenými polysacharidy je velkou výhodou hedvábí například lepší mechanické vlastnosti. Konkrétně pevnost v tahu hedvábí je až stonásobně vyšší. Mezi další výhody hedvábí patří zpracovatelnost celou řadou technik, například se dá mnohem lépe zpracovat do podoby vláken metodou elektrospinningu, než kolagen [30].

1.3 Struktura polymeru

1.3.1 Submolekulární struktura

Tato struktura se týká uspořádání v základní stavební jednotce polymerního řetězce. Charakteristické rysy této struktury jsou druhy atomů a vazeb, rozmístění vazeb a bočních substituentů na jednotlivých atomech. Mezi jednotlivými mery v polymerním řetězci se nachází kovalentní vazba, což je jedna z nejsilnějších vazeb vůbec a která je založena na sdílení elektronových párů mezi jednotlivými atomy prvků. Tato vazba je charakteristická nízkou symetrií. Díky této vazbě jsou polymery pevné a stabilní při působení vyšších teplot. Mezi další vlastnost submolekulární struktury patří polarita vazby, která souvisí s elektronegativitou daných prvků mezi sebou. Elektronegativita vyjadřuje vzdálenost prvků

v periodické tabulce takovým způsobem, že čím jsou prvky dál od sebe, tím se zvětšuje polarita vazby. Pokud máme polymer, který je silně polární (PA) a zároveň obsahuje molekuly uhlíku a kyslíku, lze očekávat, že se ve struktuře budou nacházet vodíkové můstky. Jako příklad nepolárního polymeru lze uvést PE. Pro vznik vodíkového můstku je nutné, aby atom kyslíku měl ve valenční sféře nevykompenzovaný elektron, který lze následně použít [31].

1.3.2 Molekulární struktura

Molekula polymeru je tvořena velkým počtem za sebou následujících merových jednotek, které jsou uspořádány do řetězce podle určitých pravidel. Polymerní řetězec je většinou tvořen z atomů uhlíků, které jsou mezi sebou vzájemně kovalentně spojeny, přičemž může obsahovat další atomy, jako je například síra, dusík či kyslík. Podle toho, jak jsou mezi sebou jednotky v řetězci uspořádané rozeznáváme několik typů řetězců. U alternujícího se jednotlivé mery pravidelně střídají. Opakem je statistický, kde je střídání merů zcela nahodilé. U složitějších struktur dále rozeznáváme blokové řetězce, kde se střídají jednotlivé celé bloky merů, případně ještě existuje roubovaný řetězec, u kterého je na hlavní segment řetězce navázaná boční větev dalšího meru. Podle bočního větvení lze dále dělit na další skupiny. V případě, že hovoříme o izotaktickém uspořádání, tak jsou boční skupiny uloženy na jedné straně řetězce, naproti tomu u syndiotaktického uspořádání jsou boční skupiny rozmístěny střídavě kolem základní páteře. Existuje i třetí varianta, ataktické uspořádání, kde jsou boční skupiny uloženy zcela nahodile [32].

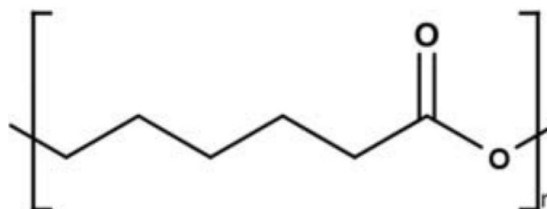
1.3.3 Nadmolekulární struktura

Nadmolekulární struktura u polymerů popisuje uspořádání makromolekul, stupeň krystalizace, velikost, orientaci, tvar krystalů atd. V případě polymerů lze popsat dvě fáze, krystalickou a amorfní. Krystalickou fází u polymerů rozumíme takové uspořádání makromolekulárních řetězců, při kterém jsou jednotlivé atomy mezi sebou pravidelně uspořádány. V případě krystalizace v roztoku nebo tavenině vznikají v první řadě nukleační jádra, od kterých dochází k růstu krystalů. Základní stavební jednotkou krystalů jsou lamely, což jsou paralelní vrstvy uspořádaných řetězců polymeru o tloušťce v řádech desítek nanometrů a délce desítek mikrometrů. Z lamel radiálně rostoucích z krystalizačního zárodku vznikají sférolity, které jsou navzájem odděleny amorfním podílem. Jedná se tedy o prostorové útvary, které mají zpočátku kulový tvar, ovšem při růstu se navzájem mezi sebou dotýkají a vznikají tak jejich rovinné hranice. Jestliže je krystalizace taveniny

ovlivněna smykovým namáháním, můžeme ve struktuře polymeru pozorovat tzv. fibrily, které jsou tvořeny napřímenými řetězci. Při rychlé krystalizaci za působení smykového namáhání pak vzniká struktura šiš-kebab. Stupeň krystalinity představuje podíl krystalických oblastí vůči amorfním a je dán rychlostí ochlazování během tuhnutí materiálu a konfigurací řetězce. Krystalické polymery jsou proto pevnější a odolnější vůči měknutí a rozpadu vlivem tepla než polymery amorfní. Struktura amorfních polymerů je charakteristická nahodilým uspořádáním na dlouhou vzdálenost. Struktura makromolekul v tuhém a v roztaveném stavu je téměř identická. Amorfní polymery, které neobsahují žádná plniva ani barviva jsou průhledné. Příčinou je skutečnost, že v amorfních materiálech není žádné uspořádání na dlouhou vzdálenost a nedochází ke změně indexu lomu uvnitř materiálu [33].

2 POLYKAPROLAKTON

Polykaprolakton patří do skupiny biodegradabilních alifatických polyesterů. Jedná se o semikrystalický polyester s nízkou teplotou tání $T_m=58$ až 63 °C a nízkou teplotou skelného přechodu $T_g=-61$ až -64 °C. Monomerní jednotka polykaprolaktonu je znázorněna na obr. 5

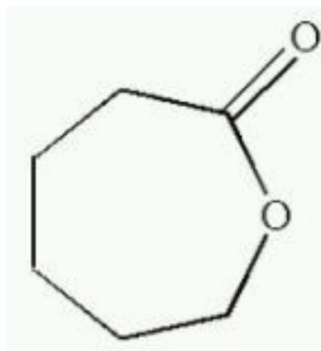


Obr. 5: Monomerní jednotka polykaprolaktonu [34]

Díky nízké teplotě skelného přechodu se polymer nachází při pokojové teplotě v kaučukovitém stavu. Mezi další zajímavé vlastnosti patří velmi dobrá biokompatibilita, hydrofobicita a mísitelnost s velkým počtem polymerů. Díky své velmi dobré biokompatibilitě a resorbovatelnosti je netoxický pro živé organismy [35; 36]. Krystalinita tohoto polymeru může dosahovat až 69%. Dále dosahuje dobré rozpustnosti v celé řadě organických rozpouštědel, jako je například dichlormethan, toluen a chloroform. Naproti tomu v ethanolu a ve vodě je polykaprolakton nerozpustný. Polykaprolakton je poměrně dobře pevný a elastický. Pevnost v tahu má v rozmezí jednotek a v extrémních případech až stovek MPa, Youngův modul je v řádech stovek MPa a prodloužení při přetržení v rozmezí 20-500% [37]. Výsledné vlastnosti polykaprolaktonu závisí na mnoha okolnostech, mezi které patří typ polymerace, molekulová hmotnost, stupeň krystalinity a morfologii koncového výrobku z tohoto polymeru [38].

2.1 Syntéza

Výchozí monomer kaprolakton se vyrábí oxidací cyklohexanonu pomocí kyseliny peroctové v přítomnosti acetonu. Tato oxidace je též nazývána jako Baeyerova-Villigerova. Další možnost je katalytická dehydrogenace hexan-1,6-diolu. Jedná se o cyklický ester, který je odvozen od kyseliny kapronové, což je kapalina rozpustná ve většině organických rozpouštědlech, včetně vody. Kaprolakton má několik konstitučních izomerů $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ a samozřejmě ϵ . Jednotlivé izomery se mezi sebou liší v počtu uhlíků v cyklu. Izomer ϵ se využívá jako monomer pro výrobu polykaprolaktonu polymerací za otevření kruhu [38]. Chemická struktura kaprolaktonu je na obr. 6.



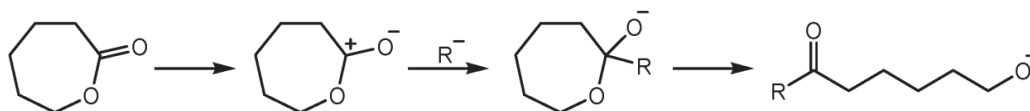
Obr. 6: Chemická struktura kaprolaktonu [38]

Alifatické polyestery, mezi které patří polykaprolakton, mohou být připravovány dvěma různými způsoby. Jedná se o polykondenzaci a polyadici za otevření kruhu cyklického monomeru. Polykondenzace patří mezi klasický způsob syntézy polyesterů. U tohoto typu syntézy spolu reagují dvě různé koncové funkční skupiny monomerů, přičemž dochází k uvolňování vedlejšího produktu (voda). Charakteristickými rysy této stupňovité polymerace je vysoká polymerační teplota, dlouhý reakční čas a taky je důležitá přesná stechiometrie mezi reagujícími karboxylovými a hydroxylovými skupinami. Surovinou pro monomery u polyesterů jsou většinou deriváty ropných látek, případně různé komponenty z obnovitelných zdrojů. Pomocí polykondenzace se například vyrábí PET láhve [39]. Polykaprolakton je nejčastěji syntetizován koordinačně-inzerční polymerací otevíráním kruhu. Tato polymerace probíhá v přítomnosti organokovových sloučenin hliníku, cínu, případně vybraných netoxických kovů, mezi které patří například železo. Důvod, proč je tato polymerace daleko více používaná, než polykondenzace je ten, že polymerace otevíráním cyklů produkuje polymer, který má výrazněji vyšší molekulovou hmotnost a nižší polydisperzitu [40]. Termodynamickou hnací silou polymerace otevíráním cyklu (ROP) je uvolnění vnitřního pnutí v kruhu monomeru. Klasické provedení je složitě kontrolovatelné, a proto je často doprovázené velkým množstvím vedlejších reakcí. Z tohoto důvodu jsou vyvíjeny různé druhy katalyzátorů [37; 41].

2.1.1 Reakční mechanismus

Prvním typem polymerace otevíráním cyklu je aniontový mechanismus. Tento typ polymerace probíhá nukleofilním útokem negativně nabitého iniciátoru na karbonylovém uhlíku, případně na uhlíkovém atomu, který sousedí s acylovým kyslíkem. Výsledkem této reakce je lineární polyester [42]. Nevýhodou tohoto typu polymerace je rozsáhlé zpětné štěpení, významná intramolekulární transesterifikace (reakce, při které dochází k výměně

alkoholové skupiny nebo kyslíkaté části za jinou), která se může vyskytovat v pozdějších fázích polymerace, a to má za následek v některých případech vznik polymerů s nízkou molekulovou hmotností. Na obr. 7 je znázorněn aniontový reakční mechanismus [37].

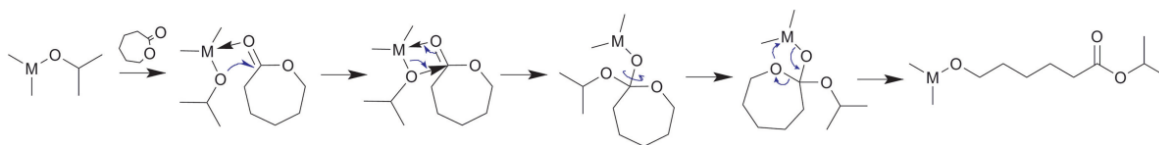


Obr. 7: Aniontový mechanismus ROP [37]

Dalším typem reakce je kationtový mechanismus. Princip reakce spočívá ve tvorbě kladně nabitě částice, která je následně napadena karbonylovým kyslíkem monomeru. Kationtovou polymeraci je obtížné řídit a často vznikají polymery s nízkou molekulovou hmotností [43; 44].

Třetím mechanismem je monomerem aktivovaná polymerace otevíráním cyklu. Tato reakce zahrnuje aktivaci molekul monomeru katalyzátorem. Po proběhnutí reakce následuje připojení aktivovaného monomeru na konec polymerního řetězce [45].

Posledním typem této polymerace je tzv. koordinačně-inzerční, neboli pseudoaniontový mechanismus, který patří mezi nejpoužívanější typ ROP polymerace. U tohoto typu propagace probíhá koordinací monomeru ke katalyzátoru. Po tomto kroku následuje vložení monomeru do vazby kov-kyslík přeskupením elektronů [46]. Rostoucí řetězec zůstává během propagace připojený ke kovu díky alkoxydové vazbě. Reakce je ukončena hydrolýzou za vytvoření koncové hydroxyskupiny. S funkčními alkoxydsubstituovanými iniciátory se vyrábějí monomery s koncovými skupinami aktivními v postpolymeračních reakcích [47]. Na obr. 8 je reakce znázorněna.



Obr. 8: Koordinačně-inzerční mechanismus ROP [37]

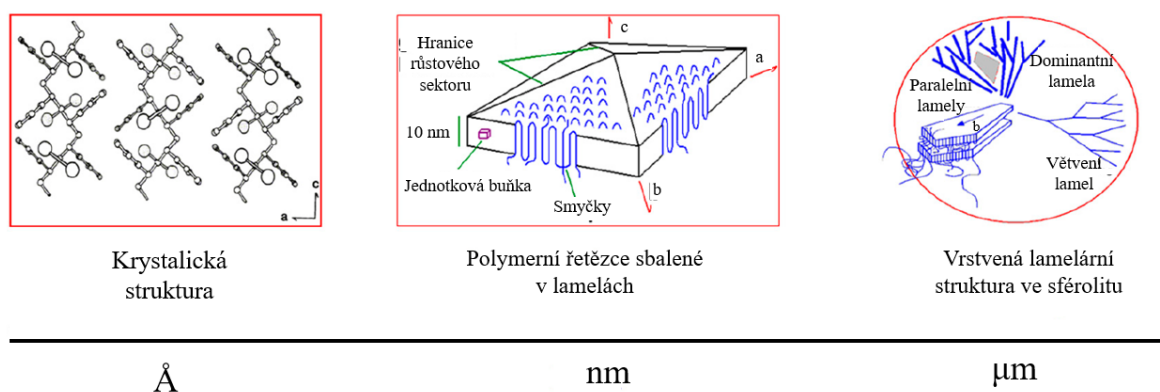
2.1.2 Katalyzátory

Mezi velmi používané katalyzátory patří alkalické katalyzátory na bázi kovů [48]. U těchto katalyzátorů je mechanismus ROP polymerace aniontový a jedná se o iontové sloučeniny. Mezi tyto katalyzátory patří diisopropylamid lithný a cyklopentadienyl sodný [37]. Do skupiny katalyzátorů na bázi kovů patří dále katalyzátory kovů alkalických zemin. Jedná se

o hojně využívané katalyzátory díky velmi dobré aktivitě a nízké toxicitě. Mezi nejpoužívanější katalyzátory tohoto typu patří vápník a hořčík. V případě hořčíku se jedná o vůbec nejrozšířenější kov alkalických zemin. Velkou výhodou tohoto prvku je jeho biologická neškodnost a díky tomu se jedná o slibný kov, který slouží při syntéze polymerů, které mají uplatnění v biomedicínských aplikacích [49]. Do skupiny katalyzátorů méně ušlechtilých kovů patří hliník a cín. Hliník je méně aktivní katalyzátor, ovšem je velmi široce používán díky tomu, že zapříčiňuje velmi dobrou kontrolu nad reakcí. Jedná se například o triflát hlinitý [50]. Mezi často používaný katalyzátor na bázi cínu patří ethylhexanoát cínatý. Hlavní přednosti tohoto katalyzátoru je účinnost, komerční dostupnost, snadná manipulace a rozpustnost v běžných organických rozpouštědlech. Do skupiny katalyzátorů na bázi přechodových kovů patří titan a zirkon. Dalšími katalyzátory na bázi kovů jsou katalyzátory na bázi kovů vzácných zemin. Tyto katalyzátory mají mírnou kyselost a téměř žádnou toxicitu. Jedná se například o skandium trifaláty v kombinaci s vodou a benzylalkoholem jako iniciátorem [51].

2.2 Krystalizace polykaprolaktonu

Pojem krystalizace (růst krystalů) je druh fázové přeměny, při které dochází k pravidelnému uspořádání částic do krystalové mřížky. Princip krystalizace je založen na zákonech termodynamiky. V případě polymerů dochází při krystalizaci ke skládání řetězců lamel, které jsou organizovaně uspořádány [52; 53]. Schématické znázornění struktury a organizace lamel sférolitu je uvedeno na obr. 9.

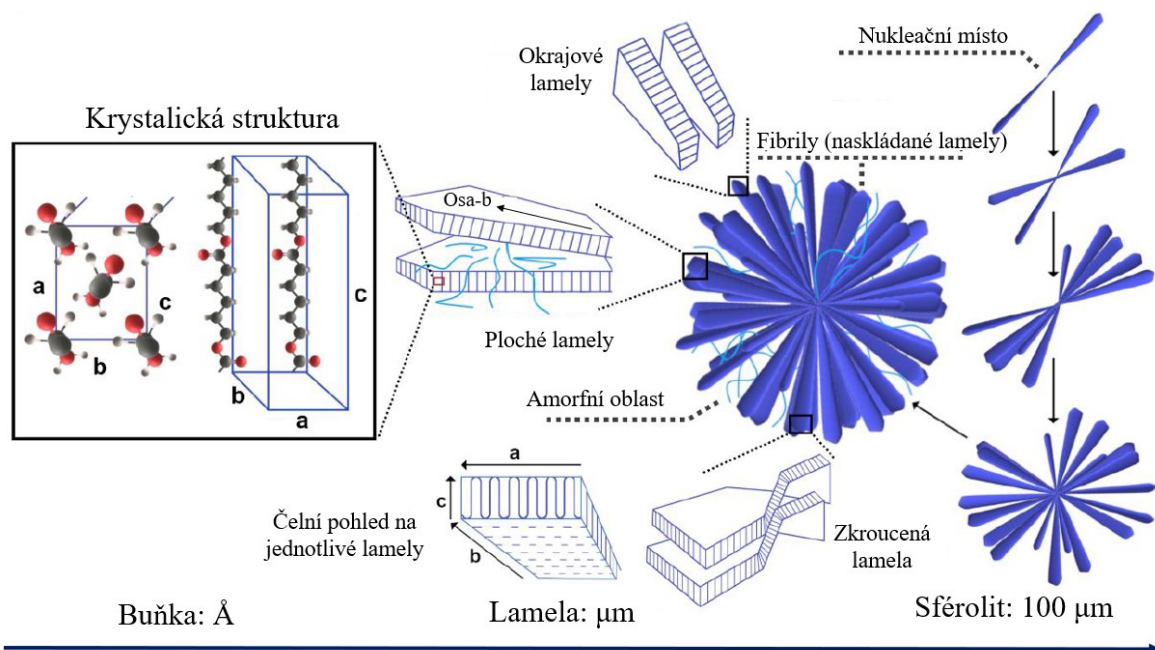


Obr. 9: Schématické znázornění víceúrovňové struktury uspořádání a organizaci lamel složeného řetězce v polymerním sférolitu [54]

Polymery krystalizují z taveniny nebo koncentrovaných roztoků [54]. Ke zkoumání sférolitů krystalických polymerů se používají tenké vrstvy o tloušťce v řádech desítek nanometrů až do několika mikrometrů [55]. Konkrétně pro polymerní sférolitické morfologie, které

vykazují radiální symetrii, je charakteristické, že četné lamelární fibrily se postupně prodlužují radiálním směrem synchronně [56]. Orientace radiálních lamel může být stejnoměrná, nahodilá nebo periodicky zkroucená. Dále se rozlišují dva případy radiálního uspořádání lamel, které mohou být buď kontinuální nebo diskrétní. Změna radiální organizace lamel má za následek možnost vzniku různých druhů sférolitických výrůstků v tenkých polymerních filmech, nezávisle na jeho chemické a krystalické struktuře [57].

PCL se velmi často používá jako vzorový materiál pro studium krystalizace polymerních materiálů díky své jednoduché chemické a krystalické struktuře [58]. Na obr. 10 je znázorněna orientace polymerních řetězců a krystalické základní buňky PCL spolu s krystalovými osami lamely vytvořené z těsně složených řetězců. Sféroлит se skládá z vysoce uspořádaných lamel, které jsou spojeny do amorfni oblasti v různé orientaci. Růst sférolitu během krystalizace polymeru začíná v místě nukleace. Velikost je řízena nukleací sférolitu a pohybuje se v řádech desítek μm s tloušťkou $10 \mu\text{m}$ [58].

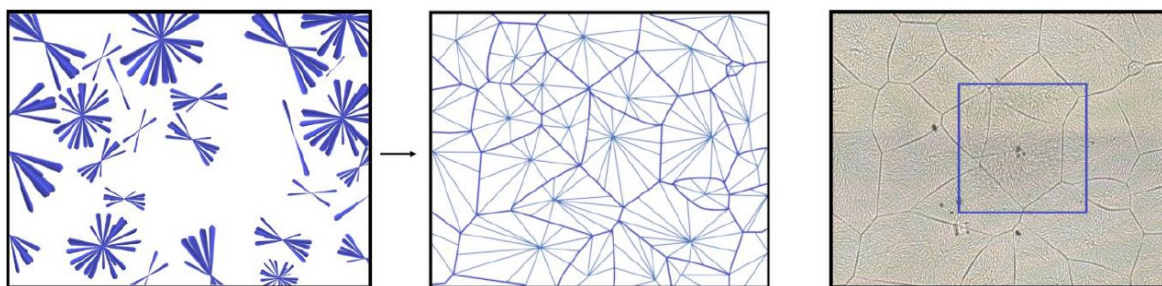


Obr. 10: Hierarchická struktura polymerního sférolitu [58]

Krystalizace PCL lze dosáhnout jak z taveniny, tak pomocí odpařování tenkých filmů litých z roztoku. Krystalizace PCL při různých podmínkách chlazení nebo odpařování rozpouštědla má za následek vznik různých optických rysů sférolitů, mezi které patří maltézské kříže, nedvojlomné a poloviční dvojlomné soustředěné prstence a páskované spirály [54].

2.2.1 Klasické sférolity

Roztok nebo tavenina semikrystalického polymeru krystalizuje do formy sférolitů a krystalizace každého z nich začíná v místě nukleace. Sférolit tudíž lze popsat jako sféricky symetrické shluky krystalů. Ve většině případů se v polymerních filmech sférolity objevují v ploché formě s radiální symetrií a rostou do té doby, než dojde k zastavení nukleace [59]. Na obr. 11 je schématické znázornění krystalizace s mikroskopickým obrázkem PCL filmu s vyznačeným sférolitem. S velkým počtem nukleačních míst spolu sférolity při růstu vzájemně interagují [58].



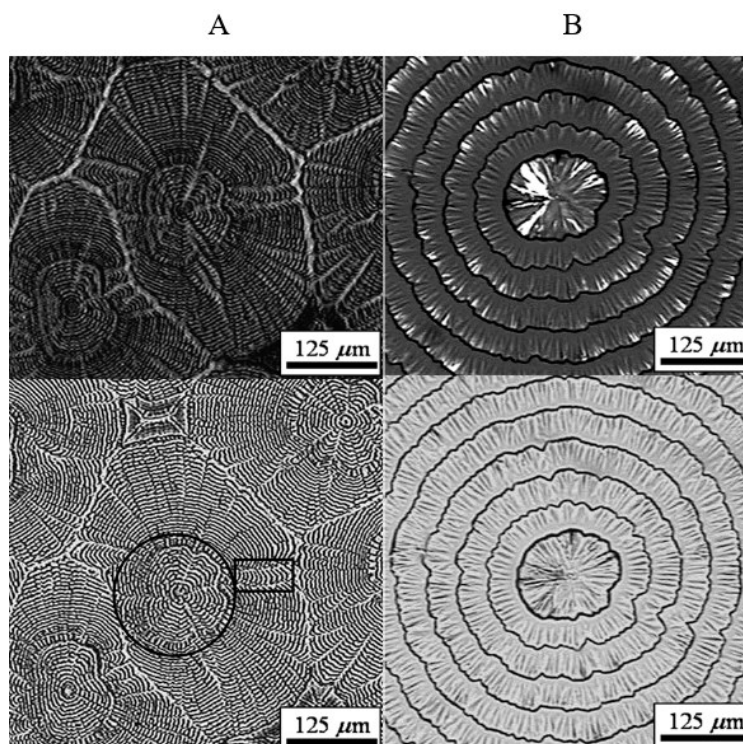
Obr. 11: PCL film: vlevo a uprostřed – schématické znázornění krystalizace, vpravo – snímek klasických radiálních sférolitů z optického mikroskopu [58]

Dlouhé fibrily, které lze snadno detekovat pomocí optické mikroskopie se skládají z lamel, které jsou orientované paralelně v oddělených amorfních oblastech. Volný prostor mezi fibrilami může být vyplněn amorfní fází, nebo zůstává mnohdy zcela nevyplněný. S pomocí mikroskopie atomárních sil lze pozorovat, že v raných fázích růstu se sférolity objevují ve formě svazků lamel a během krystalizace růstu se krystaly od sebe postupně oddalují a vyplňují prostor [59]. Jednoduchá lamela, která je vytvořena z vysoce orientovaných řetězců poskládaných několikrát do sebe zapřičiňuje, že jednoduché řetězce prochází lamelovou strukturou několikrát. Amorfní oblasti mezi lamelami jsou vytvořeny z různých záhybů, stočení, konců řetězců a polymerních řetězců bez pravidelného uspořádání [58].

2.2.2 Prstencové sférolity

Krystalizací PCL při teplotách ($55^{\circ}\text{C} \geq T_c \geq 50^{\circ}\text{C}$) blízkých teploty tání ($T_m=61^{\circ}\text{C}$) vznikají páskované sférolity. Tyto struktury vykazují určitou periodicitu, která se dá stanovit například pomocí polarizované optické mikroskopie. Z oscilace řádových parametrů krystalických os lze dokázat, že pruhování v čistém PCL je výsledkem lamel rostoucích spirálovitě podél poloměru sférolitů [60].

Polymerní sférolitické krystaly obecně vykazují kontinuální strukturu fibrilárních lamel podél radiálního směru růstu. Netradiční morfologii soustředěných prstenců s pravidelnou změnou radiální tloušťky pramenící z diskrétního uspořádání radiálních lamel lze občas pozorovat u 2D sférolitů, jestliže polymer krystalizuje z tenkých vrstev, což má za následek vzniku nedvojlomných soustředěných prstencových krystalů v tenkých vrstvách [61]. Aby došlo ke vzniku takovýchto struktur je důležité, aby perioda kroucení byla užší než interval pravidelné krystalizace. Velké soustředěné prstence vykazuje PCL, u kterého jsou vnitřní dvojité pásy totožné s pásy tradičních sférolitů s extinkčním pásem z polymerů vykazujících biaxiální krystalové struktury [62]. Wang et al. použili k rozpuštění PCL dobré rozpouštědlo, toluen, který měl nízkou molekulovou hmotnost a možnost následného řízení pomalého odpařování rozpouštědla, aby došlo ke snížení rychlosti sférolitického radiálního růstu ve filmech odlévaných z roztoku. Vznikaly tak soustředěné prstencové sférolity. Jednalo se o nedvojlomnou a dvojlomnou strukturu prstencové morfologie [63]. Lamelární mikrostruktury naznačují, že velké soustředěné prstence pocházejí z pravidelné změny tloušťky způsobené diskrétním uspořádáním radiálních lamel a dvojité pruhování je optický jev periodického kroucení biaxiálních lamel [62]. Na obr. 12 je struktura takových útvarů.



Obr. 12: Prstencová morfologie A) nedvojlomné, B) dvojlomné struktury PCL sférolitů [64]

Takové periodické vzory mají původ v diskretním vrstvení radiálních lamel indukovaném pravidelnou krystalizací. Dvojlomná vlastnost závisí na počáteční koncentraci roztoku. Nižší koncentrace roztoku má za následek tenčí film, ve kterém jsou sférolity složeny téměř ze stejnoměrných plochých lamel v důsledku kombinace polymer-substrát a pomalého radiálního růstu sférolitů, a proto je pozorován jednoosý PCL sférolit s radiálním a tangenciálním směrem podél pevné krystalografické osy [63]. Tvorbu prstencových sférolitů dále indukuje přítomnost příměsi ve struktuře PCL [65].

2.3 Charakterizace krystalické struktury materiálu

Ke zkoumání krystalických struktur slouží například rentgenová krystalografie, která snímá krystalické fáze s dostatečnou symetrií. Dále lze využít například modulační infračervenou reflexní absorpční spektroskopii, kalorimetrii nebo nukleární magnetickou rezonanci. Tyto techniky poskytují velmi omezené prostorové rozlišení. Z mikroskopických technik lze zmínit například elektronovou mikroskopii, polarizovanou optickou mikroskopii a mikroskopii atomárních sil, která nabízí vynikající prostorové rozlišení. Nevýhodou u mikroskopických technik je do jisté míry složitá příprava vzorku na samotnou charakterizaci. Klasické spektroskopické techniky, mezi které řadíme infračervenou a Ramanovu spektroskopii, rovněž poskytují množství informací [66].

2.4 Biodegradace a biokompatibilita

Polykaprolakton je v organismu biologicky rozložitelný, což je zásadní pro jeho aplikace v tkáňovém inženýrství. Degradace v lidském organismu trvá delší dobu z důvodu nedostatku potřebných enzymů. Degradace tedy probíhá hydrolyticky, a to z povrchu nebo v objemu. Délka rozkladu PCL v tkáních trvá v rozsahu jednotek měsíců a v extrémních případech až několik let [67; 68].

PCL byl schválen agenturou Food and Drug Administration (FDA) pro specifické aplikace používané v lidském těle jako zařízení pro kontrolu a dodávání léčiv [69]. Jedná se tedy o biokompatibilní polymer (bez negativních účinků na lidský organismu, ačkoliv je jeho biokompatibilita nižší například ve srovnání s kyselinou polymléčnou). Zásadní dále je skutečnost, že degraduje na netoxické produkty, které se z organismu přirozeně vylučují [70].

2.5 Využití

Vlastnosti PCL umožňují řadu aplikací. PCL v organismu degraduje a disponuje snadnou mísitelností s řadou komerčně dostupných polymerů a rozpouštědel [71]. PCL je používán například v dlouhodobých implantátech nebo pro aplikace s řízeným uvolňováním léčiv. Bohužel ale taky trpí určitými nedostatky, mezi které patří právě pomalá rychlost degradace, nízká adheze buněk a v některých případech taky horší mechanické vlastnosti. Začlenění například keramiky na bázi fosforečnanu vápenatého a bioaktivních skel poskytuje hybridní biomateriály, které vykazují zlepšené mechanické vlastnosti a taky kontrolovatelnou rychlost degradace a díky tomu jsou již takové materiály vhodnější pro tkáňové inženýrství [34].

2.5.1 Medicínské aplikace

PCL se používá například v oblasti estetické medicíny ve formě dermálních výplní na bázi mikrokuliček, přičemž je využíváno stimulační produkce kolagenu korigující známky stárnutí obličeje [72; 73]. Ve stomatologii se používá jako kompozit pro součást dentálních dlah při výplni kořenových kanálků. Chování tohoto kompozitu je velmi podobné gutaperči a díky tomu pro účely opětovného zpracování může být změkčen teplem, nebo rozpuštěn v organických rozpouštědlech. Výhodou tohoto kompozitu oproti gutaperči je ta, že kompozit na bázi PCL je biologicky odbouratelný [74]. Dále PCL a jeho kompozity nacházejí uplatnění v lékařských pomůckách, mezi které patří nitě na stehy, obvazy, různá fixační zařízení atd. [68].

2.5.2 Tkáňové inženýrství

Pro aplikaci v tkáňovém inženýrství se v současné době častěji používají syntetické než přírodní polymery, jelikož přírodní polymery mají větší tendenci kontaminovat zasaženou tkáň a taky mnohdy u těchto polymerů bývá horší pevnost související například s nízkou molekulovou hmotností [75; 76]. Syntetické polymery disponují laditelnými mechanickými vlastnostmi, které jsou přesně žádoucí z hlediska aplikace do lidského organismu. Mírnou nevýhodou syntetickým biomateriálů je to, že mohou v určitých případech v místě aplikace do organismu způsobit zánět nebo alergickou reakci, ovšem i navzdory tomuto nedostatku jsou pořád ve velké míře používány na výrobu scaffoldů pro podporu a růst tkání [77]. Scaffoldy na bázi PCL jsou vyvíjeny například pro léčbu zlomených kostí, přetržených vazů atd. Pro některé aplikace je vhodné PCL kombinovat s dalšími materiály za účelem

vytvoření kompozitu, aby se eliminovaly některé nedostatky PCL. Často volenou zpracovatelskou technikou pro přípravu PCL scaffoldů je 3D biotisk a elektrospinning. Zvýšení adheze buněk k PCL povrchu je možné například tvorbou porézního povrchu příměsí pórotvorného činidla [78].

3 HEDVÁBÍ BOURCE MORUŠOVÉHO

Hedvábí patří mezi přírodní vlákna. Hedvábné vlákno je tvořeno dvěma typy proteinů, fibroinem a sericinem. Nejpoužívanější typ hedvábí je produkován larvami bource morušového [79]. Fibroin z vlákna *Bombyx mori* je přírodní biopolymer, který má poměrně rozsáhlé aplikační možnosti, z historického hlediska zejména při operacích a lékařských zákrocích v podobě stehů. V současné době se hedvábné stehy používají například při operacích očí, rtů a obecně při léčbě kožních ran [80].

3.1 Hedvábí v nativním stavu

Neboli přírodní hedvábný protein, který je produkován bourcem morušovým vzniká v hedvábném zvlákňovacím orgánu složeném ze dvou žláz umístěných laterálně v těle larvy. Každá žláza se skládá z přední, střední, zadní části a trysky. Fibroin a sericin jsou syntetizovány v jednotlivých částech hedvábné žlázy a v kapalné formě jsou obsaženy v dutině. Kapalný obsah je po skončení posledního larválního stádia vylučován tryskou a díky specifickým mechanickým podmínkám dochází ke zvlákňování a tvorbě kokonu. Délka tohoto procesu trvá v závislosti na podmínkách přibližně 2-5 dní. Tento proces bude podrobně popsán v následující podkapitole [81].

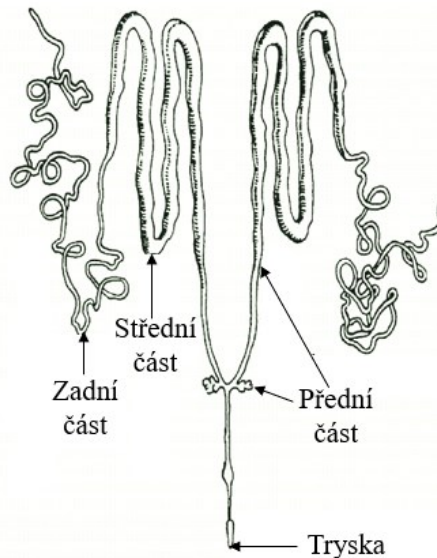
3.1.1 Vznik hedvábí v přírodě

Životní cyklus motýle bource morušového trvá přibližně 60 dnů. Během tohoto období projde vývojovými stádii-vajíčko, housenka, kukla a dospělec. Tvorba kokonu je ovlivněna celou řadou přírodních podmínek, jeho tvorba trvá v řádu jednotek dnů. Na obr. 13 je housenka a kokon *Bombyx mori*.



Obr. 13: Vlevo housenka, vpravo kokon *Bombyx mori* [30]

Larvy *Bombyx mori* mají pár snovacích žláz, které jsou v těle symetricky umístěny. Každá žláza je připojena k úzkému kanálku zakončeného tryškou ve spodní části pysku housenky. Na obr. 14 je zobrazena snovací žláza.



Obr. 14: Snovací žláza [30]

Proces tvorby hedvábného vlákna je založen na principu suchého zvlákňování z vodného roztoku fibroinu a díky specifickým podmínkám dochází k separaci vlákna [82]. V průběhu tohoto stádia se pomocí dvou otvorů ve spodní části hlavy uvolňuje v polotekutém stavu vlákno vlivem specifických pohybů housenky. Vlákna mají obvykle délku v řádech jednoho metru [83]. Během zvlákňování mění hedvábný protein sekundární strukturu z rozpustné konformace náhodného klubka a α -šroubovice (SILK I) na stabilní semikrystalickou formu s β -skládanými listy (SILK II). Postupný transformační přechod je zapříčiněn koncentračním a pH gradientem při syntéze a průchodu proteinového roztoku hedvábnou žlázou [84].

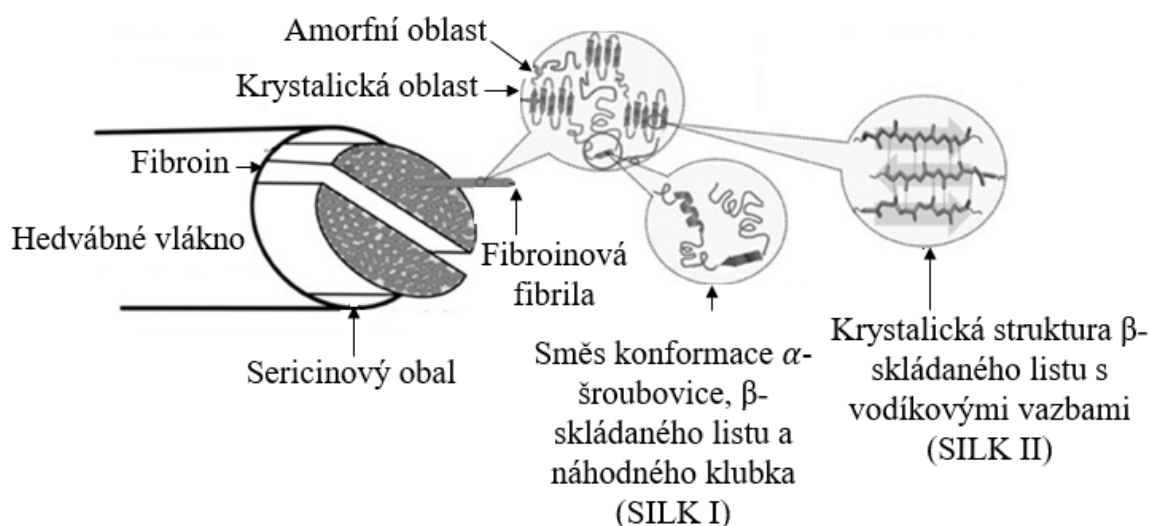
3.1.2 Struktura vlákna

Hedvábné vlákno se skládá z dvou fibroinových vláken, které jsou obaleny sericinem. Fibroinová vlákna mají průměr v rozmezí 10-25 μm . Sericin je adhezivní glykoprotein, který tvoří kolem 30% hmotnosti zámotku hedvábí a funguje zde jako ochranná vrstva vláken fibroinu [85].

Fibroin

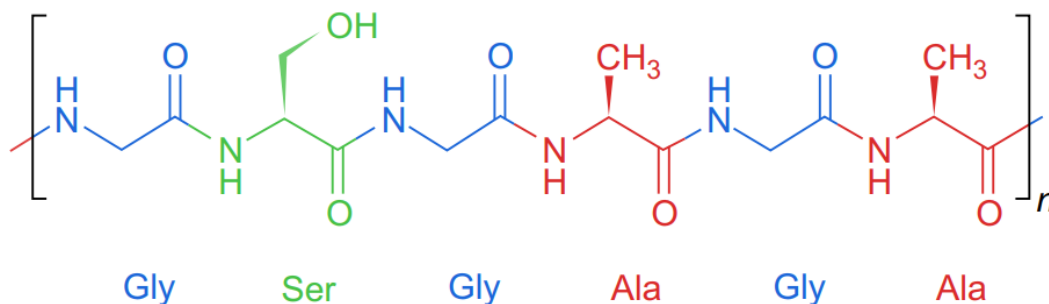
Tento druh proteinu je syntetizován v zadní části snovací žlázy. Kromě fibroinu se v zadní části syntetizují taky bílkoviny, které pomáhají fibroinu k přeměně z tekuté formy na vlákno,

kteří slouží k ochraně před rozpadem a posléze plní funkci jisté ochrany pro kokony s housenkami před predátory [86]. Fibroin se skládá z těžkého a lehkého polypeptidového řetězce, přičemž molární hmotnost těžkého řetězce je kolem 390 kDa a lehkého řetězce asi 26 kDa v molárním poměru 1:1 [87; 88; 89]. Tvorba komplexu na lehkém řetězci je zapříčiněna cysteinem na C-konci těžkého řetězce přes disulfidickou vazbu. Tento komplex dvou řetězců je nekovalentně vázán pomocí glykoproteinu P25 s molekulovou hmotností 25 kDa v poměru 6:1 (těžký:lehký) řetězec, který obsahuje vázané oligosacharidové řetězce a díky hydrofobním interakcím vytváří základní micelární jednotku během zvlákňovacího procesu [90; 91; 92; 93]. Na obr. 15 je struktura hedvábného vlákna.



Obr. 15: Stavba hedvábného vlákna [94]

Hedvábné vlákno se z drtivé většiny skládá z aminokyselin. Konkrétně, v těžkém řetězci je zastoupení glycinu (43-46%), alaninu (25-30%), serinu (12%), tyrosinu (5%) a valinu (2%). Dále se ve velmi malé míře ještě vyskytuje kyselina asparagová, glutamová, lysin, histidin a fenylalanin [30; 95]. Těžký řetězec obsahuje 12 hydrofobních domén, které jsou tvořeny aminokyselinovými sekvencemi Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala a ty jsou vzájemně odděleny 11 hydrofilními doménami. Na obr. 16 je tato struktura znázorněna.



Obr. 16: Primární struktura fibroinu [95]

Jak již bylo zmíněno, největší zastoupení v sekvenci aminokyselin má glycin, díky kterému je zajištěna konformační variabilita, která je charakteristická tzv. polymorfním chováním fibroinu. V případě sekundární struktury fibroinu je situace o poznání složitější, jelikož zde hraje roli několik faktorů [96]. Repetitivní bloky aminokyselin jsou schopné vytvářet krystalickou strukturu, která je tvořena antiparalelními β -skládanými listy pomocí intermolekulárních a intramolekulárních interakcí [97; 98; 99]. Hydrofilní části lehkého řetězce jsou tvořeny kyselinou asparagovou, lysinem a argininem, které představují amorfni oblasti fibroinu umožňující stáčení řetězce při krystalizaci během zvláknovacího procesu a jsou charakteristické velmi malou, téměř žádnou krystalinitou [100; 101]. V hydrofobní části se nejvíce vyskytuje glycin, serin a alanin. Tyto části jsou spojeny do krystalických oblastí s vodíkovými můstky a Van der Waalsovými silami a způsobují velmi dobré mechanické vlastnosti a vysokou nerozpustnost ve vodě, zředěných kyselinách a většině organických rozpouštědel [102; 103]. Mezi další kritické faktory, které určují mechanické vlastnosti patří počet, velikost, orientace, distribuce a prostorové uspořádání krystalických a nekrystalických domén v nanometrovém měřítku. Hedvábné vlákno se dále skládá z mikrovláknenných svazků mající šířku v jednotkách mikrometru, přičemž každý svazek obsahuje nanokrystaly a polykrystalické domény [104; 105; 106].

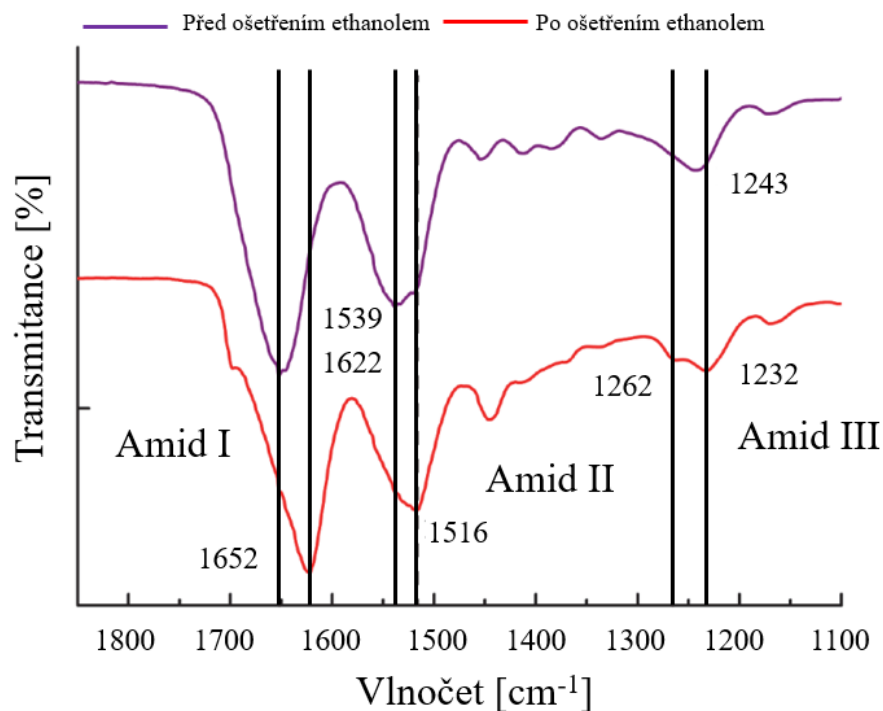
3.1.3 Konformační přechod

Jak již bylo řečeno u procesu zvláknování, jestliže se fibroin nachází v konformaci náhodného klubka (α -šroubovice) je taková struktura rozpustná ve vodě. Tuto strukturu taky lze označit jako SILK I a jedná se o amorfni strukturu. Druhá forma se nazývá semikrystalická a skládá se převážně z β -skládaných listů. Tato forma hedvábného vlákna je charakteristická nerozpustností ve většině organických rozpouštědel. Této formy lze dosáhnout různými fyzikálně-chemickými vlivy, mezi které patří například zahřátí na vysokou teplotu, mechanické namáhání, nebo ošetření povrchu alkoholem [107]. V případě

ošetření alkoholem účinnost modifikace závisí na polaritě alkoholu [108], přičemž nejvyššího podílu β -skládaného listu bývá dosaženo při ošetření methanolem [109]. Tento přechod ze stavu SILK I do stavu SILK II nastává díky změně vodíkových vazeb mezi peptidovými řetězci. Takto indukovaný stav SILK II je hodně podobný přírodnímu hedvábnému vláknu, jehož struktura po zvláknění se skládá přibližně z 55% β -skládaných listů, které jsou dispergované v amorfní matici. Rychlost tohoto procesu závisí na mechanismech rozpadu aktuálních a nově vzniklých vodíkových vazeb. Voda při transformaci způsobuje bobtnání fibroinového filmu a usnadňuje pohyb segmentů řetězce fibroinu [110].

3.1.4 Charakterizace konformačního přechodu

Existuje několik metod, kterými lze charakterizovat jednotlivé složení a strukturu hedvábného proteinu. Mezi nejjednodušší a poměrně spolehlivou metodu patří infračervená spektroskopie [96]. Konkrétně pro spektrum hedvábného proteinu jsou charakteristické vlnočty značící Amidy. Pro Amid I patří vlnočty v rozsahu $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$. Vibrace toho Amidu jsou ovlivněny již několikrát zmíněnou sekundární strukturou proteinu a taky pevností vodíkových vazeb. Amid II se nachází na vlnočtech $1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$. Tento typ Amidu je dán kombinací deformačních vibrací NH skupin a valenčních vibrací CN skupin. Amid III absorbuje nejnižší vlnočty a to kolem $1400\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$. Tato oblast není vhodná pro analýzu sekundární struktury, jelikož je ovlivněna variabilními příspěvky jednotlivých vibrací hlavních a postranních řetězců. Ve spektru hedvábné proteinu se kromě charakteristických Amidových vibrací dále ještě vyskytují v oblasti $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ valenční vibrace skupiny OH a NH. Mírný pás na vlnočtu 2900 cm^{-1} je charakteristický pro alifatické CH valenční vibrace [111; 112; 113]. Na obr. 17 je FTIR spektrum fibroinu bez modifikace a fibroinu ošetřeného ethanolem. Změnu konformace lze pozorovat na maximech charakteristických pro skupiny Amid I, Amid II a Amid III. Po ošetření ethanolem lze pozorovat, že dochází k transformaci sekundární struktury doprovázené posunem maximálních hodnot absorbance k nižším vlnočtům pro všechny skupiny, který je způsoben zánikem α -šroubovice a tvorbou β -skládaných listů [114; 115].



Obr. 17: FTIR spektrum hedvábného proteinu před a po šetřením ethanolém [115]

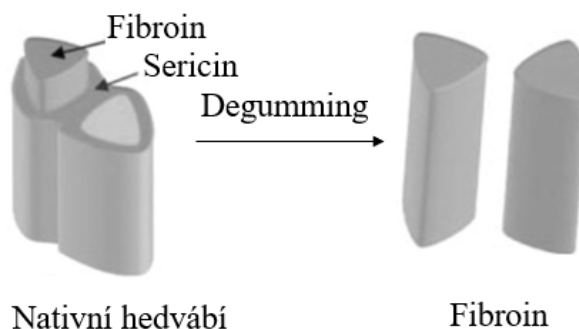
3.2 Regenerované hedvábí

Regenerovaný hedvábný protein je získáván izolováním z kokonů bource morušového případně z odpadu textilní výroby [116]. Nativní hedvábí je obtížné zpracovatelné z důvodu špatné rozpustnosti a vysoké teplotní odolnosti, proto je nezbytné protein izolovat a převést do lépe zpracovatelné formy, které nabízí široké uplatnění. V průběhu izolace je získán čistý fibroin, sericin se v průběhu procesu čištění odstraní, a tudíž materiál ztrácí po provedení tohoto kroku 30% své hmotnosti. Co se týká mechanických vlastností regenerovaného hedvábí, tak ty jsou o poznání horší s porovnáním s hedvábí v nativním stavu. Toto je zapříčiněno strukturálními změnami a taky částečnou denaturací proteinu. Během rozpouštěcího procesu dochází ke štěpení směsi polypeptidových řetězců, které mají velikost kolem 100 kDa. Stupeň degradace takto rozpuštěného hedvábí lze ovlivnit použitým rozpouštědlem [117]. Po převedení hedvábného proteinu do zpracovatelné formy získáme roztok, ze kterého lze připravit velkou škálu morfologií, mezi které patří například hydrogely, mikrovlákna, 3D scaffoldy a filmy [118].

3.2.1 Zpracování

Jak již bylo zmíněno výše, přírodní hedvábné vlákno je velmi obtížně zpracovatelné, a proto je nutné z něj odstranit jeden z proteinů, sericin. Po odstranění sericinu selepší

zpracovatelnost, biokompatibilita a sníží se i alergické reakce, které zhoršují využití tohoto materiálu ve farmacii a regenerativní medicíně. Zjednodušený náčrt tohoto procesu je na obr. 18.



Obr. 18: Proces odstranění sericinu [30]

Tento proces odstranění sericinu se nazývá degumming. Volba rozpouštědla pro následné rozpouštění izolovaného fibroinu má klíčový vliv na mechanismus samotného rozpouštění, schopnost gelovatění, formování filmu a tendenci fibroinu ke konformačním přechodům [119; 120]. Blíže bude postup zpracování popsán v experimentální části práce.

3.3 Využití

Hedvábí se jako šicí materiál v medicíně používá poměrně dlouho, v současné době se aplikace dramaticky rozšiřují například pro hojení ran, cílenou dopravu léčiv nebo 3D matrice pro tkáňové inženýrství. Jak již bylo zmíněno, velká přednost hedvábí spočívá v tom, že disponuje podobnou biokompatibilitou, jako běžně používané biomateriály [121; 122]. Mezi další výhody hedvábí patří taky mechanické vlastnosti, které jsou zapříčiněny jeho strukturou a polymorfním charakterem. Stěžejním benefitem hedvábí je možnost navázání růstových faktorů a adhezivních skupin podporující interakci s buňkami na funkční skupiny řetězce [123].

3.3.1 Regenerativní medicína

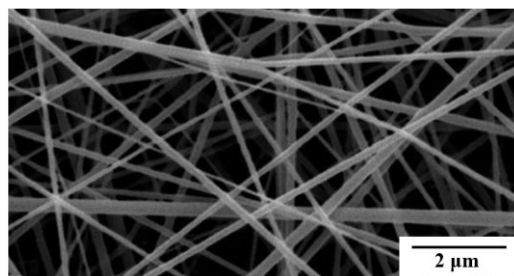
Jedná se o vědní obor, který se věnuje aplikacím tkáňových nebo orgánových implantátů za účelem hojení ran nebo náhrady poškozených tkání a orgánů. Regenerativní medicína je nadřazený pojem již několikrát zmiňovanému tkáňovému inženýrství [124]. Využití v regenerativní medicíně hedvábného proteinu je velmi rozšířené. Hedvábný protein se uplatňuje například u systémů pro hojení ran. Jedná se o vytvoření biokompatibilního obvazového materiálu, který zabraňuje dehydrataci rány, zachovává si vlhké prostředí na

povrchu a slouží jako ochranná bariéra proti nežádoucím mikroorganismům a pachům [125]. Extracelulární matrix stimuluje hojení ran, a proto při vývoji inovativních obvazových materiálů je konstrukčně i složením simulována extracelulární matrix. Tohoto lze docílit pomocí vhodné kombinace paramylonu s hedvábným proteinem. Tato kompozitní fólie vytvořená z těchto dvou materiálů vykazuje dobrou tepelnou stabilitu a hydrofobitu [126].

Dále lze v regenerativní medicíně použít hedvábný protein pro potah implantátů. Obecně zavedení jakéhokoliv implantátu do lidského těla většinou má za negativní následek různé zdravotní infekce, a proto je vhodné implantáty různě modifikovat. Mezi nejčastější modifikace patří povlakování implantátu hedvábného proteinu pomocí sprejování a namáčení. Zde není nutné, jako například u 3D tisku využívat kompozitní materiál, ale je možno využít čistého fibroinu, jelikož při použití dalších rozpouštědel dochází k poškození materiálu v místě implantátu [127].

3.3.2 Fibroinová nanovlákna

Vlákna z hedvábného fibroinu se nejčastěji připravují pomocí metody vícevrstvého elektrostatického zvlákňování. Touto metodou vznikají vlákna mající průměr desítky až stovky nanometrů. Výhodou elektrostatického zvlákňování je regulace mechanických vlastností, průměru a struktury vláken během samotného procesu [128; 129]. Jak již bylo zmíněno výše, strukturu β -skládaného listu ve fibroinových vláknech lze ovlivnit ošetřením pomocí methanolu. Struktura morfologie nanovláken určitým způsobem připomíná extracelulární matrix, díky které jsou vytvořeny velmi dobré podmínky pro růst buněk. Fibroinová nanovlákna nacházejí uplatnění jako materiál pro tvorbu náhrady kostní, chrupavčité tkáně, ale taky při výrobě obvazů [130]. Na obr. 19 uveden příklad hedvábných vláken.



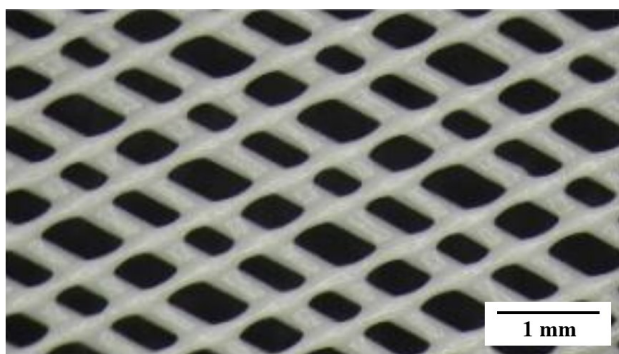
Obr. 19: Nanovlákna z hedvábného proteinu [128]

3.3.3 Nanočástice

Částice hedvábí nacházejí velké uplatnění v kosmetice jako přípravky pečující o pleť. Další uplatnění nacházejí například v medicíně pro dopravu léčiv a enzymů. Existuje několik způsobů, jak lze nanočástice získat. Mezi nejpoužívanější patří srážení (precipitace) vodného roztoku přebytkem polárního rozpouštědla, mezi které patří ethanol, aceton a methanol. Toto způsobuje, že fibroinu se změní struktura z náhodného klubka na konformaci β -skládaných listů. Další metody pro vznik hedvábných nanočástic patří fázová separace pomocí dihydrogenfosforečnanu draselného. Velikost pórů nanočástic se pohybuje v řádech desítek až stovek mikrometrů, přičemž použitou metodou lze ovlivnit velikost pórů [131]. Hedvábí je velmi dobrý materiál pro trvalé dodávání léčiv díky své velmi dobré biokompatibilitě, mechanickým vlastnostem, laditelné biodegradabilitě pro řízené uvolňování léčiv [132].

3.3.4 3D tisk

Změny v sekundární struktuře hedvábného proteinu zapříčiňují, že zpracování samotného materiálu 3D tiskem je téměř nemožné, a proto se hedvábný protein kombinuje s jinými biomateriály, mezi které patří například kyselina hyaluronová, chitosan a polyethylenglykol. Vytvoření takových kompozitů na bázi hedvábného proteinu je umožněna optimalizace reologických vlastností, biokompatibility a taky je potlačena nežádoucí imunitní reakce při aplikaci do organismu. Další výhodou použití 3D tisku hedvábného proteinu je ta, že tato metoda nevyžaduje oproti jiným metodám použití velkého množství chemických činidel, které dále negativně ovlivňují vlastnosti výsledného produktu [133]. Na obr. 20 je znázorněna vytištěná mřížka na bázi hedvábného proteinu.



Obr. 20: Vytištěná mřížka z hedvábného proteinu [134]

4 TEXTUROVANÉ POLYMERNÍ POVRCHY

Různé povrchové úpravy materiálů rozšiřují možnost využití daného biomateriálu v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně. V případě polymerů, které slouží pro tyto aplikace jsou velmi důležité chemické podmínky, které mají stěžejní vliv na kultivaci buněk na povrchu daného substrátu. U filmů povrchová úprava ovlivňuje zejména mechanické vlastnosti, které jsou důležité při diferenciaci buněk na povrchu biomateriálu. Velmi vhodnou metodou pro zvýšení například drsnosti filmu je fyzikální zesíťování. V případě nano měřítka u texturovaných vzorků nedochází k ovlivňování diferenciaci buněk. Konkrétně u fibroinových filmů obohacených tropoelastinem je chování buněk nejvíce ovlivněno průměrnou drsností povrchu a materiální tuhostí. Každé buňce vyhovuje jiný povrch pro optimální růst. Chování kmenových buněk na povrchu je zcela odlišné než například chování svalových buněk. Kmenové buňky preferují spíše drsnější povrchy, proto je nutno brát v potaz o jakou buněčnou linii se u dané aplikace jedná [135; 136].

4.1 Fibroinové filmy

Fibroinové filmy mají velmi širokou škálu aplikací, mezi které patří například systémy pro hojení ran, obvazy, obalové vrstvy implantátů, systémy pro uvolňování léčiv a v poslední době se hodně skloňuje využití hedvábné proteinu v elektronice. Možností přípravy filmů je několik, ale mezi nejpoužívanější patří zejména metoda odlévání z vodného roztoku při následném odpaření rozpouštědla. Jak již bylo zmíněno, sekundární strukturu fibroinu lze ovlivnit procesními podmínkami při zpracování a použitým rozpouštědlem. Například kyselina mravenčí zapříčiňuje vyšší obsah β -skládaných listů ve fibroinovém filmu, naproti tomu hexafluoroisopropanol indukuje strukturu α -šroubovice. Filmy, u kterých je dominantní struktura α -šroubovic, je nutné dodatečně stabilizovat pomocí methanolu vodní parou pomocí žihání. Tyto filmy naopak vykazují větší uspořádanost sekundární struktury. Pomocí chemické modifikace lze ovlivnit porozitu a mikrostrukturu vzniklých filmů. Tyto vlastností mají stěžejní vliv na interakci s buňkami [137; 138; 114; 139]. Velmi používanou technikou pro přípravu fibroinových filmů je odlévání fibroinu v kombinaci s dalšími polymery za následného odpaření rozpouštědla [140]. Ve studiu Kweon et al. připravili filmy z hedvábného fibroinu a chitosanu, na kterých zkoumali mechanické vlastnosti v závislosti na různém podílu chitosanu. Bylo zjištěno, že v těchto směsích nedochází k mikroskopické separaci fází nehledě na směsné poměry. Hustota, stupeň bobtnání a mechanické vlastnosti filmů byly silně ovlivněny obsahem chitosanu ve směsi. Mechanické vlastnosti lze zlepšit

smícháním hedvábného fibroinu s 10-40 % chitosanové složky. Koeficient propustnosti vodní páry směsných filmů byl podobný s koeficientem komerčních obvazů na hojení ran, a proto lze filmy na bázi hedvábného fibroinu a chitosanu použít jako obvaz pro rány díky svým velmi dobrým mechanickým vlastnostem a dobré propustnosti páry a kyslíku [141].

Ve studii Freddi et al. použili k hedvábnému fibroinu celulózu. Připravené filmy byly transparentní a z morfologického hlediska homogenní. Fyzikální vlastnosti filmů závisí na jednotlivých poměrech těchto dvou polymerů. Bylo zjištěno, že přidáním celulózy byla umožněna příprava membrán s vynikajícím elastickým chováním [142].

Ve studii Wang et al. zkoumali filmy na bázi fibroinu a kyseliny hyaluronové. Tyto filmy byly připraveny pomocí metody odlévání z roztoku. Bylo zjištěno, že mezi hedvábným fibroinem a kyselinou hyaluronovou se vytvořily účinné intramolekulární a intermolekulární příčné vazby. Rozpustnost filmů ve vodě se výrazně zlepšila. Filmy dále podporovaly velmi dobře proliferaci buněk. Dále tyto filmy díky mírné povrchové smáčivosti a specifickým vazebným místům pro buňky stimulovaly buněčnou proliferaci a vedly k větší životaschopnosti buněk. Takto připravené filmy mohou mít potenciální uplatnění v tkáňovém inženýrství [143].

4.2 Modifikace povrchu

Úprava povrchové topografie má velmi velký vliv na výsledné vlastnosti a chování povrchové vrstvy filmů. Jak již bylo zmíněno výše, texturizace povrchu hraje důležitou roli v mnoha aspektech, například pro adhezi a proliferaci buněk. Povrchy se většinou modifikují pomocí proteinů a peptidů s funkčními skupinami, které ovlivňují chování buněk. Upravené povrchy zlepšují adhezi, intracelulární interakci a aktivují signální dráhy, které podporují samovolnou obnovu kmenových buněk [144].

4.2.1 Patterning

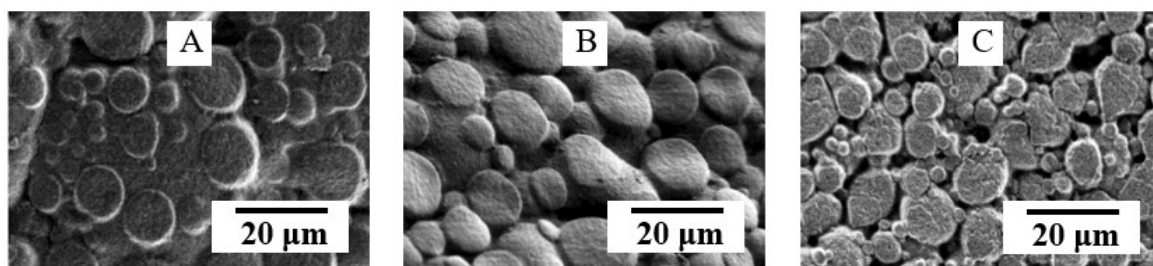
Jedním z nejčastějších způsobů generování povrchové topografie na polymerním filmu je přenesení vzoru z šablony z polydimethylsiloxanu (PDMS). Princip spočívá ve vytvrzení polymerního roztoku krystalizací nebo odpařením rozpouštědla na této šabloně, čímž dochází k přenesení vzoru a stabilizaci struktury [145].

Jedná se o velmi používanou techniku pro modifikaci fibroinové matrice za účelem přípravy různých 3D scaffoldů a texturovaných povrchů na bázi fibroinových roztoků, které jsou nanášeny na nosné destičky. Filmy upravené pomocí lyofilizace mají širokou škálu

uplatnění, může se jednat například o studium angiogeneze. Filmy mají průměr pórů v řádech desítek μm s tloušťkou cca 0,5 mm, přičemž pórovitost tvoří přibližně 80 % [146]. Poměrně značnou nevýhodou při lyofilizaci hedvábného proteinu je to, že dochází k tvorbě tzv. lamelární morfologie, která negativně ovlivňuje následné aplikace. Tento nedostatek lze eliminovat například přidavkem hedvábných nanovláken [147].

4.2.2 Fázová separace

Metody založené na fázové separaci představují velmi rychlý postup při výrobě strukturovaných povrchů. Fázově separační přístupy vychází z různé mísitelnosti dvou polymerních složek nebo polymeru a rozpouštědla. Během fázové separace dochází ke změně morfologie povrchu filmu, která je charakteristická vznikem pórovité struktury. Mezi nejdůležitější parametry, kterými lze ovlivnit výslednou strukturu filmu patří typ rozpouštědla, teplota, chemické složení, koncentrace polymerního roztoku a v poslední řadě rychlost odpařování rozpouštědla, kterým lze poměrně značně ovlivnit symetrii a velikost vzniklých pórů [148]. V případě fibroinu byly vyvíjeny například texturované filmy založené na fázové separaci fibroinu a polyethylen oxidu (PEO). Tento syntetický polymer byl zamíchan do hedvábné matrice z toho důvodu, že je velmi dobře biokompatibilní a taky rozpustný ve vodě. [149]. Ukázka PEO-fibroinových filmů je znázorněna na obr. 21.



Obr. 21: Ukázka filmů na bázi fibroinu a PEO vytvořených pomocí fázové separace [149]
Polymerní roztok je odléván při velké vlhkosti, čímž dochází ke kondenzaci kapiček vody na povrchu odpařujícího se polymerního roztoku, což má za následek velkou organizaci kapiček vody a vzniku velmi porézní struktury. Tvorba povrchových pórů probíhá ve třech fázích. V první řadě dochází nejprve k odpařování rozpouštědla z roztoku, což vede k ochlazení povrchu. Dále dochází na povrchu ke kondenzaci vlhkosti ve formě kapiček vody, které mají pravidelné uspořádání. V poslední fázi po ochlazení na okolní teplotu dochází k odpaření zbytku rozpouštědla a kondenzace vody má za následek vznik voštinové struktury. Nesmírně důležitou roli na tvorbu kapiček vody hraje použité rozpouštědlo, které se volí s ohledem na několik faktorů (rozpustnost ve vodě, hustota, bod varu, tlak par). U

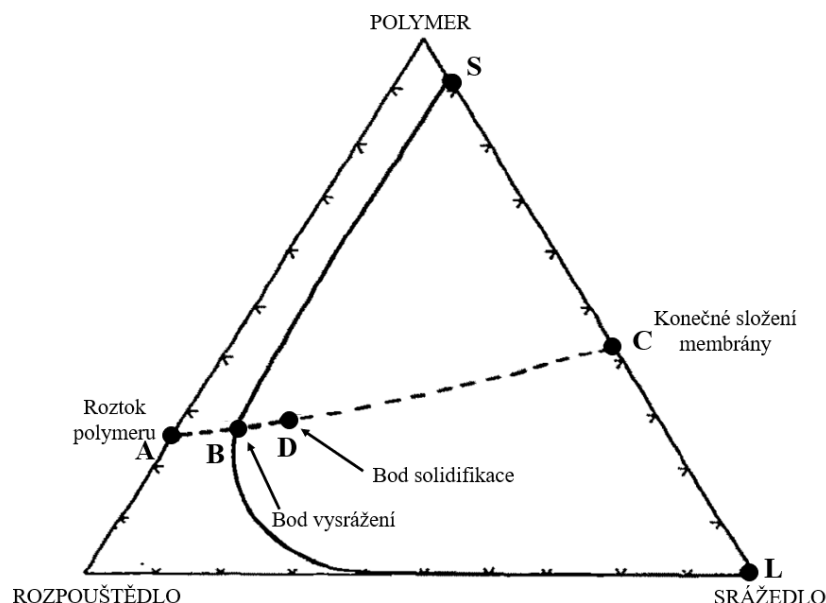
této metody je taky důležité, aby se kapičky vody stabilizovaly na povrchu a nedocházelo k jejím rozpouštění na polymerním povrchu. Z tohoto důvodu je určité omezení této metody v případě použití fibroinových filmů, u kterých je důležité následné odlití [150].

Působení směsi rozpouštědel

Dalším přístupem k fázově separačním úpravám povrchu je tvarování povrchu působením dobrého a špatného rozpouštědla. Princip této metody je založen na dávkování směsi dobrého a špatného rozpouštědla na rotující povrch polystyrenového filmu. Jako dobré rozpouštědlo byl použit tetrahydrofuran (THF), které zabezpečuje bobtnání povrchu filmu a jako špatné rozpouštědlo posloužil 2-ethoxyethanol (ETH), které je separované na povrchu v podobě mikrokapiček a umožňuje jeho formování. Při opakovaném přidávání směsi po menších dávkách ($5 \times 200 \mu\text{l}$) dochází k zvětšení obou fází a kapiček, které tvoří povrchové póry. V poslední fázi dochází díky rotaci k odpaření první dobrého rozpouštědla a následně až potom špatného rozpouštědla. Tímto postupem dojde ke vzniku filmu s povrchovými mikropóry. Konečná podoba texturovaného povrchu závisí na mnoha procesních parametrech (velikost, počet a rychlost dávkování, rychlost spin-coateru a poměr jednotlivých rozpouštědel, která musí být vzájemně mísitelná a separovatelná). Po doladění všech kritických parametrů je možno generovat povrchové nerovnosti síťových struktur a izolovaných pórů [151].

4.2.3 Fázová inverze

Při tvorbě polymerních membrán je využíváno procesu fázové inverze. Pevný polymer (bohatá fáze), který tvoří strukturu membrány a kapalný polymer (chudá fáze) tvoří póry membrány. Po odlévání polymeru dochází k odpaření dobrého rozpouštědla, které obohacuje odlitý film o špatné rozpouštědlo do té doby, dokud nedojde k vysrážení celé polymerní složky [152]. Princip této metody lze znázornit pomocí třífázového diagramu, který je zobrazen na obr. 22



Obr. 22: Princip metody fázové inverze pomocí třífázového diagramu [152]

V každém z rohu diagramu je zobrazena jedna složka-rozpouštědlo, polymer a srážedlo. Body uvnitř trojúhelníku znázorňují směs tří složek. Diagram se dále skládá z celkem dvou oblastí, ve které jsou všechny složky mísitelné (jednofázová) a systém, který odděluje tuhou od kapalně fáze (dvoufázový). Jakmile začne vznikat membrána, systém se mění z bodu A na bod C, který představuje konečné složení membrány. V tomto bodě jsou dvě fáze v rovnováze-pevná, která tvoří strukturu membrány (bod S) a kapalná tvořící membránové póry naplněné srážedlem (bod L). Bod C určuje celkovou pórovitost membrány. Celkový proces srážení je popsán cestou od bodu A po bod C, během něhož dochází k výměně rozpouštědla za srážedlo. Kritická koncentrace rozpouštědla a srážedla, při které dojde k prvnímu vysrážení polymeru charakterizuje bod B. Se zvyšujícím se srážedlem dochází ke ztrátě rozpouštědla a následně zvyšování koncentrace polymeru do té doby, dokud viskozita dosáhne maxima, kdy se z polymeru stává pevná látka v bodu solidifikace (D). Výskyt vysokých koncentrací polymeru mají za následek nerovnovážné stavy při tvorbě membrány. Stěžejní vlastnost, která hraje důležitou roli je viskozita polymeru, jelikož i při malé změně koncentrace se velmi dramaticky mění, čímž dochází k omezenému pohybu polymeru [152].

4.3 Růst buněk na texturovaných systémech

Účelem výše popsaných texturizačních postupů je zlepšení buněčné adheze k povrchu scaffoldu. Scaffoldy v tkáňovém inženýrství vyžadují několik kritérií, zásadní je vysoká biokompatibilita, dobré mechanické vlastnosti odpovídající nativní tkáni a správně zvolená

povrchová úprava výsledného substrátu. Pro zlepšení růstu a zejména adheze buněk je povrchová úprava často nezbytná. Ve většině případů převažuje lepší adheze buněk na drsnějším povrchu, který vykazuje větší specifický povrch a dochází tak ke zvětšení kontaktní plochy mezi povrchem substrátu a buňkou. Důležité pojmy v této oblasti jsou proliferace a diferenciací kmenových buněk. Proliferace znamená novotvoření buněk, diferenciací představuje vznik strukturně funkční buňky. Tyto procesy lze zvýšit vhodnými fyzikálně-chemickými podněty, jelikož zde je velmi důležité, aby byla dosažena velká účinnost při regeneraci poraněné tkáně daným biomateriálem. Tyto biomateriály by měly být vytvořeny tak, aby se co nejvíce podobaly mikroprostředím, ve kterém kmenové buňky sídlí a podporují diferenciací a proliferaci [153; 154].

4.4 Směsi PCL s fibroinem

Mísitelnost těchto dvou materiálů se využívá zejména v oblasti elektrostatického zvlákňování. Čistý PCL je kombinován s fibroinem za účelem zlepšení buněčné adheze a mechanických vlastností. Fibroin se k polykaprolaktonu přidává například ve formě mikročástic [155]. Na nanovlákněných strukturách připravených pomocí elektrostatického zvlákňování je sledován vliv fibroinu na fyzikální a strukturální vlastnosti [156]. Wang et al. studovali pozitivní vliv příměsí hedvábného proteinu na zlepšení mechanických vlastností a dlouhodobé uvolňování léčiv. [157]. Ve studii Wei et al. vytvořili také nanovlákněné struktury na bázi PCL a fibroinu za účelem testování účinků na růst a proliferaci epitelálních buněk ústní sliznice [158]. Další možnou metodou zpracování těchto materiálů z hlediska použití v tkáňovém inženýrství je 3D tisk. Například Cengiz et al. navrhli ve své studii takové scaffoldy, u kterých byly póry PCL ve vytištěné mřížce vyplněny BMF po namočení výtisku do proteinového roztoku [159]. Mikročástice hedvábí v PCL matici ovlivňují kromě mechanických a biologických vlastností rovněž degradační procesy [160]. Dále bylo zjištěno, že částice zvyšují mísitelnost PCL s jiným polymerem [161; 162]. Přímý vliv fibroinových částic na krystalickou strukturu čistého PCL studovaný na planárních systémech doposud nebyl prezentován.

4.4.1 Aplikace směsí fibroinu a polykaprolaktonu

Mechanické vlastnosti a laditelná degradabilita materiálových směsí z fibroinu a polykaprolaktonu umožňují vývoj tkáňových náhrad například pro periferní nervy [163]. Jako bioaktivní příměs se fibroin přidává k polykaprolaktonu při vývoji umělého menisku

[164]. Příměs fibroinu do PCL systému dále podporuje tvorbu minerálních usazenin na povrchu tkáňové náhrady, čímž se podílí na regeneraci kostní tkáně [165]. Fibroin dále zvyšuje hydrofilitu polykaprolaktonu [166], čehož se využívá při vývoji systémů pro hojení ran [167].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo připravit směsi fibroinu a polykaprolaktonu s organickými rozpouštědly a tyto směsi zpracovat odléváním a pomocí 3D tisku.

Na připravených filmech a výtiscích následně charakterizovat vliv přítomnosti fibroinu na krystalickou strukturu polykaprolaktonu.

Dále pomocí fázově separačních procesů vytvořit texturovaný povrch na substrátech složených z fibroinu a polykaprolaktonu a vyšetřit vliv složení směsi a post-procesních úprav na topografii povrchu.

6 MATERIÁLY A METODY

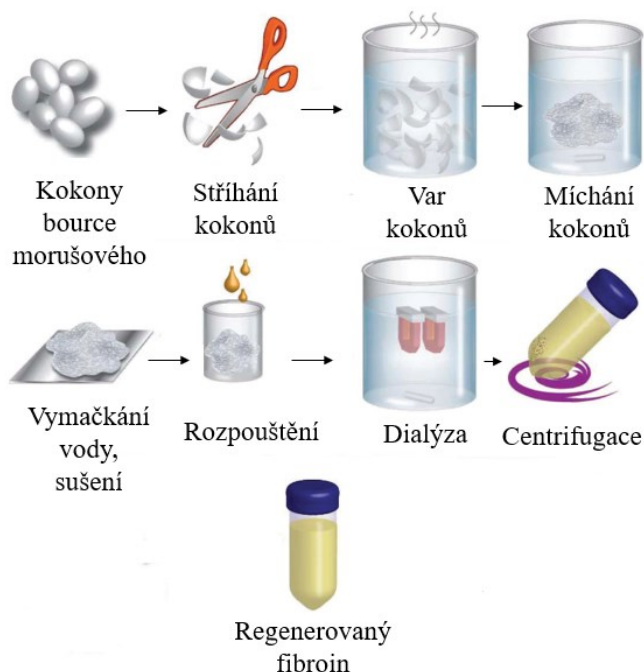
6.1 Použité chemikálie

Pro přípravu vzorků byl použit syntetický polymer polykaprolakton (PCL) PURASORB® od firmy Corbion. V případě přírodního polymeru byl použit hedvábný protein izolovaný z kokonů bource morušového, které byly dodány Univerzitou Bayreuth. Jako dobré rozpouštědlo byl použit 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol (HFIP); 99% (abcr GmbH), špatné rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO); 99,99% (VWR Chemicals). Na izolaci hedvábného proteinu byl použit bromid lithný a uhličitan sodný od firmy Sigma Aldrich. Na úpravu polymerních filmů byl použit methanol od firmy LC-MS CHROMASOLV a ethanol od firmy Exxsol DSP.

6.2 Příprava vzorků

6.2.1 Izolace hedvábného proteinu

Nedílnou součástí experimentální práce byla samotná příprava z klíčových materiálů spočívající v izolaci fibroinu z kokonů bource morušového. Zjednodušené schéma jednotlivých kroků izolace je zobrazeno na obr. 23.



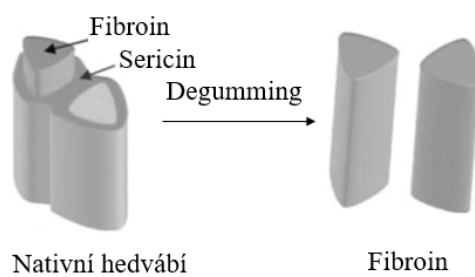
Obr. 23: Schéma jednotlivých kroků izolace fibroinu [168]

Vstupní surovina ve formě kokonů z bource morušového je zachycena na obr. 24



Obr. 24: Kokony bource morušového

Hedvábné vlákno z kokonů bource morušového obsahuje dva typy proteinů, fibroin a sericin. Sericin se z vlákna odstraňuje procesem zvaným degumming. Výsledek tohoto procesu je znázorněn na obr. 25.



Obr. 25: Proces odstranění sericinu [30]

Během tohoto procesu byly kokony nastříhány a vařeny při 100 °C v 0,02M vodném roztoku Na_2CO_3 po dobu jedné hodiny. Výtěžek materiálu zbaveného sericinu přibližně odpovídá 75 hm.% fibroinu z původního nastříhaného množství kokonů [169]. Po získání čistých fibroinových vláken byla vlákna proplachována ultračistou vodou a sušena přes noc při 50 °C. Druhý den následovalo rozpouštění fibroinu v 9,3 M LiBr, kdy na 1 g fibroinu připadly 4 ml LiBr. Rozpouštění fibroinu v sušárně trvalo přibližně čtyři hodiny při 60 °C. Následující dny byl LiBr z roztoku odstraněn pomocí dialýzy proti vodě během 6 výměn v průběhu dvou dní. Poslední den za účelem odstranění drobných nečistot byl roztok fibroinu centrifugován při 9000 RPM, 4 °C, třikrát po dvaceti minutách. Jako poslední krok byla provedena lyofilizace roztoku fibroinu, která je zachycena na obr. 26.



Obr. 26: Lyofilizovaný fibroin

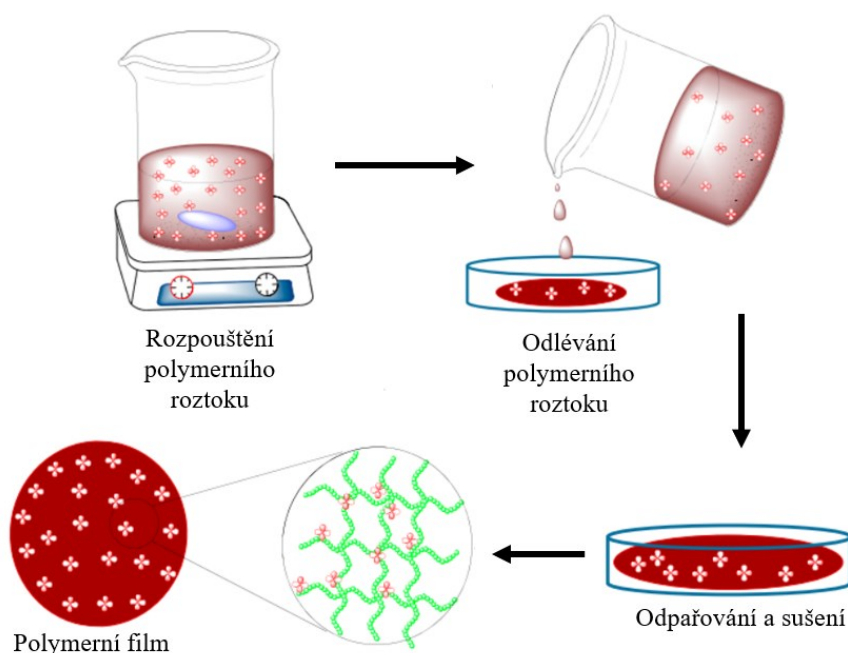
Tato operace se dělá za účelem prodloužení doby skladovatelnosti, jelikož čistý roztok fibroinu se dá skladovat jen omezenou dobu a mezi další výhody lyofilizované formy fibroinu patří možnost opětovného rozpouštění a zpracování do požadovaných morfologií.

6.2.2 Příprava roztoků

Jednotlivé směsi BMF a PCL s dobrým a špatným rozpouštědlem byly rozpouštěny na třepačce po dobu 4 hodin při pokojové teplotě. V případě dobrého rozpouštědla (HFIP) byl výsledný poměr mezi pevným podílem (směs BMF a PCL) a rozpouštědlem (HFIP) 1:9 (g: ml). V tomto poměru byly připraveny roztoky čistého PCL a čistého BMF a dále různě koncentrované fibroinové vzorky vůči PCL 10%, 20%, 33%, 50% a 67%. Špatné rozpouštědlo bylo dávkováno k vybraným vzorkům takovým způsobem, že na 1 ml dobrého rozpouštědla (HFIP) připadalo 160 μ l špatného rozpouštědla (DMSO).

6.2.3 Metoda odlévání z roztoku

Jedná se o velmi rozšířenou a často používanou metodou pro přípravu polymerních filmů. Schéma této metody je na obr. 27.

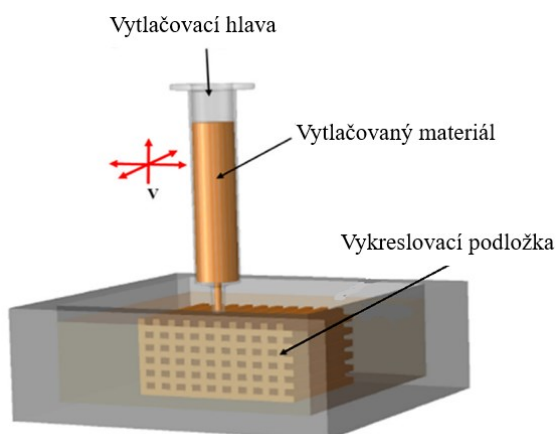


Obr. 27: Schéma metody odlévání z roztoku [170]

Princip metody spočíval v tom, že se polymerní roztok dávkoval v objemu 600 μl do kultivačních polystyrenových misek o ploše 9,2 cm^2 , které byly následně umístěny do exsikátoru a sušeny pomocí proudícího vzduchu po dobu 18 hodin. Během tohoto procesu postupně docházelo k odpaření rozpouštědla. Pro zpomalení odpařování rozpouštědla za účelem eliminace povrchového zvlnění byly misky při vysoušení přiklopeny víčkem. Po uplynutí této doby sušení byl získán polymerní film, který byl dále charakterizován.

6.2.4 Extruzní 3D tisk

Vybrané směsné roztoky byly zpracovány pomocí 3D extruzního tisku. Po vytištění byly sledovány různé časové intervaly odpařování rozpouštědla, přičemž jeden spočíval v okamžitém nekontrolovaném odpaření rozpouštědla v digestoři, druhý v pomalém kontrolovaném odpaření rozpouštědla v exsikátoru. Dále během vysychání byla na vytištěné mřížky aplikována voda nebo ethanol o objemu 500 μl za účelem získání porézních struktur. Princip metody 3D tisku je zachycen na obr. 28.



Obr. 28: Princip extruzního 3D tisku [171]

Rozpouštění jednotlivých vzorků probíhalo za stejně definovaných podmínek, jako tomu bylo u metody odlévání. Roztok byl dávkován do stříkačky a pomocí vytlačovací hlavy byl polymerní roztok tisknut ve tvaru mřížky na kultivační polystyrenovou misku. Tisk byl proveden mikroextruzí z roztoku pomocí pneumatické hlavy na 3D biotiskárně. Rozměr vytištěných mřížek byl $10 \times 10 \times 0,3 \text{ mm}$ s hustotou vnitřní výplně 15 %. Pro všechny výtisky byla použita kónická špička o průměru 0,26 mm. Jednotlivé parametry tisku nebyly konstantní, jelikož se musely měnit s ohledem na složení směsi a pohybovaly se v rozmezí tlaku 10-40 kPa a rychlosti tisku $25-40 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Tisk probíhal při pokojové teplotě tiskové hlavy i podložky.

6.3 Charakterizace vzorků

6.3.1 Skenovací elektronový mikroskop

Pro výslednou charakterizaci daných struktur byl použit skenovací elektronový mikroskop Phenom Pro od společnosti Phenom World. Všechny vzorky, které byly charakterizovány tímto mikroskopem bylo nutno nejprve pokovit vrstvou směsi zlata a paladia v naprašovačce kovů po dobu 75 s při použití proudu 18 mA za současné přítomnosti argonu. Vzorek byl pro tento účel upevněn na terčík oboustrannou uhlíkovou páskou a umístěn do standardního držáku pro vodivé vzorky. U každého vzorku byly pořízeny čtyři snímky se zvětšením $500\times$, $1000\times$, $2000\times$ a $4000\times$. Všechna měření byla provedena v režimu zpětně odražených elektronů při použití 10 kV urychlovacího napětí. Měření prvkového složení povrchu bylo provedeno pomocí Phenom™ XL G2 v režimu Mapping s urychlovacím napětím 15 kV pomocí BSD detektoru (zpětně odražených elektronů). Obrazová analýza byla provedena v softwaru ImageJ, verze 1.6_0_24.

6.3.2 Mikroskop atomárních sil

Topografie jednotlivých vzorků byla charakterizována pomocí mikroskopu atomárních sil Dimension ICON (Bruker). Rychlost skenování byla 0,7 Hz s rozlišením 512×512 pixelů. Měření probíhalo v poklepovém režimu při pokojové teplotě na vzduchu. Pro měření byla použita sonda s rezonanční frekvencí 70 kHz a konstantou tuhosti $0,4 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$ (ScanAsyst-Air, Bruker). Obrazová analýza byla provedena pomocí softwaru Gwyddion verze 2.55 a ImageJ verze 1.6_0_24.

6.3.3 Profilometrie

Změny povrchové topografie byly dále charakterizovány pomocí mechanické a optické profilometrie. Měření bylo realizováno na mechanickém profilometru Dektak XT (Bruker) s diamantovým hrotem s poloměrem křivosti $2,5 \mu\text{m}$ a přitlakem 5 mg. Vyhodnocení drsnosti bylo provedeno podle normy ISO 4287. Měření na optickém profilometru ContourGT-K (Bruker) bylo provedeno s použitím čočky se zvětšením $20 \times$.

6.3.4 3D bio tiskárna

Princip extruzního 3D bio tisku spočívá v postupném vytlačování roztoku z vytlačovací hlavy na vykreslovací podložku. Vytlačovací hlava se pohybuje ve třech rozměrech, přičemž podložka zůstává během tisku nehybná. Vytištěný materiál tuhne odpařením rozpouštědla. Mezi výhody použití této techniky 3D tisku je dobrá flexibilita a jednoduchost, která je založena na prostém dávkování materiálu přímo do stříkačky. Mezi nevýhody patří omezené použití jednotlivých materiálů, jelikož velmi viskózní materiály vyžadují použití vysokého tlaku vytlačovací hlavy, čímž taky dochází ke složitější manipulaci při dávkování viskózního roztoku do stříkačky. Vybrané směsi byly tisknuty pomocí pneumatické hlavy 3D biotiskárny Bio X (Cellink). Jednotlivé parametry tisku (tvar mřížky, rychlost tisku, tlak, teplota a tloušťka jehly) byly nastavovány přímo v softwaru tiskárny. Jednotlivé mřížky byly tištěny podle STL souboru z databáze tiskárny.

6.3.5 WAXS

V rentgenové krystalografii je širokoúhlý rozptyl rentgenového záření analýza Braggových píků rozptýlených do širokých úhlů, které jsou podle Braggova zákona způsobeny strukturami o velikosti nanometrů. Jedná se o metodu rentgenové difrakce, která slouží pro stanovení stupně krystalinity u polymerů nebo pro chemické a fázové složení daného filmu.

Analýza byla provedena na přístroji XRDynamic 500. Měření probíhalo na reflexi pomocí absolutního skenovacího módu při napětí zdroje 40 kV, proudu 49 mA. Měření bylo provedeno v rozsahu úhlů 5-30 °, velikosti kroku 0,05 ° a délka kroku byla 50,034 s.

6.3.6 FTIR

Princip infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací je založena na absorpci infračerveného záření při průchodu vzorkem, při níž dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekul v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Analýza k důkazu výskytu obou polymerů ve směsi byla provedena pomocí FTIR spektrometru od společnosti Nicolet iS5 využívající techniku ATR s germaniovým krystalem. Pro měření bylo použito 32 skenů v rozlišení 4 cm⁻¹ a rozsahu vlnových délek 400 až 4000 cm⁻¹.

6.3.7 Optický a digitální mikroskop

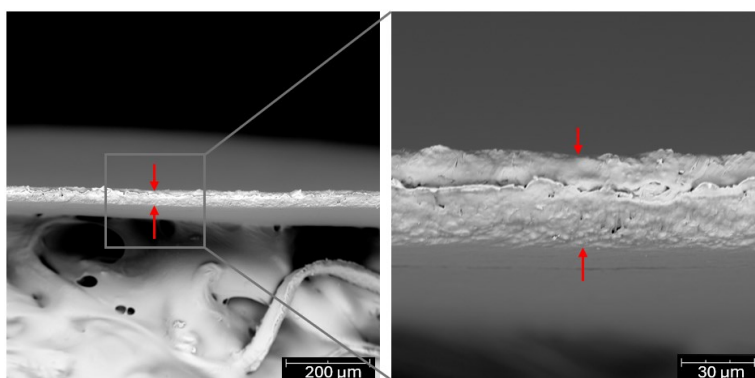
Pro zaznamenání celkového tvaru tištěné mřížky byl použit digitální mikroskop Dino-Lite Edge AM4815ZT vyrobený od společnosti Dino-Lite. Přístroj disponuje zvětšením 20 – 200× s maximálním rozlišením 1280 × 1024 pixelů. K tomuto mikroskopu bylo nutné použít software DinoCapture 2.0. Vybrané snímky sférolitů v polarizovaném světle byly pořízeny pomocí optického mikroskopu Nikon Eclipse 50i od společnosti Nikon.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci experimentální části práce byly připraveny směsi hedvábného proteinu s polykaprolaktonem o různém poměru těchto složek. Z těchto směsí byly následně odlévány filmy, přičemž na těchto filmech byla sledována měnící se sférolitická struktura PCL a topografické změny zapříčiněné přítomností fibroinu ve směsi. Další technikou zpracování byl 3D tisk, pomocí kterého byly připravovány jednoduché mřížky sloužící ke studiu topografických změn spojených s měněním se podílem fibroinu ve směsi a různými způsoby sušení výtisku.

7.1 Texturované filmy na bázi PCL a BMF

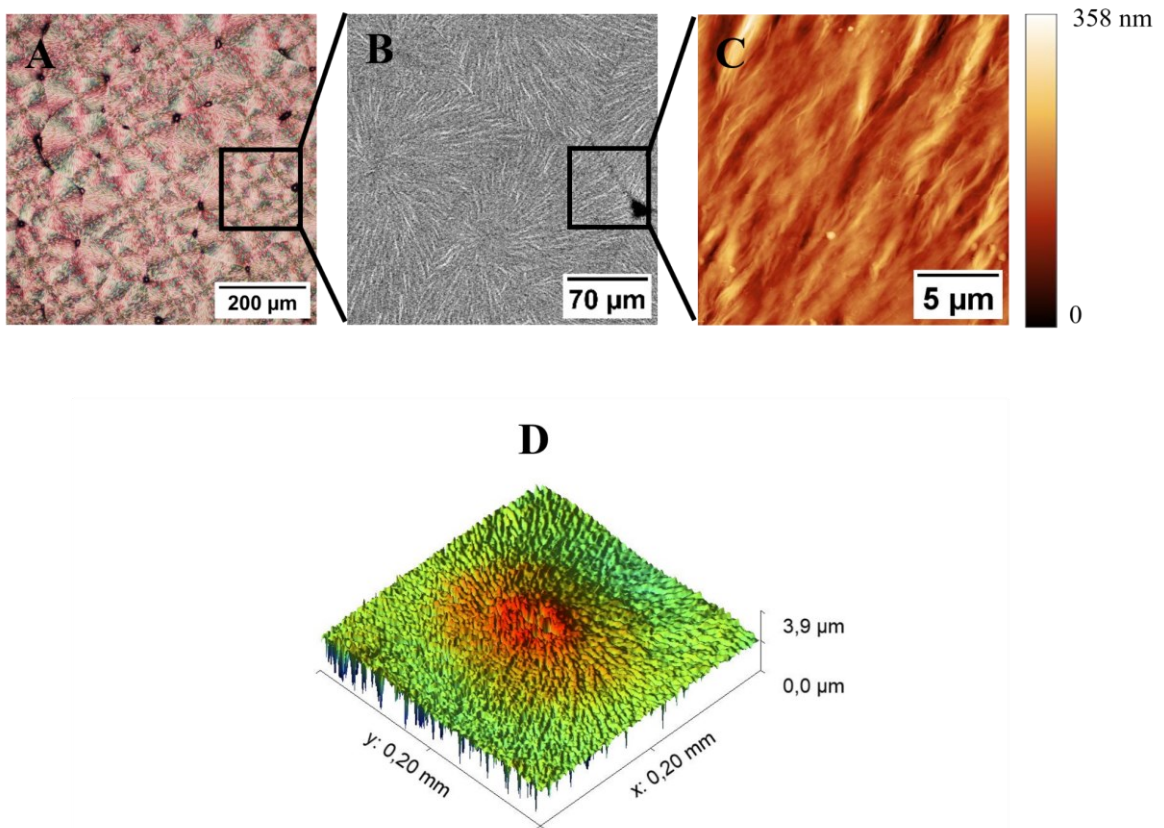
V první části experimentální práce budou prezentovány povrchově texturované filmy na bázi PCL a fibroinu. Hedvábné filmy byly připraveny odléváním roztoku těchto dvou polymerů do kultivačních PS misek. Po odpaření rozpouštědla za podmínek definovaných v předchozích kapitolách byly získány samonosné filmy o tloušťce $d=(37,6\pm 0,5) \mu\text{m}$. Tloušťka filmu byla analyzována pomocí SEM, viz obr. 29.



Obr. 29: Tloušťka filmů měřena pomocí SEM

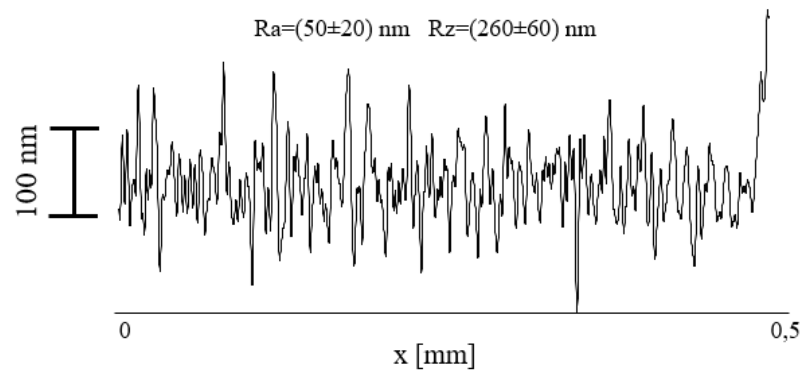
7.1.1 Struktura čistého PCL

V první fázi experimentální části práce byla studována struktura sférolitů čistého PCL filmu krystalizujícího z roztoku organického rozpouštědla. Na obr. 30 jsou zachyceny sférolity pomocí optického mikroskopu v polarizovaném světle, kde lze pozorovat typickou strukturu maltézských křížů. Na obr. 30 uprostřed a vpravo je poté znázorněna detailní radiálně orientovaná fibrilární struktura lamel sférolitu, odpovídající literatuře [172; 173].

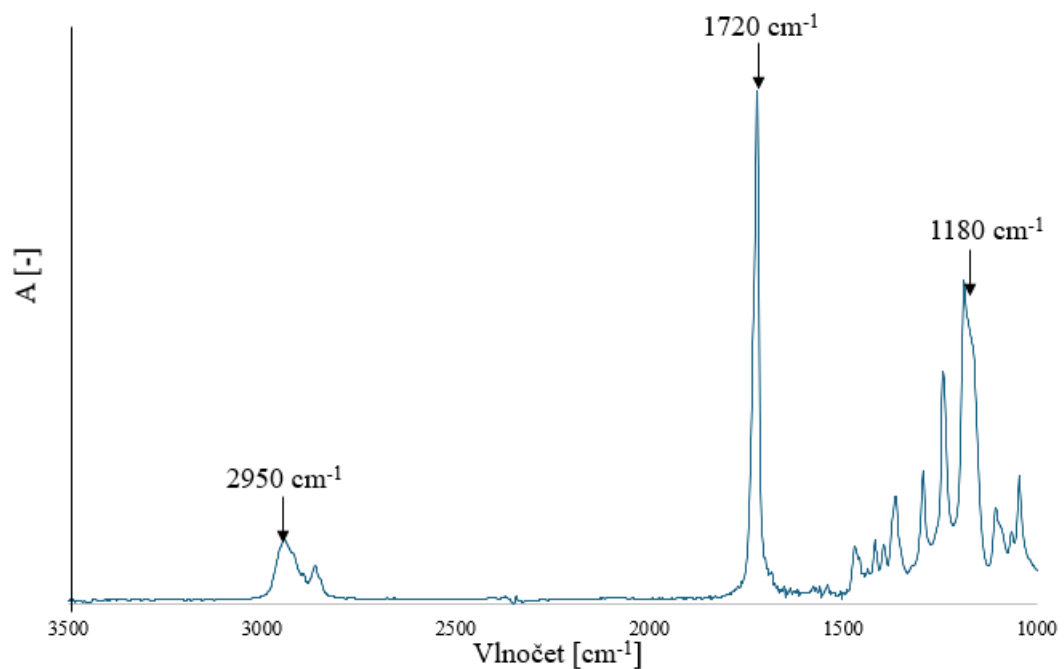


Obr. 30: A) Sférolitická struktura PCL filmu zobrazená pomocí optické polarizační mikroskopie, B) SEM C) AFM zobrazení struktury sférolitů, D) topografie PCL sférolitu znázorněna pomocí optického profilometru

Co se týká topografie PCL sférolitu, převýšení fibril v ose z činí stovky nanometrů, což bylo zjištěno jak pomocí AFM na obr. 30 C, tak pomocí mechanického profilometru, viz. obr. 31. Na optickém profilometru lze pozorovat makroskopické zvrásnění povrchu v řádu jednotek mikrometrů, které je způsobeno nahromaděním materiálu v jádru sférolitu, obr. 30 D.

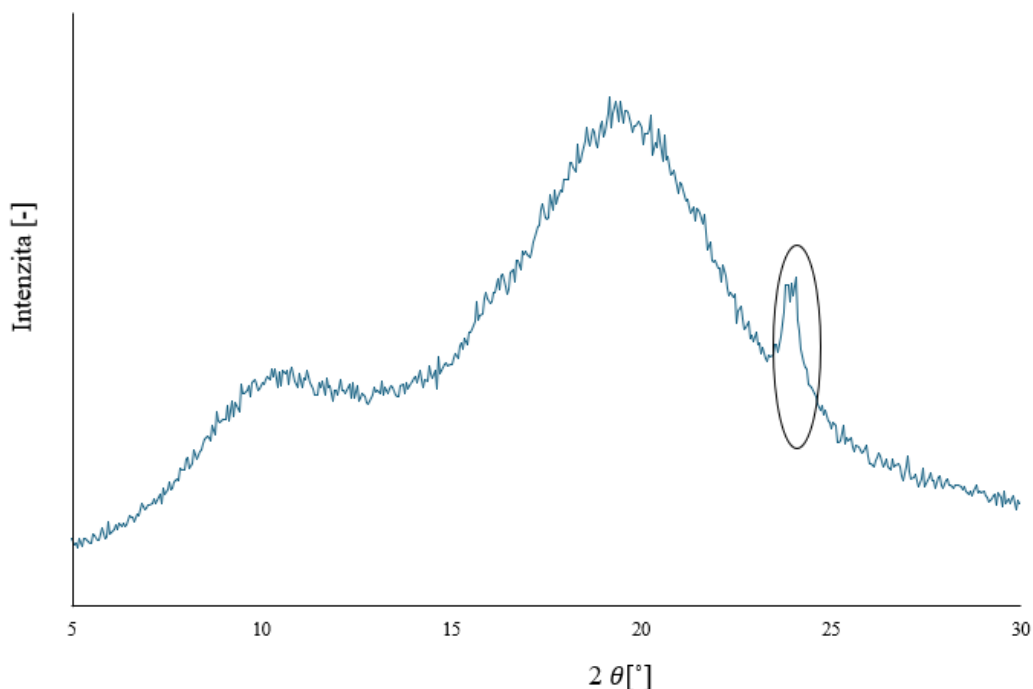


Obr. 31: Topografie čistého PCL filmu, profil pořízen mechanickým profilometrem
 PCL byl dále podroben FTIR analýze, obr. 32. Pík s hodnotou vlnočtu 2950 cm^{-1} je charakteristický pro CH_2 asymetrické vibrace. Nejvyšší pík na hodnotě vlnočtu 1720 cm^{-1} značí karbonylové skupiny a vlnočet 1180 cm^{-1} je charakteristický pro OC-O vibrace [174].



Obr. 32: FTIR spektrum čistého PCL filmu

Krystalické podíly jednotlivých materiálů v polymerních filmech byly analyzovány pomocí rentgenové krystalografie, pomocí které můžeme pozorovat změnu intenzity signálu při určitém úhlu. Na obr. 33 lze pozorovat WAXS spektrum čistého PCL na PS substrátu. PS substrát pod polymerními filmy je zodpovědný za tvar spektra [175], vyznačené maximum pak odpovídá PCL [176].



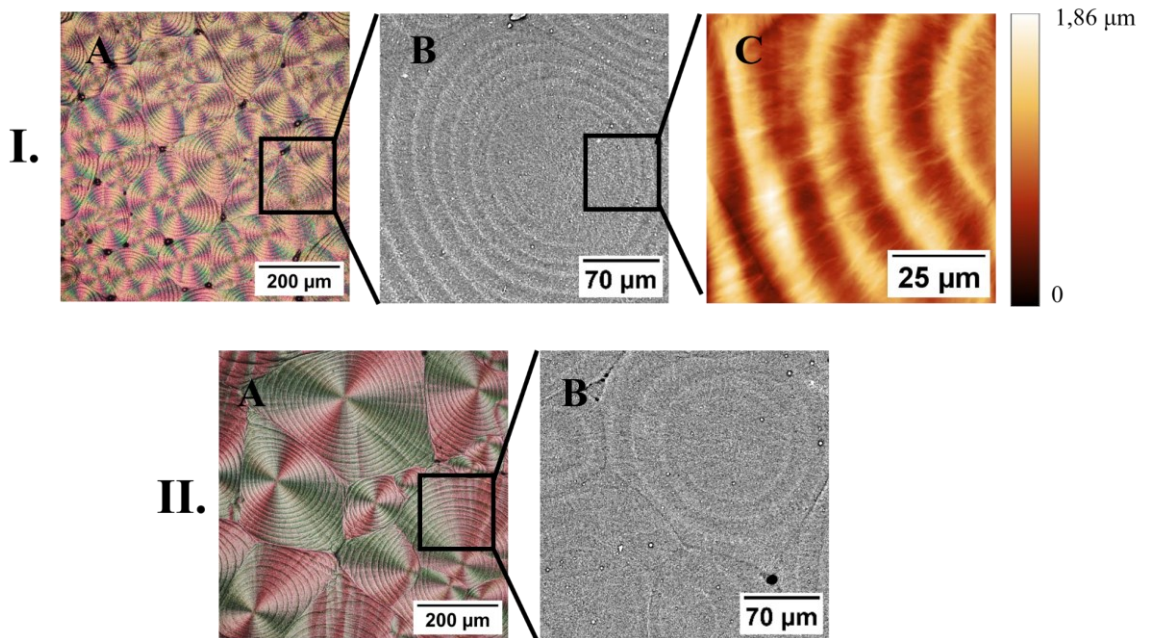
Obr. 33: WAXS analýza čistého PCL filmu

7.1.2 PCL prstencové sférolity

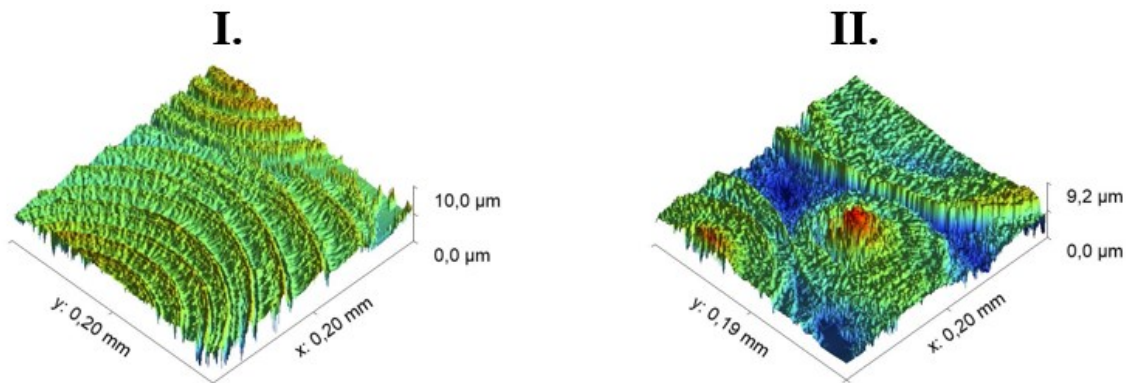
V rámci předchozí závěrečné práce [177] bylo zjištěno, že hedvábný protein při smíchání s polykaprolaktonem v určitém poměru tvoří ve směsi částice a při tisku ovlivňuje velikost PCL sférolitů. Tato skutečnost byla nyní blíže zkoumána na 2D systémech o větší ploše. U filmů s minoritním podílem fibroinu ve směsi 10 a 20 % vůči PCL byla pozorována tvorba prstencových PCL sférolitů. Tento jev odpovídá skutečnosti, že PCL má tendenci tvořit prstencové sférolity v přítomnosti příměsi [178]. Struktura prstencových sférolitů je znázorněna na obr. 34. Na snímcích z polarizačního optického mikroskopu lze vidět, že i u tohoto typu sférolitů lze pozorovat maltézské kříže. Detailní struktura je opět znázorněna pomocí SEM a AFM. Bylo pozorováno, že nejvýraznější prstencová struktura vznikala při koncentraci fibroinu 10 %. Při 20% koncentraci již není tak výrazná a se zvyšující se koncentrací zaniká, jak bude diskutováno dále.

Výška prstencových kruhů činí jednotky mikrometrů, viz AFM snímek na obr. 34 I.C. Na optickém profilometru obr. 35 lze opět pozorovat násobně vyšší převýšení dáno celkovým zvlněním povrchu, rovněž je však nezbytné vzít v úvahu možnou nepřesnost měřicí techniky u tohoto typu povrchu. Za zmínku stojí fakt, že v případě rostoucí koncentrace fibroinu

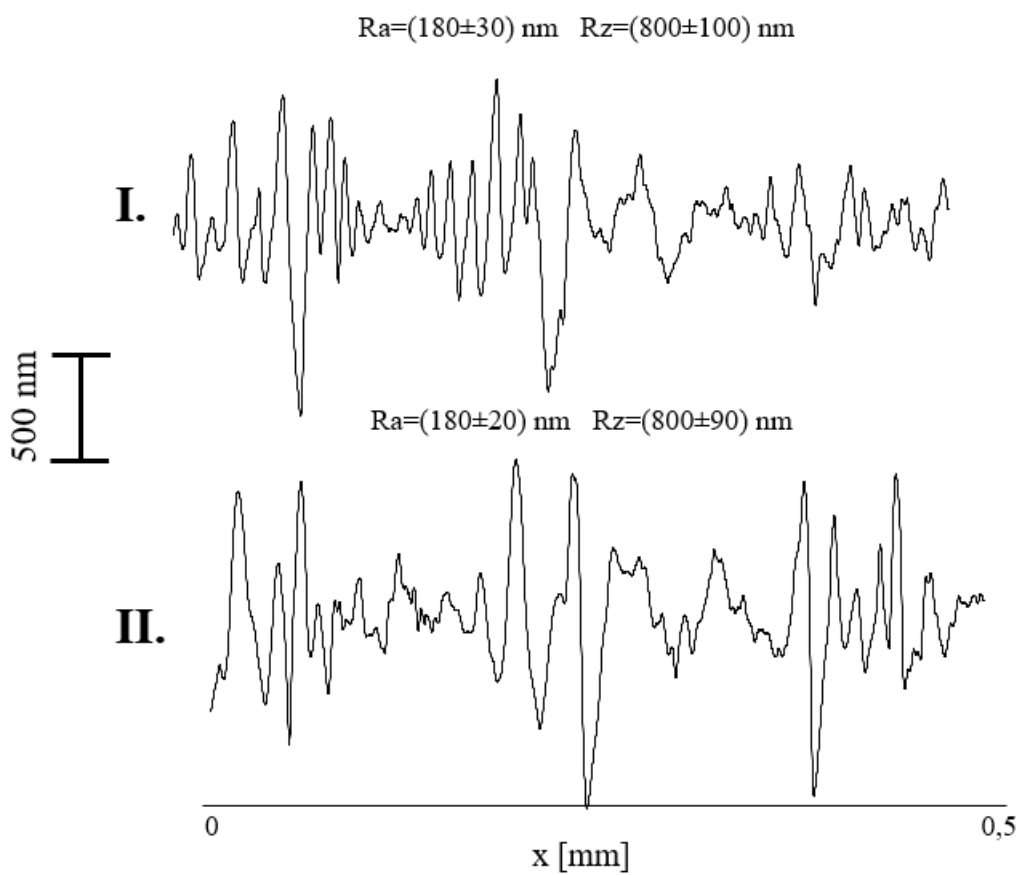
dochází ke snížení počtu prstenců v PCL sférolitu, jejich výška (charakterizována parametrem Rz, obr. 36) však zůstává uniformní.



Obr. 34: Struktura prstencových sférolitů na PCL filmech s příměsí fibroinu v podílu I. 10 % a II. 20 % vůči PCL, A) snímek z optického mikroskopu, B) SEM znázornění prstencové struktury C) AFM snímek detailní prstencové topografie

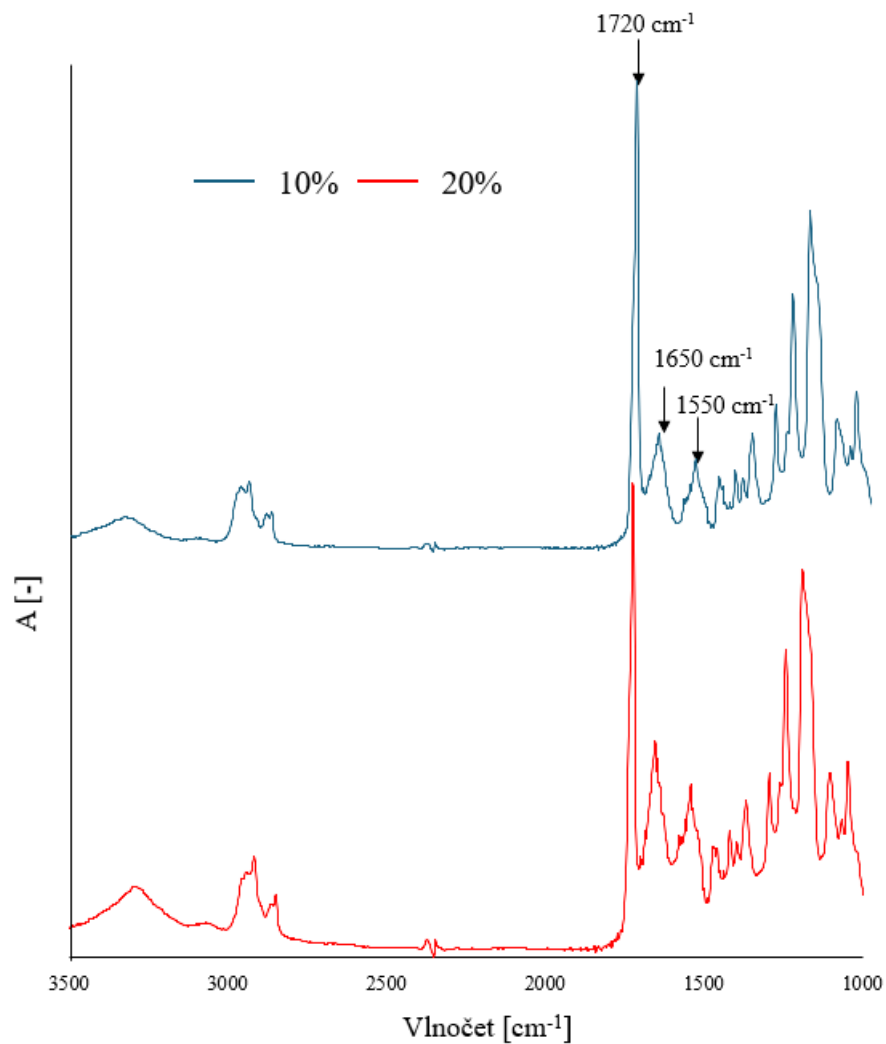


Obr. 35: Náhled prstencové topografie PCL sférolitů s příměsí I. 10 % BMF, II. 20 % BMF, snímky z optického profilometru



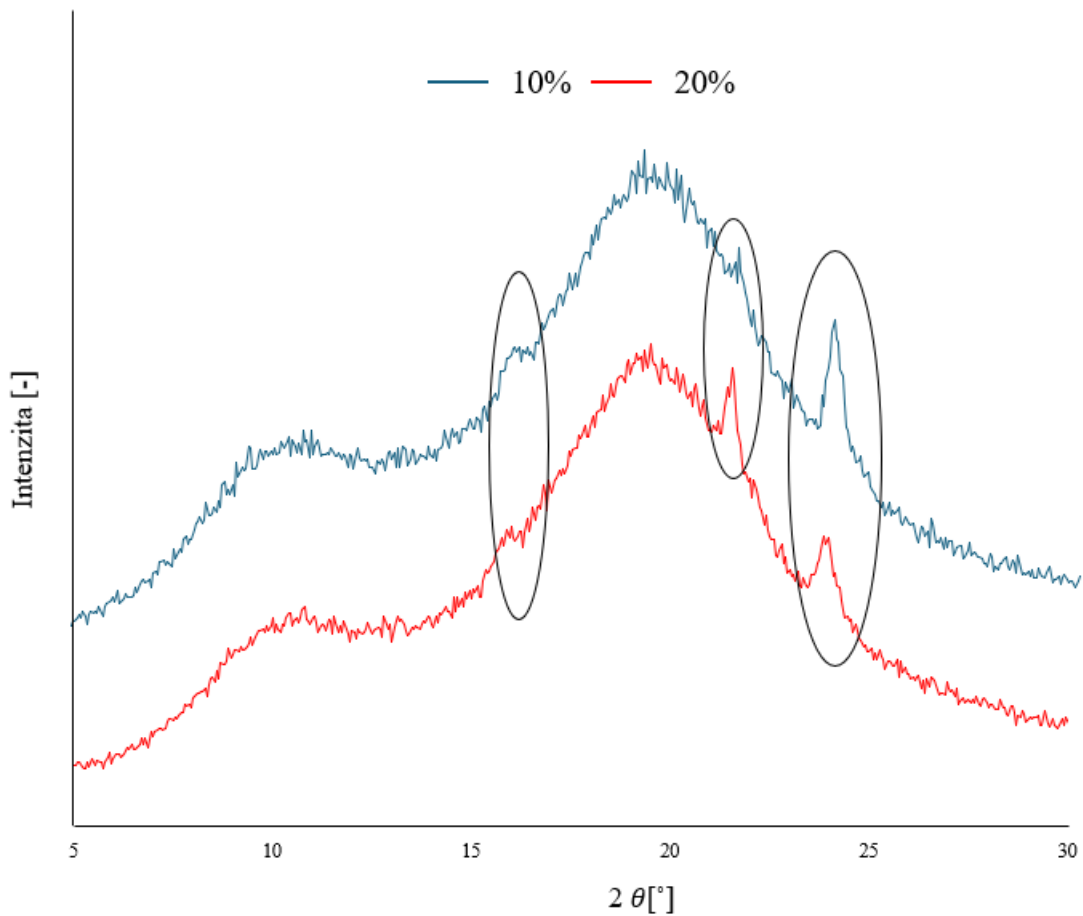
Obr. 36: Topografie PCL filmu s obsahem I. 10 % fibroinu a II. 20 % fibroinu, profily pořizeny mechanickým profilometrem

Přítomnost obou složek směsi v připravených filmech s obsahem 10 a 20 % fibroinu vůči PCL byla zjišťována pomocí FTIR analýzy. Na FTIR spektru na obr 37. lze pozorovat, že ve srovnání s čistým PCL dochází k výskytu charakteristických vibrací pro fibroin při vlnočtech 1650 cm^{-1} (Amid I), 1550 cm^{-1} (Amid II). Dále lze pozorovat trend, že s rostoucí koncentrací BMF se postupně zvyšují charakteristické píky pro tento materiál, naopak s klesající koncentrací PCL klesá charakteristický pík pro tento materiál.



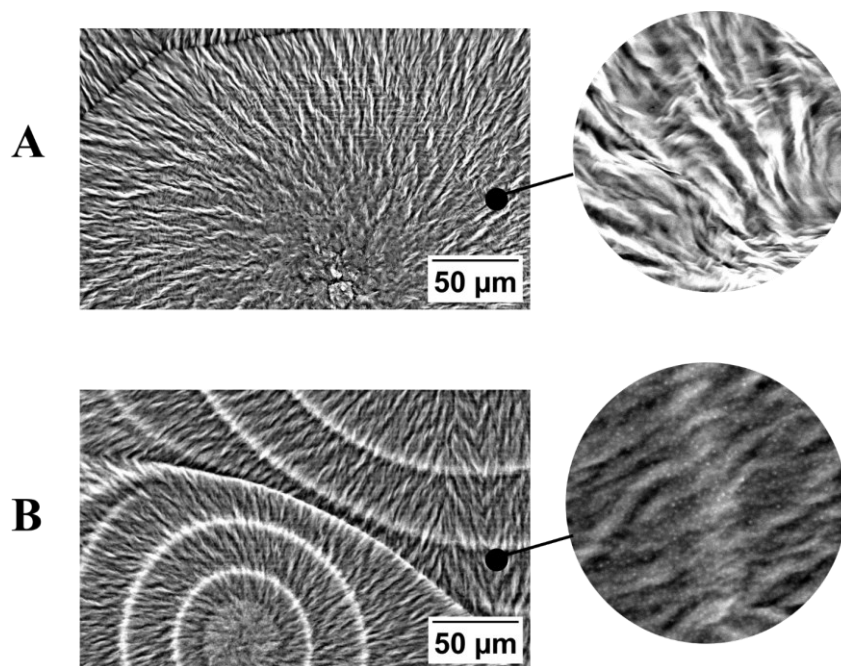
Obr. 37: FTIR spektrum prstencových struktur

Na obr. 38 jsou snímky z WAXS pro PCL filmy s obsahem 10 a 20 % fibroinu. Přítomnost fibroinu se projevila maximum při cca 22°. Nelze opomenout maximum při cca 16°, které se objevuje pouze u těchto dvou směsí a pravděpodobně značí právě prstencovou strukturu.



Obr. 38: WAXS analýza prstencových struktur

Za účelem zjištění distribuce fibroinových částic ve sférolitické struktuře hmotnostního zastoupení daných prvků byla provedena pomocí SEM prvková analýza čistého PCL a PCL s obsahem 10 % fibroinu. Srovnání detailních struktur je znázorněno na obr. 39, uvedené výřezy mají plochu 50×50 μm. V detailu na snímku 39 B lze pozorovat homogenně distribuované částice fibroinu v PCL matrici. Přítomnost fibroinu je dále prokázána přítomností dusíku z peptidového řetězce ve struktuře filmu, tab.2, přičemž zvýšení koncentrace fibroinu ve směsi je doprovázena detekcí mírně zvýšeného obsahu dusíku v analyzovaném vzorku.



Obr. 39: SEM snímky struktury A) Čistého PCL, B) PCL s 10% podílem fibroinu

Tab. 2: Prvková analýza pro roztok čistého PCL a roztoku s 10% podílem fibroinu

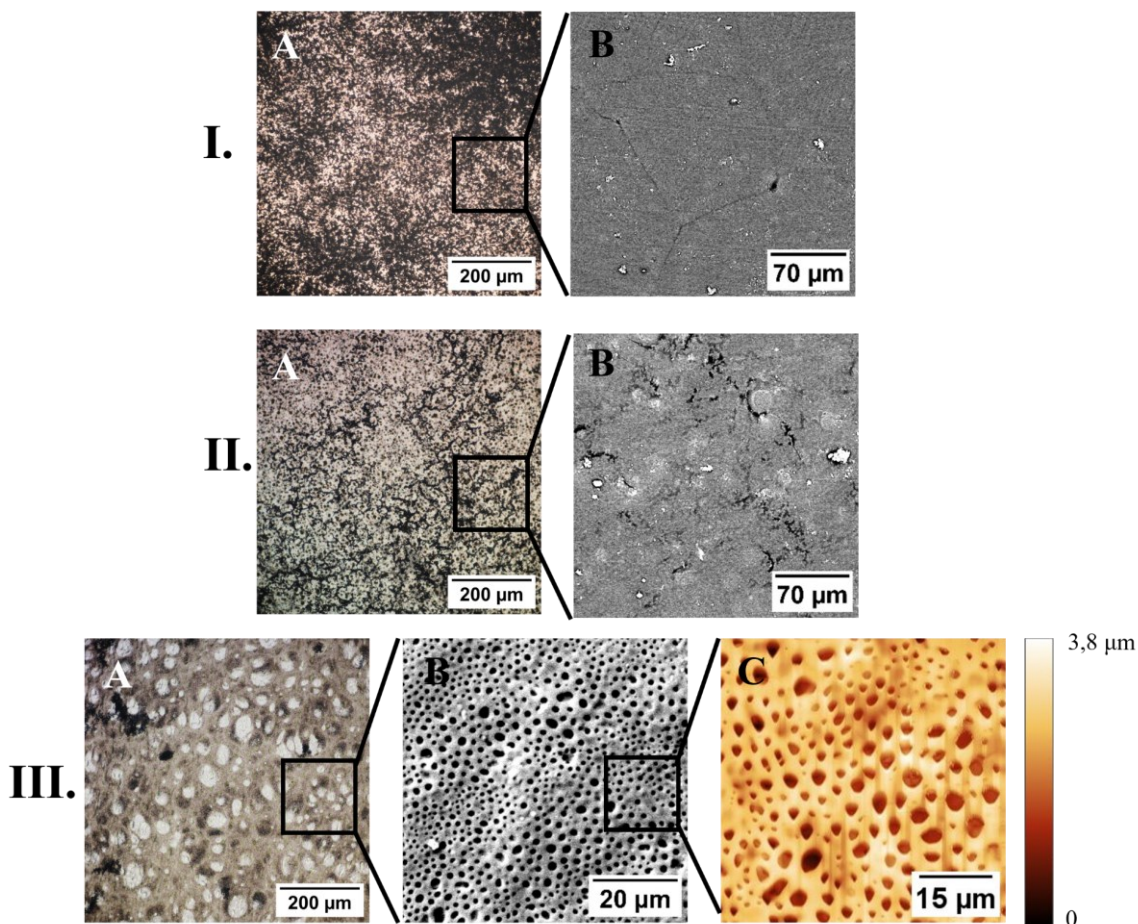
Materiál	Hmotnostní koncentrace [%]		
	čistý PCL	10 % fibroin - PCL	20 % fibroin - PCL
Uhlík	70±2	59±3	56±1,0
Kyslík	30±2	29,4±0,8	28.2±1,6
Dusík	0	11±3	15.8±0,6

7.1.3 Porézní BMF-PCL povrchy

S narůstající koncentrací podílu fibroinu ve směsi bylo možné u připravených filmů pozorovat postupný rozpad polykaprolaktonových sférolitů a fázová separace mezi těmito materiály vedla ke vzniku porézní topografie na povrchu

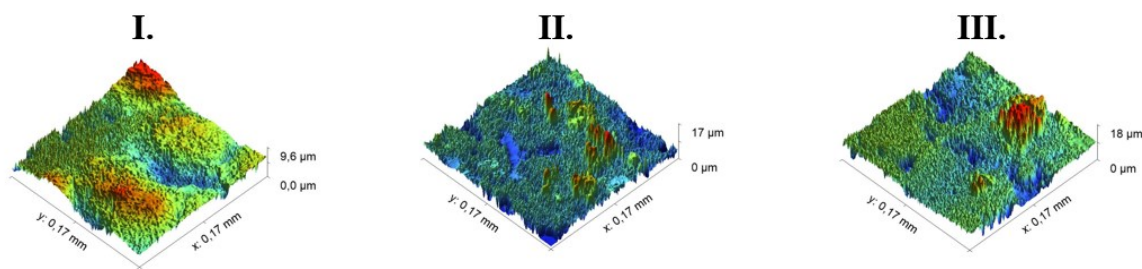
Obr. 40 I. a II. prezentuje snímky optického a elektronového mikroskopu pro filmy s podílem fibroinu 33 % a 50 % na kterých lze pozorovat téměř vymizení sférolitické struktury polykaprolaktonu, která jsou hůře detekovatelná přes zvrásnění povrchu a dochází zde ke vzniku pravděpodobně agregovaných shluků fibroinu. Můžeme si na těchto snímcích všimnout, že v případě 33% koncentrace fibroinu sférolitická struktura ještě zcela nezanikla,

ovšem toto již neplatí pro 50% koncentraci. Velmi zajímavého výsledku bylo dosaženo v případě 67% roztoku, jelikož u tohoto složení docházelo k tvorbě porézního povrchu, který lze pozorovat v detailu na obr. 40 III, B,C. Podobnou porézní topografii lze pozorovat u směsi PCL s epoxydovou pryskyřicí, která je rovněž spojena s fázovou separací těchto dvou materiálů [179].



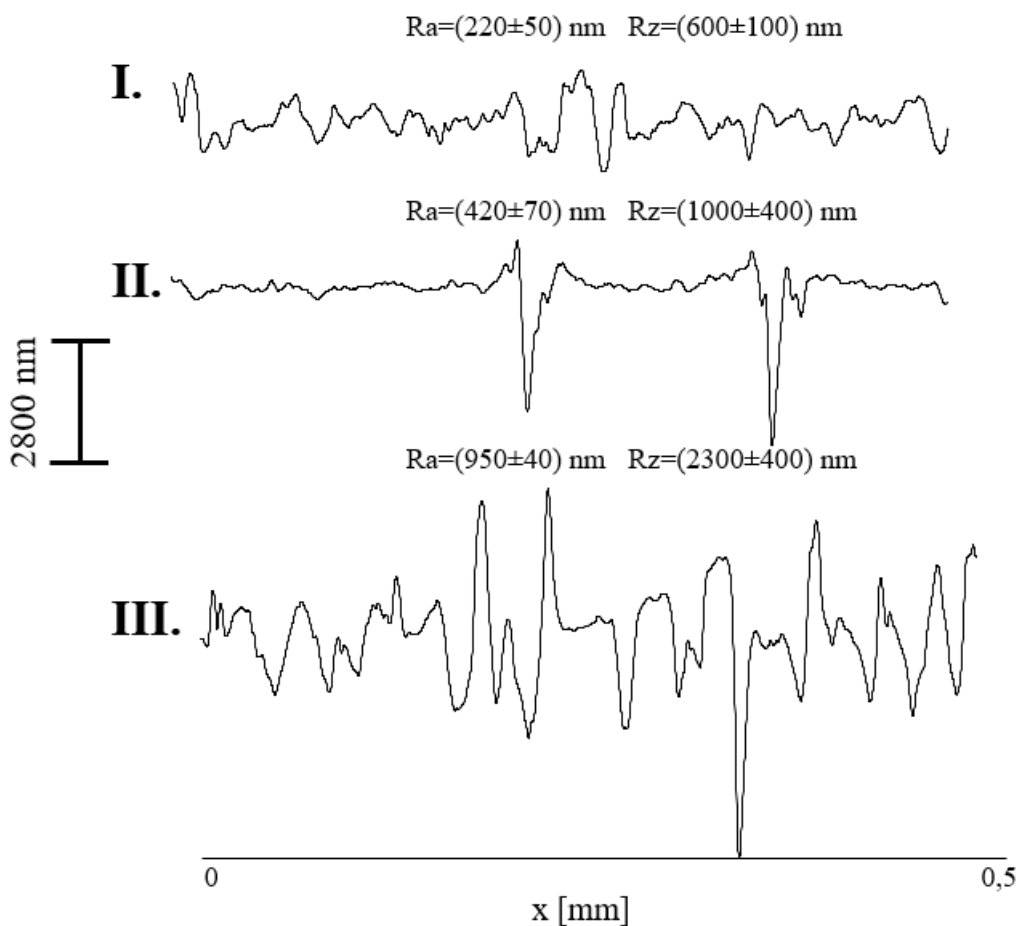
Obr. 40: Struktura porézního povrchu na PCL filmech s příměsí fibroinu v podílu I. 33 %, II. 50 % a III. 67% vůči PCL, A) snímek z optického mikroskopu, B) SEM znázornění povrchové struktury C) AFM snímek detailní porézní topografie

Podobně jako v předchozích případech byly pořízeny 3D obrázky z optického profilometru, obr. 41, z kterých je patrné, že makroskopická topografie filmů s těmito podíly fibroinu je výrazně nehomogenní.



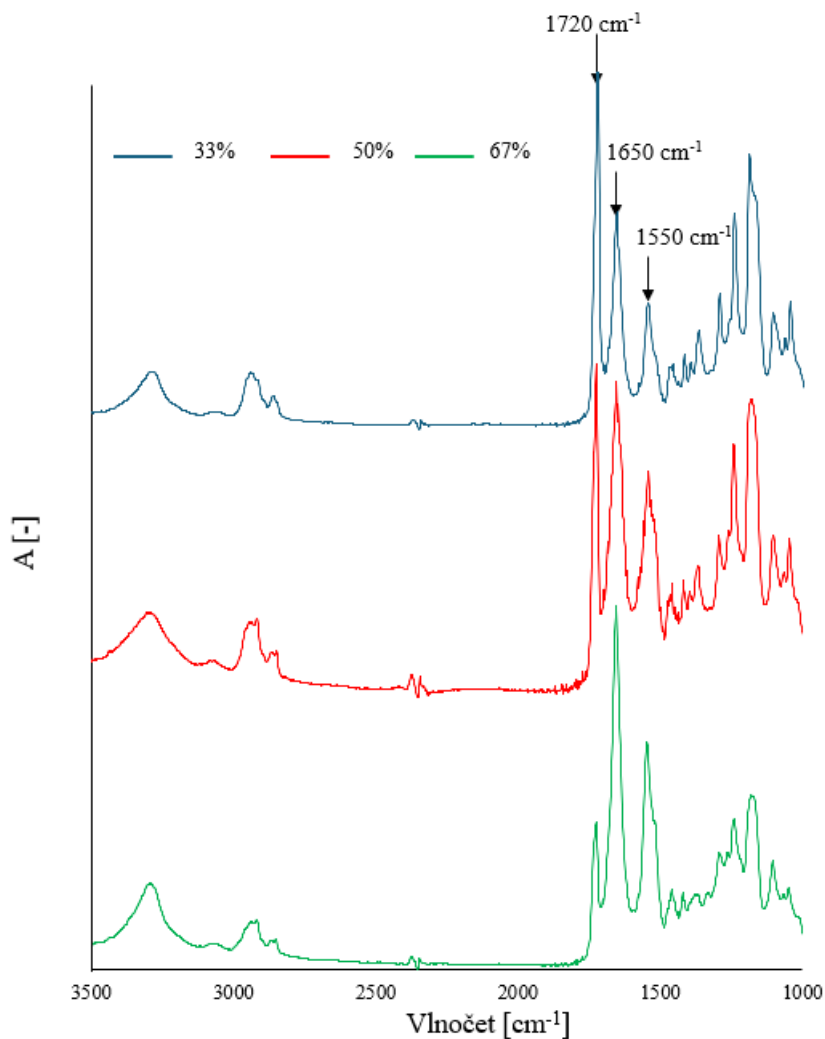
Obr. 41: Náhled porézní topografie PCL s příměsí I. 33 % BMF, II. 50 % BMF a III. 67 % BMF, snímky z optického profilometru

Drsnost povrchu charakterizovaná parametry R_a a R_z patrná z profilových řezů na obr. 42 dále narůstá, ve srovnání s čistým PCL až desetinásobně.



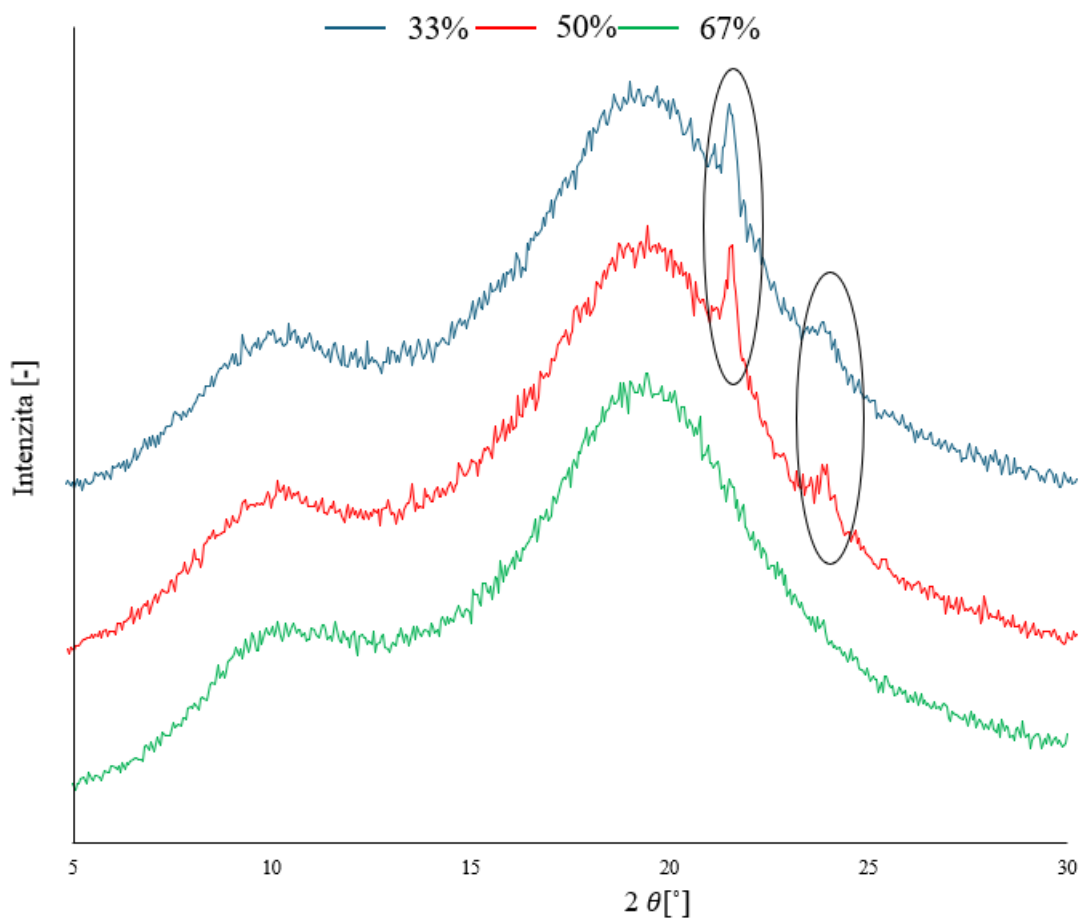
Obr. 42: Topografie PCL filmu s obsahem I. 33 % fibroinu, II. 50 % fibroinu a III. 67% fibroinu, profily pořízeny mechanickým profilometrem

Z výsledků FITR analýzy na obr. 43 plyne potvrzení trendu, že s rostoucí koncentrací BMF se postupně zvyšují charakteristické vibrace pro BMF (Amid I, Amid II) a naopak klesá charakteristický pík pro karbonylové skupiny patřící PCL.



Obr. 43: FTIR spektrum filmů ze směsí PCL s podílem 33 %, 50 % a 67 % BMF

Podobné změny lze pozorovat i na grafu z krystalografické analýzy, které jsou zachyceny na obr. 44, kde je patrné, že při zániku prstencových struktur se již nevyskytuje maximum kolem 16 °, jako tomu bylo na obr. 38. Dále bylo zjištěno, že při rostoucí koncentraci BMF se na úkor krystalické oblasti PCL zvyšuje intenzita charakteristická pro krystalickou BMF oblast. U vzorku s nejvyšším podílem fibroinu 67 % pak dochází překvapivě k vymizení všech píků, což naznačuje, že nebylo možné detekovat krystalickou fázi.

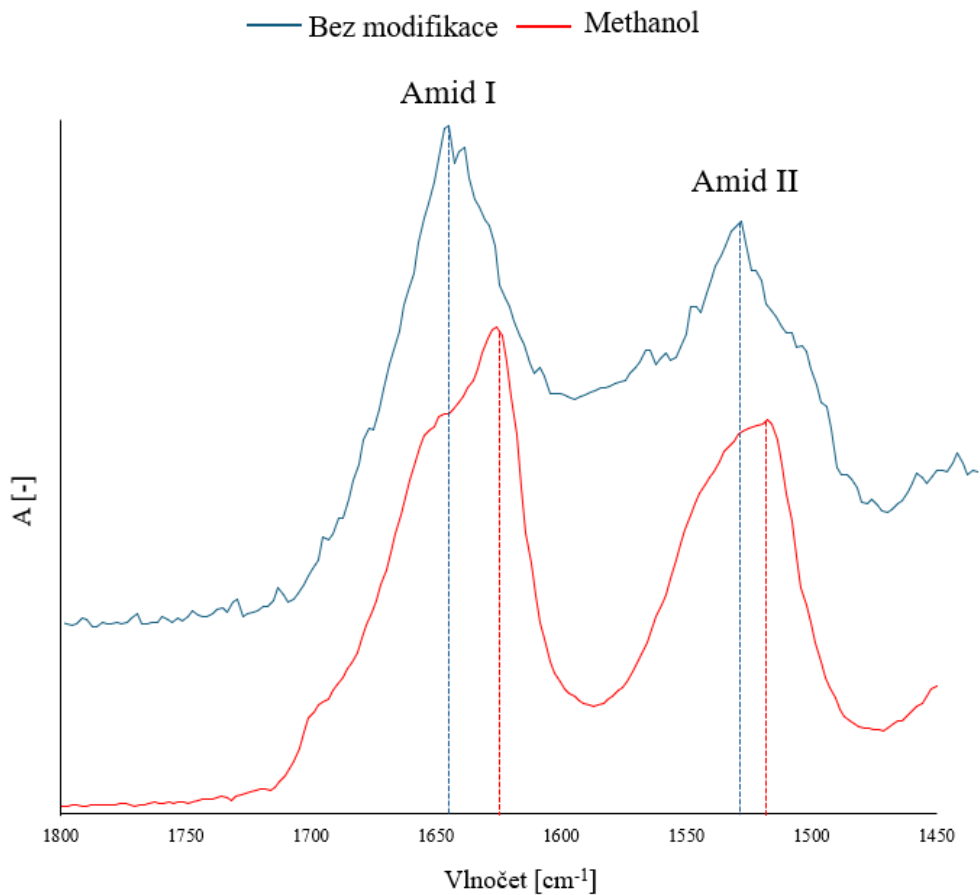


Obr. 44: WAXS analýza filmů ze směsí PCL s podílem 33 %, 50 % a 67 % BMF

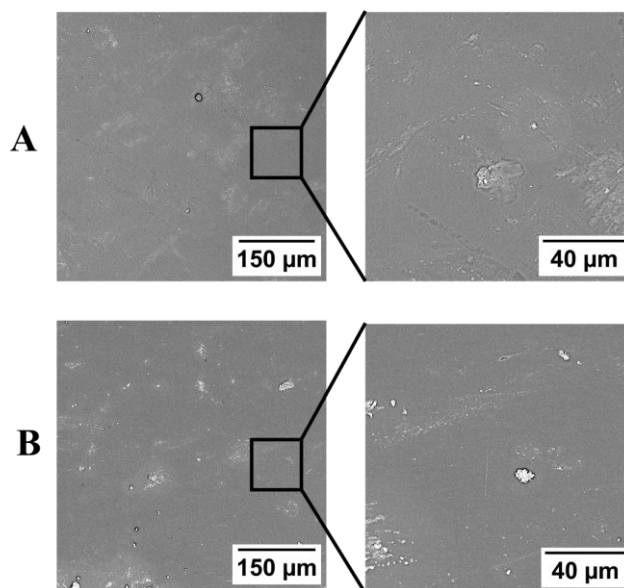
7.1.4 Transformace sekundární struktury fibroinu

Fibroin přítomný v matrici PCL se po vysušení v atmosféře dusíku nachází v rozpustné konformaci SILK I. Vzhledem k tomu, že připravované substráty jsou do budoucna určeny pro testy buněčné proliferace, je nezbytné transformovat jejich sekundární strukturu do ve vodě nerozpustné formy SILK II, k čemuž bylo v této práci zvoleno ošetření methanolem. Na vysušený film byl deponován v tenké vrstvě po dobu jednoho dne methanol. U vybraného vzorku (10%) byl aplikován ethanol za účelem získání informace, zda i různé typy alkoholů ovlivňují výslednou topografii [180].

Na obr. 45 je FTIR spektrum čistého fibroinu. U spektra, které bylo modifikováno methanolem, dochází ke změně sekundární struktury doprovázené posunem maxim pro charakteristické skupiny BMF k nižším vlnovým [181].

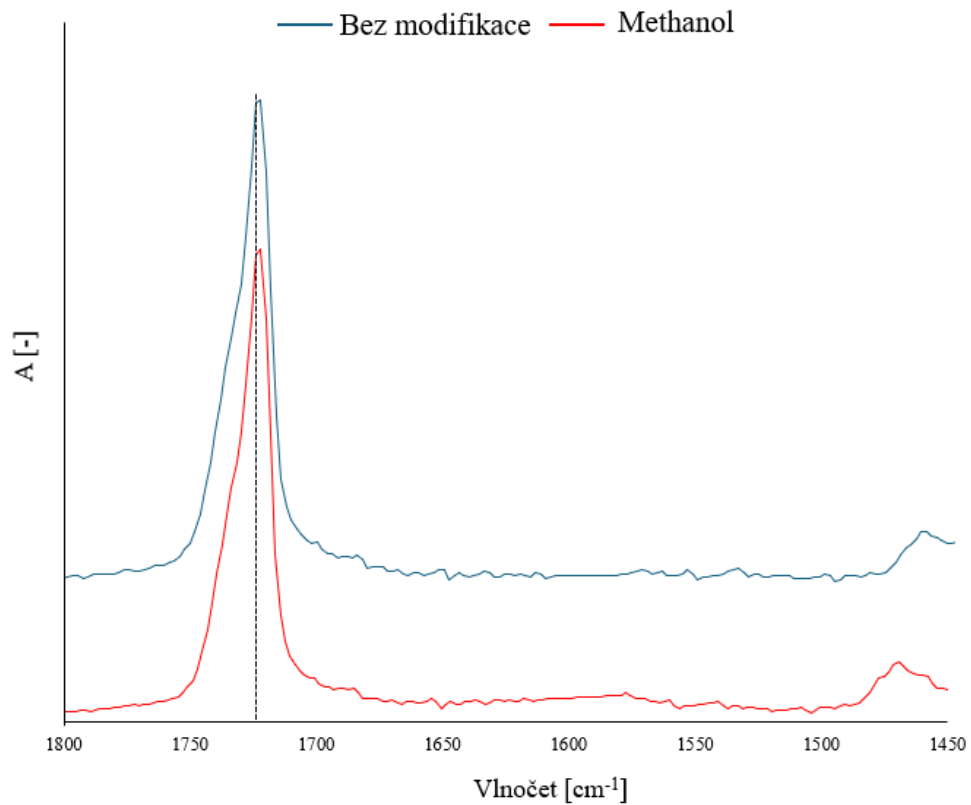


Obr. 45: FTIR spektrum čistého BMF filmu po vysušení a po ošetření methanolem
Na obr. 46 je snímek z elektronového mikroskopu filmu z čistého fibroinu, který byl modifikován pomocí methanolu. Na filmech nebyly zaznamenány po ošetření methanolem výrazné topografické změny.



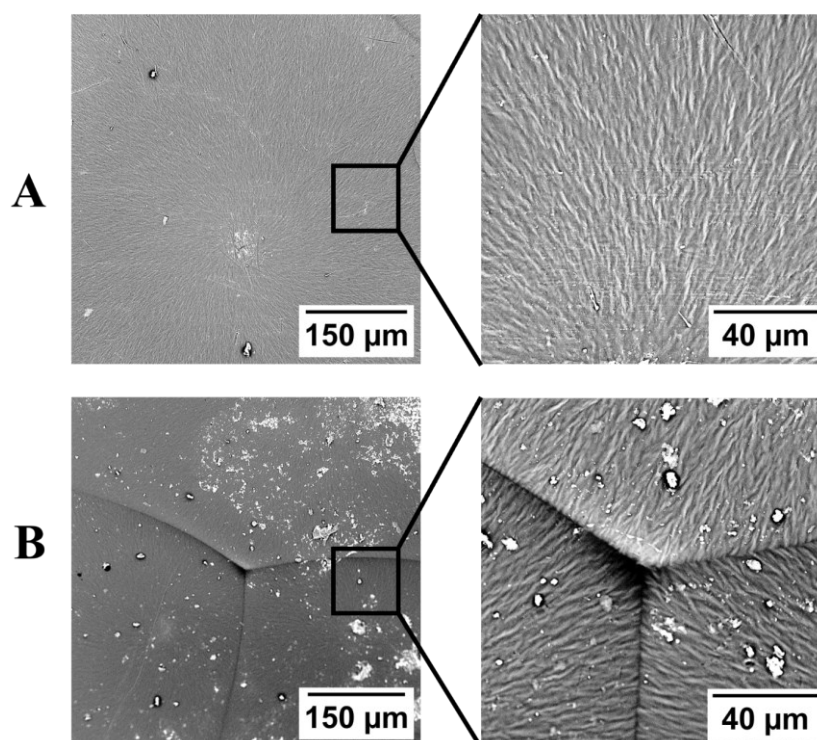
Obr. 46: Film z čistého BMF: A) před ošetřením methanolem B) po ošetření methanolem

Na obr. 47 je uvedeno FTIR spektrum čistého PCL před ošetřením a po ošetření methanolem, přičemž zde by nemělo docházet k žádné změně v posunech vlnočtů a opravdu lze pozorovat, že u tohoto materiálu na spektru ošetřeném alkoholem se nijak neprojevuje žádná změna.



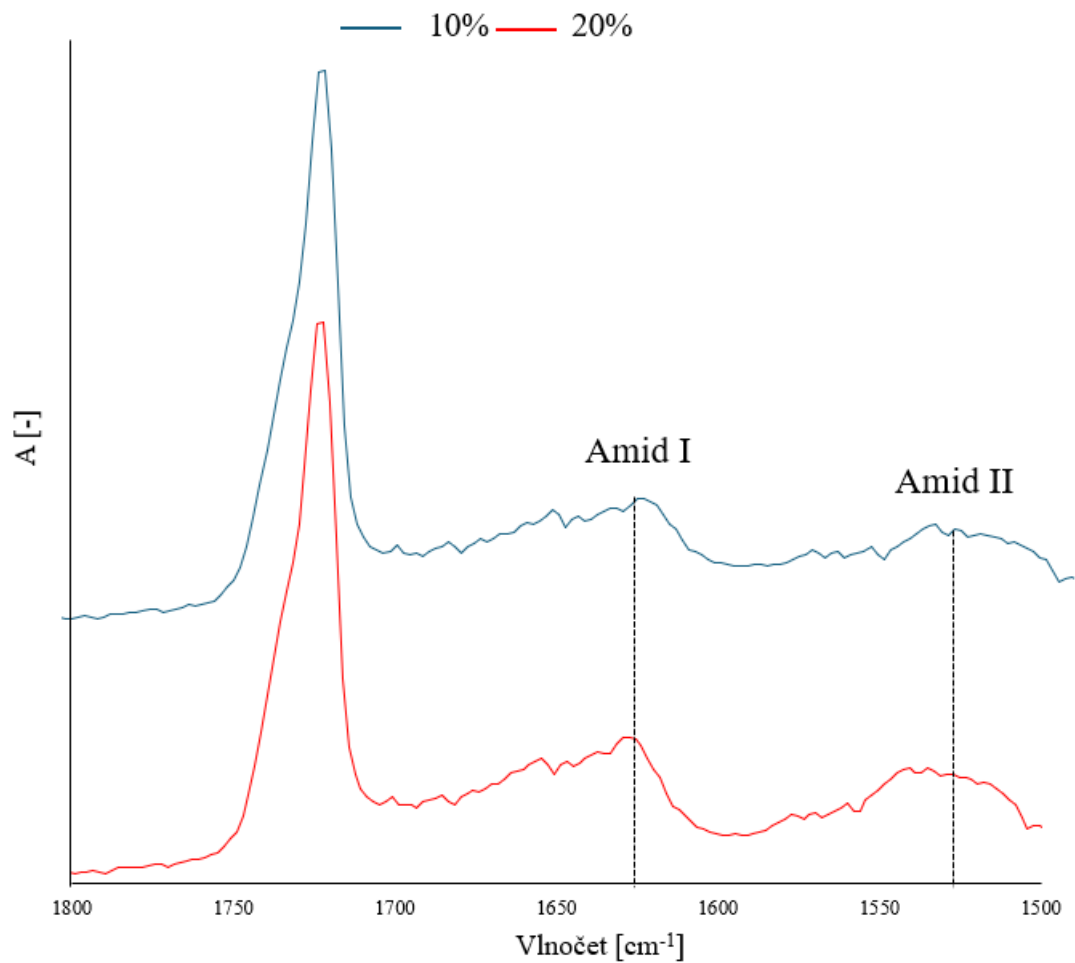
Obr. 47: Detail FTIR spektra čistého PCL před ošetřením methanolem a po ošetření methanolem

Na obr.48 je SEM srovnání čistého PCL před a po ošetření methanolem, na kterém lze pozorovat, že při působení methanolu nedochází ke změně struktury sférolitů.



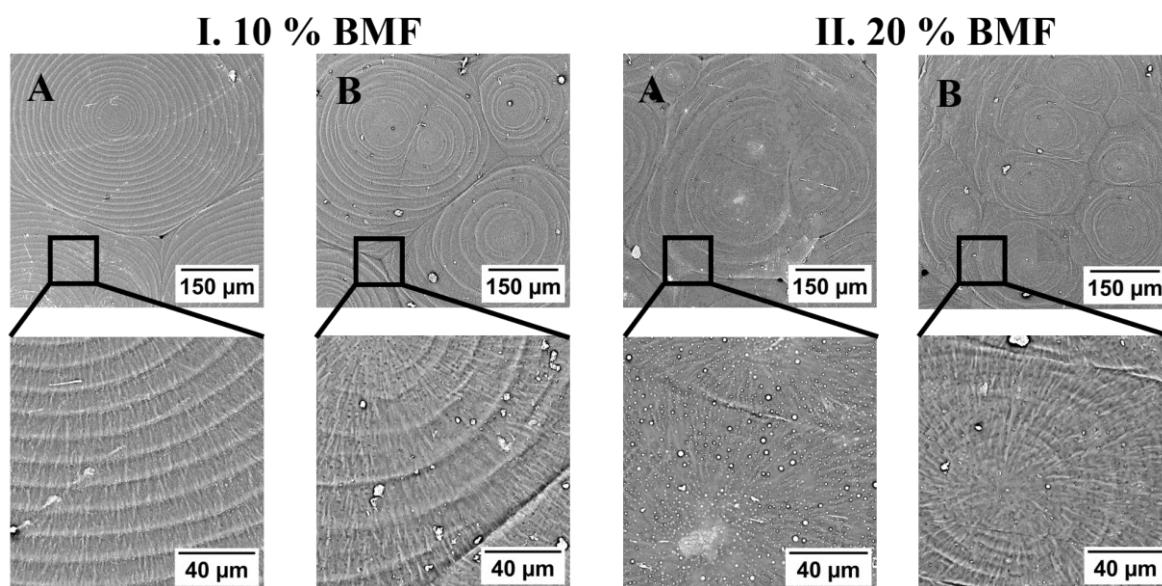
Obr. 48: Film z čistého PCL: A) před ošetřením methanolem B) po ošetření methanolem

U PCL filmů s obsahem 10 a 20 % fibroinu již bylo možné pozorovat konformační přechod na FITR spektru, obr. 49. Dochází k posunu maxim pro Amid I z 1650 cm^{-1} na 1625 cm^{-1} a Amid II z 1550 cm^{-1} na 1525 cm^{-1} .



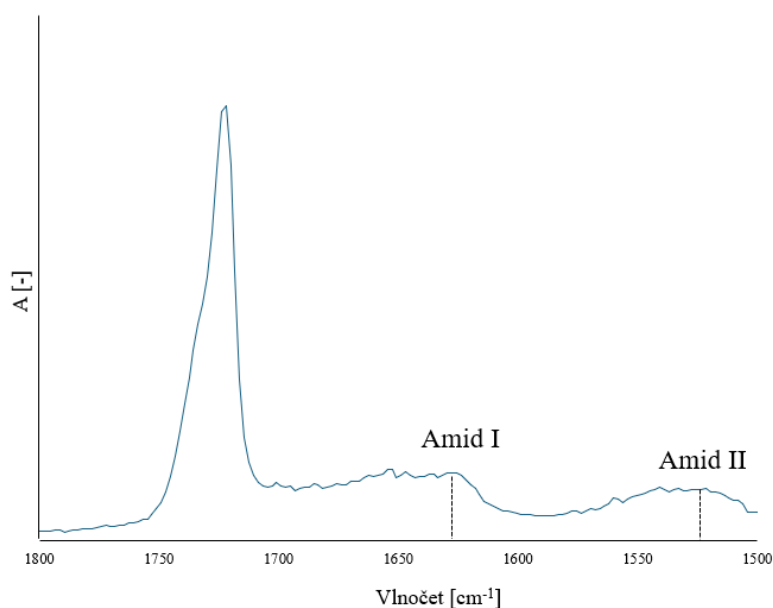
Obr. 49: Detail FTIR spektra pro transformované filmy s obsahem 10 % a 20 % fibroinu

Na SEM snímcích filmů s 10 % (obr. 50. I) a 20 % (obr. 50 II) lze pozorovat, že po ošetření methanolem nedochází k zániku prstencové struktury sférolitů, avšak při větším přiblížení lze pozorovat, že methanol na těchto filmech tvoří povrchové mikro-prohlubně.

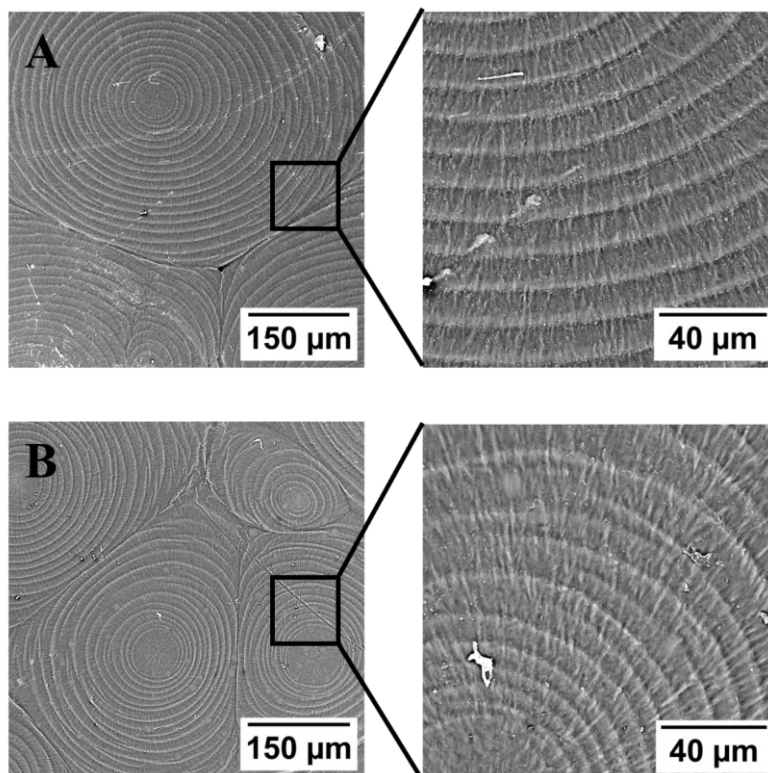


Obr. 50: SEM snímky prstencových struktur A) před a B) po ošetření methanolem, I) 10% BMF, II) 20% BMF

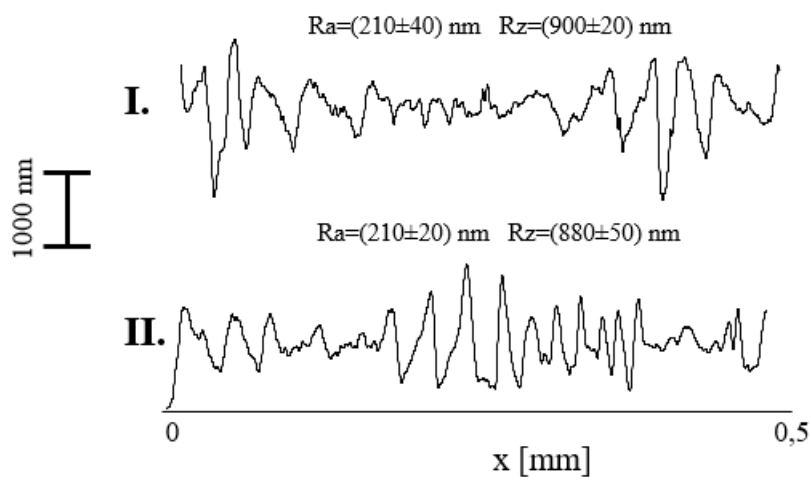
Na obr. 51 je znázorněno FTIR spektrum filmu s 10% fibroinu po ošetření ethanolem pro srovnání působení dalšího druhu alkoholu, přičemž dochází ke stejnému posunu na FITR spektru jako v případě methanolu. Na obr. 52 jsou SEM snímky povrchu před a po ošetření ethanolem a v tomto případě mikro-jamky na povrchu již nejsou tak výrazné, jako v případě použití methanolu.



Obr. 51: Detail FTIR spektra 10% BMF vzorku testovaného v ethanolu



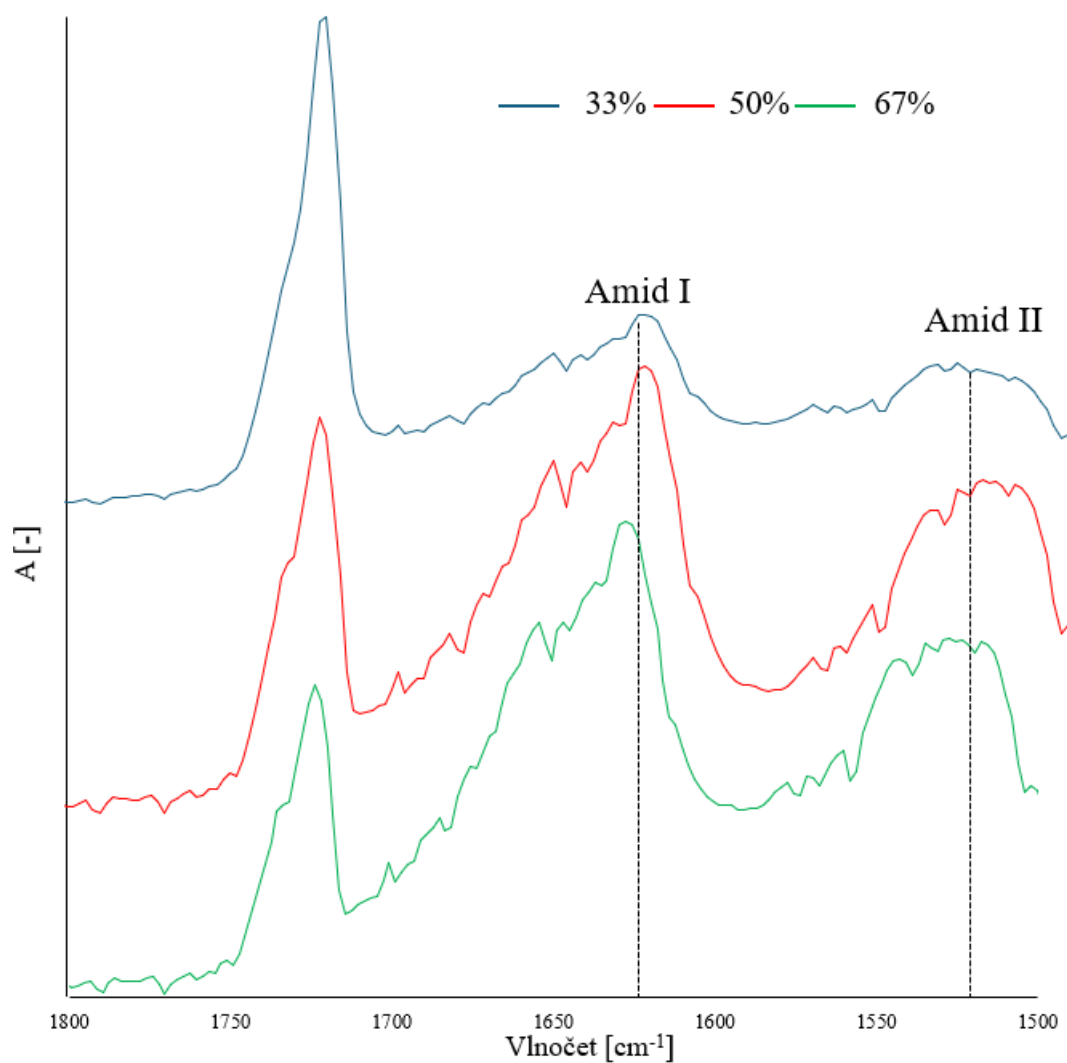
Obr. 52: SEM snímky prstencových struktur 10% BMF A) před a B) po ošetření ethanolom
 Na obr. 53 je znázorněna topografie drsnosti povrchu při modifikaci různých typů alkoholů, přičemž bylo zjištěno, že výsledky vyšly téměř totožně.



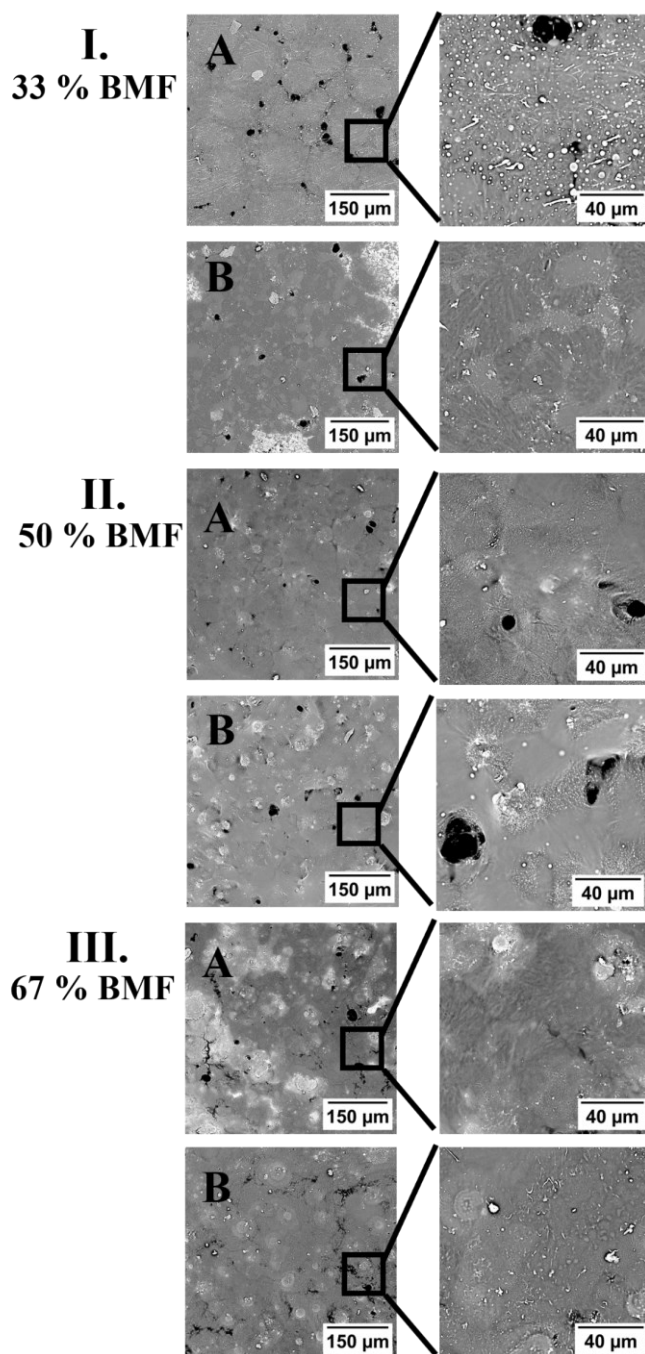
Obr. 53: Drsnost povrchu 10% vzorku I) ošetřeného methanolem, II) ošetřeného ethanolom

Posun maxim ve FTIR spektrech způsobený transformací sekundární struktury fibroinu je samozřejmě výrazněji detekovatelný na filmech s vyšším obsahem fibroinu tj. 33, 50 a 67 %, viz obr. 54.

Povrchy těchto filmů jsou zobrazeny pomocí SEM na obr. 55. Na povrchu nelze pozorovat výrazné změny po působení alkoholu, nedochází k tvorbě prohlubní jako v případě 10 a 20% podílu fibroinu.



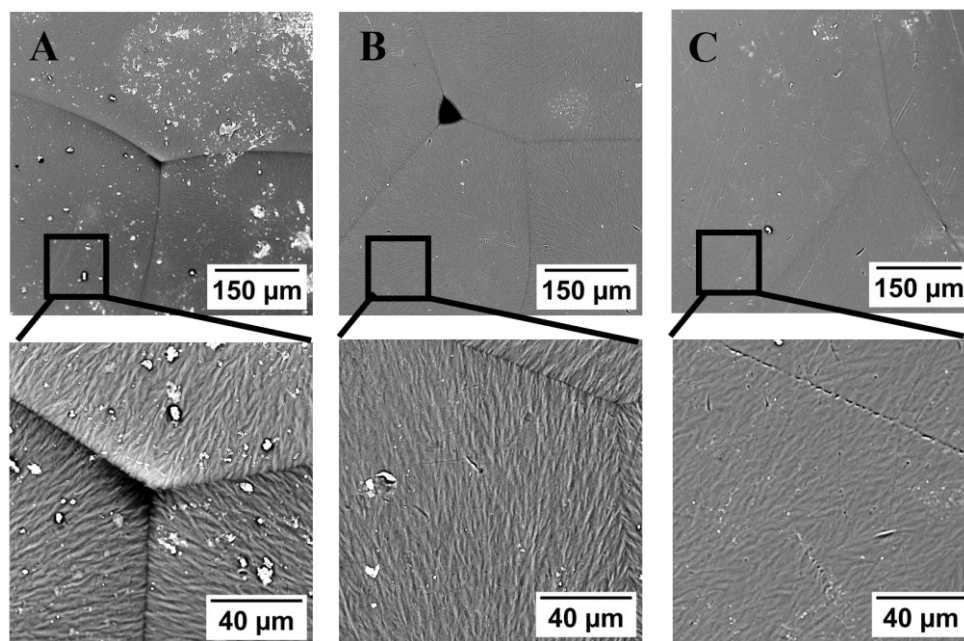
Obr. 54: Detail FTIR spektra filmů ze směsi s obsahem 33 %, 50 % a 67 % fibroinu



Obr. 55: SEM snímky porézního povrchu A) před a za B) po ošetření methanolem, I) 33% BMF, II) 50% BMF, III) 67% BMF

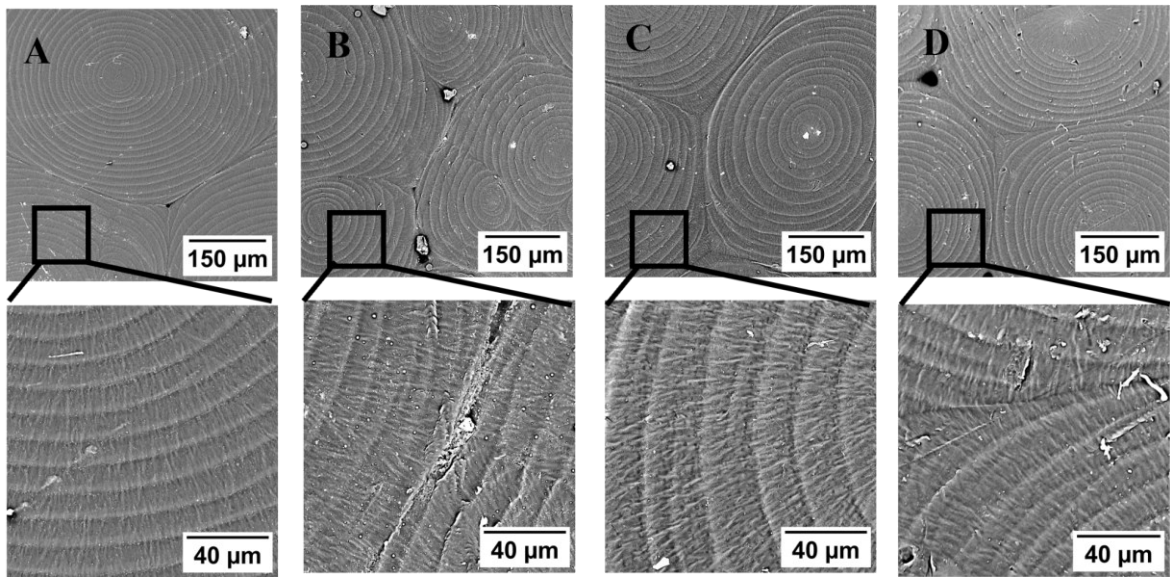
7.1.5 Stabilita BMF-PCL filmů ve vodě

Připravené filmy byly následně vystaveny působení vody po definované časy. V případě čistého PCL po působení vody na methanolem neošetřený povrch po dobu 48 hodin zůstává povrchová struktura sférolitů zachována. Po působení vody na povrch ošetření však lze pozorovat, že topografie je méně výrazná obr. 56

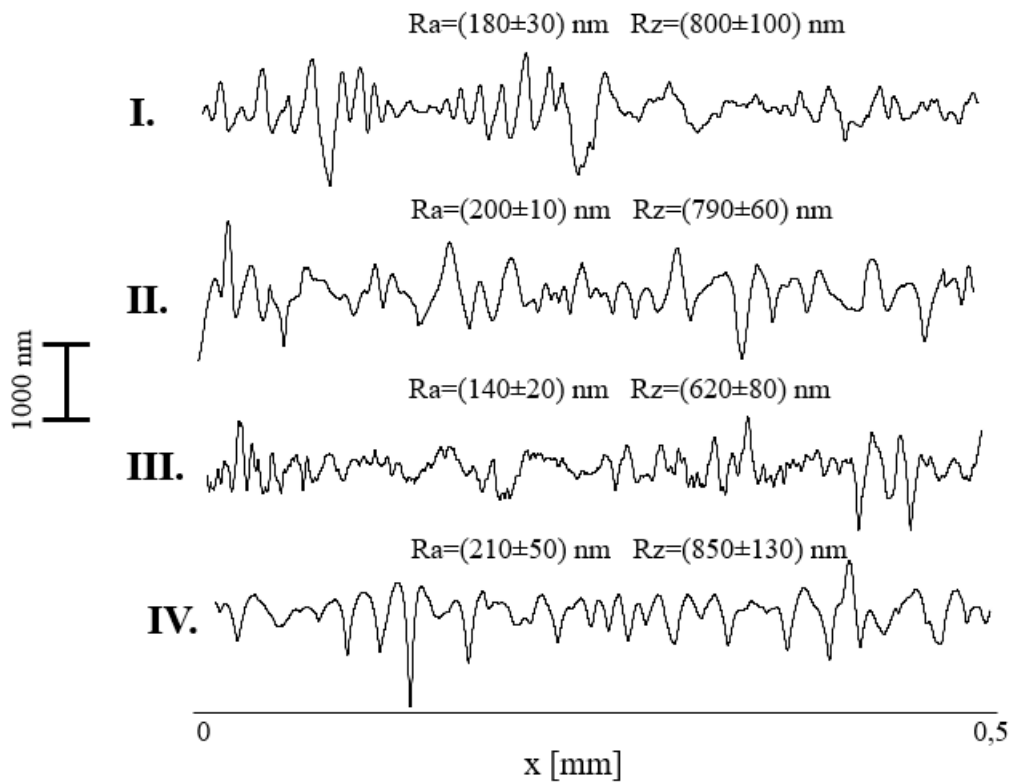


Obr. 56: Vzorek čistého PCL :A) po vysušení, B) po inkubaci ve vodě, C) po ošetření methanolem a inkubaci ve vodě

Na obr. 57 jsou snímky ze SEM mikroskopu vzorku s 10 % fibroinu ošetřeného ve vodě. U methanolem neošetřených vzorků bylo možné pozorovat topografické změny na hranách sférolitů, kdy mohla být vlivem přítomnosti rozpustných částic fibroinu v matrici narušena stabilita struktury. Na Obr. 57 C a D je pak zobrazena struktura filmu s 10% obsahem fibroinu po ošetření methanolem, resp. ethanolom a působení vody. Je patrné, že přítomnost transformovaných částic zvyšuje stabilitu topografie filmu. Dále lze pozorovat přítomnost povrchových prohlubní vzniklých po ošetření methanolem, které zůstávají i po inkubaci ve vodě. Mezi parametry drsnosti jednotlivých typů povrchu na obr. 58 jsou velmi malé rozdíly.

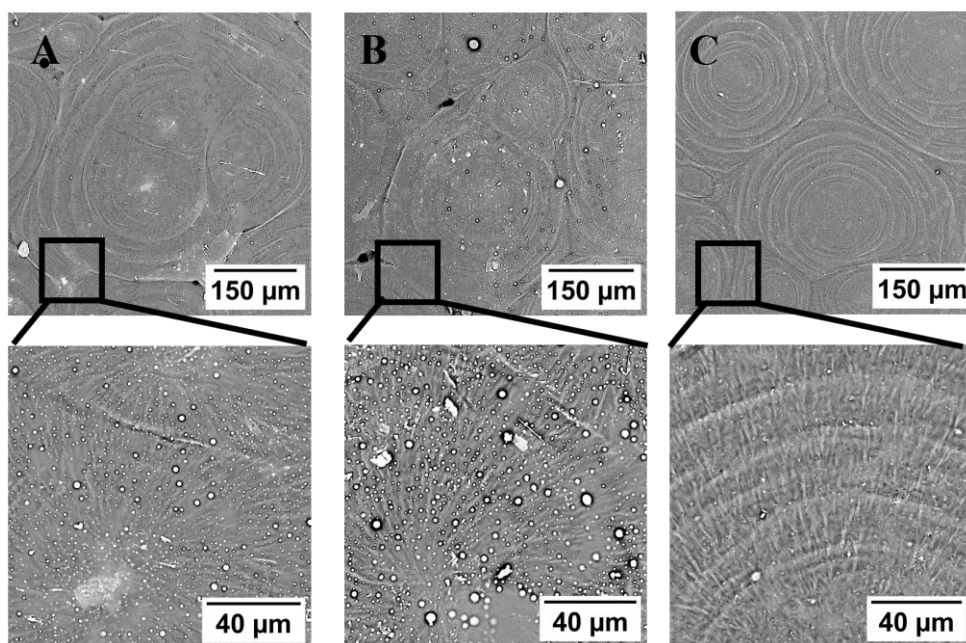


Obr. 57: Vzorek s 10 % fibroinu A) po vysušení, B) po inkubaci ve vodě, C) po ošetření methanolem a inkubaci ve vodě a D) po ošetření ethanolem a inkubaci ve vodě



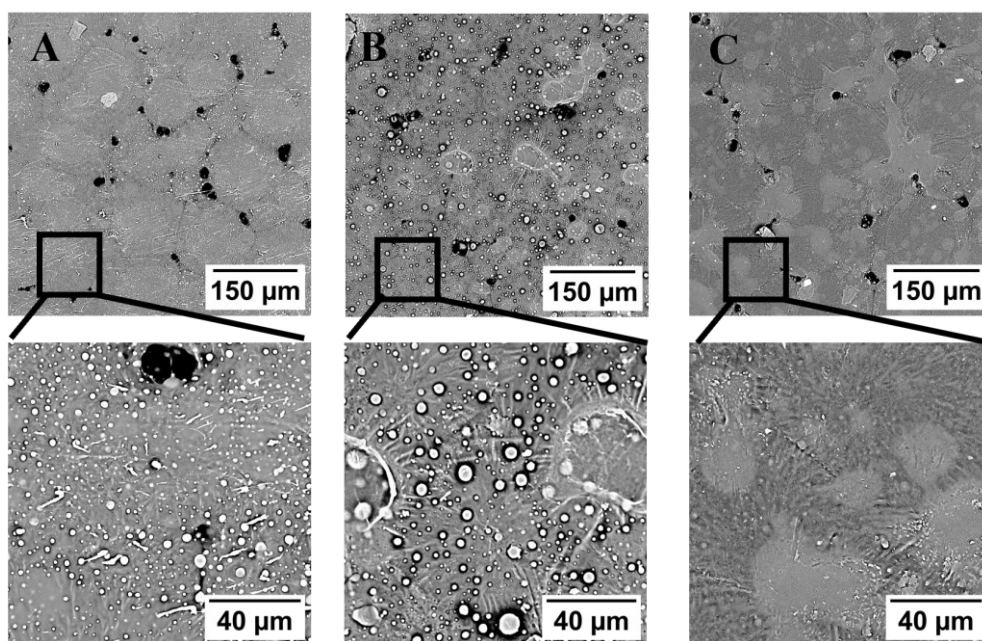
Obr. 58: Topografie drsnosti povrchu 10 % fibroinu: I) po vysušení, II) po inkubaci ve vodě, III) po ošetření methanolem a IV) po ošetření ethanolem a inkubaci ve vodě

Narušení struktury působením vody v případě přítomnosti netransformovaných částic je ještě výraznější v případě filmu s obsahem 20 % fibroinu, obr. 59 B. Na povrchu dochází k tvorbě agregovaných částic pravděpodobně fibroinu. Fibroin ve formě SILK I je ve vodě rozpustný, zároveň se však v přítomnosti vody transformuje do SILK II stavu, například působením vodních par. Stejně tak při převedení do pevného stavu z vodného roztoku zaujímá SILK II formu. Ošetření methanolem strukturu opět stabilizovalo, stejně jako v případě 10 % podílu fibroinu ve směsi, obr. 59 C.

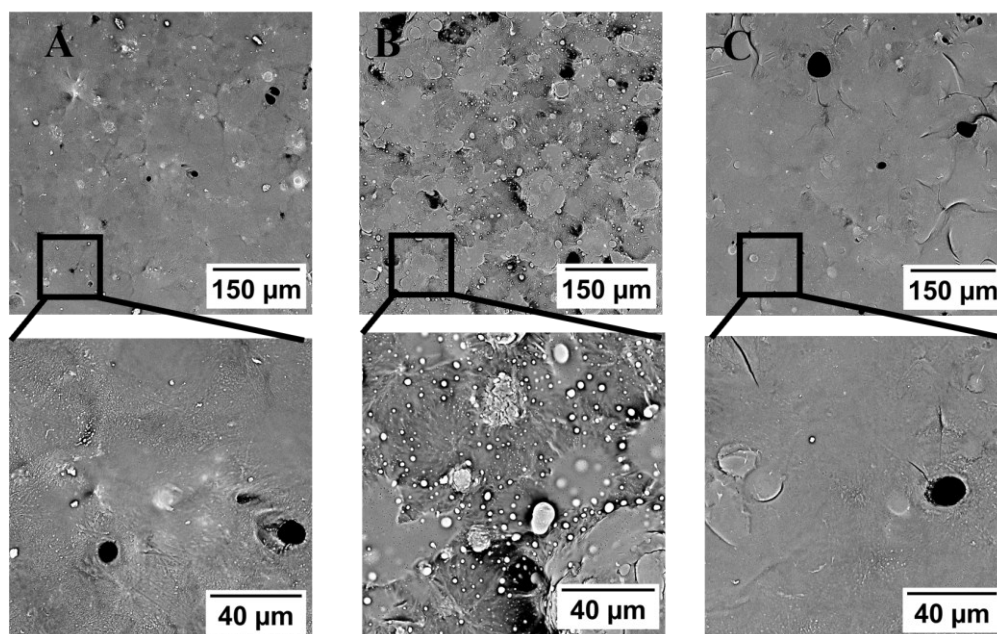


Obr. 59: Vzorek s 20 % fibroinu A) po vysušení, B) po inkubaci ve vodě, C) po ošetření methanolem a inkubaci ve vodě

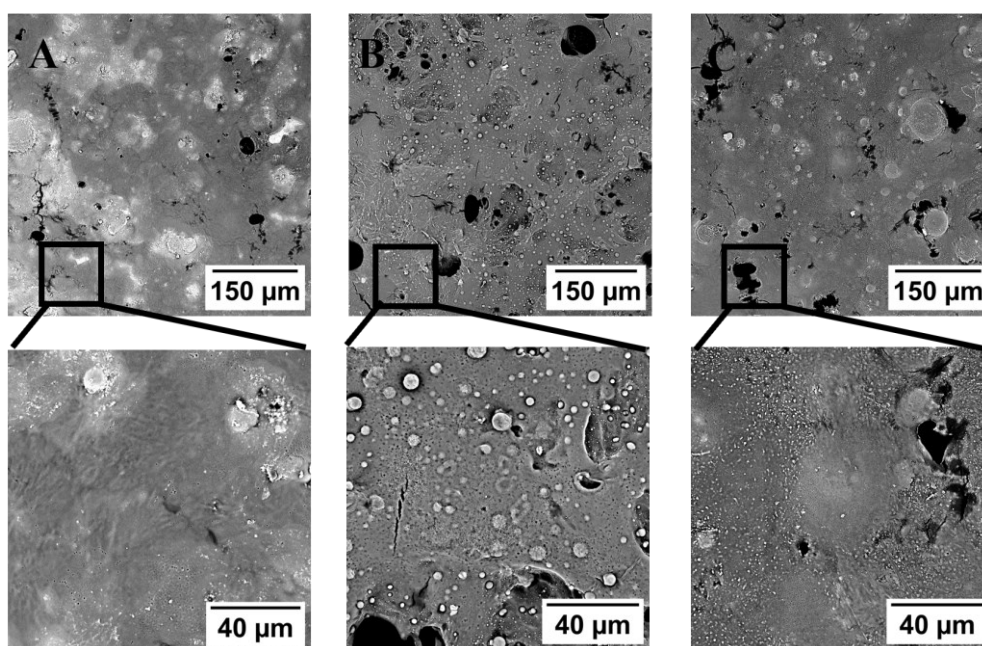
Bylo pozorováno, že se zvyšující se koncentrací nestabilizovaného fibroinu ve směsi (33 %, 50 %, a 67 %) se výrazně zvyšuje míra deformace topografie filmu způsobená jeho degradací, obr. 60-62. Rovněž byly pozorovány čím dále větší agregované shluky fibroinu na povrchu. Ošetření methanolem opět stabilitu výrazně zlepšilo, obecně lze však říct, že vyšší podíly fibroinu ve směsi cca nad 30 % se na topografii začínají projevovat negativně, způsobují nehomogenní zdrsňení povrchu a urychlují jeho degradaci. Tento aspekt urychlení degradace polykaprolaktonu by však mohl být žádoucí v některých aplikacích v tkáňovém inženýrství.



Obr. 60: Vzorek s 33 % fibroinu A) po vysušení, B) po inkubaci ve vodě, C) po ošetření methanolem a inkubaci ve vodě



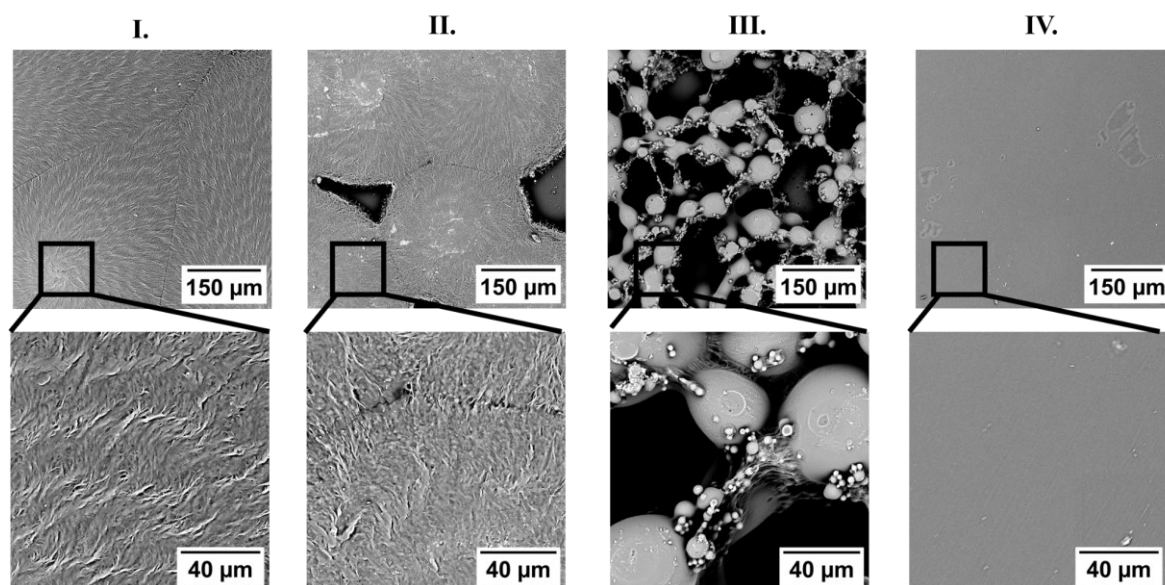
Obr. 61: Vzorek s 50 % fibroinu A) po vysušení, B) po inkubaci ve vodě, C) po ošetření methanolem a inkubaci ve vodě



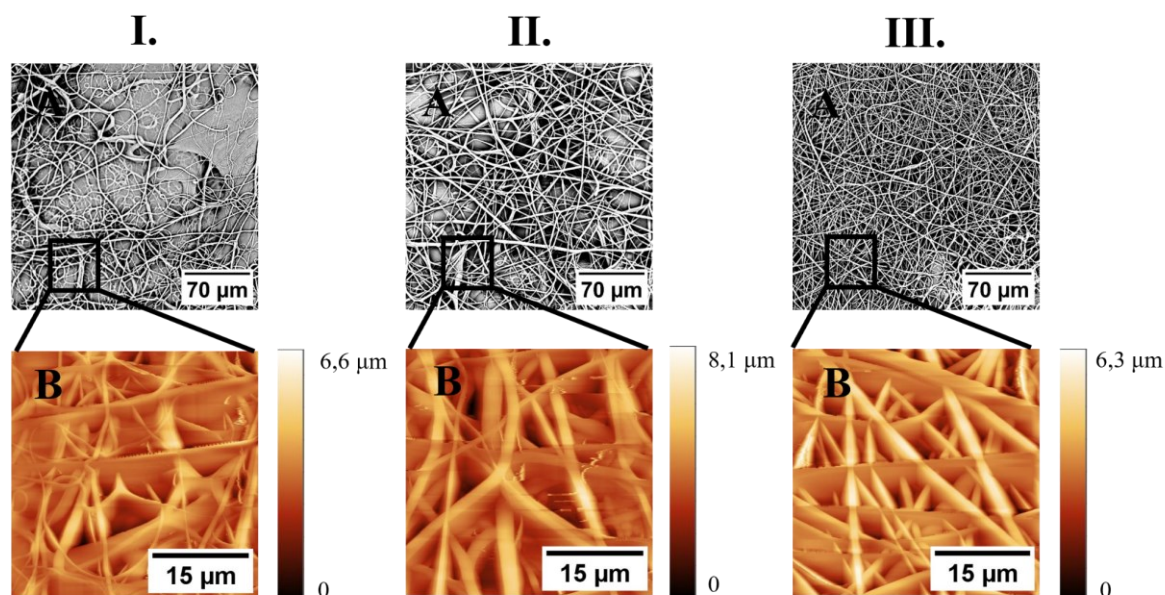
Obr. 62: Vzorek s 67 % fibroinu A) po vysušení, B) po inkubaci ve vodě, C) po ošetření methanolem a inkubaci ve vodě

7.1.6 Vliv špatného rozpouštědla na povrchovou topografii

Za účelem změny v povrchové topografii, která je způsobena fázovou separací působením směsi rozpouštědel, byly připraveny vybrané filmy z roztoků PCL s fibroinem v HFIP s příměsí špatného rozpouštědla DMSO. Na obr. 63 jsou snímky ze SEM. Na čisté PCL nemá přítomnost DMSO téměř žádný vliv, ale s větším přídatkem BMF se začíná výrazně projevovat fázová separace jednotlivých polymerů s výrazným projevem u směsi s podílem 67 % fibroinu. V případě čistého BMF se opět přítomnost DMSO nijak neprojevuje. Fázová separace fibroinu a polykaprolaktonu je studována zejména z hlediska vlivu na zpracovatelnost, především v případě techniky elektrostatického zvláknování [182]. V rámci experimentální činnosti bylo testováno i zvláknování těchto směsí, které již není součástí této práce. Výsledky však potvrzují, že přítomnost minoritního podílu fibroinu ve směsi zlepšuje zvláknitelnost PCL, která je dále výrazně podpořena špatným rozpouštědlem DMSO ve směsi. Náhled preliminárních výsledků je na obr. 64.



Obr. 63: SEM snímky struktur se špatným rozpouštědlem: I) čisté PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF, IV) čisté BMF

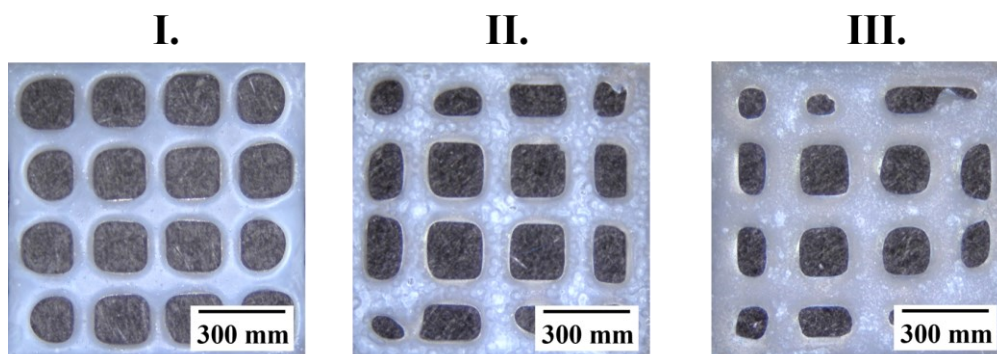


Obr. 64: Snímky spinovaných vláken I) Čistého PCL, II) PCL + 10% BMF a III) PCL + 10% BMF + DMSO; A) SEM snímky, B) AFM snímky

7.2 3D tisk směsí PCL a BMF

Vybrané směsi popsané v předchozí kapitolách byly následně zpracovány metodou 3D tisku z roztoku. Kromě podílu fibroinu ve směsi byly sledovány různé způsoby sušení výtisku. Na obr. 65 je náhled na makroskopickou strukturu vytištěných mřížek z roztoku PCL v HFIP s obsahem 0 %, 10 % a 67 % fibroinu. Při tisku bylo patrné, že nejnádhněji tisknutelný je

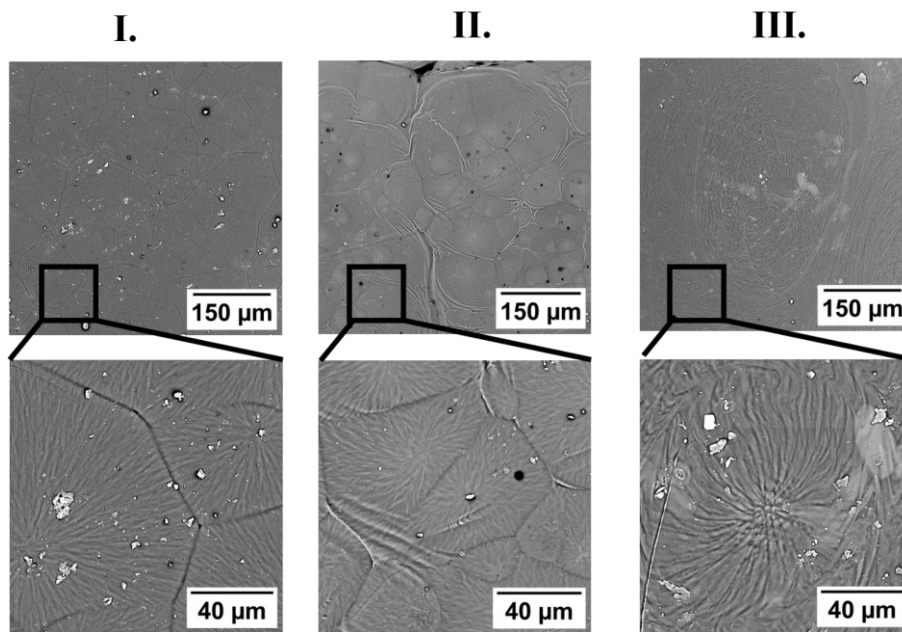
čistý PCL. Po mírném přidavku BMF bylo možné pozorovat, že tisknutelnost směsi z důvodu nárůstu viskozity a postupné krystalizace fibroinu vlivem smykového namáhání se mírně zhoršila, přičemž nejnáročnější na tisk byla jednoznačně směs, kde byl BMF v přebytku.



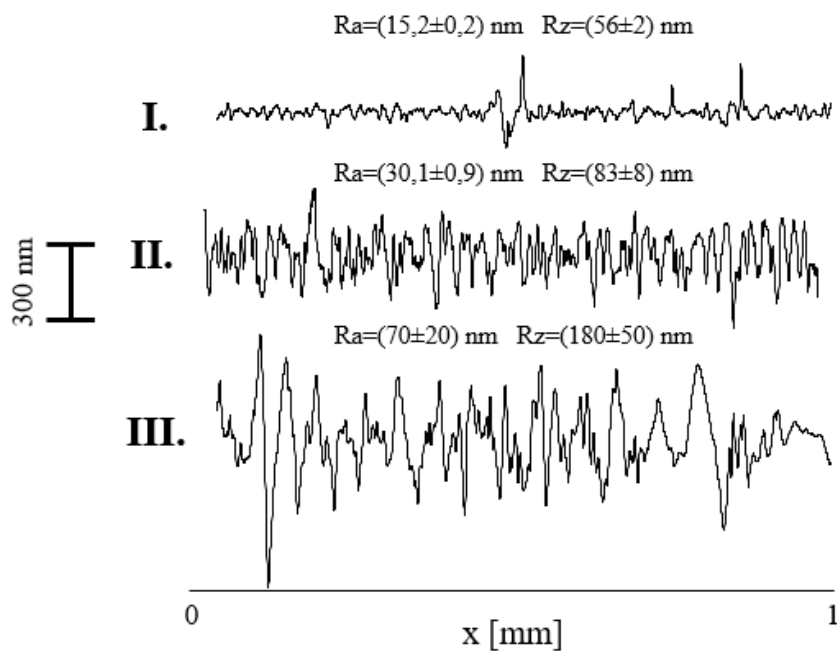
Obr. 65: Makroskopický náhled na vytištěné mřížky: I) Čistý PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF

7.2.1 Vliv rychlosti sušení na topografii

Na obr. 66 jsou zobrazeny povrchy mřížek ze všech analyzovaných směsí, kdy tyto mřížky byly po vytištění ponechány volně v digestoři s odtahem, tudíž došlo k velmi rychlému odpaření rozpouštědla a krystalizaci. Přítomnost 10 % fibroinu ve směsi nemá výrazný vliv na strukturu PCL sférolitů, lze pouze pozorovat neorganizované zvrásnění na povrchu dáno pravděpodobně rychlostí odpaření rozpouštědla. Zvláštní strukturu lamel sférolitů lze však pozorovat v případě obsahu fibroinu 67 %. Ačkoliv v případě filmů při této koncentraci dochází k rozrušení sférolitické struktury PCL, zde zůstává zčásti zachována. Ve srovnání s výše popsány filmů lze konstatovat, že v tomto případě se přítomnost částic na struktuře PCL zdnalivě výrazně neprojevuje. Z profilometrických měření na obr. 67 však plyne, že s nárůstem obsahu fibroinu ve směsi opět dochází ke zvýšení parametrů drsnosti.



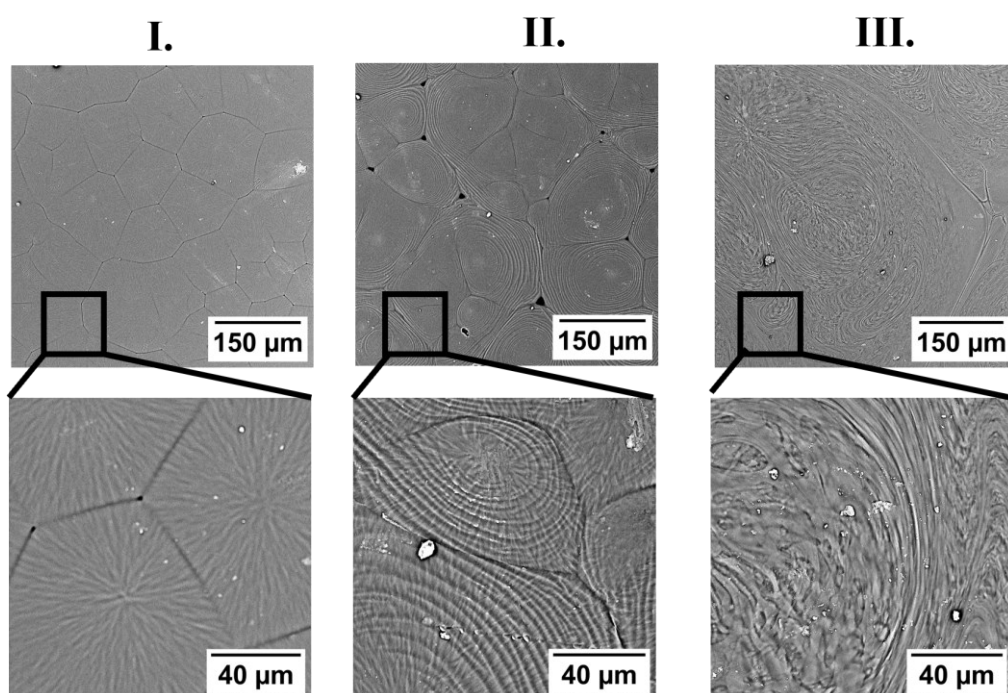
Obr. 66: SEM snímky mřížek, které byly sušeny digestoři: I) Čisté PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF



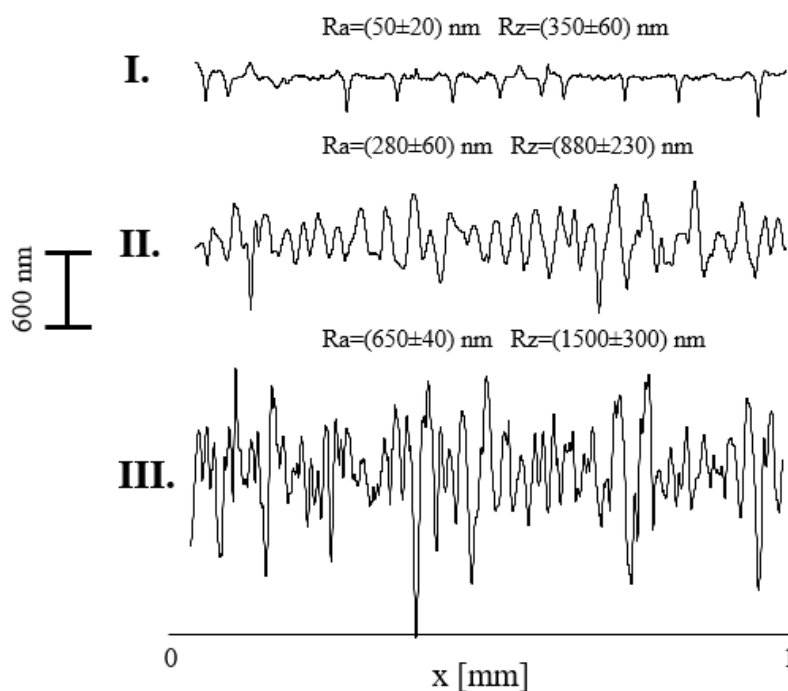
Obr. 67: Drsnost povrchu u mřížek, které byly sušeny digestoři: I) Čisté PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF

Na obr. 68 je prezentován případ, kdy po vytištění byly výtisky umístěny do exsikátoru, aby odpařování rozpouštědla probíhalo pomaleji. V případě filmu s příměsí 10 % fibroinu bylo na rozdíl od předchozího experimentu s rychlým sušením pozorováno formování

prstencových sférolitů stejně jako v případě filmů, které byly rovněž sušeny kontrolovaně delší dobu. Kromě tloušťky polymerní vrstvy a velikosti plochy se tedy jako zásadní v roli při formování prstencového sférolitu ukázala rychlost odpařování rozpouštědla a tím pádem rychlost krystalizace, která je samozřejmě spojena i se dvěma zmíněnými parametry. Drsnost povrchů (obr. 69) opět s narůstající koncentrací fibroinu narůstá a je vyšší než v případě krátké doby sušení.



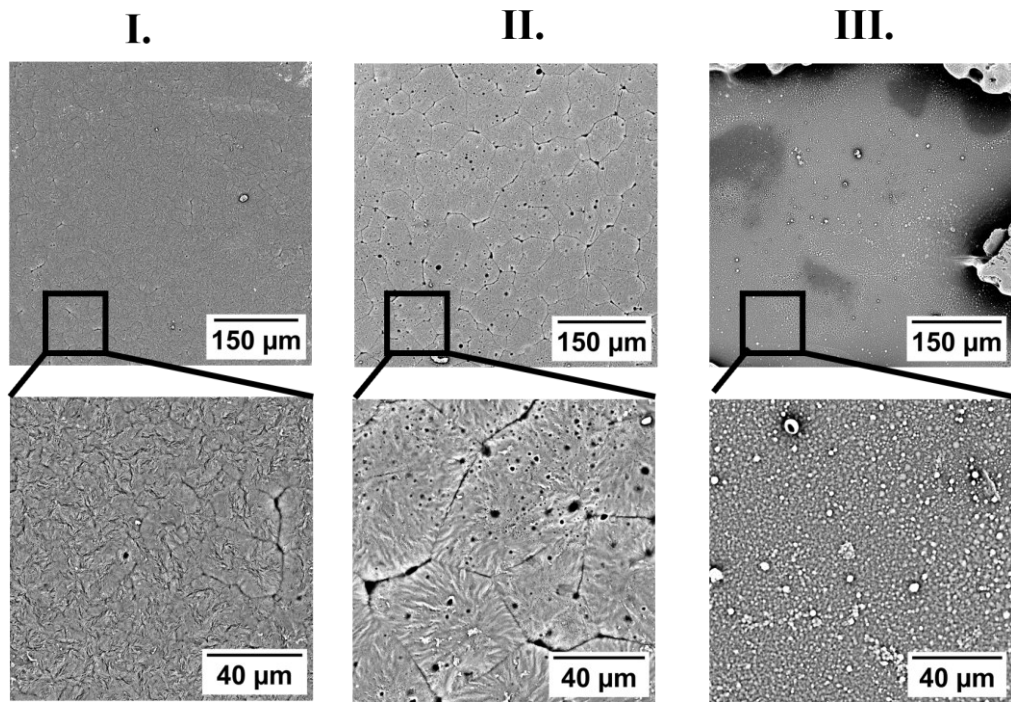
Obr. 68: SEM snímky mřížek, které byly sušeny v exsikátoru: I) Čisté PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF



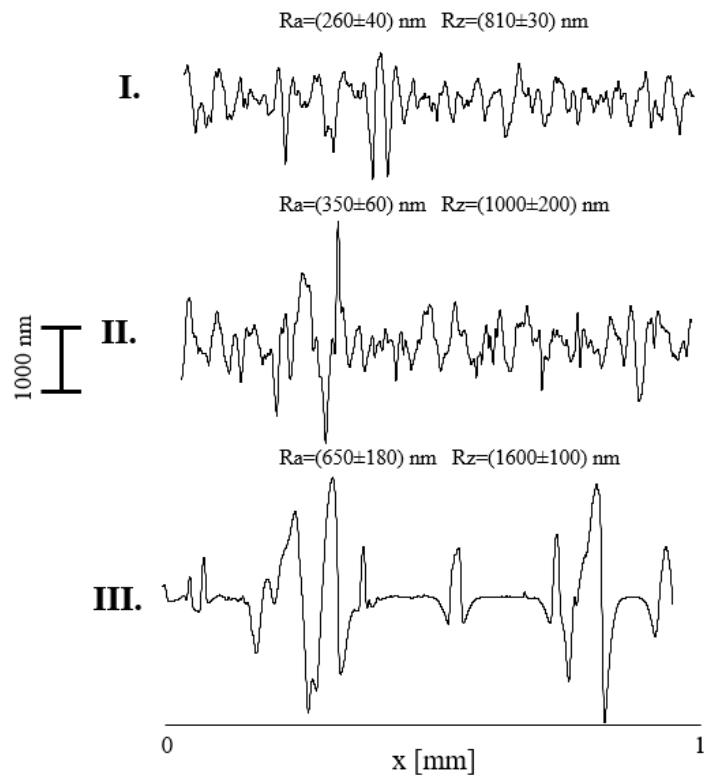
Obr. 69: Drsnost povrchu u mřížek, které byly sušeny v exsikátoru: I) Čistě PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF

7.2.2 Vliv vody a alkoholu na topografii

Dále bylo sledováno, jaký vliv na topografii bude mít pokrytí výtisku vodou nebo alkoholem s cílem generovat porézní strukturu na povrchu. V první fázi byla na mřížky deponována bezprostředně po vytištění voda. Náznak porézní povrchové topografie lze pozorovat na obr. 70 II. pro film s 10 % fibroinu. V případě vyššího plnění 67 % (obr. 70 III.) lze pozorovat podobný jev jako v případě filmů, tedy že při vysychání mřížky dochází k vysrážení fibroinu do větších částic. Parametry drsnosti vykazovaly stále stejný trend, že s rostoucí koncentrací BMF se zvyšuje drsnost povrchu.

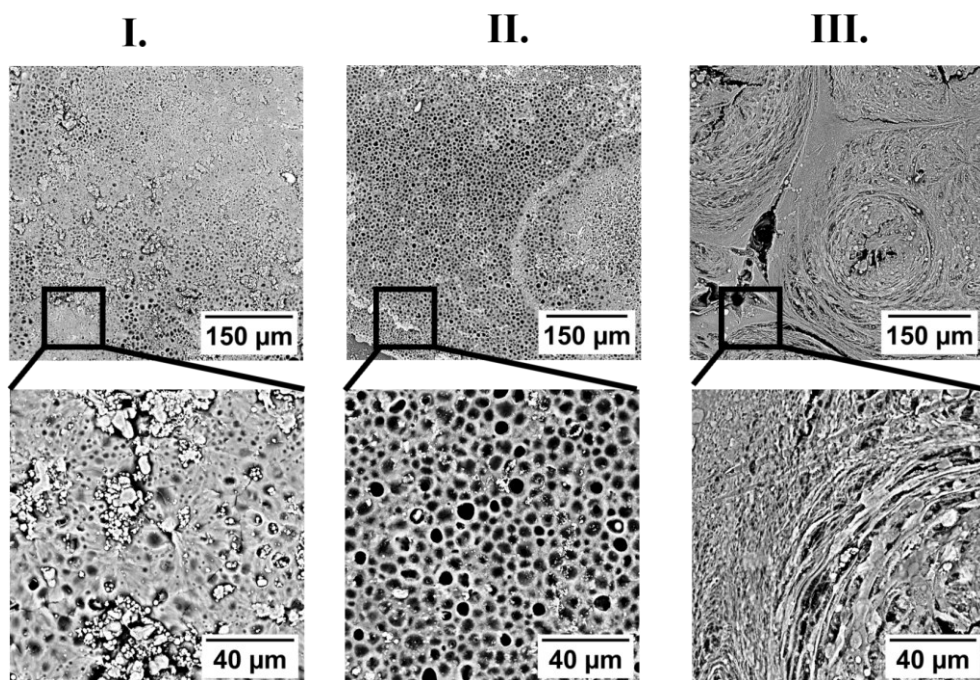


Obr. 70: SEM snímky mřížek, které byly ihned po vytištění zakápnuty vodou: I) Čisté PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF

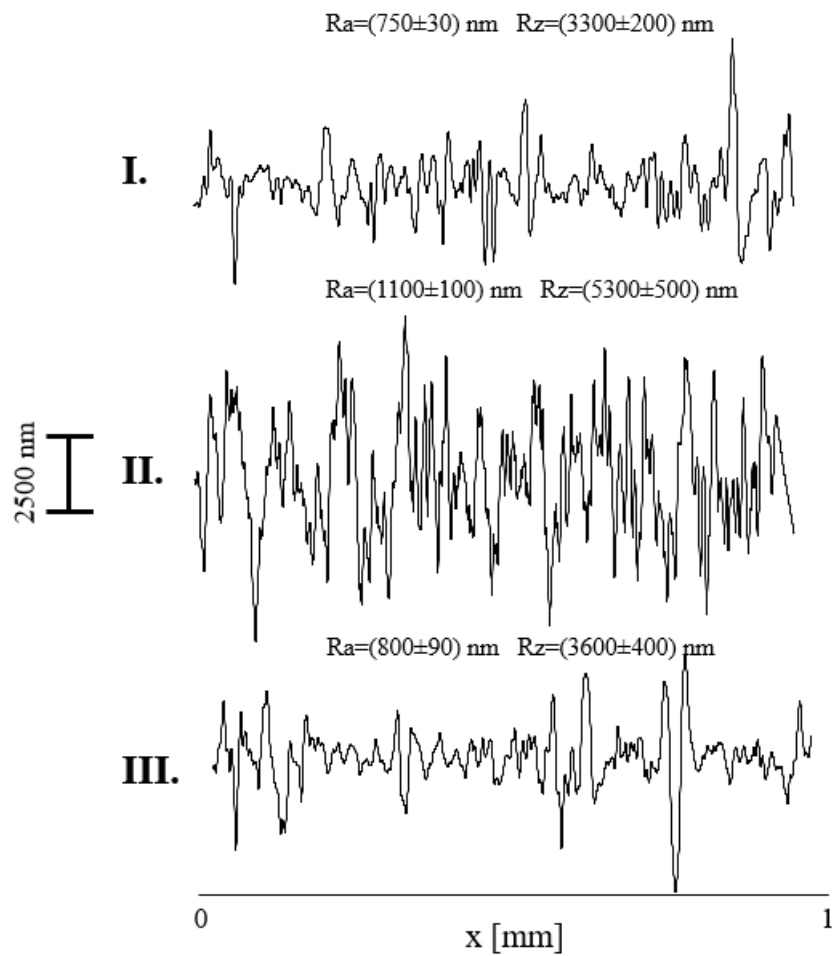


Obr. 71: Drsnost povrchu u mřížek, které byly ihned po vytištění zakápnuty vodou: I) Čisté PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF

V poslední části se zaměříme na použití ethanolu, přičemž způsob sušení byl stejný, jako v předchozím případě s vodou. Na strukturu byl ihned po vytištění deponován ethanol. Výsledky poskytují zajímavé informace o topografii jednotlivých výtisků. Odpařující se HFIP z výtisků je pro oba polymery dobrým rozpouštědlem, kdežto ethanol je pro oba polymery rozpouštědlem špatným [183; 184]. Při postupném odpařování rozpouštědel tak dochází k formování tvaru povrchu. Po deposici ethanolu na čerstvý výtisk z PCL došlo na tomto povrchu k tvorbě nehomogenní porézní topografie. Výraznější efekt byl pozorován v případě vzorku s plněním 10 % fibroinem (obr. 72 II.). Zde vlivem působení ethanolu vznikla na povrchu homogenní jamková struktura. V tomto kroku vlivem působení ethanolu dochází zároveň ke stabilizaci přítomného fibroinu. Specifickou texturu lze pozorovat i v případě vyššího podílu fibroinu ve směsi 67 %, kdy tato definovaná struktura opět kopíruje tvar sférolitů PCL, ačkoliv se zdálo, že při tomto složení již k jejich tvorbě nedochází. Parametry drsnosti (obr. 73) jsou nyní nejvyšší pro jamkový povrch vzorku s plněním 10 % fibroinu, přičemž maximální převýšení dosahuje přibližně 5 μm .



Obr. 72: SEM snímky mřížek, které byly ihned po vytištění zakápnuty ethanolem: I) Čistě PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF



Obr. 73: Drsnost povrchu u mřížek, které byly ihned po vytištění zakápnuty ethanolem: I) Čistě PCL, II) 10% podíl BMF, III) 67% podíl BMF

ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byly studovány možnosti zpracování polykaprolaktonu a hedvábného proteinu. Cílem práce bylo prostudovat vliv koncentrace fibroinu ve směsi na strukturu sférolitů polykaprolaktonu, na zpracovatelnost a topografii připravených struktur.

V rámci experimentální práce bylo zjištěno, že fibroin rozpuštěný v organickém rozpouštědle spolu s polykaprolaktonem tvoří částice, které mají výrazný vliv na následnou krystalizaci polykaprolaktonu při sušení tenkých polymerních vrstev. Při nižších koncentracích fibroinu ve směsi se polykaprolakton organizuje do formy prstencových sférolitů. Rostoucí koncentrace hedvábného proteinu postupně narušuje organizované uspořádání lamel sférolitů související se separací těchto dvou materiálů, což vede ke vzniku nehomogenně drsného povrchu. Při většinovém podílu hedvábného proteinu bylo dosaženo povrchové topografie porézního charakteru. Fázová separace těchto dvou polymerů byla podpořena přidáním špatného rozpouštědla pro oba polymery do roztoku, přičemž byl nastíněn pozitivní vliv tohoto jevu na elektrostatické zvláknování směsi. Pomocí WAXS analýzy byly zachyceny jednotlivé krystalické formy obou materiálů.

Z důvodu plánovaných biologických experimentů byla dále studována transformace sekundární struktury fibroinu za účelem převedení materiálu do formy nerozpustné ve vodě. Navazující bylo následně sledování stability připravených struktur ve vodě na základě povrchových změn. Bylo zjištěno, že povrchová struktura PCL-fibroinových filmů je po transformaci sekundární struktury fibroinu při jeho nižších koncentracích stabilní ve vodě. U filmů s nestabilizovaným fibroinem docházelo působením vody pravděpodobně k jeho rozpuštění a vysrážení ve formě větších částic. Bylo dále pozorováno, že ošetření povrchu alkoholem mělo za následek tvorbu mikro-prohlubní na povrchu.

Vybrané směsi ve formě roztoku byly zpracovány extruzním 3D tiskem. Zde bylo zjištěno, že nejen složení směsi, ale taky způsob sušení hraje zcela klíčovou roli na výslednou topografii výtisků. Pomalejší odpařování rozpouštědla má za následek vznik prstencových sférolitů i ve struktuře výtisku. Dále byl sledován vliv působení vody a alkoholu na topografii výtisku při odpařování rozpouštědla. Přítomnost těchto rozpouštědel vedla k tvorbě jamkové povrchové topografie. Dále lze konstatovat, že přídavek hedvábného proteinu má ve všech případech za následek zvýšení drsnosti povrchu. V současné době jsou studovány biokompatibilita a reologické vlastnosti směsí v pevném stavu za účelem jejich tisku z taveniny.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LOPEZ, Irving. *Fracture Mechanics Fundamentals And Applications*. 3rd. 2001. ISBN 978-1-107-09676-9.
- [2] ANDERSON, Ted. *Fracture Mechanics: Fundamentals and Applications*. 4th. CRC Press, 2017. ISBN 9781498728133.
- [3] SPERLING, Laslie Howard. *Introduction to physical polymer science*. 4th. New Jersey: John Wiley, 2006. ISBN 13 978-0-471-70606-9.
- [4] FELDMAN, Dorel. Polymer History. online. *Designed Monomers and Polymers*. 2012, roč. 11, č. 1, s. 1-15. ISSN 1568-5551. Dostupné z: <https://doi.org/10.1163/156855508X292383>. [cit. 2023-09-30].
- [5] HORROCKS, A. a ANAND, R. *Handbook of Technical Textiles*. 2nd. Woodhead, 2000. ISBN 978-1-85573-385-5.
- [6] HOFFMAN, Allan S. a LEMONS, Jack E. *Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine*. 3rd. Boston: Elsevier/Academic Press, 2013. ISBN 978-0-12-374626-9.
- [7] TEMENOFF, Johnna S. a MIKOS, Antonios G. *Biomaterials: The Intersection of Biology and Materials Science*. 1st. New York: Pearson, 2008. ISBN 978-0130097101.
- [8] HENCH, Larry L. a JONES, Jelian R. *Biomaterials, artificial and tissue engineering*. 1st. Cambridge: Woodhead, 2005. ISBN 9780849325779.
- [9] OHRING, M. *Journal of the Brazilian Society of Mechanical Sciences and Engineering*. 1st. New York: Academia Press, 1995.
- [10] ROBINSON, Jeremy a PADMARUJU, Anoop. Polymer in Medicine CE 435 Introduction to Polymer Department of Chemical Engineering.
- [11] BARONE, D. T.-J.; RAQUEZ, J.-M. a DUBOIS, Ph. Bone-guided regeneration: from inert biomaterials to bioactive polymer (nano)composites. online. *Polymers for Advanced Technologies*. 2011, roč. 22, č. 5, s. 463-475. ISSN 1042-7147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/pat.1845>. [cit. 2024-05-06].
- [12] RATNER, B. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 1st. San Diego: Academic Press. ISBN 01-258-2460-2.
- [13] DEB, Payel; DEOGHARE, Ashish B.; BORAH, Animesh; BARUA, Emon a DAS LALA, Sumit. Scaffold Development Using Biomaterials: A Review. online. *Materials Today: Proceedings*. 2018, roč. 5, č. 5, s. 12909-12919. ISSN 22147853. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.02.276>. [cit. 2023-10-01].
- [14] VAN BLITTERSWIJK, Clemens; THOMSEN, Peter; HUBBELL, Jeffrey a CANCEDDA, Ranieri. *Tissue Engineering (Academic Press Series in Biomedical Engineering)*. 1st. London, 2008. ISBN 978-0123708694.
- [15] MILNE, Ian; RITCHIE, R.O. a KARIHALOO, B.L. *Comprehensive Structural Integrity*. 1st. Boston: Elsevier, 2003. ISBN 9780080490731.
- [16] SHUKLA, Sudheesh K.; MISHRA, Ajay K.; AROTIBA, Omotayo A. a MAMBA, Bhekie B. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013, roč. 59, s. 46-58. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.043>. [cit. 2023-10-07].

- [17] JENNINGS, J. a BUMGARDER, J. *Chitosan Based Biomaterials*. 2nd. Boston: Elsevier, 2016. ISBN 9780081002285.
- [18] NARAYAN, R. *Nanostructured Materials for Biomedical Applications*. 1st. Elsevier, 2017. ISBN 9780081007167.
- [19] MA, P.X. *Biomaterials and Regenerative Medicine*. 1st. Cambridge University Press, 2014. ISBN 978-1107012097.
- [20] GOA, Karen L. a BENFIELD, Paul. Hyaluronic Acid. online. *Drugs*. 1994, roč. 47, č. 3, s. 536-566. ISSN 0012-6667. Dostupné z: <https://doi.org/10.2165/00003495-199447030-00009>. [cit. 2023-10-07].
- [21] SALWOWSKA, Natalia M; BEBENEK, Katarzyna A; ŻĄDŁO, Dominika A a WCISŁO-DZIADECKA, Dominika L. Physiochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review. online. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2016, roč. 15, č. 4, s. 520-526. ISSN 1473-2130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jocd.12237>. [cit. 2023-10-07].
- [22] RINAUDO, Marguerite. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. online. *Polymer International*. 2008, roč. 57, č. 3, s. 397-430. ISSN 0959-8103. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/pi.2378>. [cit. 2023-10-07].
- [23] THOMAS, S.; BALAKRISHNAN, P. a SREEKALA, M.S. *Fundamental Biomaterials: Polymers*. 1st. United Kingdom: Elsevier, 2018. ISBN 9780081021941.
- [24] AMBROSIO, Luihi. *Biomedical Composites*. 2nd. Duxford: Elsevier, 2017. ISBN 9780081007525.
- [25] WANG, X.; LI, X.; BANK, R.A. a AGRAWAL, C.M. Effects of Collagen Unwinding and Cleavage on the Mechanical Integrity of the Collagen Network in Bone. online. *Calcified Tissue International*. 2002, roč. 71, č. 2, s. 186-192. ISSN 0171-967X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00223-001-1082-2>. [cit. 2023-10-07].
- [26] FAKIROV, S. a BHATTACHARYYA, D. *Handbook of engineering biopolymers: homopolymers, blends, and composites*. 1st. 2007. ISBN 978-1-56990-405-3.
- [27] BHATTACHARJEE, Promita; KUNDU, Banani; NASKAR, Deboki; KIM, Hae-Won; MAITI, Tapas K. et al. Silk scaffolds in bone tissue engineering: An overview. online. *Acta Biomaterialia*. 2017, roč. 63, s. 1-17. ISSN 17427061. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.09.027>. [cit. 2023-10-07].
- [28] SANGAMESH, G.; LAURENCIN, Cato a DENG, Meng. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. 1st. Burlington: Elsevier, 2014. ISBN 9780123972903.
- [29] PALADINI, Federica a POLLINI, Mauro. Novel Approaches and Biomaterials for Bone Tissue Engineering: A Focus on Silk Fibroin. online. *Materials*. 2022, roč. 15, č. 19. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma15196952>. [cit. 2023-10-07].
- [30] KOH, Leng-Duei; CHENG, Yuan; TENG, Choon-Peng; KHIN, Yin-Win; LOH, Xian-Jun et al. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials. online. *Progress in Polymer Science*. 2015, roč. 46, s. 86-110. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.001>. [cit. 2023-11-02].
- [31] DANIELS, C.D. *Polymers structure and properties*. 1st. USA, 1989. ISBN 87762-552-2.

- [32] SEYMOUR, R.B. *Polymers for engineering applications*. 1st. London: Asm Intl, 2015. ISBN 978-0871702470.
- [33] CALLISTER, W.D. a RETHWISCH, D.G. *Materials Science and Engineering, an Introduction*. 3rd. USA: Willey, 1994. ISBN 978-1-118-32457-8.
- [34] HAJALI, Faezeh; TAJBAKSHI, Saeid a SHOJAEI, Akbar. Fabrication and Properties of Polycaprolactone Composites Containing Calcium Phosphate-Based Ceramics and Bioactive Glasses in Bone Tissue Engineering: A Review. online. *Polymer Reviews*. 2017, roč. 58, č. 1, s. 164-207. ISSN 1558-3724. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/15583724.2017.1332640>. [cit. 2023-10-15].
- [35] OERTEL, G. *Polyurethane handbook*. 1st. Munich: Hanser, 1994. ISBN 1-56990-157-0.
- [36] GUARINO, V.; GENTILE, G.; SORRENTINO, L. a AMBROSIO, L. Polycaprolactone. online. *Synthesis, properties, and applications. Encyclopedia of Polymer Science and Technology* [..]. 2017. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/0471440264.pst658>. [cit. 2023-10-15].
- [37] LABET, Marianne a THIELEMANS, Wim. Synthesis of polycaprolactone: a review. online. *Chemical Society Reviews*. 2009, roč. 38, č. 12. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/b820162p>. [cit. 2023-10-15].
- [38] AZIMI, Bahareh; NOURPANAH, Parviz; RABIEE, Mohammad a ARBAB, Shahram. Poly (ϵ -caprolactone) Fiber: An Overview. online. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*. 2014, roč. 9, č. 3. ISSN 1558-9250. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/155892501400900309>. [cit. 2023-10-15].
- [39] HAKKARAINEN, Minna a THIELEMANS, Wim. Aliphatic Polyesters: Abiotic and Biotic Degradation and Degradation Products. online. *Degradable Aliphatic Polyesters*. Advances in Polymer Science. 2002, roč. 38, č. 12, s. 113-138. ISBN 978-3-540-42249-5. ISSN 0306-0012. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/3-540-45734-8_4. [cit. 2023-10-17].
- [40] DOBRZYNSKI, Piotr. Mechanism of ϵ -caprolactone polymerization and ϵ -caprolactone/trimethylene carbonate copolymerization carried out with Zr(Acac)₄. online. *Polymer*. 2007, roč. 48, č. 8, s. 2263-2279. ISSN 00323861. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.02.005>. [cit. 2023-10-15].
- [41] DUBOIS, P.; COULEMBIER, O. a RAQUEZ, J. *Handbook of Ring-Opening Polymerization*. 1st. 2009. ISBN 978-3-527-31953-4.
- [42] PENCZEK, Stanislaw a SLOMKOWSKI, Stanislaw. Progress in Anionic Ring-Opening Polymerization. online. *Recent Advances in Anionic Polymerization*. 1987, s. 275-295. ISBN 978-94-010-7924-2. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-94-009-3175-6_19. [cit. 2023-10-21].
- [43] SAZANOV, Yu N. Polymerisation of Lactones. online. *Russian Chemical Reviews*. 1968, roč. 37, č. 6, s. 463-469. ISSN 0036-021X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1070/RC1968v037n06ABEH001653>. [cit. 2023-10-21].
- [44] RYNER, M. a ALBERTSSON, A. *Degradable Aliphatic Polyesters*. 1st. Berlin: Heidelberg, 2002. ISBN 978-3-540-42249-5.
- [45] ICART, Luis; FERNANDES, Edson; AGÜERO, Lissette; CUESTA, Maelia; SILVA, Dionisio et al. End Functionalization by Ring Opening Polymerization: Influence of Reaction Conditions on the Synthesis of End Functionalized Poly(lactic Acid). online. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2017. ISSN 01035053. Dostupné z: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170118>. [cit. 2023-10-21].

- [46] MECERREYES, David; JÉRÔME, Robert a DUBOIS, Philippe. Novel Macromolecular Architectures Based on Aliphatic Polyesters: Relevance of the “Coordination-Insertion” Ring-Opening Polymerization. online. *Macromolecular Architectures*. Advances in Polymer Science. 1999, s. 1-59. ISBN 978-3-540-65576-3. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/3-540-49196-1_1. [cit. 2023-10-21].
- [47] LING, Jun; SHEN, Jingguo a HOGEN-ESCH, Thio E. A density functional theory study of the mechanisms of scandium-alkoxide initiated coordination–insertion ring-opening polymerization of cyclic esters. online. *Polymer*. 2009, roč. 50, č. 15, s. 3575-3581. ISSN 00323861. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.06.006>. [cit. 2023-10-21].
- [48] PLATEL, Rachel; HODGSON, Linda a WILLIAMS, Charlotte. Biocompatible Initiators for Lactide Polymerization. online. *Polymer Reviews*. 2008, roč. 48, č. 1, s. 11-63. ISSN 1558-3724. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/15583720701834166>. [cit. 2023-10-22].
- [49] BROWNING, E. *Toxicity of industrial metals*. 1st. Butterworths, 1969. ISBN 978-0407415508.
- [50] WANG, Yi a KUNIOKA, Masao. Ring-Opening Polymerization of Cyclic Monomers with Aluminum Triflate. online. *Macromolecular Symposia*. 2005, roč. 224, č. 1, s. 193-206. ISSN 1022-1360. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/masy.200550617>. [cit. 2023-10-24].
- [51] NOMURA, Nobuyoshi; TAIRA, Atsuko; TOMIOKA, Takashi a OKADA, Masahiko. A Catalytic Approach for Cationic Living Polymerization: Sc(OTf)₃-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Lactones. online. *Macromolecules*. 2000, roč. 33, č. 5, s. 1497-1499. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ma991580r>. [cit. 2023-10-24].
- [52] CHAN, Chi-Ming a LI, Lin. Direct Observation of the Growth of Lamellae and Spherulites by AFM. online. *Intrinsic Molecular Mobility and Toughness of Polymers II*. Advances in Polymer Science. 2005, s. 1-41. ISBN 978-3-540-26162-9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/b136971>. [cit. 2023-10-27].
- [53] KELLER, A. A note on single crystals in polymers: Evidence for a folded chain configuration. online. *Philosophical Magazine*. 1957, roč. 2, č. 21, s. 1171-1175. ISSN 0031-8086. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/14786435708242746>. [cit. 2023-10-27].
- [54] LI, Yiguo; WANG, Zongbao a HE, Tianbai. Morphological Control of Polymer Spherulites via Manipulating Radial Lamellar Organization upon Evaporative Crystallization: A Mini Review. online. *Crystals*. 2017, roč. 7, č. 4. ISSN 2073-4352. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cryst7040115>. [cit. 2023-10-27].
- [55] RAMANATHAN, Muruganathan a DARLING, Seth B. Mesoscale morphologies in polymer thin films. online. *Progress in Polymer Science*. 2011, roč. 36, č. 6, s. 793-812. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.12.006>. [cit. 2023-10-27].
- [56] BASSETT, D.C. *Principles of Polymer Morphology*. St. UK: Cambridge University Press, 1981. ISBN 978-0521298865.
- [57] LI, Yiguo; HUANG, Haiying; WANG, Zongbao a HE, Tianbai. Tuning Radial Lamellar Packing and Orientation into Diverse Ring-Banded Spherulites: Effects of Structural Feature and Crystallization Condition. online. *Macromolecules*. 2014, roč.

- 47, č. 5, s. 1783-1792. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ma402579d>. [cit. 2023-10-27].
- [58] KOZIOL, Paulina; KOSOWSKA, Karolina; LIBERDA, Danuta; BORONDICS, Ferenc a WROBEL, Tomasz P. Super-Resolved 3D Mapping of Molecular Orientation Using Vibrational Techniques. online. *Journal of the American Chemical Society*. 2022, roč. 144, č. 31, s. 14278-14287. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jacs.2c05306>. [cit. 2023-10-28].
- [59] NGUYEN-TRI, Phuong; GHASSEMI, Payman; CARRIERE, Pascal; NANDA, Sonil; ASSADI, Aymen Amine et al. Recent Applications of Advanced Atomic Force Microscopy in Polymer Science: A Review. online. *Polymers*. 2020, roč. 12, č. 5. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym12051142>. [cit. 2023-10-28].
- [60] KOSSACK, Wilhelm a KREMER, Friedrich. Banded spherulites and twisting lamellae in poly- ϵ -caprolactone. online. *Colloid and Polymer Science*. 2019, roč. 297, č. 5, s. 771-779. ISSN 0303-402X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00396-019-04503-8>. [cit. 2023-10-27].
- [61] CRIST, Buckley a SCHULTZ, Jerold M. Polymer spherulites: A critical review. online. *Progress in Polymer Science*. 2016, roč. 56, s. 1-63. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.11.006>. [cit. 2023-10-27].
- [62] LI, Yiguo; HUANG, Haiying; HE, Tianbai a WANG, Zongbao. Rhythmic Growth Combined with Lamellar Twisting Induces Poly(ethylene adipate) Nested Ring-Banded Structures. online. *ACS Macro Letters*. 2012, roč. 1, č. 1, s. 154-158. ISSN 2161-1653. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/mz2000785>. [cit. 2023-10-27].
- [63] LI, Yiguo; WANG, Zongbao; GU, Qun a WU, Xuedong. Enhance understanding of rhythmic crystallization in confined evaporating polymer solution films: from environment to solution film and then to one period. online. *RSC Advances*. 2016, roč. 6, č. 51, s. 45241-45249. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C6RA02803A>. [cit. 2023-10-27].
- [64] WANG, Zongbao; ALFONSO, Giovanni C.; HU, Zhijun; ZHANG, Jidong a HE, Tianbai. Rhythmic Growth-Induced Ring-Banded Spherulites with Radial Periodic Variation of Thicknesses Grown from Poly(ϵ -caprolactone) Solution with Constant Concentration. online. *Macromolecules*. 2008, roč. 41, č. 20, s. 7584-7595. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ma8005697>. [cit. 2024-04-26].
- [65] LI, Wei; YAN, Rongjiang a JIANG, Bingzheng. The ring-banded spherulite structure of poly(ϵ -caprolactone) in its miscible mixtures with poly(styrene-co-acrylonitrile). online. *Polymer*. 1992, roč. 33, č. 4, s. 889-892. ISSN 00323861. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(92\)90358-4](https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)90358-4). [cit. 2024-05-09].
- [66] HECHT, E. *Optics*. 4th. Addison-Wesley, 2001. ISBN 978-0805385663.
- [67] CIRILLO, Valentina; GUARINO, Vincenzo a AMBROSIO, Luigi. Design of Bioactive Electrospun Scaffolds for Bone Tissue Engineering. online. 2012, roč. 10, č. 3, s. 223-228. ISSN 2280-8000. Dostupné z: <https://doi.org/10.5301/JABFM.2012.10343>. [cit. 2023-10-28].
- [68] WOODRUFF, Maria Ann a HUTMACHER, Dietmar Werner. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. online. *Progress in Polymer Science*. 2010, roč. 35, č. 10, s. 1217-1256. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>. [cit. 2023-10-28].

- [69] LI, L. a LABARBERA, D.V. 3D High-Content Screening of Organoids for Drug Discovery. online. *Comprehensive Medicinal Chemistry III*. 2017, s. 388-415. ISBN 9780128032015. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12329-7>. [cit. 2023-10-28].
- [70] SALGADO, Christiane L.; SANCHEZ, Elisabete M. S.; ZAVAGLIA, Cecília A. C. a GRANJA, Pedro L. Biocompatibility and biodegradation of polycaprolactone-sebacic acid blended gels. online. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2012, roč. 100, č. 1, s. 243-251. ISSN 1549-3296. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33272>. [cit. 2024-05-08].
- [71] LOWERY, Joseph L.; DATTA, Néha a RUTLEDGE, Gregory C. Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly(ϵ -caprolactone) fibrous mats. online. *Biomaterials*. 2010, roč. 31, č. 3, s. 491-504. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.072>. [cit. 2023-10-28].
- [72] MOERS-CARPI, Marion Michaela a SHERWOOD, Sally. Polycaprolactone for the Correction of Nasolabial Folds: A 24-Month, Prospective, Randomized, Controlled Clinical Trial. online. *Dermatologic Surgery*. 2013, roč. 39, č. 3, s. 457-463. ISSN 1076-0512. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/dsu.12054>. [cit. 2023-10-28].
- [73] KIM, Jongseo Antonio a VAN ABEL, Daan. Neocollagenesis in human tissue injected with a polycaprolactone-based dermal filler. online. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*. 2015, roč. 17, č. 2, s. 99-101. ISSN 1476-4172. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/14764172.2014.968586>. [cit. 2023-10-28].
- [74] HIRAISHI, Noriko; YAU, Joyce Y.Y.; LOUSHINE, Robert J.; ARMSTRONG, Steven R.; WELLER, R. Norman et al. Susceptibility of a Polycaprolactone-based Root Canal-filling Material to Degradation. III. Turbidimetric Evaluation of Enzymatic Hydrolysis. online. *Journal of Endodontics*. 2007, roč. 33, č. 8, s. 952-956. ISSN 00992399. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.05.004>. [cit. 2023-10-28].
- [75] RICKS, ChristianB; SHIN, SamuelS; BECKER, Christopher a GRANDHI, Ramesh. Extracellular matrices, artificial neural scaffolds and the promise of neural regeneration. online. *Neural Regeneration Research*. 2014, roč. 9, č. 17. ISSN 1673-5374. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.141778>. [cit. 2023-10-28].
- [76] CHEN, Fa-Ming a LIU, Xiaohua. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. online. *Progress in Polymer Science*. 2016, roč. 53, s. 86-168. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004>. [cit. 2023-10-28].
- [77] REN, Xiaoyan; TU, Victor; BISCHOFF, David; WEISGERBER, Daniel W.; LEWIS, Michael S. et al. Nanoparticulate mineralized collagen scaffolds induce in vivo bone regeneration independent of progenitor cell loading or exogenous growth factor stimulation. online. *Biomaterials*. 2016, roč. 89, s. 67-78. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.02.020>. [cit. 2023-10-28].
- [78] ABDAL-HAY, Abdalla; SHEIKH, Faheem A.; GÓMEZ-CEREZO, N.; ALNEAIRI, Abdulrahman; LUQMAN, Monis et al. A review of protein adsorption and bioactivity characteristics of poly ϵ -caprolactone scaffolds in regenerative medicine. online. *European Polymer Journal*. 2022, roč. 162. ISSN 00143057. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110892>. [cit. 2023-10-28].

- [79] VEPARI, Charu a KAPLAN, David L. Silk as a biomaterial. online. *Progress in Polymer Science*. 2007, roč. 32, č. 8-9, s. 991-1007. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013>. [cit. 2023-11-02].
- [80] KUNDU, Banani; RAJKHOWA, Rangam; KUNDU, Subhas C. a WANG, Xungai. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013, roč. 65, č. 4, s. 457-470. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.043>. [cit. 2023-11-02].
- [81] NASKAR, D.; BARUA, R.R.; GHOSH, A.K. a KUNDU, S.C. Introduction to silk biomaterials. online. *Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2014, s. 3-40. ISBN 9780857096999. Dostupné z: <https://doi.org/10.1533/9780857097064.1.3>. [cit. 2023-11-02].
- [82] VOLLRATH, Fritz a KNIGHT, David P. Liquid crystalline spinning of spider silk. online. *Nature*. 2001, roč. 410, č. 6828, s. 541-548. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/35069000>. [cit. 2023-11-02].
- [83] RAJITHA, K. a SOWMYA, P. *Biochemical and Cellular Archives Dermestid beetle [Dermestes ater (De Geer)] : A pest in silkworm (Bombyx mori L.) seed production*. 2021.
- [84] ANDERSSON, Marlene; JOHANSSON, Jan a RISING, Anna. Silk Spinning in Silkworms and Spiders. online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, roč. 17, č. 8. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms17081290>. [cit. 2023-11-02].
- [85] ZHOU, Cong-Zhao; CONFALONIERI, Fabrice; JACQUET, Michel; PERASSO, Roland; LI, Zhen-Gang et al. Silk fibroin: Structural implications of a remarkable amino acid sequence. online. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2001, roč. 44, č. 2, s. 119-122. ISSN 0887-3585. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/prot.1078>. [cit. 2023-11-04].
- [86] NIRMALA, Xavier; KODRÍK, Dalibor; ŽUROVEC, Michal a SEHNAL, František. Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor. online. *European Journal of Biochemistry*. 2001, roč. 268, č. 7, s. 2064-2073. ISSN 0014-2956. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02084.x>. [cit. 2023-11-04].
- [87] SPRAGUE, Karen U. Bombyx mori silk proteins. Characterization of large polypeptides. online. *Biochemistry*. 1975, roč. 14, č. 5, s. 925-931. ISSN 0006-2960. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bi00676a008>. [cit. 2023-11-04].
- [88] JOHNSTON, Erik R.; MIYAGI, Yu; CHUAH, Jo-Ann; NUMATA, Keiji a SERBAN, Monica A. Interplay between Silk Fibroin's Structure and Its Adhesive Properties. online. 2018, roč. 4, č. 8, s. 2815-2824. ISSN 2373-9878. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00544>. [cit. 2023-11-04].
- [89] ASAKURA, Tetsuo; OKUSHITA, Keiko a WILLIAMSON, Mike P. Analysis of the Structure of Bombyx mori Silk Fibroin by NMR. online. *Macromolecules*. 2015, roč. 48, č. 8, s. 2345-2357. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b00160>. [cit. 2023-11-04].
- [90] RIZZO, Giorgio; LO PRESTI, Marco; GIANNINI, Cinzia; SIBILLANO, Teresa; MILELLA, Antonella et al. Bombyx mori Silk Fibroin Regeneration in Solution of Lanthanide Ions: A Systematic Investigation. online. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021, roč. 9. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.653033>. [cit. 2023-11-04].

- [91] TANAKA, Kazunori; KAJIYAMA, Naoki; ISHIKURA, Kiyohide; WAGA, Shou; KIKUCHI, Aiko et al. Determination of the site of disulfide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1999, roč. 1432, č. 1, s. 92-103. ISSN 01674838. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00088-6). [cit. 2023-11-04].
- [92] INOUE, Satoshi; TANAKA, Kazunori; ARISAKA, Fumio; KIMURA, Sumiko; OHTOMO, Kohei et al. 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. online. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, roč. 275, č. 51, s. 40517-40528. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M006897200>. [cit. 2023-11-04].
- [93] TANAKA, Kazunori; INOUE, Satoshi a MIZUNO, Shigeki. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. online. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 1999, roč. 29, č. 3, s. 269-276. ISSN 09651748. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(98\)00135-0](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(98)00135-0). [cit. 2023-11-04].
- [94] VOLKOV, Vadim; FERREIRA, Ana V. a CAVACO-PAULO, Artur. On the Routines of Wild-Type Silk Fibroin Processing Toward Silk-Inspired Materials: A Review. online. *Macromolecular Materials and Engineering*. 2015, roč. 300, č. 12, s. 1199-1216. ISSN 14387492. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mame.201500179>. [cit. 2023-11-04].
- [95] WÖLTJE, M. a BÖBEL, M. Natural biodegradable medical polymers. online. *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers*. 2017, s. 351-376. ISBN 9780081003725. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100372-5.00012-X>. [cit. 2023-11-04].
- [96] WILSON, Donna; VALLUZZI, Regina a KAPLAN, David. Conformational Transitions in Model Silk Peptides. online. *Biophysical Journal*. 2000, roč. 78, č. 5, s. 2690-2701. ISSN 00063495. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76813-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76813-5). [cit. 2023-11-04].
- [97] MARSH, Richard E.; COREY, Robert B. a PAULING, Linus. An investigation of the structure of silk fibroin. online. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1955, roč. 16, s. 1-34. ISSN 00063002. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(55\)90178-5](https://doi.org/10.1016/0006-3002(55)90178-5). [cit. 2023-11-04].
- [98] KAPLAN, David L. Fibrous proteins—silk as a model system. online. *Polymer Degradation and Stability*. 1998, roč. 59, č. 1-3, s. 25-32. ISSN 01413910. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(97\)00000-1](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(97)00000-1). [cit. 2023-11-04].
- [99] TAKAHASHI, Yasuhiro; GEHOH, Mikio a YUZURIHA, Kimio. Structure refinement and diffuse streak scattering of silk (*Bombyx mori*). online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1999, roč. 24, č. 2-3, s. 127-138. ISSN 01418130. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(98\)00080-4](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00080-4). [cit. 2023-11-04].
- [100] RAJKHOWA, Rangam; HU, Xiao; TSUZUKI, Takuya; KAPLAN, David L. a WANG, Xungai. Structure and Biodegradation Mechanism of Milled *Bombyx mori* Silk Particles. online. *Biomacromolecules*. 2012, roč. 13, č. 8, s. 2503-2512. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bm300736m>. [cit. 2023-11-04].

- [101] BINI, Elisabetta; KNIGHT, David P a KAPLAN, David L. Mapping Domain Structures in Silks from Insects and Spiders Related to Protein Assembly. online. *Journal of Molecular Biology*. 2004, roč. 335, č. 1, s. 27-40. ISSN 00222836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.10.043>. [cit. 2023-11-04].
- [102] ZHOU, C.-Z. Fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain gene. online. *Nucleic Acids Research*. roč. 28, č. 12, s. 2413-2419. ISSN 13624962. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.2413>. [cit. 2023-11-02].
- [103] SASHINA, E. S.; BOCHEK, A. M.; NOVOSELOV, N. P. a KIRICHENKO, D. A. Structure and solubility of natural silk fibroin. online. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2006, roč. 79, č. 6, s. 869-876. ISSN 1070-4272. Dostupné z: <https://doi.org/10.1134/S1070427206060012>. [cit. 2023-11-04].
- [104] POZA, P; PÉREZ-RIGUEIRO, J; ELICES, M a LLORCA, J. Fractographic analysis of silkworm and spider silk. online. *Engineering Fracture Mechanics*. 2002, roč. 69, č. 9, s. 1035-1048. ISSN 00137944. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0013-7944\(01\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S0013-7944(01)00120-5). [cit. 2023-11-04].
- [105] OMENETTO, Fiorenzo G. a KAPLAN, David L. New Opportunities for an Ancient Material. online. *Science*. 2010, roč. 329, č. 5991, s. 528-531. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.1188936>. [cit. 2023-11-04].
- [106] PUTTHANARAT, S.; STRIBECK, N.; FOSSEY, S.A.; EBY, R.K. a ADAMS, W.W. Investigation of the nanofibrils of silk fibers. online. *Polymer*. 2000, roč. 41, č. 21, s. 7735-7747. ISSN 00323861. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00036-7](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00036-7). [cit. 2023-11-04].
- [107] JIN, Hyoung-Joon; FRIDRIKH, Sergey V.; RUTLEDGE, Gregory C. a KAPLAN, David L. Electrospinning Bombyx mori Silk with Poly(ethylene oxide). online. *Biomacromolecules*. 2002, roč. 3, č. 6, s. 1233-1239. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bm025581u>. [cit. 2023-11-06].
- [108] KAEWPIROM, Supranee a BOONSANG, Siridech. Influence of alcohol treatments on properties of silk-fibroin-based films for highly optically transparent coating applications. online. *RSC Advances*. 2020, roč. 10, č. 27, s. 15913-15923. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D0RA02634D>. [cit. 2024-05-09].
- [109] CHIAO, Yu-Hsuan a HUNG, Wei-Song. Separation performance of alcohol-induced silk fibroin membranes with homogeneous and heterogeneous microstructures. online. *Separation and Purification Technology*. 2022, roč. 293. ISSN 13835866. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.121004>. [cit. 2024-05-09].
- [110] CHEN, Xin; SHAO, Zhengzhong; KNIGHT, David P. a VOLLRATH, Fritz. Conformation transition kinetics of Bombyx mori silk protein. online. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2007, roč. 68, č. 1, s. 223-231. ISSN 0887-3585. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/prot.21414>. [cit. 2023-11-06].
- [111] BARTH, Andreas a ZSCHERP, Christian. What vibrations tell about proteins. online. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 2002, roč. 35, č. 4, s. 369-430. ISSN 0033-5835. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S0033583502003815>. [cit. 2023-11-06].
- [112] HU, Xiao; KAPLAN, David a CEBE, Peggy. Dynamic Protein–Water Relationships during β -Sheet Formation. online. *Macromolecules*. 2008, roč. 41, č. 11, s. 3939-3948. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ma071551d>. [cit. 2023-11-06].

- [113] LAITY, P.R.; GILKS, S.E. a HOLLAND, C. Rheological behaviour of native silk feedstocks. online. *Polymer*. 2015, roč. 67, s. 28-39. ISSN 00323861. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.04.049>. [cit. 2023-11-06].
- [114] JIN, H.-J.; PARK, J.; KARAGEORGIU, V.; KIM, U.-J.; VALLUZZI, R. et al. Water-Stable Silk Films with Reduced β -Sheet Content. online. *Advanced Functional Materials*. 2005, roč. 15, č. 8, s. 1241-1247. ISSN 1616-301X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adfm.200400405>. [cit. 2023-11-06].
- [115] SHEN, Gaotian; HU, Xingyou; GUAN, Guoping; WANG, Lu a MATSUSAKI, Michiya. Surface Modification and Characterisation of Silk Fibroin Fabric Produced by the Layer-by-Layer Self-Assembly of Multilayer Alginate/Regenerated Silk Fibroin. online. *PLOS ONE*. 2015, roč. 10, č. 4. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124811>. [cit. 2023-11-06].
- [116] JARAMILLO-QUICENO, Natalia; ÁLVAREZ-LÓPEZ, Catalina a RESTREPO-OSORIO, Adriana. Structural and thermal properties of silk fibroin films obtained from cocoon and waste silk fibers as raw materials. online. *Procedia Engineering*. 2017, roč. 200, s. 384-388. ISSN 18777058. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.07.054>. [cit. 2023-11-06].
- [117] CHENG, Guotao; WANG, Xin; TAO, Sijie; XIA, Ju a XU, Shui. Differences in regenerated silk fibroin prepared with different solvent systems: From structures to conformational changes. online. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015, roč. 132, č. 22. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.41959>. [cit. 2023-11-06].
- [118] NAM, Jin a PARK, . : Effects of freezing temperature, alcohol addition, and molecular weight. online. *Journal of Applied Polymer Science*. 2001, č. 12, s. 3008-3021. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.1751>. [cit. 2023-11-06].
- [119] CHO, Hee Jung; KI, Chang Seok; OH, Hanjin; LEE, Ki Hoon a UM, In Chul. Molecular weight distribution and solution properties of silk fibroins with different dissolution conditions. online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2012, roč. 51, č. 3, s. 336-341. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.06.007>. [cit. 2023-11-07].
- [120] NAM, Jin a PARK, Young Hwan. Morphology of regenerated silk fibroin: Effects of freezing temperature, alcohol addition, and molecular weight. online. *Journal of Applied Polymer Science*. 2001, roč. 81, č. 12, s. 3008-3021. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.1751>. [cit. 2023-11-07].
- [121] ALTMAN, Gregory H; DIAZ, Frank; JAKUBA, Caroline; CALABRO, Tara; HORAN, Rebecca L et al. Silk-based biomaterials. online. *Biomaterials*. 2003, roč. 24, č. 3, s. 401-416. ISSN 01429612. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00353-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00353-8). [cit. 2023-11-11].
- [122] HOLLAND, Chris; NUMATA, Keiji; RNJAK-KOVACINA, Jelena a SEIB, F. Philipp. The Biomedical Use of Silk: Past, Present, Future. online. *Advanced Healthcare Materials*. 2019, roč. 8, č. 1. ISSN 2192-2640. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adhm.201800465>. [cit. 2023-11-11].
- [123] WANG, Yuancheng; WANG, Feng; XU, Sheng; WANG, Riyuan; CHEN, Wenjing et al. Genetically engineered bi-functional silk material with improved cell proliferation and anti-inflammatory activity for medical application. online. *Acta*

- Biomaterialia*. 2019, roč. 86, s. 148-157. ISSN 17427061. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.12.036>. [cit. 2023-11-11].
- [124] SUN, Weizhen; GREGORY, David Alexander; TOMEH, Mhd Anas a ZHAO, Xiubo. Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Tissue Engineering. online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 3. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22031499>. [cit. 2023-11-11].
- [125] PEREIRA, Rui F. P.; SILVA, Maria M. a DE ZEA BERMUDEZ, Verónica. Bombyx mori Silk Fibers: An Outstanding Family of Materials. online. *Macromolecular Materials and Engineering*. 2015, roč. 300, č. 12, s. 1171-1198. ISSN 14387492. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mame.201400276>. [cit. 2023-11-11].
- [126] ARTHE, R.; ARIVUOLI, D. a RAVI, Venkatraman. Preparation and characterization of bioactive silk fibroin/paramylon blend films for chronic wound healing. online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, roč. 154, s. 1324-1331. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.010>. [cit. 2023-11-11].
- [127] AIGNER, Tamara Bernadette; DESIMONE, Elise a SCHEIBEL, Thomas. Biomedical Applications of Recombinant Silk-Based Materials. online. *Advanced Materials*. 2018, roč. 30, č. 19. ISSN 0935-9648. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adma.201704636>. [cit. 2023-11-11].
- [128] WANG, Danyan; LIU, Haifeng a FAN, Yubo. Silk fibroin for vascular regeneration. online. *Microscopy Research and Technique*. 2017, roč. 80, č. 3, s. 280-290. ISSN 1059-910X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jemt.22532>. [cit. 2023-11-11].
- [129] FAN, SuNa; ZHANG, Yi; HUANG, XiangYu; GENG, LiHong; SHAO, HuiLi et al. Silk materials for medical, electronic and optical applications. online. *Science China Technological Sciences*. 2019, roč. 62, č. 6, s. 903-918. ISSN 1674-7321. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11431-018-9403-8>. [cit. 2023-11-11].
- [130] FINK, J.K. *Additives for High Performance Applications: Chemistry and Applications*. 1st. New Jersey: Wiley, 2016. ISBN 978-1-119-36389-7.
- [131] MOTTAGHITALAB, Fatemeh; FAROKHI, Mehdi; SHOKRGOZAR, Mohammad Ali; ATYABI, Fatemeh a HOSSEINKHANI, Hossein. Silk fibroin nanoparticle as a novel drug delivery system. online. *Journal of Controlled Release*. 2015, roč. 206, s. 161-176. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.020>. [cit. 2023-11-11].
- [132] LI, Adrian B.; KLUGE, Jonathan A.; GUZIEWICZ, Nicholas A.; OMENETTO, Fiorenzo G. a KAPLAN, David L. Silk-based stabilization of biomacromolecules. online. *Journal of Controlled Release*. 2015, roč. 219, s. 416-430. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.037>. [cit. 2023-11-09].
- [133] WANG, Qiusheng; HAN, Guocong; YAN, Shuqin a ZHANG, Qiang. 3D Printing of Silk Fibroin for Biomedical Applications. online. *Materials*. 2019, roč. 12, č. 3. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma12030504>. [cit. 2023-11-11].
- [134] MU, Xuan; GONZALEZ-OBESO, Constancio; XIA, Zhiyu; SAHOO, Jugal Kishore; LI, Gang et al. 3D Printing of Monolithic Proteinaceous Cantilevers Using Regenerated Silk Fibroin. online. *Molecules*. 2022, roč. 27, č. 7. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27072148>. [cit. 2023-11-11].
- [135] CHAREST, Joseph L.; GARCÍA, Andrés J. a KING, William P. Myoblast alignment and differentiation on cell culture substrates with microscale topography and model

- chemistries. online. *Biomaterials*. 2007, roč. 28, č. 13, s. 2202-2210. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.01.020>. [cit. 2023-11-15].
- [136] HU, Xiao; PARK, Sang-Hyug; GIL, Eun Seok; XIA, Xiao-Xia; WEISS, Anthony S. et al. The influence of elasticity and surface roughness on myogenic and osteogenic-differentiation of cells on silk-elastin biomaterials. online. *Biomaterials*. 2011, roč. 32, č. 34, s. 8979-8989. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.037>. [cit. 2023-11-15].
- [137] LU, Qiang; HU, Xiao; WANG, Xiaoqin; KLUGE, Jonathan A.; LU, Shenzhou et al. Water-insoluble silk films with silk I structure. online. *Acta Biomaterialia*. 2010, roč. 6, č. 4, s. 1380-1387. ISSN 17427061. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.041>. [cit. 2023-11-26].
- [138] BORKNER, Christian B.; ELSNER, Martina B. a SCHEIBEL, Thomas. Coatings and Films Made of Silk Proteins. online. 2014, roč. 6, č. 18, s. 15611-15625. ISSN 1944-8244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/am5008479>. [cit. 2023-11-26].
- [139] SERVOLI, Eva; MANIGLIO, Devid; MOTTA, Antonella; PREDAZZER, Rosanna a MIGLIARESI, Claudio. Surface Properties of Silk Fibroin Films and Their Interaction with Fibroblasts. online. *Macromolecular Bioscience*. 2005, roč. 5, č. 12, s. 1175-1183. ISSN 1616-5187. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mabi.200500137>. [cit. 2023-11-26].
- [140] HUEMMERICH, D.; SLOTTA, U. a SCHEIBEL, T. Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins. online. *Applied Physics A*. 2006, roč. 82, č. 2, s. 219-222. ISSN 0947-8396. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00339-005-3428-5>. [cit. 2023-11-26].
- [141] KWEON, Haeyong; HA, Hyun Chul; UM, In Chul a PARK, Young Hwan. Physical properties of silk fibroin/chitosan blend films. online. *Journal of Applied Polymer Science*. 2001, roč. 80, č. 7, s. 928-934. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.1172>. [cit. 2023-11-26].
- [142] FREDDI, Giuliano; ROMANÒ, Maria; MASSAFRA, Maria Rosaria a TSUKADA, Masuhiro. Silk fibroin/cellulose blend films: Preparation, structure, and physical properties. online. *Journal of Applied Polymer Science*. 1995, roč. 56, č. 12, s. 1537-1545. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.1995.070561203>. [cit. 2023-11-26].
- [143] WANG, Ling Shuang; YAN, Shu Qin a LI, Ming Zhong. Silk Fibroin/Hyaluronic Acid Blend Film with Good Water Stability and Cytocompatibility. online. *Applied Mechanics and Materials*. 2013, roč. 377, s. 209-214. ISSN 1662-7482. Dostupné z: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.377.209>. [cit. 2023-11-26].
- [144] PARK, Hyun-Ji; YANG, Kisuk; KIM, Mun-Jung; JANG, Jiho; LEE, Mihyun et al. Bio-inspired oligovitronectin-grafted surface for enhanced self-renewal and long-term maintenance of human pluripotent stem cells under feeder-free conditions. online. *Biomaterials*. 2015, roč. 50, s. 127-139. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.015>. [cit. 2023-11-26].
- [145] GUPTA, Maneesh K.; KHOKHAR, Shama K.; PHILLIPS, David M.; SOWARDS, Laura A.; DRUMMY, Lawrence F. et al. Patterned Silk Films Cast from Ionic Liquid Solubilized Fibroin as Scaffolds for Cell Growth. online. *Langmuir*. 2007, roč. 23, č. 3, s. 1315-1319. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/la062047p>. [cit. 2023-11-26].

- [146] BAI, Lun; WU, Dongping; XU, Janmei; LIU, Huifeng; XIE, Min et al. On model of angiogenesis and the mechanism in porous silk fibroin films. online. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2011, roč. 22, č. 4, s. 927-933. ISSN 0957-4530. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4258-y>. [cit. 2023-11-28].
- [147] ZHENGSHI, Zhang; ZHAOZHAO, Ding; JIWEI, Huang; JIANZHONG, Qin; YIXIN, Shen et al. Green process to prepare water-insoluble silk scaffolds with silk I structure. online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, roč. 117, s. 144-151. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.175>. [cit. 2023-11-28].
- [148] XUE, Longjian; ZHANG, Jilin a HAN, Yanchun. Phase separation induced ordered patterns in thin polymer blend films. online. *Progress in Polymer Science*. 2012, roč. 37, č. 4, s. 564-594. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.09.001>. [cit. 2023-11-28].
- [149] JIN, Hyoung-Joon; PARK, Jaehyung; VALLUZZI, Regina; CEBE, Peggy a KAPLAN, David L. Biomaterial Films of Bombyx Mori Silk Fibroin with Poly(ethylene oxide). online. *Biomacromolecules*. 2004, roč. 5, č. 3, s. 711-717. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bm0343287>. [cit. 2023-11-28].
- [150] GALEOTTI, Francesco; ANDICSOVA, Anita; YUNUS, Sami a BOTTA, Chiara. Precise surface patterning of silk fibroin films by breath figures. online. *Soft Matter*. 2012, roč. 8, č. 17. ISSN 1744-683X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/c2sm25089f>. [cit. 2023-11-28].
- [151] WRZECIONKO, Erik; MINAŘÍK, Antonín; SMOLKA, Petr; MINAŘÍK, Martin; HUMPOLÍČEK, Petr et al. Variations of Polymer Porous Surface Structures via the Time-Sequenced Dosing of Mixed Solvents. online. 2017, roč. 9, č. 7, s. 6472-6481. ISSN 1944-8244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsami.6b15774>. [cit. 2023-11-28].
- [152] STRATHMANN, H. a KOCK, K. The formation mechanism of phase inversion membranes. online. *Desalination*. 1977, roč. 21, č. 3, s. 241-255. ISSN 00119164. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(00\)88244-2](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(00)88244-2). [cit. 2023-11-28].
- [153] NAKAJI-HIRABAYASHI, Tadashi; KATO, Koichi; ARIMA, Yusuke a IWATA, Hiroo. Oriented immobilization of epidermal growth factor onto culture substrates for the selective expansion of neural stem cells. online. *Biomaterials*. 2007, roč. 28, č. 24, s. 3517-3529. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.022>. [cit. 2023-12-01].
- [154] LEIPZIG, Nic D.; WYLIE, Ryan G.; KIM, Howard a SHOICHET, Molly S. Differentiation of neural stem cells in three-dimensional growth factor-immobilized chitosan hydrogel scaffolds. online. *Biomaterials*. 2011, roč. 32, č. 1, s. 57-64. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.031>. [cit. 2023-12-01].
- [155] BOJEDLA, Sri Sai Ramya; CHAMEETTACHAL, Shibu; YELESWARAPU, Sriya; NIKZAD, Mostafa; MASOOD, Syed H. et al. Silk fibroin microfiber-reinforced polycaprolactone composites with enhanced biodegradation and biological characteristics. online. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2022, roč. 110, č. 7, s. 1386-1400. ISSN 1549-3296. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37380>. [cit. 2024-05-02].
- [156] BARNTHIP, Naris; TEEKA, Jantima; KANTHA, Puripat; TEEPOO, Siriwan a DAMJUTI, Watchara. Fabrication and characterization of polycaprolactone/cellulose

- acetate blended nanofiber mats containing sericin and fibroin for biomedical application. online. *Scientific Reports*. 2022, roč. 12, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26908-2>. [cit. 2024-05-06].
- [157] WANG, Zengkai; SONG, Xiaolu; CUI, Yanhua; CHENG, Kai; TIAN, Xiaohua et al. Silk fibroin H-fibroin/poly(ϵ -caprolactone) core-shell nanofibers with enhanced mechanical property and long-term drug release. online. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2021, roč. 593, s. 142-151. ISSN 00219797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.02.099>. [cit. 2024-05-06].
- [158] WEI, Gaijie; LI, Chao; FU, Qiang; XU, Yuemin a LI, Hongbin. Preparation of PCL/silk fibroin/collagen electrospun fiber for urethral reconstruction. online. *International Urology and Nephrology*. 2015, roč. 47, č. 1, s. 95-99. ISSN 0301-1623. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11255-014-0854-3>. [cit. 2024-05-06].
- [159] CENGIZ, Ibrahim Fatih; MAIA, Fatima Raquel; DA SILVA MORAIS, Alain; SILVA-CORREIA, Joana; PEREIRA, Helder et al. Entrapped in cage (EiC) scaffolds of 3D-printed polycaprolactone and porous silk fibroin for meniscus tissue engineering. online. *Biofabrication*. 2020, roč. 12, č. 2. ISSN 1758-5090. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab779f>. [cit. 2024-05-02].
- [160] VYAS, Cian; ZHANG, Jun; ØVREBØ, Øystein; HUANG, Boyang; ROBERTS, Iwan et al. 3D printing of silk microparticle reinforced polycaprolactone scaffolds for tissue engineering applications. online. *Materials Science and Engineering: C*. 2021, roč. 118. ISSN 09284931. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111433>. [cit. 2024-05-02].
- [161] DADRAS CHOMACHAYI, Masoud; JALALI-ARANI, Azam; BELTRÁN, Freddys R.; DE LA ORDEN, Ma Ulagares a MARTÍNEZ URREAGA, Joaquín. Biodegradable Nanocomposites Developed from PLA/PCL Blends and Silk Fibroin Nanoparticles: Study on the Microstructure, Thermal Behavior, Crystallinity and Performance. online. *Journal of Polymers and the Environment*. 2020, roč. 28, č. 4, s. 1252-1264. ISSN 1566-2543. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01684-0>. [cit. 2024-05-08].
- [162] DADRAS CHOMACHAYI, Masoud; JALALI-ARANI, Azam a URREAGA, Joaquín Martínez. The effect of silk fibroin nanoparticles on the morphology, rheology, dynamic mechanical properties, and toughness of poly(lactic acid)/poly(ϵ -caprolactone) nanocomposite. online. *Journal of Applied Polymer Science*. 2020, roč. 137, č. 40. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.49232>. [cit. 2024-05-08].
- [163] GAO, Ming; LIU, Xin; JI, Bing; HUA, Ruheng; LI, Guicai et al. Electrospun Silk Fibroin/Polycaprolactone Biomimetic Scaffold for Peripheral Nerve Regeneration. online. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*. 2016, roč. 6, č. 11, s. 902-909. ISSN 2157-9083. Dostupné z: <https://doi.org/10.1166/jbt.2016.1517>. [cit. 2024-05-09].
- [164] LI, Yangyang; CHEN, Mingxue; ZHOU, Wenhao; GAO, Shuang; LUO, Xujiang et al. Cell-free 3D wet-electrospun PCL/silk fibroin/Sr2 scaffold promotes successful total meniscus regeneration in a rabbit model. online. *Acta Biomaterialia*. 2020, roč. 113, s. 196-209. ISSN 17427061. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.06.017>. [cit. 2024-05-09].
- [165] MARIN, Elia; YOSHIKAWA, Orion; BOSCHETTO, Francesco; HONMA, Taigi; ADACHI, Tetsuya et al. Innovative electrospun PCL/fibroin/l-dopa scaffolds supporting bone tissue regeneration. online. *Biomedical Materials*. 2022,

- roč. 17, č. 4. ISSN 1748-6041. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ac6c68>. [cit. 2024-05-09].
- [166] KHOSRAVI, Alireza; GHASEMI-MOBARAKEH, Laleh; MOLLAHOSSEINI, Hossein; AJALLOUEIAN, Fatemeh; MASOUDI RAD, Maryam et al. Immobilization of silk fibroin on the surface of PCL nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications. online. *Journal of Applied Polymer Science*. 2018, roč. 135, č. 37. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.46684>. [cit. 2024-05-09].
- [167] FENG, Yanping; JUPEI, Zhang; DONG, Zhihong a TANG, Lu. Characterization, biocompatibility, and optimization of electrospun SF/PCL composite nanofiber films. online. *REVIEWS ON ADVANCED MATERIALS SCIENCE*. 2023, roč. 62, č. 1. ISSN 1605-8127. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/rams-2022-0333>. [cit. 2024-05-09].
- [168] ROCKWOOD, Danielle N; PREDA, Rucsanda C; YÜCEL, Tuna; WANG, Xiaoqin; LOVETT, Michael L et al. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. online. *Nature Protocols*. 2011, roč. 6, č. 10, s. 1612-1631. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.379>. [cit. 2023-11-07].
- [169] PRASONG, S.; YAOWALAK, S. a WILAIWAN, S. Characteristics of Silk Fiber with and without Sericin Component: A Comparison between Bombyx mori and Philosamia ricini Silks. online. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2009, roč. 12, č. 11, s. 872-876. ISSN 10288880. Dostupné z: <https://doi.org/10.3923/pjbs.2009.872.876>. [cit. 2024-04-02].
- [170] ROY, Sagar a SINGHA, Nayan. Polymeric Nanocomposite Membranes for Next Generation Pervaporation Process: Strategies, Challenges and Future Prospects. online. *Membranes*. 2017, roč. 7, č. 3. ISSN 2077-0375. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/membranes7030053>. [cit. 2024-04-02].
- [171] WANG, Xin; JIANG, Man; ZHOU, Zuowan; GOU, Jihua a HUI, David. 3D printing of polymer matrix composites: A review and prospective. online. *Composites Part B: Engineering*. 2017, roč. 110, s. 442-458. ISSN 13598368. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2016.11.034>. [cit. 2024-04-02].
- [172] YU, Chengtao; XIE, Qing; BAO, Yongzhong; SHAN, Guorong a PAN, Pengju. Crystalline and Spherulitic Morphology of Polymers Crystallized in Confined Systems. online. *Crystals*. 2017, roč. 7, č. 5. ISSN 2073-4352. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cryst7050147>. [cit. 2024-05-02].
- [173] WANG, Kan; CAI, Lei; JESSE, Stephen a WANG, Shanfeng. Poly(ϵ -caprolactone)-Banded Spherulites and Interaction with MC3T3-E1 Cells. online. *Langmuir*. 2012, roč. 28, č. 9, s. 4382-4395. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/la205162d>. [cit. 2024-05-02].
- [174] ELZEIN, Tamara; NASSER-EDDINE, Mohamad; DELAITE, Christelle; BISTAC, Sophie a DUMAS, Philippe. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. online. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004, roč. 273, č. 2, s. 381-387. ISSN 00219797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.001>. [cit. 2024-05-02].
- [175] GUTIÉRREZ GONZÁLEZ, Jessica; FERNÁNDEZ LEYES, Marcos D.; RITACCO, Hernán A.; SCHROEDER, Walter F. a ZUCCHI, Ileana A. Long PEO-based nanoribbons generated in a polystyrene matrix through reaction-induced microphase separation followed by a fast crystallization process. online. *Soft Matter*. 2021, roč.

- 17, č. 8, s. 2279-2289. ISSN 1744-683X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D0SM02058C>. [cit. 2024-05-06].
- [176] PONJAVIC, Marijana; NIKOLIC, Marija S.; JEREMIC, Sanja; DJOKIC, Lidija; NIKODINOVIC-RUNIC, Jasmina et al. Influence of Short Central PEO Segment on Hydrolytic and Enzymatic Degradation of Triblock PCL Copolymers. online. *Journal of Polymers and the Environment*. 2018, roč. 26, č. 6, s. 2346-2359. ISSN 1566-2543. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10924-017-1130-2>. [cit. 2024-05-06].
- [177] TRTEK, Adam. : *3D tisk polymerních směsí na bázi hedvábného proteinu*. Bakalářská práce. UTB Zlín, 2022.
- [178] LI, Yiguo; WU, Lin; HE, Chengdong; WANG, Zongbao a HE, Tianbai. Strong enhancement of the twisting frequency of achiral orthorhombic lamellae in poly(ϵ -caprolactone) banded spherulites via evaporative crystallization. online. *CrystEngComm*. 2017, roč. 19, č. 8, s. 1210-1219. ISSN 1466-8033. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C6CE02577C>. [cit. 2023-10-27].
- [179] POEL, G. Vanden; GOOSSENS, S.; GODERIS, B. a GROENINCKX, G. Reaction induced phase separation in semicrystalline thermoplastic/epoxy resin blends. online. *Polymer*. 2005, roč. 46, č. 24, s. 10758-10771. ISSN 00323861. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.09.013>. [cit. 2024-05-06].
- [180] CHEN, Xin; KNIGHT, David P. a SHAO, Zhengzhong. β -turn formation during the conformation transition in silk fibroin. online. *Soft Matter*. 2009, roč. 5, č. 14. ISSN 1744-683X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/b900908f>. [cit. 2024-05-02].
- [181] LING, Shengjie; QI, Zeming; KNIGHT, David P.; SHAO, Zhengzhong a CHEN, Xin. Synchrotron FTIR Microspectroscopy of Single Natural Silk Fibers. online. *Biomacromolecules*. 2011, roč. 12, č. 9, s. 3344-3349. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bm2006032>. [cit. 2024-05-02].
- [182] ZHU, Jiang; LUO, Jingjing; ZHAO, Xingyan; GAO, Junjiu a XIONG, Jie. Electrospun homogeneous silk fibroin/poly (ϵ -caprolactone) nanofibrous scaffolds by addition of acetic acid for tissue engineering. online. *Journal of Biomaterials Applications*. 2016, roč. 31, č. 3, s. 421-437. ISSN 0885-3282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/0885328216659775>. [cit. 2024-05-08].
- [183] CAO, Yu; HAN, Wenjuan; PU, Ziyang; WANG, Xiaofeng; WANG, Bo et al. Fabrication of hierarchically porous superhydrophilic polycaprolactone monolith based on nonsolvent-thermally induced phase separation. online. *RSC Advances*. 2020, roč. 10, č. 44, s. 26319-26325. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D0RA04687F>. [cit. 2024-05-09].
- [184] SILVA, Mariana F.; DE MORAES, Mariana A.; NOGUEIRA, Grínia M.; RODAS, Andrea C. D.; HIGA, Olga Z. et al. Glycerin and ethanol as additives on silk fibroin films: Insoluble and malleable films. online. *Journal of Applied Polymer Science*. 2013, roč. 128, č. 1, s. 115-122. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.38139>. [cit. 2024-05-09].

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PCL	Polykaprolakton
BMF	Bombyx mori fibroin
T_m	Teplota tání
T_g	Teplota skelného přechodu
ROP	Polymerace otevíráním cyklu
M_n	Molekulová hmotnost
HFIP	Hexafluoroizopropanol
RPM	Otáčky za minutu
R_a	Průměrná drsnost
R_z	Nejvyšší výška profilu
DMSO	Dimethylsulfoxid
WAXS	Širokouhlý rozptyl rentgenového záření
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
AFM	Mikroskop atomárních sil

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Struktura chitosanu [16]</i>	17
<i>Obr. 2: Struktura kyseliny hyaluronové [20]</i>	17
<i>Obr. 3: Zjednodušená struktura kolagenu [25]</i>	18
<i>Obr. 4: Aplikace hedvábného proteinu v regenerativní medicíně [27]</i>	20
<i>Obr. 5: Monomerní jednotka polykaprolaktonu [34]</i>	23
<i>Obr. 6: Chemická struktura kaprolaktonu [38]</i>	24
<i>Obr. 7: Aniontový mechanismus ROP [37]</i>	25
<i>Obr. 8: Koordinačně-inzerční mechanismus ROP [37]</i>	25
<i>Obr. 9: Schématické znázornění víceúrovňové struktury uspořádání a organizaci lamel složeného řetězce v polymerním sférolitu [54]</i>	26
<i>Obr. 10: Hierarchická struktura polymerního sférolitu [58]</i>	27
<i>Obr. 11: PCL film: vlevo a uprostřed – schématické znázornění krystalizace, vpravo – snímek klasických radiálních sférolitů z optického mikroskopu [58]</i>	28
<i>Obr. 12: Prstencová morfologie A): nedvojlomné, B) dvojlomné struktury PCL sférolitů [64]</i>	29
<i>Obr. 13: Vlevo housenka, vpravo kokon Bombyx mori [30]</i>	33
<i>Obr. 14: Snovací žláza [30]</i>	34
<i>Obr. 15: Stavba hedvábného vlákna [94]</i>	35
<i>Obr. 16: Primární struktura fibroinu [95]</i>	36
<i>Obr. 17: FTIR spektrum hedvábného proteinu před a po šetřením ethanolem [115]</i>	38
<i>Obr. 18: Proces odstranění sericinu [30]</i>	39
<i>Obr. 19: Nanovlákná z hedvábného proteinu [128]</i>	40
<i>Obr. 20: Vytýštěná mřížka z hedvábného proteinu [134]</i>	41
<i>Obr. 21: Ukázka filmů na bázi fibroinu a PEO vytvořených pomocí fázové separace [149]</i>	44
<i>Obr. 22: Princip metody fázové inverze pomocí třífázového diagramu [152]</i>	46
<i>Obr. 23: Schéma jednotlivých kroků izolace fibroinu [168]</i>	51
<i>Obr. 24: Kokony bource morušového</i>	52
<i>Obr. 25: Proces odstranění sericinu [30]</i>	52
<i>Obr. 26: Lyofilizovaný fibroin</i>	53
<i>Obr. 27: Schéma metody odlévání z roztoku [170]</i>	54
<i>Obr. 28: Princip extruzního 3D tisku [171]</i>	55
<i>Obr. 29: Tloušťka filmů měřena pomocí SEM</i>	58

<i>Obr. 30:A) Sférolitická struktura PCL filmu zobrazená pomocí optické polarizační mikroskopie, B) SEM C) AFM zobrazení struktury sférolitů, D) topografie PCL sférolitu znázorněna pomocí optického profilometru</i>	<i>59</i>
<i>Obr. 31:Topografie čistého PCL filmu, profil pořízen mechanickým profilometrem</i>	<i>60</i>
<i>Obr. 32:FTIR spektrum čistého PCL filmu.....</i>	<i>60</i>
<i>Obr. 33: WAXS analýza čistého PCL filmu</i>	<i>61</i>
<i>Obr. 34:Struktura prstencových sférolitů na PCL filmech s příměsí fibroinu v podílu I. 10 % a II. 20 % vůči PCL, A) snímek z optického mikroskopu, B) SEM znázornění prstencové struktury C) AFM snímek detailní prstencové topografie</i>	<i>62</i>
<i>Obr. 35:Náhled prstencové topografie PCL sférolitů s příměsí I. 10 % BMF, II. 20 % BMF, snímky z optického profilometru</i>	<i>62</i>
<i>Obr. 36:Topografie PCL filmu s obsahem I. 10 % fibroinu a II. 20 % fibroinu, profily pořízeny mechanickým profilometrem</i>	<i>63</i>
<i>Obr. 37:FTIR spektrum prstencových struktur</i>	<i>64</i>
<i>Obr. 38:WAXS analýza prstencových struktur</i>	<i>65</i>
<i>Obr. 39: SEM snímky struktury A) Čistého PCL, B) PCL s 10% podílem fibroinu</i>	<i>66</i>
<i>Obr. 40:Struktura porézního povrchu na PCL filmech s příměsí fibroinu v podílu I. 33 %, II. 50 % a III.67% vůči PCL, A) snímek z optického mikroskopu, B) SEM znázornění povrchové struktury C) AFM snímek detailní porézní topografie</i>	<i>67</i>
<i>Obr. 41:Náhled porézní topografie PCL s příměsí I. 33 % BMF, II. 50 % BMF a III. 67 % BMF, snímky z optického profilometru</i>	<i>68</i>
<i>Obr. 42:Topografie PCL filmu s obsahem I. 33 % fibroinu, II. 50 % fibroinu a III. 67% fibroinu, profily pořízeny mechanickým profilometrem</i>	<i>68</i>
<i>Obr. 43:FTIR spektrum filmů ze směsi PCL s podílem 33 %, 50 % a 67 % BMF</i>	<i>69</i>
<i>Obr. 44:WAXS analýza filmů ze směsi PCL s podílem 33 %, 50 % a 67 % BMF.....</i>	<i>70</i>
<i>Obr. 45:FTIR spektrum čistého BMF filmu po vysušení a po ošetření methanolem.....</i>	<i>71</i>
<i>Obr. 46:Film z čistého BMF:A) před ošetřením methanolem B) po ošetření methanolem .</i>	<i>71</i>
<i>Obr. 47: Detail FTIR spektra čistého PCL před ošetřením methanolem a po ošetření methanolem</i>	<i>72</i>
<i>Obr. 48:Film z čistého PCL:A) před ošetřením methanolem B) po ošetření methanolem ..</i>	<i>73</i>
<i>Obr. 49: Detail FTIR spektra pro transformované filmy s obsahem 10 % a 20 % fibroinu</i>	<i>74</i>
<i>Obr. 50:SEM snímky prstencových struktur A) před a B) po ošetření methanolem, I) 10% BMF, II)20% BMF</i>	<i>75</i>
<i>Obr. 51:Detail FTIR spektra 10% BMF vzorku testovaného v ethanolu</i>	<i>75</i>
<i>Obr. 52:SEM snímky prstencových struktur 10% BMF A) před a B) po ošetření ethanolem</i>	<i>76</i>
<i>Obr. 53: Drsnost povrchu 10% vzorku I) ošetřeného methanolem, II) ošetřeného ethanolem</i>	<i>76</i>
<i>Obr. 54: Detail FTIR spektra filmů ze směsi s obsahem 33 %, 50 % a 67 % fibroinu</i>	<i>77</i>

<i>Obr. 55: SEM snímky porézního povrchu A) před a za B) po ošetření methanolem, I) 33% BMF, II) 50% BMF, III) 67% BMF</i>	78
<i>Obr. 56: Vzorek čistého PCL : A) po vysušení, B) po inkubaci ve vodě, C) po ošetření methanolem a inkubaci ve vodě</i>	79
<i>Obr. 57: Vzorek s 10 % fibroinu A) po vysušení, B) po inkubaci ve vodě, C) po ošetření methanolem a inkubaci ve vodě a D) po ošetření ethanolem a inkubaci ve vodě</i>	80
<i>Obr. 58: Topografie drsnosti povrchu 10 % fibroinu: I) po vysušení, II) po inkubaci ve vodě, III) po ošetření methanolem a IV) po ošetření ethanolem a inkubaci ve vodě</i>	80
<i>Obr. 59: Vzorek s 20 % fibroinu A) po vysušení, B) po inkubaci ve vodě, C) po ošetření methanolem a inkubaci ve vodě</i>	81
<i>Obr. 60: Vzorek s 33 % fibroinu A) po vysušení, B) po inkubaci ve vodě, C) po ošetření methanolem a inkubaci ve vodě</i>	82
<i>Obr. 61: Vzorek s 50 % fibroinu A) po vysušení, B) po inkubaci ve vodě, C) po ošetření methanolem a inkubaci ve vodě</i>	82
<i>Obr. 62: Vzorek s 67 % fibroinu A) po vysušení, B) po inkubaci ve vodě, C) po ošetření methanolem a inkubaci ve vodě</i>	83
<i>Obr. 63: SEM snímky struktur se špatným rozpouštědlem: I) čisté PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF, IV) čisté BMF</i>	84
<i>Obr. 64: Snímky spinovaných vláken I) Čistého PCL, II) PCL + 10% BMF a III) PCL + 10% BMF + DMSO; A) SEM snímky, B) AFM snímky</i>	84
<i>Obr. 65: Makroskopický náhled na vytištěné mřížky: I) Čisté PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF</i>	85
<i>Obr. 66: SEM snímky mřížek, které byly sušeny digestoři: I) Čisté PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF</i>	86
<i>Obr. 67: Drsnost povrchu u mřížek, které byly sušeny digestoři: I) Čisté PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF</i>	86
<i>Obr. 68: SEM snímky mřížek, které byly sušeny v exsikátoru: I) Čisté PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF</i>	87
<i>Obr. 69: Drsnost povrchu u mřížek, které byly sušeny v exsikátoru: I) Čisté PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF</i>	88
<i>Obr. 70: SEM snímky mřížek, které byly ihned po vytištění zakápnuty vodou: I) Čisté PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF</i>	89
<i>Obr. 71: Drsnost povrchu u mřížek, které byly ihned po vytištění zakápnuty vodou: I) Čisté PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF</i>	89
<i>Obr. 72: SEM snímky mřížek, které byly ihned po vytištění zakápnuty ethanolem: I) Čisté PCL, II) 10% BMF, III) 67% BMF</i>	90
<i>Obr. 73: Drsnost povrchu u mřížek, které byly ihned po vytištění zakápnuty ethanolem: I) Čisté PCL, II) 10% podíl BMF, III) 67% podíl BMF</i>	91

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1: Příklady polymerních materiálů a jejich aplikace v medicíně [10]</i>	<i>15</i>
<i>Tab. 2: Prvková analýza pro roztok čistého PCL a roztoku s 10% podílem fibroinu</i>	<i>66</i>