

Aplikace hedvábného proteinu v aditivní výrobě

Martin Martinec

Bakalářská práce
2021

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Martin Martinec
Osobní číslo: T18081
Studijní program: B2808 Chemie a technologie materiálů
Studijní obor: Materiálové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Aplikace hedvábného proteinu v aditivní výrobě

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma aplikace hedvábného proteinu v aditivní výrobě.
2. V rešerši se zaměřte na způsoby biosyntézy hedvábí v přírodě a izolaci fibroinového proteinu.
3. Charakterizujte strukturní a mechanické vlastnosti hedvábného proteinu a proveďte srovnání s běžně užívanými přírodními biomateriály.
4. Popište známé metody přípravy fibroinových 3D konstrukcí pomocí 3D tisku a uveďte jejich aplikační význam.
5. Poznatky získané z literatury přehledně diskutujte a uveďte hlavní závěry plynoucí z provedené studie.

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

Seznam doporučené literatury:

1. Sommer, M. R.; Schaffner, M.; Carnelli, D.; Studart, A. R.; 3D Printing of Hierarchical Silk Fibroin Structures. ACS Applied Materials & Interfaces. 2016, 8(50), 34677-34685.
2. Chua, C. K.; Yeong, W. Y.; Bioprinting: principles and applications. Singapore: World Scientific, 2015, ISBN 978-981-4612-104.
3. Zhang, L. G.; Fisher, J. P.; Leong, K. W.; 3D bioprinting and nanotechnology in tissue engineering and regenerative medicine. Elsevier, 2015, ISBN 978-0-12-800547-7.
4. Ozbolat, I. T.; 3D Bioprinting: Fundamentals, Principles and Applications. Elsevier, 2016, ISBN 978-0-12-803010-3.

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

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **21. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Ve Zlíně dne 19. února 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

**BACHERLOR'S THESIS
AUTHOR'S DECLARATION**

I take cognizance of the fact that:

- my Bachelor's thesis will be stored in electronic form in the university information system and will be available for viewing;
- my Bachelor's thesis fully adheres to the Act No. 121/2000 Coll. on Copyright and Related Rights and on Amendments to Certain Acts (Copyright Act), as amended, in particular to § 35 Paragraph 3;
- in accordance with § 60 Paragraph 1 of the Copyright Act, Tomas Bata University in Zlín is entitled to conclude a licence agreement on the utilisation of a school work within the scope of § 12 Paragraph 4 of the Copyright Act;
- in accordance with § 60 Paragraph 2 and 3 of the Copyright Act, I may use my work – Bachelor's thesis – or grant the licence for the utilisation thereof to another party only with prior written consent by Tomas Bata University in Zlín, which is in such a case entitled to claim from me an appropriate contribution to the reimbursement of the costs incurred by Tomas Bata University in Zlín due to the creation of the work (up to the full amount of this cost);
- if a software was provided for the preparation of the Bachelor's thesis by Tomas Bata University in Zlín or by other entities only for study and research purposes (i.e. for non-commercial use), the results of the Bachelor's thesis cannot be used for commercial purposes;
- if the output of the Bachelor's thesis is a software product, the source codes and/or the files of which the project is comprised are considered as an inseparable part of the thesis. Failure to submit this part may be a reason for failure to defend the thesis.

I declare

- that the Bachelor's thesis has been solely the result of my own work and that I have cited all the sources I had used. In case of publication of the results, I will be listed as a co-author.
- that the submitted version of the Bachelor's thesis and the version uploaded in electronic form in the IS/STAG system are identical in terms of their content.

In Zlín on:

Name and surname of student:

.....
Signature of student

ABSTRAKT

Byly studovány možnosti zpracování hedvábného proteinu pomocí aditivní výroby. Fibroin je v zájmu výzkumu díky svým dobrým mechanickým vlastnostem a biokompatibilitě. Lze jej zpracovat řadou metod, v současné době je však díky pokroku ve vývoji preferována technika 3D tisku. Ta umožňuje vytvořit 3D struktury podporující růst buněk, 3D tištěné fibroinové konstrukce tak nachází využití především v biomedicíně. 3D tisk samotného fibroinu je z řady důvodů obtížný, proto se k tiskovému materiálu přidávají modifikační příměsi pro zlepšení tokových vlastností a mechanických vlastností výsledné struktury. Byly studovány různé materiálové systémy užívané pro tisk ve směsi s fibroinem. Směs fibroinu s hydroxyapatitem byla vyhodnocena jako nejlepší z hlediska možného uplatnění v ortopedii.

Klíčová slova: hedvábný protein, fibroin, aditivní výroba, 3D tisk, biotisk

ABSTRACT

The possibilities of processing of silk protein by additive manufacturing were studied. Fibroin excels with its mechanical properties and biocompatibility and there is an interest in research. It can be processed by several methods. The most preferred method, however, is 3D printing due to recent advances in development. 3D printing makes it possible to create 3D structures supporting cell growth, so 3D printed fibroin constructions are mainly used in biomedicine. 3D printing of fibroin alone is difficult for number of reasons, so it is necessary to add modifiers to the printing material to improve flow and mechanical properties of the resulting structure. Various materials in a mixture with fibroin used for printing were studied. The mixture of fibroin and hydroxyapatite was evaluated as the best in terms of possible use in orthopedics.

Keywords: silk protein, fibroin, additive manufacturing, 3D printing, bioprinting

Na tomto místě bych rád poděkoval Ing. Karolíně Kocourkové za vstřícnost a veškeré úsilí spojené se vznikem této práce. Dále bych chtěl poděkovat mé rodině za trpělivost a podporu po celou dobu studia.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 CÍLE PRÁCE	11
2 PŘÍRODNÍ HEDVÁBNÝ PROTEIN	12
2.1 STAVBA VLÁKNA.....	12
2.2 PROCES ZVLÁKŇOVÁNÍ	13
2.3 MECHANICKÉ VLASTNOSTI.....	14
2.4 VYUŽITÍ	15
3 REGENEROVANÝ HEDVÁBNÝ PROTEIN	17
3.1 PŘÍPRAVA REGENEROVANÉHO FIBROINU	17
3.2 VLASTNOSTI REGENEROVANÉHO FIBROINU	17
3.2.1 Struktura.....	17
3.2.2 Mechanické vlastnosti.....	18
3.2.3 Rozpustnost.....	18
3.3 SROVNÁNÍ FIBROINU S VYBRANÝMI BIOPOLYMERY.....	18
3.3.1 Kolagen	19
3.3.2 Hyaluronan.....	19
3.3.3 Kyselina polymléčná.....	19
3.3.4 Keratin.....	20
4 3D TISK	21
4.1 3D BIOTISK.....	21
4.2 METODY 3D TISKU	22
4.2.1 Inkjet	22
4.2.2 Robotic dispensing	22
4.2.3 Laser-based printing.....	23
4.2.4 Fused deposition modeling	23
5 3D TISK FIBROINU	24
5.1.1 Příměs glukomananu	25
5.1.2 Příměs hydroxyapatitu	26
5.1.4 Příměs želatiny	27
5.1.5 Příměs hydroxypropyl methylcelulózy	27
5.1.6 Příměs kyseliny hyaluronové	27
6 DISKUZE	29
ZÁVĚR	31
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	36
SEZNAM OBRÁZKŮ	37

ÚVOD

Hedvábí je lidmi využíváno již po staletí. Uplatnění našlo především v textilním odvětví, kde se využívá k výrobě oděvních a módních doplňků, které jsou oblíbeny kvůli typickému perleťovému lesku a hebkosti hedvábí. V historii bylo hedvábí využíváno jako šicí materiál také v lékařství. Další možné aplikace hedvábného proteinu v oblasti medicíny jsou dnes předmětem intenzivního zkoumání.

Hedvábný protein fibroin se vyznačuje unikátní kombinací vlastností. V první řadě se jedná o biokompatibilitu, která je srovnatelná s dalšími biomateriály, jako je kolagen nebo hyaluronan. Fibroin je rovněž biodegradabilní, rychlost biodegradability však do jisté míry závisí na sekundární struktuře fibroinu. Změnou sekundární struktury lze zároveň ovlivnit rozpustnost tohoto proteinu v různých typech rozpouštědel. Sekvence aminokyselin a následné sekundární uspořádání proteinu zodpovídají za dobré mechanické vlastnosti. Studium souvislostí mezi strukturou fibroinu a jeho funkčností se zabývá například skupina vedená Davidem L. Kaplanem.

S rozvojem technologií zejména v oblasti aditivní výroby, neboli 3D tisku, spolu s novými poznatky o syntéze a vlastnostech fibroinového proteinu se otevírají nové možnosti využití fibroinu v oblasti bioinženýrství při přípravě 3D konstrukcí. Princip 3D tisku je založen na postupném vrstvení materiálu. Touto metodou lze tisknout nejen jednoduché konstrukce, ale i složité geometrické útvary. V oblasti biomedicíny se jedná například o tzv. scaffoldy, což jsou konstrukční prvky určené pro podporu buněčného růstu při náhradě poškozené tkáně. Při užití 3D tisku pro zpracování fibroinu je třeba překonat řadu limitů plynoucích zejména z reologických a mechanických vlastností materiálu.

První část práce seznamuje se stavbou přírodního hedvábného vlákna a s procesem zvlákňování. Dále je popsána izolace fibroinu z kokonů bource morušového včetně zhodnocení jeho vlastností a srovnání s jinými biopolymery.

Další část práce je zaměřena na 3D tisk a jeho užití pro materiály na bázi fibroinu. Na závěr jsou diskutovány možnosti tisku čistého fibroinu a jeho směsí.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je zhodnotit možnosti zpracování hedvábného proteinu fibroinu pomocí 3D tisku. Pro tyto účely bude provedena rešerše dosavadních poznatků v této oblasti prezentovaná v odborných publikacích.

V první řadě je nezbytné popsat stěžejní vlastnosti studovaného materiálu. Bude popsána struktura fibroinového vlákna a její formování v průběhu syntézy. Poté budou shrnuty mechanické vlastnosti, možnosti zpracování přírodního materiálu do regenerované formy a možné aplikace. V neposlední řadě bude uvedeno srovnání s jinými přírodními polymery.

Dále budou popsány možnosti 3D tisku fibroinových materiálů. Na základě provedené rešerše budou diskutovány přínosy a aplikační možnosti jednotlivých postupů.

2 PŘÍRODNÍ HEDVÁBNÝ PROTEIN

Hedvábné vlákno se skládá ze dvou hlavních proteinů, fibroinu a sericinu. V přírodě je syntetizováno např. živočichy řádu *Hymenoptera* nebo *Lepidoptera* na konci larválního stádia, kdy je hedvábí produkováno dvěma tubulárními žlázami, které se spojují do zvlákňovací trysky na břišní straně hlavy. Vytváří si tak kokony, které je chrání před predátory. Největší využití v průmyslu našlo hedvábí produkované larvami bource morušového (*Bombyx mori*) [1].

2.1 Stavba vlákna

Hedvábné vlákno je kompozitní materiál obsahující dvě fibroinová vlákna, která jsou obalena vrstvou sericinu. Sericin je adhezivní protein, který drží tato vlákna pohromadě a zároveň zabraňuje předčasné transformaci do krystalické konformace β -skládaného listu (β -sheet) z roztoku fibroinu při procesu zvlákňování uvnitř housenky bource morušového.

Fibroin se skládá z lehkého řetězce s molární hmotností 26 kDa a těžkého řetězce s molární hmotností přibližně 391 kDa. Tyto řetězce jsou spojeny jednou disulfidickou vazbou na C-konci těžkého řetězce. Těžký řetězec má strukturu blokového kopolymeru [2]. Obsahuje 11 krátkých hydrofilních oblastí složených z 31 aminokyselin a 12 hydrofobních bloků, které odpovídají 94 % těžkého řetězce [3].

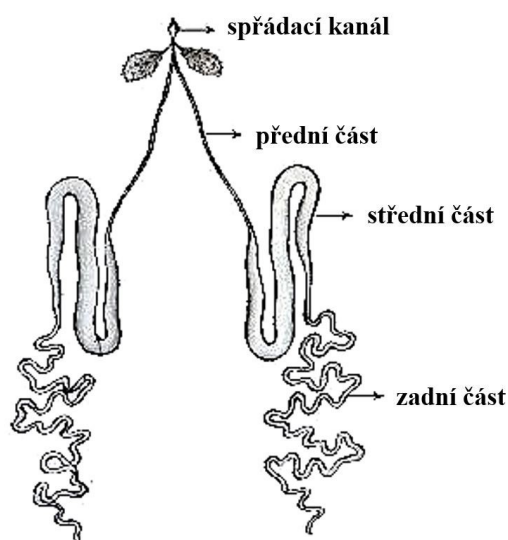
Komplex těžkého a lehkého řetězce je vázán glykoproteinem P25 pomocí hydrofobních interakcí v poměru 6:1 a tvoří tak micelární jednotku, která je důležitá při transportu fibroinu v procesu zvlákňování [4].

Hydrofobní řetězce zahrnují převážně sekvence glycin-x (GX), kde x je alanin (A) (65 %), serin (S) (23 %), nebo tyrosin (T) (9 %). Tyto GX sekvence se dále dělí do tří skupin:

- Vysoce opakující se GAGAGS sekvence přispívá k tvorbě krystalických oblastí β -sheet listů
- Méně opakující se GAGAGY sekvence přispívá k tvorbě semi-krystalických oblastí
- Sekvence podobná sekvenci v prvním bodě, s výjimkou přítomnosti AAS, který se vyskytuje na C-konci a hraje roli při narušování β -sheet listů [3]

2.2 Proces zvlákňování

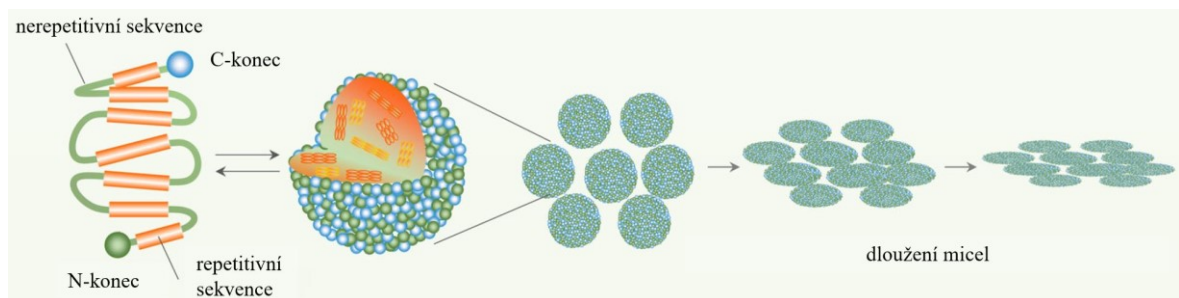
Fibroin vzniká v přírodě procesem zvlákňování. V průběhu procesu dochází ke změně konformace. Fibroin přechází z rozpustné formy náhodného klubka a α -šroubovice označované jako SILK I na semi-krystalickou konformaci obsahující β -skládané listy (značeno jako SILK II). Ke změně dochází především působením koncentračního a pH gradientu a smykového namáhání [5]. K syntéze proteinů tvořících hedvábné vlákno dochází v epitelálních buňkách hedvábné žlázy housenky bource morušového. Hedvábná žláza je symetrický párový orgán a každá část se dělí na 3 segmenty (obr. 1).



Obr. 1: Schéma hedvábné žlázy [6]

K syntéze fibroinu dochází v zadní části hedvábné žlázy. Počáteční koncentrace fibroinu ve vodě je 12 hm. %, konzistence je gelová. V této části žlázy dosahuje pH hodnoty 6,9. Fibroin se dále přesune do rozšiřující se střední hedvábné žlázy. V tomto prostornějším segmentu dochází k syntéze sericinu. Zároveň zde probíhá zakoncentrování fibroinu na 25 hm. %, pH prostředí klesá na 5,2. Mezi střední a přední žlázou dochází ke změně geometrie žlázy a proteinový vodný roztok přechází na sol-gel při pH 5,0 [7]. Přední žláza se dále zužuje, na počátku má průměr 400 μm a na výstupu 50 μm . Při pH 4,8 dochází k přeuspořádání makromolekul do formy podobné micelám s anizotropními vlastnostmi tekutých krystalů (obr. 2). Tato postupná transformace ovlivňuje proudění molekul a jejich uspořádání při průchodu spřádacím kanálem [8; 9]. Při průchodu přední částí žlázy dochází k dalšímu snižování množství vody v roztoku na 70 hm. %. Na výstupu ze zvlákňovacího kanálu se vysoce koncentrované tekuté krystaly přemění na tenké vlákno v konformaci β -skládaných

listů, které je nerozpustné ve vodě. Sprádání je podporováno smykovými silami způsobenými pohybem hlavy larvy bource morušového [7].



Obr. 2: Schéma zobrazující uspořádání makromolekul fibroinu do micel a jejich dloužení působením smykového namáhání [8]

Snižování koncentrace vody v průběhu procesu je spojeno s rostoucí koncentrací vápenatých iontů v jednotlivých částech žlázy. Změna iontové síly a pH roztoku má pravděpodobně stěžejní vliv na uspořádání makromolekul do formy micel s negativně nabitými hydrofilními koncovými částmi makromolekulárních řetězců na povrchu, viz obr. 2 [7; 8]. Pozvolná změna konformace proteinů vede k tvorbě mechanicky pevného vlákna s hierarchickou texturou [8].

Proces tvorby vlákna je stále předmětem studií zejména z reologického hlediska. Provedené simulace přirozeného zvlákňování naznačují, že tlak potřebný k vytlačení hedvábného vlákna přesahuje fyziologické možnosti larvy. Byla navržena teorie popisující postupnou fázovou separaci vody k okrajům hedvábné žlázy, kde plní funkci lubrikační vrstvy, usnadňující průchod tvořícího se vlákna kanálem [10].

2.3 Mechanické vlastnosti

Přírodní fibroinové vlákno bource morušového má dobré mechanické vlastnosti, a to především díky hydrofobním řetězcům, které tvoří krystalické oblasti uspořádané do β – sheet sekundární struktury [2]. Stabilita krystalických oblastí je zajištěna vodíkovými můstky společně s Van der Waalsovými silami a hydrofobními interakcemi. Za houževnatost a dloužitelnost je pak zodpovědná semi-amorfní matrice. Při zatížení v tahu je materiál homogenně napínán do doby, kdy se přestane chovat elasticky a začne se plasticky deformovat. V ten moment dochází k rozpadu semi-amorfní matrice a dojde k zatížení β – sheet krystalitů až do bodu lomu [4].

β – sheet krystality mohou být intermolekulární nebo intramolekulární, přičemž každá forma se opět chová jinak v průběhu mechanického namáhání. Zatímco při štěpení

intermolekulárních krystalitů dochází k oslabení až celkovému selhání materiálu, štěpením intramolekulárních krystalitů dochází k prodloužení materiálu. Důvodem vynikajících mechanických vlastností pavoučího vlákna (*Nephilia pilipes*) je obsah až 57 % intramolekulárních krystalitů z celkového množství krystalitů. U hedvábného vlákna bource morušového je to 18 % intramolekulárních krystalitů z celkového množství. Mechanické vlastnosti fibroinu by tedy mohly být zlepšeny nárůstem obsahu intramolekulárních β -sheet krystalitů. Mechanické vlastnosti přírodního vlákna jsou vysoce variabilní [11; 12]. Fibroin má Youngův modul 10 – 17 GPa. Jeho mez pevnosti v tahu je 300 – 740 MPa, lámání při napětí nastává při 4 – 26 % a má houževnatost 70 – 78 MJ m⁻³ [4]. Díky specifické strukturní hierarchii vykazují přírodní hedvábná vlákna vysokou houževnatost i při velmi nízkých teplotách, k tvárnému lomu dochází i při teplotě kapalného dusíku, přičemž prodloužení při přetržení je srovnatelné s chováním při pokojové teplotě [8].

2.4 Využití

Hedvábí se už po tisíciletí využívá v textilním průmyslu, především díky svým mechanickým vlastnostem, ale i vzhledu. Je pevné, hebké a je specifické svým perleťovým leskem.

Fibroin konkuruje svou vysokou biokompatibilitou některým hojně využívaným biopolymerům, jako jsou kolagen nebo kyselina polymléčná. V minulosti bylo hedvábné vlákno ve své přírodní formě často používáno jako šicí materiál. V současné době lze však fibroin zpracovávat do celé řady morfologií (filmy, vlákna, porézní struktury), čímž nalézá uplatnění zejména v tkáňovém inženýrství jako biomateriál [13]. Používá se při vývoji scaffoldů pro náhradu chrupavčité tkáně [14] nebo k vytvoření obvazového materiálu podporujícího hojení ran [15]. Pro takové využití jsou důležité vlastnosti jako je buněčná odezva, difúze, morfologie struktury nebo topografie povrchu biomateriálu. Povrchová struktura hraje důležitou roli pro interakci s buňkami a ovlivňuje například jejich diferenciaci. Dále může mít vliv na rychlost uvolňování léčiv [16]. Flexibilita fibroinových filmů v kombinaci s nerozpustností ve vodě umožňuje jejich užití pro výrobu biointegrovaných elektrických zařízení [17; 18]. Pro medicínské aplikace je nezbytné izolovat fibroin z kokonů bource morušového a dosáhnout vysoké čistoty. Proces čištění zahrnuje odstranění sericinu, který podle některých studií v kombinaci s fibroinem způsobuje zánětlivou reakci, i když samostatně tyto materiály vyvolávají minimální odezvu

organismu [19; 20]. Fibroin izolovaný z kokonů bource morušového se také označuje jako regenerovaný.

3 REGENEROVANÝ HEDVÁBNÝ PROTEIN

Před zpracováním fibroinu do požadovaných morfologií je nezbytné izolovat čistý fibroin z kokonů bource morušového. Hlavním krokem je odstranění sericinu a následné převedení fibroinu do rozpustné formy pomocí různých systémů rozpouštědel. Proces čištění vede ke změnám vlastností fibroinu [21; 22].

3.1 Příprava regenerovaného fibroinu

Je známá celá řada přístupů k čištění fibroinu. Pro zachování konstantních vlastností materiálu je však stěžejní dodržovat uniformní postup. Změnami jednotlivých procesních parametrů lze ovlivnit jak čistotu fibroinu, tak jeho molekulovou hmotnost a následně rozpustnost a zpracovatelské vlastnosti [21; 22; 23; 24]. Nejčastěji je užíván postup podle D. L. Kaplana [2]. Pro získání čistého fibroinu je v první řadě potřeba odstranit sericin procesem zvaným „degumming“. Nejprve je nutné nastříhat hedvábí na malé kousky, které se vaří v 0,02 M roztoku uhličitanu sodného Na_2CO_3 po dobu 30 min. Následně se fibroin 3x proplachuje ultračistou vodou ve stanovených časových intervalech, vyždímá se a přes noc se nechá vysušit při teplotě 50 °C. Po vysušení se hmota rozpouští v roztoku LiBr při teplotě 60 °C po dobu 4 hodin. Roztok fibroinu v LiBr se následně dialyzuje proti vodě. Hrubé nečistoty jsou po dialýze odstraněny centrifugací. Centrifuguje se 2x po 20 minutách při 4 °C a 9000 otáčkách za minutu. Získaný vodný roztok fibroinu lze následně zpracovávat do požadovaných struktur. Doba skladování vodného roztoku fibroinu v lednici je omezená, proto je vhodné jej před dlouhodobějším skladováním lyofilizovat [2], přičemž teplota zamrazení před lyofilizací ovlivňuje strukturu a konformaci fibroinu [24]. Vysušený fibroin lze poté opětovně rozpustit a dále zpracovávat. [2]

3.2 Vlastnosti regenerovaného fibroinu

3.2.1 Struktura

V průběhu rozpouštění je zničena specifická struktura přírodního hedvábného vlákna zodpovídající za materiálové vlastnosti [8]. Proces odstranění sericinu a rozpouštění fibroinu ovlivňuje molekulovou hmotnost fibroinu v závislosti na procesních podmínkách nebo použitém systému rozpouštědel. S molekulovou hmotností poté souvisí konformační přechod z náhodného klubka na strukturu β -sheet. Jak bylo zmíněno výše, právě sekundární struktura má dominantní vliv na mechanické vlastnosti fibroinu [23].

3.2.2 Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti regenerovaného fibroinu jsou horší ve srovnání s přírodním vláknem. Izolovaný fibroin je křehký a má nízkou pevnost v tahu. Při simulaci podmínek přirozeného zvlákňování v průběhu zpracování regenerovaného fibroinu, například úpravou pH prostředí nebo tažením materiálu, dochází k výraznému zlepšení mechanických vlastností, zejména houževnatosti, která může dokonce překonat přírodní vlákno [25].

3.2.3 Rozpustnost

Pro rozpouštění přírodního fibroinu se nejčastěji používá vodný roztok LiBr, který nezpůsobuje konformační přechod fibroinu do nerozpustné formy SILK II. Tento systém je tedy vhodný pro studium konformačních přechodů nebo pro následnou přípravu morfologií s požadavky na řízenou degradabilitu. Další směsí vhodnou pro rozpouštění fibroinu je roztok $\text{CaCl}_2\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH-H}_2\text{O}$, ve kterém se fibroin rozpouští rychleji ale následně přechází do nerozpustné formy [23]. Regenerovaný fibroin lze opětovně rozpouštět v 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanolu (HFIP), přičemž toto rozpouštědlo opět nepodporuje transformaci sekundární struktury do nerozpustného stavu. Pomocí HFIP nelze rozpustit přírodní fibroinové vlákno, pravděpodobně z důvodu vysoké hustoty vodíkových vazeb [26]. Rozpouštění v kyselině mravenčí má naopak za následek přeuspořádání konformace do stavu SILK II. Lze připravit rovněž vodný roztok fibroinu, který však po čase přechází do gelového stavu a je obtížně zpracovatelný z důvodu citlivosti na smykové namáhání [25].

3.3 Srovnání fibroinu s vybranými biopolymery

Biomateriály pro medicínské aplikace mohou být přírodního a syntetického původu. Nejčastěji užívanými materiály pro přípravu medicínských zařízení nebo tkáňových náhrad jsou přírodní materiály na bázi biopolymerů, které jsou pro tělo přirozené, biokompatibilní a biodegradabilní. Na druhou stranu je často obtížné u laboratorně zpracovaných přírodních materiálů docílit požadovaných mechanických vlastností. Zároveň je třeba u materiálů přírodního původu počítat s variabilitou ve struktuře a vlastnostech. Stěžejní je pro danou aplikaci vybrat vhodný materiál, případně jejich kombinaci, pro optimální stimulaci buněčného růstu nebo přiblížení se vlastnostem nahrazované tkáně [27]. V této kapitole budou představeny další biomateriály vhodné pro aplikace v medicíně pro srovnání s fibroinem.

3.3.1 Kolagen

Kolagen je základní protein, který zajišťuje strukturální soudržnost v organismech. Je tuhý, pevný a nerozpustný ve vodě. Vyskytuje se především v mezibuněčné hmotě a je součástí orgánů a tkání, např. kostí a svalů. V lidském těle tvoří kolagen 20 % všech proteinů. Skládá se ze tří α -šroubovic, které jsou tvořeny aminokyselinami, především glycinem, prolinem a hydroxyprolinem. Při stárnutí kolagenu dochází k většímu zesíťování, což ovšem snižuje jeho pružnost. V přírodě existuje především v kombinaci s jinými proteiny [28]. Kolagen má oproti fibroinu výrazně menší Youngův modul 0,0018 – 0,046 GPa. Jeho mez pevnosti v tahu je také menší než u fibroinu, jeho hodnota je 0,9 – 7,4 MPa. Ovšem jeho lámání při napětí nastává až při 24 – 68 % [4].

3.3.2 Hyaluronan

Hyaluronan je lineární polysacharid a biopolymer s vysokou molekulovou hmotností. V lidském těle se vyskytuje v pojivových tkáních, ve svalových tkáních, v kůži, ale i v orgánech jako jsou plíce a játra. Funkcí hyaluronanu je transport vody a hydratace tkání, regulace distribuce plazmových proteinů a lubrikace pohyblivých částí těla, jako jsou svaly a klouby [29; 30]. Hyaluronan je hojně využíván v kosmetice k výrobě hydratačních krémů a gelů. Ve zdravotnictví má hyaluronan využití např. při doplnění kloubní tekutiny u lidí trpících artritidou, při operacích oka nebo při hojení jizev po operacích. V neposlední řadě je užitečný při uvolňování léků zaměřené na léčbu očí, nosu nebo plic [30]. Velmi důležitou vlastností hydratovaného hyaluronanu je viskoelasticita. Viskozita i elasticita nejsou konstantní, liší se velikostí oscilačního a smykového pohybu. Při zvýšení rychlosti pohybu dochází ke snížení viskozity, což se projeví v množství síly potřebné k překonání vnitřního tření a zvýší se elasticita. Ta je poté zodpovědná za vratnou deformaci. Nejlépe je to vidět při mechanickém namáhání buněk měkkých tkání, kdy elasticita snižuje deformaci buněk a zajišťuje rychlé navrácení původního tvaru [29].

3.3.3 Kyselina polymléčná

Kyselina polymléčná je termoplastický polymer, který se vyrábí z kyseliny mléčné. Ta se získává fermentací nebo petrochemickou úpravou škrobu kukuřice, rýže nebo obilnin. Kyselina polymléčná se vyrábí dvěma způsoby. Prvním, méně používaným, je přímá kondenzace za nízkého tlaku, kdy vzniká polymer o malé molekulové hmotnosti 2 – 10 kDa. Druhým, komerčněji využívaným způsobem výroby je polymerace pomocí otevření laktidového kruhu [31].

Mezi její výjimečné vlastnosti patří biodegradabilita a biokompatibilita. Jako biokompatibilní materiál se používá v medicíně ve formě stehů nebo protetických pomůcek. Díky vhodné biodegradabilitě se využívá ve spotřebitelském průmyslu k výrobě plastových sáčků a tašek nebo různých obalů potravin. Kyselina polymléčná degraduje hydrolýzou na kyselinu mléčnou, která je mikroorganismy rozložena na vodu a oxid uhelnatý. Pokud se nechá kompostovat s jinou biomasou, k biodegradaci dojde po 2 týdnech a k úplnému rozložení dojde po 3 – 4 týdnech [32].

Kyselina polymléčná se vyskytuje v amorfním, semi-krystalickém i krystalickém stavu. Teplota skelného přechodu v amorfním stavu je 60 °C a teplota tání v semi-krystalickém a krystalickém stavu je v rozmezí 130 – 180 °C [33]. V krystalickém stavu má kyselina polymléčná tyto mechanické vlastnosti: modul pevnosti v ohybu s hodnotou 3,4 GPa, pevnost v tahu s hodnotou 60 MPa a lámání při napětí nastává při 8% prodloužení. Mezi významné vlastnosti patří také vysoká povrchová energie, která je zajišťuje snadný 3D tisk [32].

3.3.4 Keratin

Keratin je vláknitý protein produkovaný kůží, která se skládá ze dvou vrstev, dermis a epidermis. Dermis je spodní část kůže a je tvořen elastinem a kolagenem. Epidermis tvoří vnější vrstvu a je tvořen epidermálními buňkami. Keratin vzniká procesem rohovatění, kdy dochází k nahromadění odumřelých epidermálních buněk vyskytujících se v epidermis. V závislosti na struktuře jej dělíme na α -keratin a β -keratin. α -keratin můžeme nalézt u savců, a to v kůži, ve vlasech, ve vlně nebo v kopytech. β -keratin je významný u plazů a ptáků, nalezneme jej v drápech, šupinách, peří nebo v zobáku. Oba typy se od sebe liší strukturou středních filament. U α -keratinu je střední filamentum tvořeno do sebe zapletenými α -šroubovicemi, které mají podobnou strukturu kolagenu a tvoří mikrofibrily o průměru 8 nm. β -keratin má strukturu β -skládaných listů a jeho průměr je 4 nm [28].

Keratin je biokompozit skládající se z pevného vlákna a viskoelastické matrice, která přenáší vzniklé napětí na vlákno a brání šíření trhlin. Mechanické vlastnosti závisí na množství vlhkosti, kterou viskoelastická matrice pohlcuje. Čím více vlhkosti pohltní, tím dojde k většímu poklesu tvrdosti. Pokud dojde ke kombinaci keratinu s vápníkem nebo jiným minerálem, keratin tvrdne [28].

4 3D TISK

Aditivní výroba, neboli 3D tisk, je výrobní proces založený na postupném pokládání souvislých vrstev materiálu na základě 3D modelu, který lze zpracovat například v programu CAD (Computer-aided design) [27; 34].

3D tisk nabízí možnost vytisknout složité geometrické útvary s vysokou přesností. Mohou to být jak mikro struktury, tak makrostruktury. U tisku mikrostruktur se klade velký důraz na přesnost tiskárny. Velmi důležitá je rovněž adheze jednotlivých vrstev, sledována bývá zároveň povrchová struktura tisknutých výrobků. U makrostruktur záleží na velikosti výsledného produktu, která je limitována možnostmi dané tiskárny.

Průkopníkem 3D tisku je Charles Hull, který používal první podobu 3D tisku, proces zvaný stereolitografie již v roce 1986, kdy si tento postup nechal patentovat. Historie vývoje byla značně ovlivněna vypršením některých patentů, což zapříčinilo rapidní zrychlení rozvoje. Došlo k velkému snížení nákladů na výrobu samotných 3D tiskáren i vytisknutých produktů a byla vyvinuta spousta nových metod tisku.

Metoda 3D tisku je hojně využívána v průmyslu při vývoji výrobků, zejména v oblasti výroby prototypů. V posledních letech nachází výrazné uplatnění v biomedicíně při výrobě scaffoldů. Scaffoldy jsou 3D biokompatibilní struktury podporující buněčný růst, vyvíjené za účelem opravy nebo náhrady poškozené tkáně. Pomocí výpočetní tomografie a následného 3D modelingu by bylo možné pacientovi vytisknout implantát tkáně na míru [34].

4.1 3D biotisk

Speciálním typem 3D tisku je 3D biotisk, při kterém je 3D struktura tvořena z tzv. bioinku. Bioink je tvořen materiálem nebo směsí materiálů s inkorporovanými živými buňkami. Před samotným tiskem je potřeba navrhnout a připravit samotný bioink a následně otestovat jeho vlastnosti. Jako biotisk je často prezentován i postup, kdy se tiskne scaffold z materiálu bez buněk, přičemž buňky jsou do struktury očkované následně. V tomto případě je jako bioink značen biokompatibilní tisknutý materiál.

Aby si vytisknutý materiál udržel svůj tvar a strukturu a zároveň byla zachována životaschopnost buněk, je potřeba nastavit u tisku důležité parametry, jako jsou např. rychlost vytlačování bioinku, jeho tlak a teplota [35].

4.2 Metody 3D tisku

4.2.1 Inkjet

Metoda inkjet se podobá klasickým tiskárnám. Bioink je při tisku přesunut ze zásobníku do komory, odkud se uvolňuje. Pro jeho uvolnění se používají dva mechanismy, piezoelektrický a termální. U piezoelektrického systému je potřeba do místa jednotky dodat napětí, které způsobí pohyb jednotky a vytvoření tlaku potřebného k vytlačení bioinku. Termální mechanismus je založen na výrazném zahřívání bioinku za vzniku bubliny, která vytvoří tlak zajišťující vytlačení bioinku tryskou. Hodnota vyhřívání dosahuje až 300 °C, tato teplota však přetrvá několik mikrosekund a způsobí zahřátí bioinku o necelých 10 °C. Na bioink takto zvýšená teplota má minimální dopad. Oproti ostatním metodám tisku má inkjet tu výhodu, že nemusí být v přímém kontaktu s povrchem, na který je bioink tisknut. Tato technologie však není vhodná pro tisk živých buněk. Roztok se živými buňkami má vysokou viskozitu a aby bylo možné jej vytisknout, bylo by potřeba zvýšit tlak působící na roztok, což by vedlo k poškození buněk [36].

4.2.2 Robotic dispensing

Metodu robotic dispensing můžeme rozdělit na dva typy. Prvním typem je extruze, při které dochází k vytlačování materiálu skrze dávkovač působením buď pneumatického zařízení využívající vysokého tlaku, nebo pístu využívající mechanickou sílu. Dávkovač je umístěn na robotické hlavě, která je schopna se pohybovat po osách x, y a z. Pomocí extruze je možné materiál vytlačovat na prázdný povrch, do kapaliny nebo gelu a je vytlačován ve formě tenkého vlákna. Podobně jako u inkjetu, při tisku živých buněk dochází k jejich deformaci působením vysokého tlaku. Metodu lze však využít při tisku endotelových buněk ve formě jednoduché 3D konstrukce tkáně a při vytvoření filmů nebuněčných vaskulárních implantátů [36]. Druhým typem je vypouštění kapek. Bioink je vytlačěn pístem skrze ventil, jehož otevírání je řízeno magnetickým polem cívky ventilu. Velikost průchozí kapky je ovlivněna tlakem působícím na bioink a na sekvenci otevírání a zavírání ventilu. Takto vytvořená kapka se pohybuje v řádech nanolitrů. Výhodou oproti extruzi je možnost využití bioinku s nižší viskozitou [35].

4.2.3 Laser-based printing

Tato metoda je založena na přenosu bioinku z jednoho substrátu na druhý pomocí pulsujícího laserového paprsku. Povrch substrátu, na který je deponován tisknutý materiál, je upraven vrstvou titanu nebo zlata. Absorbovaná energie poté určuje velikost přenesených kapiček bioinku. Metoda laser-based printing je vhodná pro tisk bioinku s vysokou viskozitou a pro tisk živých buněk nahuštěných na sebe s vysokým rozlišením. Její využití je však omezeno velikostí vytisknuté 3D konstrukce a vysokými náklady na tisk [35].

4.2.4 Fused deposition modeling

Jedná se o jednu z nejpoužívanějších metod 3D tisku. Využívá techniky a systému jako při extruzi metodou robotic dispensing. Materiál se zahřeje do poloroztaveného stavu a při kontaktu s povrchem tuhne. Díky možnosti tisku bioinku s vyšší viskozitou než u metody inkjet lze tisknout i kompozity materiálů s lepšími vlastnostmi. Při zvýšení smykové rychlosti u tisku dochází u některých biomateriálů jako je hedvábí a kyselina polymléčná k nenewtonskému snížení viskozity. Hardware je proto upraven tak, aby bylo možné smykovou rychlost upravovat během extruze. Při vysoké smykové rychlosti bioinků dochází ke snížení viskozity, což umožní průchod bioinku tryskou při vytlačování. Po vytisknutí dochází ke snížení smykového tření a k navrácení původní viskozity. Podobně jako u metody robotic dispensing lze tisknout živé buňky, avšak působením vysokých tlaků při vytlačování bioinku s živými buňkami dochází k jejich poškození. Jejich šance na přežití je 40 – 86 % [36].

5 3D TISK FIBROINU

Fibroin lze tisknout bez příměsí, úspěšnost však závisí na kvalitě a vlastnostech regenerovaného roztoku fibroinu a na podmínkách tisku. [37]. Jedna z prvních 3D fibroinových struktur tištěných extruzní metodou byla připravena skupinou Jeniffer A. Lewis. Bioink fibroinu byl připraven o koncentraci 28 – 30 % a byl vytisknut ve tvaru čtverce. Do struktury se vědcům povedlo aplikovat mezenchymální kmenové buňky, které vykazovaly diferenciaci. Další používanou metodou tisku fibroinu je inkjet. Touto technikou se povedlo vytisknout fibroinovou strukturu vědecké skupině vedené David L. Kaplanem. Roztok fibroinu o hmotnostní koncentraci 0,6 % byl natisknut na vinylový plast ve formě linek. Do struktury fibroinu a na vinylový plast byly aplikovány buňky kostní dřeně, buněčný růst a diferenciaci vykazovaly pouze buňky aplikované do struktury fibroinu [38].

3D tisk scaffoldů na bázi fibroinu je dále možný pomocí metody „direct-write assembly“. Regenerovaný roztok fibroinu byl připraven rozpuštěním fibroinu ve LiBr při 60 °C po dobu 4 hodin. Po provedení dialýzy byla koncentrace roztoku 8 %, následným zakoncentrováním v polyethylenglykolu byla koncentrace zvýšená na 28 – 30 % a jeho viskozita byla 2,9 Pa·s. Pro 3D tisk byla použita metoda extruze. Roztok byl vytlačěn tryskou o vnějším průměru 1 mm a o vnitřním průměru 0,58 mm. Extruze probíhala rychlostí 2 mm/s při tlaku 20 – 70 kPa. Roztok byl vytlačěn do 86 % methanolu, kde proběhla koagulace proteinů do filament. Scaffoldy byly vytvořeny nanesením 2 – 6 vrstev na sebe, jejich velikost byla 2mm x 2mm. Po vysušení a krystalizaci měla vlákna průměr 4,5 μm. Po aplikování lidských mezenchymálních kmenových buněk vykazovala struktura schopnost podpory růstu buněk a jejich diferenciaci [39].

Poměrně novou technikou je tisk biopolymerů do gelového granulátového média, které plní roli stabilizátoru výtisku. V případě fibroinu byla použita směs nanojílu a polyethylenglykolu (PEG), kdy nanojíl stabilizuje strukturu během tisku a PEG způsobuje síťování fibroinu [40].

5.1 Směsi fibroinu pro 3D tisk

Regenerovaný roztok fibroinu zbavený sericinu pomocí procesu degumming má horší mechanické vlastnosti než přírodní hedvábi. Proto se k regenerovanému fibroinu přidávají různé příměsi, které tvoří s fibroinem kompozity. Tyto příměsi ovlivňují reologické vlastnosti směsi, například zvyšují viskozitu, což ovlivňuje zpracovatelnost a napomáhá

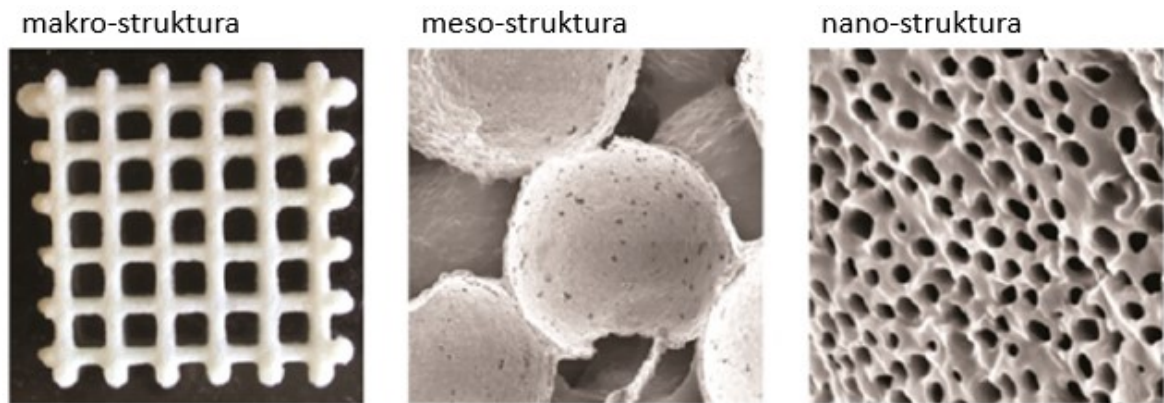
vytisknuté struktury udržet její tvar. Mezi často používané příměsi patří PEG, glycerol, glukomanan nebo také hydroxyapatit a chitosan. [37]

5.1.1 Příměs glukomananu

Glukomanan je hydrofilní polymer, který je biokompatibilní a biodegradabilní. Příměs glukomananu zapříčiňuje ve směsi s fibroinem vznik vodíkových vazeb, které způsobují přeměnu konformace části α -šroubovic na β -skládané listy. Díky glukomananu má směs po vytisknutí lepší viskoelasticitu a mechanickou odolnost [41]. Zároveň glukomanan ve směsi zlepšuje reologické vlastnosti v průběhu tisku.

Roztok fibroinu byl připraven následujícím způsobem – po odstranění sericinu, kdy byly kokony hedvábí dvakrát povařeny v 0,02M uhličitanu sodném po dobu 1 hodiny proběhlo rozpuštění fibroinu v 9M LiBr a fibroin se dialyzoval ve vodě po dobu 36 hodin. Roztok byl přefiltrován skrze 5 μ m filtr ve stříkačce a následně byl sušen pomocí mrazení až do získání 16 hm. % roztoku. Glukomanan byl rozpuštěn a míchán ve vodě o teplotě 80 °C do doby, než vznikl roztok o koncentraci 6 hm. %. Za stálého míchání byl roztok glukomananu chlazen na 4 °C. Jednotlivé složky byly poté smíchány. Před samotným tiskem byl ink zbaven plynů. Ink byl tisknut skrze kuželovitou jehlu o vnitřním průměru 2,2 mm rychlostí 10 mm/s při tlaku 1 – 4 kPa. Vytisknuté struktury byly vysušeny na vzduchu a následně byly vloženy do 90 % methanolu po dobu 30 minut k zajištění tvorby β -skládaných listů fibroinu. K získání čistě fibroinových struktur byla vytisknutá struktura ponořena do vody o teplotě 121 °C a působením tlaku 1 bar po dobu 20 minut.

Příměsí voskových nebo polykaprolaktonových mikročástic v kombinaci s nanočásticemi k fibroinu s glukomananem lze dosáhnout hierarchické textury výtisku. (obr. 3). Částice kaprolaktamu nebo vosku jsou po stabilizaci struktury fibroinu odstraněny rozpuštěním v dichlormethanu nebo chloroformu při 60°C. Výsledná struktura vykazuje uzavřenou pórovitost podobnou pěnovitým strukturám vyskytujících se v peří nebo v zobáku u ptáků. Vzniklé struktury se sice neblíží dokonalým strukturám známým z přírody, mohly by však najít využití v tkáňovém inženýrství a v environmentálních nebo biotechnických aplikacích. [42]



Obr. 3: Hierarchická textura 3D tištěných fibroinových konstrukcí [42]

5.1.2 Příměs hydroxyapatitu

Směs hydroxyapatitu a fibroinu lze použít k vytvoření 3D scaffoldů pomocí metody 3D tisku „direct-write assembly“. Byly vytvořeny scaffoldy s modulem pružnosti o velikosti 223 MPa, který byl větší, než u scaffoldů vytvořených metodou „electrospinning“. Uvnitř byly vytvořeny póry o velikosti 200 – 750 μm a filameny o průměru 200 μm . Po aplikaci lidských mezenchymálních kmenových buněk do struktury bylo zjištěno, že další úpravou velikosti a rozmístění pórů by mohlo dojít k vylepšení vlastností výsledné struktury. Byly vytvořeny směsi nanočástic fibroinu o velikosti 500 – 800 nm, nanočástic hydroxyapatitu o velikosti 30 – 60 nm a kyseliny polymléčné v různých poměrech. Nejlepší směs byla tvořena 94 % kyseliny polymléčné, 3 % hydroxyapatitu a 3 % fibroinu, ze které byly vytisknuty 3D svorky. Struktura měla pevnost tlaku s hodnotou 2,4 MPa a vykazovala biokompatibilitu a vynikající podporu buněčného růstu. Díky těmto vlastnostem byla struktura aplikována k hojení zlomeniny kosti u myši. Z výsledné studie bylo zjištěno, že 3D scaffold dokázal zlomené kosti narovnat a zahojit zlomené segmenty. V místech použití scaffoldů taktéž došlo k vytvoření osteoidů z osteoblastů, což potvrdilo vynikající biokompatibilitu použitých struktur [39].

5.1.3 Příměs chitosanu

Směs chitosanu a částic fibroinu o velikosti 5,72 μm byla použita ke 3D tisku hydrogelových scaffoldů. Ink byl tisknut skrze 580 μm trysku rychlostí 10 – 20 mm/s při tlaku 0,4 – 0,7 baru. Viskozita se pohybovala v rozmezí 1,4 – 8,4 Pa·s v závislosti na koncentraci částic chitosanu a fibroinu, avšak stabilita výsledné struktury a tisknutelnost byla závislá především na koncentraci částic fibroinu. K vysrážení struktury byla použita lázeň ze směsi voda/ethanol. Modul pevnosti v tlaku struktury byl až 8000 Pa. Do struktury byly aplikovány

lidské fibroblasty. Bylo zjištěno, že se zvyšující koncentrací částic fibroinu se zvyšovala proliferace buněk. Scaffoldy obsahující 100 % a 300 % fibroinových částic vydržely v buněčném kultivačním médiu po dobu 2 týdnů [39].

5.1.4 Příměs želatiny

Směs fibroinu a želatiny byla použita ke 3D tisku scaffoldů k náhradě kloubní chrupavky králíka. Směs byla síťována pomocí ethanolu a genipinu. Při tvorbě scaffoldů se kladl velký důraz na výslednou tloušťku scaffoldů, aby odpovídala reálné králičí chrupavce. Správné tloušťky bylo dosaženo vytvořením tří vrstev, které obsahovaly póry o velikosti 350 μm . Povrch scaffoldů byl ošetřen neporézní membránou, která zajišťovala udržení aplikovaných kmenových buněk kostní dřeně. Mezi důležité parametry patřil poměr mezi množstvím želatiny a fibroinu, který měl velký vliv na výsledné vlastnosti struktury. Byl zjištěn modul pevnosti v tlaku struktury s hodnotou 2 – 5 MPa a tvrdost s hodnotou 100 – 400 kPa. Struktura byla považována za ideální pro proliferaci a diferenciaci buněk a k tvorbě mezibuněčné hmoty [39].

5.1.5 Příměs hydroxypropylmethylcelulózy

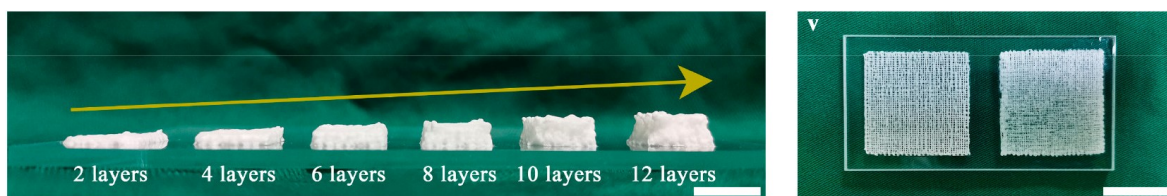
Hydroxypropylmethylcelulóza (HPMC) je viskoelastický polymer sloužící jako hydrofilní nosný materiál používaný v lékařství. Je to vysoce bobtnající materiál, který při kontaktu s vodou do sebe vodu difunduje, dojde ke zvětšení jeho objemu a uvolní materiál, který v sobě nese. Využívá se jako médium pro uvolnění léčiv v medicíně [43].

Směs HPMC a fibroinu byla využita ke 3D tisku hydrogel scaffoldů sloužící k regeneraci průdušnic. Byla připravena smícháním 30% roztoku fibroinu a 10% roztoku HPMC a z jejich rozdílných poměrů byly tisknuty scaffoldy. Tisk probíhal skrze jehlu o průměru 260 μm rychlostí 40 mm/s při tlaku 0,1 – 0,5 MPa. Výsledná struktura scaffoldů o průměru 15 mm a tloušťce 1,8 mm byla ponořena do ethanolu po dobu 1 hodiny k vytvoření β -skládaných listů. Uvnitř byly vytvořeny póry o průměru 469 μm a celková struktura byla z 58 % porézní. Pevnost v tahu struktury byla 0,17 MPa. Dovnitř struktury byly aplikovány bronchiální epitelové buňky a při jejich pozorování bylo zjištěno, že struktura podporuje proliferaci buněk a je vhodná pro použití regenerace průduškového epitelu [39].

5.1.6 Příměs kyseliny hyaluronové

DN (double-network) hydrogely jsou složeny ze dvou typů hydrogelů bez kovalentního provázání. Jedna složka je obvykle tuhá a křehká a zajišťuje odolnost proti šíření trhlin,

druhou složku představuje měkký polymer s nízkou hustotou síťování. Při kombinaci dvou rozdílných složek dochází k synergii a zlepšení mechanických vlastností výsledného modelu, zejména modulu pružnosti. V tomto případě fibroin tvoří křehkou a pevnou matici a methakrylát kyseliny hyaluronové slouží jako změkčující složka. Předpokládá se, že karboxylové skupiny na řetězcích kyseliny hyaluronové neutralizují aminoskupiny proteinových segmentů, čímž eliminují repulsní síly mezi těmito segmenty a podpoří proces tvorby vodíkových vazeb mezi makromolekulami proteinu. 3D scaffoldy z této směsi vykazují vyšší stabilitu ve srovnání s želatinovými hydrogely. Poskytují rovněž vhodné mikroprostředí pro buněčný růst a migraci [44].



Obr. 4: 3D scaffoldy připravené ze směsi fibroinu a methakrylátu kyseliny hyaluronové [44]

6 DISKUZE

Hedvábný fibroin vzniká v přírodě složitým procesem zvlákňování za velmi specifických podmínek a přiblížit se jim v laboratorních podmínkách je téměř nereálné. Při zvlákňování dochází k postupné změně pH a koncentrace vápenných iontů, což má pravděpodobně stěžejní vliv na změnu konformace proteinů a tedy na vznik mechanicky pevného vlákna [5]. Díky přítomnosti proteinu sericinu, který obaluje vlákno, má přírodní fibroin lepší vlastnosti, než fibroin zbavený sericinu. Sericin však není biokompatibilní a vyvolává alergickou reakci nebo zánět, tudíž pro použití v medicíně není vhodné používat přírodní fibroin [19; 20]. Sericinu se odstraňuje pomocí procesu degumming, kdy se nechá fibroin povařit v roztoku uhličitanu sodného [2]. Vliv na úbytek sericinu má teplota, při které se fibroin vaří, čas, množství vody v roztoku a koncentrace přítomné soli. S úbytkem sericinu v procesu degumming dochází ke snížení molekulové hmotnosti a zmenšuje se pevnost v tahu, což je pravděpodobně způsobeno degradací proteinu [22].

Fibroin lze zpracovávat řadou metod, jednou z nich je electrospinning [45]. Fibroin zpracovaný touto metodou však nemá optimální vlastnosti a jeho využití je tedy omezené. Důraz je kladen na 3D tisk, který je za posledních několik let intenzivně rozvíjen [27]. 3D tisk fibroinu je velmi komplikovaný a je řízený celou řadou parametrů, především závisí na kvalitě získaného regenerovaného roztoku. S tím souvisí jeho molekulová hmotnost, která výrazně ovlivňuje průběh tisku a v neposlední řadě záleží na podmínkách samotného tisku, jako je teplota nebo tlak. Čím vyšší tlak se u tisku fibroinu použije, tím více dochází k mechanickému namáhání. To způsobí změnu konformace z α -šroubovice na β -skládané listy a dochází ke krystalizaci fibroinu. Výsledná struktura však nesplňuje kvalitativní požadavky, většinou je křehká. Kromě toho reologické změny v průběhu tisku znesnadňují celý proces.

V posledních letech se rovněž vyvíjí i 3D biotisk. Je to speciální metoda, při které se tiskne tzv. bioink. Bioink je směs materiálů, ve které se vyskytují živé buňky. Jako 3D biotisk se často používá i postup, při kterém je nejprve vytisknut materiál a až poté jsou do něj aplikovány živé buňky. Biotisk má však limitující faktory. Při 3D tisku je často potřeba použít vysokého tlaku nebo teploty, při takových podmínkách však dochází k uhynutí aplikovaných buněk. [35] Dalším omezujícím faktorem je růst buněk na materiálu. Spousta materiálů totiž růst buněk výrazně nepodporuje, včetně fibroinu. Podpořit růst buněk na fibroinu lze například modifikací RGD peptidem [46].

Fibroin lze tisknout samotný, výtisky ovšem často nemají dostačující mechanické vlastnosti. Lze je vylepšit použitím příměsí, například jiných biopolymerů, které mechanické vlastnosti modifikují. Pomocí příměsí lze rovněž ovlivnit viskozitu, která hraje roli při procesu 3D tisku a zároveň má vliv na výslednou strukturu materiálu. Mezi časté příměsi fibroinu patří glukomanan, hydroxyapatit, chitosan a želatina.

Glukomanan se využívá ve směsi s fibroinem především díky své biokompatibilitě a nízké imunitní odezvě. Důležitou vlastností, kterou glukomanan přispívá je zvýšená mechanická odolnost, která je způsobena vznikem vodíkových vazeb mezi glukomananem a fibroinem za podpory vzniku β -skládaných listů. Výslednou strukturou je porézní materiál, který není cytotoxický, tudíž je vhodný k využití v biomedicíně. [42]

Další používanou příměsí je hydroxyapatit, který se běžně vyskytuje v kostech. Na rozdíl od glukomananu hydroxyapatit podporuje buněčný růst. Díky své podpoře ke vstřebávání vápníku se 3D scaffoldy vytvořené touto směsí využívají k urychlení hojení zlomenin. [39]

Další příměsí je chitosan, který je základní složkou chitinu. Ve směsi s fibroinem zajišťuje cytokompatibilitu a správnou biodegradaci. Bylo dokázáno, že se zvyšující koncentrací částic fibroinu se zvyšovala proliferace buněk. Směs chitosan – fibroin má pevnost v tlaku 8000 Pa, kdežto směs hydroxyapatit – fibroin má pevnost v tlaku 2,4 MPa. Lze tedy říci, že směs hydroxyapatit – fibroin lze použít v místech, která jsou více namáhána.

Želatina je biokompatibilní a využívá se ve směsi s fibroinem za účelem zvýšení adheze buněk. Modul pevnosti v tlaku této směsi je 2 – 5 MPa. Díky svým vlastnostem se tato směs využívá k regeneraci kloubních chrupavek. [39]

Hlavním problémem při přípravě fibroinových konstrukcí je předčasná transformace sekundární struktury do nerozpustné formy, která je často indukována smykovým namáháním. To výrazně znesnadňuje proces 3D tisku. Zároveň výsledné konstrukce jsou příliš křehké a nepředstavují optimální prostředí pro růst buněk. Další příměsí, která může tyto problémy eliminovat, je kyselina hyaluronová, která při kombinaci s fibroinem může plnit funkci změkčovadla [44].

ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byly studovány možnosti využití hedvábného proteinu při aditivní výrobě. Ve srovnání s jinými metodami zpracování fibroinu, například zvlákňováním, 3D tisk poskytuje více možností pro modifikaci vlastností struktury a také větší morfologickou variabilitu. Bylo zjištěno, že 3D tisk samotného regenerovaného roztoku je komplikovaný a závisí na celé řadě procesních parametrů. Pro dosažení optimálních vlastností materiálu se nabízí možnost simulace přirozených podmínek zvlákňování, která může být v laboratorních podmínkách obtížně realizovatelná. Proto se při 3D tisku fibroinu využívají další biopolymery a příměsi, které ulehčují tisk a zlepšují vlastnosti výsledné struktury. Při využití příměsi glukomananu s fibroinem dochází k vytvoření vodíkových vazeb, které zapříčiňují zvýšení mechanické odolnosti směsi. Příměs hydroxyapatitu vykazuje zvýšenou proliferaci buněk a bylo zjištěno, že díky vstřebávání vápníku lze tuto směs použít k regeneraci zlomenin. Další studovanou příměsí je chitosan, který je cytocompatibilní a při zvyšující se koncentraci fibroinových iontů vykazuje zvýšený růst buněk. Oproti ostatním příměsím však vykazuje horší mechanické vlastnosti. Při využití příměsi želatiny bylo zjištěno, že vykazuje zvýšenou adhezi buněk a má výborné mechanické vlastnosti pro aplikaci k regeneraci kloubních chrupavek. Speciální metodou pro vytváření 3D struktur je 3D biotisk, při kterém se tiskne materiál obsahující živé buňky. Biotisk je však limitován podmínkami tisku, kdy při překročení určité hranice teploty nebo tlaku dochází k úhynu buněk. Pozornost by měla být věnována v budoucnu 3D tisku směsí hydroxyapatitu a fibroinu pro aplikaci v oblasti regenerace kostní tkáně.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SEHNAL, František. Biotechnologies Based on Silk. VILCINSKAS, Andreas, ed., Andreas VILCINSKAS. *Insect Biotechnology*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011, s. 211-224. ISBN 978-90-481-9640-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-90-481-9641-8_11
- [2] ROCKWOOD, Danielle, Rucsanda PREDA, Tuna YÜCEL, Xiaoqin WANG, Michael LOVETT a David KAPLAN. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nature Protocols*. 2011, **6**(10), 1612-1631. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2011.379
- [3] HOLLAND, Chris, Keiji NUMATA, Jelena RNJAK-KOVACINA a F. SEIB. The Biomedical Use of Silk: Past, Present, Future. *Advanced Healthcare Materials*. 2019, **8**(1), 26. ISSN 21922640. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201800465
- [4] KOH, Leng-Duei, Yuan CHENG, Choon-Peng TENG et al. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials. *Progress in Polymer Science*. 2015, **46**, 86-110. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2015.02.001
- [5] ANDERSSON, Marlene, Jan JOHANSSON a Anna RISING. Silk Spinning in Silkworms and Spiders. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, **17**(8), 14. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms17081290
- [6] BHAT, Muzafar, Punyavathi SOMASHEKAR a Manjunatha BOREGOWDA. ELECTROPHORETIC SEPARATION AND COMPARATIVE ANALYSIS OF SILK GLAND PROTEINS FROM BOMBYX AND PHILOSAMIA. *International Journal of Bioassays*. 2014, **3**(08), 3214-3218. ISSN 2278-778X. Dostupné také z: https://www.researchgate.net/publication/267024721_ELECTROPHORETIC_SEPARATION_AND_COMPARATIVE_ANALYSIS_OF_SILK_GLAND_PROTEINS_FROM_BOMBYX_AND_PHILOSAMIA
- [7] FOO, C., E. BINI, J. HENSMAN, D.P. KNIGHT, R.V. LEWIS a D.L. KAPLAN. Role of pH and charge on silk protein assembly in insects and spiders. *Applied Physics A*. 2006, **82**(2), 223-233. ISSN 0947-8396. Dostupné z: doi:10.1007/s00339-005-3426-7
- [8] LING, Shengjie, Zhao QIN, Chunmei LI, Wenwen HUANG, David KAPLAN a Markus BUEHLER. Polymorphic regenerated silk fibers assembled through bioinspired spinning. *Nature Communications*. 2017, **8**(1), 12. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-017-00613-5
- [9] ASAKURA, Tetsuo, Kosuke UMEMURA, Yasumoto NAKAZAWA, Haruko HIROSE, James HIGHAM a David KNIGHT. Some Observations on the Structure and Function of the Spinning Apparatus in the Silkworm Bombyx mori. *Biomacromolecules*. 2007, **8**(1), 175-181. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm060874z
- [10] SPARKES, James a Chris HOLLAND. Analysis of the pressure requirements for silk spinning reveals a pultrusion dominated process. *Nature Communications*. 2017, **8**(1), 10. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-017-00409-7
- [11] ZHAO, Hong-Ping, Xi-Qiao FENG a Hui-Ji SHI. Variability in mechanical properties of Bombyx mori silk. *Materials Science and Engineering: C*. 2007, **27**(4), 675-683. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2006.06.031

- [12] PÉREZ-RIGUEIRO, J., C. VINEY, C. LLORCA a M. ELICES. Silkworm silk as an engineering material. *Journal of Applied Polymer Science*. 1998, **70**(12), 9. ISSN 2439-2447. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-4628(19981219)70:12<2439::AID-APP16>3.0.CO;2-J
- [13] VEPARI, Charu a David KAPLAN. Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science*. 2007, **32**(8-9), 991-1007. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013
- [14] CHENG, Gu, Zahra DAVOUDI, Xin XING, Xin YU, Xin CHENG, Zubing LI, Hongbing DENG a Qun WANG. Advanced Silk Fibroin Biomaterials for Cartilage Regeneration. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2018, **4**(8), 2704-2715. ISSN 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbomaterials.8b00150
- [15] FAROKHI, Mehdi, Fatemeh MOTTAGHITALAB, Yousef FATAHI, Ali KHADEMHOSEINI a David KAPLAN. Overview of Silk Fibroin Use in Wound Dressings. *Trends in Biotechnology*. 2018, **36**(9), 907-922. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2018.04.004
- [16] QI, Yu, Hui WANG, Kai WEI, Ya YANG, Ru-Yue ZHENG, Ick KIM a Ke-Qin ZHANG. A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Level Structures. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, **18**(3), 21. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18030237
- [17] KIM, Dae-Hyeong, Jonathan VIVENTI, Jason AMSDEN et al. Dissolvable films of silk fibroin for ultrathin conformal bio-integrated electronics. *Nature Materials*. 2010, **9**(6), 511-517. ISSN 1476-1122. Dostupné z: doi:10.1038/nmat2745
- [18] ZHANG, Yujia, Zhitao ZHOU, Zhen FAN et al. Self-Powered Multifunctional Transient Bioelectronics. *Small*. 2018, **14**(35), 10. ISSN 16136810. Dostupné z: doi:10.1002/sml.201802050
- [19] ARAMWIT, Pornanong, Sorada KANOKPANONT, Wanchai DE-EKNAMKUL a Teerapol SRICHANA. Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2009, **107**(5), 556-561. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiosc.2008.12.012
- [20] WANG, Zheng, Yeshun ZHANG, Jinxiang ZHANG et al. Exploring natural silk protein sericin for regenerative medicine: an injectable, photoluminescent, cell-adhesive 3D hydrogel. *Scientific Reports*. 2015, **4**(1), 11. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep07064
- [21] PHILLIPS, David, Lawrence DRUMMY, Deborah CONRADY et al. Dissolution and Regeneration of Bombyx mori Silk Fibroin Using Ionic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*. 2004, **126**(44), 14350-14351. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja046079f
- [22] BUCCIARELLI, Alessio, Gabriele GRECO, Ilaria CORRIDORI, Nicola PUGNO a Antonella MOTTA. A Design of Experiment Rational Optimization of the Degumming Process and Its Impact on the Silk Fibroin Properties. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2021, **7**(4), 1374-1393. ISSN 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbomaterials.0c01657
- [23] CHENG, Guotao, Xin WANG, Sijie TAO, Ju XIA a Shui XU. Differences in regenerated silk fibroin prepared with different solvent systems: From structures to conformational changes. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015, **132**(22), -. ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.41959

- [24] NAM, Jin a Young PARK. Morphology of regenerated silk fibroin: Effects of freezing temperature, alcohol addition, and molecular weight. *Journal of Applied Polymer Science*. 2001, **81**(12), 3008-3021. ISSN 0021-8995. Dostupné z: doi:10.1002/app.1751
- [25] HA, Sung-Won, Alan TONELLI a Samuel HUDSON. Structural Studies of Bombyx m ori Silk Fibroin during Regeneration from Solutions and Wet Fiber Spinning. *Biomacromolecules*. 2005, **6**(3), 1722-1731. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm050010y
- [26] LOCK, Robert L. *PROCESS FOR MAKING SILK FIBRON FIBERS*. USA. D01F 4/02. Uděleno 12.10.1993.
- [27] BOSE, Susmita, Caitlin KOSKI a Ashley VU. Additive manufacturing of natural biopolymers and composites for bone tissue engineering. *Materials Horizons*. 2020, **7**(8), 2011-2027. ISSN 2051-6347. Dostupné z: doi:10.1039/D0MH00277A
- [28] MEYERS, Marc, Po-Yu CHEN, Albert LIN a Yasuaki SEKI. Biological materials: Structure and mechanical properties. *Progress in Materials Science*. 2008, **53**(1), 1-206. ISSN 00796425. Dostupné z: doi:10.1016/j.pmatsci.2007.05.002
- [29] FRASER, J., T. LAURENT a U. LAURENT. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*. 1997, **242**(1), 27-33. ISSN 09546820. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x
- [30] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární Medicína*. 2008, **53**(8), 397-411. ISSN 03758427. Dostupné z: doi:10.17221/1930-VETMED
- [31] RASAL, Rahul, Amol JANORKAR a Douglas HIRT. Poly(lactic acid) modifications. *Progress in Polymer Science*. 2010, **35**(3), 338-356. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.12.003
- [32] OKSMAN, K., M. SKRIFVARS a J.-F. SELIN. Natural fibres as reinforcement in polylactic acid (PLA) composites. *Composites Science and Technology*. 2003, **63**(9), 1317-1324. ISSN 02663538. Dostupné z: doi:10.1016/S0266-3538(03)00103-9
- [33] LUNT, James. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. *Polymer Degradation and Stability*. 1998, **59**(1-3), 145-152. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-3910(97)00148-1
- [34] NGO, Tuan, Alireza KASHANI, Gabriele IMBALZANO, Kate NGUYEN a David HUI. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. *Composites Part B: Engineering*. 2018, **143**, 172-196. ISSN 13598368. Dostupné z: doi:10.1016/j.compositesb.2018.02.012
- [35] WIODARCZYK-BIEGUN, Małgorzata a Aránzazu DEL CAMPO. 3D bioprinting of structural proteins. *Biomaterials*. 2017, **134**, 180-201. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2017.04.019
- [36] JOSE, Rod, Maria RODRIGUEZ, Thomas DIXON, Fiorenzo OMENETTO a David KAPLAN. Evolution of Bioinks and Additive Manufacturing Technologies for 3D Bioprinting. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2016, **2**(10), 1662-1678. ISSN 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbmaterials.6b00088
- [37] MU, Xuan, Vincent FITZPATRICK a David KAPLAN. From Silk Spinning to 3D Printing: Polymer Manufacturing using Directed Hierarchical Molecular Assembly. *Advanced Healthcare Materials*. 2020, **9**(15), 17. ISSN 2192-2640. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201901552

- [38] DEBARI, Megan, Mia KEYSER, Michelle BAI a Rosalyn ABBOTT. 3D printing with silk: considerations and applications. *Connective Tissue Research*. 2020, **61**(2), 163-173. ISSN 0300-8207. Dostupné z: doi:10.1080/03008207.2018.1553959
- [39] REDDY, Narendra. 3D printing silk. *Silk: Materials, Processes, and Applications*. Elsevier, 2020, s. 179-199. ISBN 9780128184950. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818495-0.00007-7
- [40] RODRIGUEZ, Maria, Thomas DIXON, Eliad COHEN, Wenwen HUANG, Fiorenzo OMENETTO a David KAPLAN. 3D freeform printing of silk fibroin. *Acta Biomaterialia*. 2018, **71**, 379-387. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2018.02.035
- [41] FRANÇA, Carla, Vicente NASCIMENTO, Jacobo HERNANDEZ-MONTELONGO, Daisy MACHADO, Marcelo LANCELOTTI a Marisa BEPPU. Synthesis and Properties of Silk Fibroin/Konjac Glucomannan Blend Beads. *Polymers*. 2018, **10**(8), 14. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10080923
- [42] SOMMER, Marianne, Manuel SCHAFFNER, Davide CARNELLI a André STUART. 3D Printing of Hierarchical Silk Fibroin Structures. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2016, **8**(50), 34677-34685. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.6b11440
- [43] SIEPMANN, J. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001, **48**(2-3), 139-157. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(01)00112-0
- [44] SUN, Muyang, Jin CHENG, Jiahao ZHANG et al. Stepwise Cross-Linking of Fibroin and Hyaluronic for 3D Printing Flexible Scaffolds with Tunable Mechanical Properties. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2021, **7**(3), 916-925. ISSN 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbmaterials.0c00368
- [45] WANG, Mao, Hyung-Joon JIN, David KAPLAN a Gregory RUTLEDGE. Mechanical Properties of Electrospun Silk Fibers. *Macromolecules*. 2004, **37**(18), 6856-6864. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma048988v
- [46] SOFIA, S., M. MCCARTHY, G. GRONOWICZ a D. KAPLAN. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001, **54**(1), 10. Dostupné z: doi:10.1002/1097-4636(200101)54:1<139::AID-JBM17>3.0.CO;2-7

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

LiBr	Bromid lithný
PEG	Polyethylenglykol
Na ₂ CO ₃	Uhličitan sodný
CAD	Computer-aided design
HPMC	Hydroxypropylmethylcelulóza

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Schéma hedvábné žlázy [6]</i>	13
<i>Obr. 2: Schéma zobrazující uspořádání makromolekul fibroinu do micel a jejich dloužení působením smykového namáhání [8]</i>	14
<i>Obr. 3: Hierarchická textura 3D tištěných fibroinových konstrukcí [42]</i>	26
<i>Obr. 4: 3D scaffoldy připravené ze směsi fibroinu a methakrylátu kyseliny hyaluronové [44]</i>	28