


Strukturované vrstvy na bázi hedvábného proteinu a jejich aplikace v regenerativní medicíně

Anna Bulgurovská

Bakalářská práce
2021

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Anna Bulgurovská
Osobní číslo: T19024
Studijní program: B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace: Biomateriály a kosmetika
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Strukturované vrstvy na bázi hedvábného proteinu a jejich aplikace v regenerativní medicíně

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma příprava strukturovaných vrstev na bázi hedvábného proteinu a jejich aplikace v regenerativní medicíně.
2. Připravte koncentrované roztoky fibroinu a otestujte možnosti jejich zpracování pomocí elektrostatického zvlákňování.
3. Připravené vlákna charakterizujte pomocí dostupných mikroskopických technik.
4. Výsledky přehledně diskutujte a uveďte hlavní závěry práce.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] HOLLAND, Chris, Keiji NUMATA, Jelena RNJAK-KOVACINA, F. SEIB. The Biomedical Use of Silk: Past, Present, Future. *Advanced Healthcare Materials*. 2019, 8(1), 26
- [2] ROCKWOOD, Danielle, Rucsanda PREDA, Tuna YÜCEL, Xiaoqin WANG, Michael LOVETT, David KAPLAN. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nature Protocols*. 2011, 6(10), 1612-1631
- [3] VEPARI, Charu, David KAPLAN. Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science*. 2007, 32(8-9), 991-1007
- [4] BOSE, Susmita, Caitlin KOSKI, Ashley VU. Additive manufacturing of natural biopolymers and composites for bone tissue engineering. *Materials Horizons*. 2020, 7(8), 2011-2027

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

Datum zadání bakalářské práce: **25. února 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

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, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce popisuje přípravu strukturovaných vrstev na bázi hedvábného proteinu *Bombyx mori* fibroinu pomocí elektrostatického zvlákňování. Byly použity roztoky o různých koncentracích proteinu ve třech typech rozpouštědel. Morfologie získaných vláken byla charakterizována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu a konfokálního mikroskopu. Experimenty ukázaly, že výslednou strukturu i tloušťku vláken lze ovlivnit změnou procesních parametrů při zvlákňování a složením roztoku, zejména volbou rozpouštědla. Bylo zjištěno, že při použití kyseliny mravenčí jako rozpouštědla byl povrch mnohem více homogenní a vlákna měla menší průměr než při použití hexafluoroisopropanolu. Použití dimethylsulfoxidu jako špatného rozpouštědla vedlo ke vzniku mechanicky pevnějších vláken.

Klíčová slova: fibroin, *Bombyx mori*, elektrospinning, vlákna, tkáňové inženýrství

ABSTRACT

This bachelor thesis describes the preparation of structured layers based on the silk protein *Bombyx mori* fibroin using electrospinning. Solutions with different protein concentrations in three types of solvents were used. The morphology of the obtained fibers was characterized using a scanning electron microscope and a confocal microscope. Experiments have shown that the resulting structure and thickness of the fibers can be influenced by changing the process parameters during spinning and the composition of the solution. It was found if formic acid was used as the solvent, the surface was much more homogeneous, and the diameter of the fibers were smaller than when hexafluoroisopropanol was used. The use of dimethyl sulfoxide as a poor solvent has led to the formation of mechanically stronger fibers.

Keywords: fibroin, *Bombyx mori*, electrospinning, fibers, tissue engineering

Touto cestou bych chtěla srdečně poděkovat především paní Ing. Karolíně Kocourkové za cenné rady, připomínky a pomoc při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla vyjádřit poděkování doc. Ing. Antonínu Minaříkovi, Ph.D. za poskytnutí literatury a dalších podkladů a materiálů k tomuto tématu se vztahujících, možnost konzultací a osobních setkání za účelem diskuse o řešeném problému. Mé poděkování patří také mé rodině a přátelům, kteří mi byli oporou 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 HEDVÁBNÉ PROTEINY	11
1.1 HEDVÁBÍ BOURCE MORUŠOVÉHO	11
1.1.1 Vznik v přírodě	11
1.1.2 Struktura	13
1.1.3 Mechanické vlastnosti	15
1.1.4 Izolace	15
2 APLIKACE HEDVÁBNÝCH PROTEINŮ	16
2.1 APLIKACE FIBROINU	16
2.1.1 Regenerativní medicína	17
2.2 SERICIN	18
2.2.1 Využití sericinu	19
3 ELECTROSPINNING	23
3.2 APARATURA	24
3.3 ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ HEDVÁBNÉHO PROTEINU	25
3.3.1 Rozpuštědla vhodná pro zvláknování fibroinu	25
3.3.2 Použití příměsí	27
3.3.3 Procesní parametry zvláknování hedvábí	27
3.3.4 Aplikace hedvábných nanovláken	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
4 POPIS EXPERIMENTU	30
4.1 MATERIÁLY	30
4.2 IZOLACE FIBROINU	30
4.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	31
4.4 PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE FIBROINOVÝCH SUBSTRÁTŮ	31
4.4.1 Skenovací elektronový mikroskop	32
4.4.2 Konfokální mikroskop	33
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	34
5.1 ZVLÁKŇOVÁNÍ Z KYSELINY MRAVENČÍ	34
5.1.1 Vliv koncentrace	34
5.1.2 Vliv vzdálenosti kolektoru a elektrody	36
5.1.3 Vliv času depozice při zvláknování	39
5.2 ZVLÁKŇOVÁNÍ Z ROZTOKU FIBROINU S HEXAFLUOROISOPROPA NOLEM	40
5.2.1 Vliv koncentrace proteinu v roztoku	41
5.3 ZVLÁKŇOVÁNÍ Z ROZTOKU S PŘÍDAVKEM ŠPATNÉHO ROZPOUŠTĚD LA	43

5.4	FLUORESCENČNÍ BARVENÍ HEDVÁBNÝCH VLÁKEN	46
ZÁVĚR		52
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		54
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		60
SEZNAM OBRÁZKŮ		61
SEZNAM TABULEK		62

ÚVOD

Hedvábí je funkční proteinový biomateriál produkovaný různými druhy hmyzu. Hedvábí bource morušového je rozsáhle studováno pro své aplikace v regenerativní medicíně. Jedná se o biokompatibilní materiál se skvělými mechanickými vlastnostmi, ale zároveň je biologicky odbouratelný. Díky jeho hierarchické struktuře a všestrannosti se mnoho výzkumníků zaměřilo na hedvábí jako vhodného kandidáta pro navrhování nových materiálů s modifikovatelnými vlastnostmi pro rozmanitou řadu specifických aplikací, jako jsou elektronická zařízení, systémy ultrafiltrace vody, biosenzory, systémy dodávání léků a aplikace v tkáňovém inženýrství. Vlákná přírodního hedvábí lze zpracovat na příze a netkané matrice, zatímco fibroinová vlákna lze regenerovat a zpracovat na filmy, houby, hydrogely, mikročástice a tkané/netkané matrice. V poslední době je velká pozornost věnována procesu elektrostatického zvlákňování, pomocí kterého lze vyrobit polymerní nanovlákná o průměru v rozsahu od několika mikrometrů až po desítky nanometrů v závislosti na složení polymerního roztoku a podmínkách zpracování. Tato práce se zabývá přípravou roztoků fibroinu s použitím dobrého a špatného rozpouštědla a následným porovnáním vlivu roztoků a parametrů na výslednou morfologii vláken a jejich průměr.

V teoretické části práce je popsána struktura přírodního hedvábného vlákna, jeho syntéza v přírodě a vlastnosti přírodního vlákna. V literární rešerši je dále popsáno využití obou složek hedvábného vlákna, fibroinu a sericinu, v regenerativní medicíně. Poslední část se věnuje shrnutí metody přípravy nanovláknenných struktur pomocí elektrostatického zvlákňování.

Praktická část práce se zabývá přípravou strukturovaných vrstev na bázi fibroinu za použití dobrých rozpouštědel kyseliny mravenčí a hexafluoroisopropanolu a špatného rozpouštědla dimethylsulfoxidu. Struktury tvořené fibroinovými vlákny byly připravovány pomocí elektrostatického zvlákňování. Následně byla pozorována morfologie vzniklých vláken pomocí skenovacího elektronového mikroskopu a posuzována úspěšnost zvlákňování a změna tloušťky vláken v závislosti na procesních parametrech zvlákňování a složení roztoků.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 HEDVÁBNÉ PROTEINY

Hedvábí je řadu let používáno k výrobě dlouhých textilních vláken, které můžeme dále používat pro výrobu oděvních a módních doplňků. Původním domovem hedvábí je starověká Čína, první zmínky datujeme do 3. tisíciletí př. n. l. Hedvábí bylo považováno za velmi cenný obchodní artikl, traduje se, že pokus o vývoz technologie výroby hedvábných vláken byl trestán smrtí [1].

Hedvábné proteiny jsou v dnešní době používány při výrobě biomateriálů. Jelikož je hedvábí přírodního původu, je biokompatibilní s lidským tělem, má skvělé mechanické vlastnosti, ale zároveň je biologicky odbouratelné, proto je vhodné jej používat i pro výrobu biomateriálů a také kosmetiky.

Hedvábná vlákna mohou být přírodního i syntetického původu. Přírodní vlákna získáváme především z kokonů bource morušového (*Bombyx mori*), ale také z hedvábných sítí pavouků, mezi které patří nefila kyjonohá (*Trichonephila clavipes*) [2].

1.1 Hedvábí bource morušového

Bourec morušový patří mezi noční motýly z čeledi *Bombycidae*. Jedná se o nejvýznamnějšího producenta hedvábí na světě. V průběhu let byl vyšlechtěn z divokého *Bombyx mandarina* a v dnešní době se už ve volné přírodě nevyskytuje.

Je to nenápadně zbarvený motýl s bílým ochmýřeným tělem a rozpětím křídel okolo 4 cm. Dospělý jedinec nepřijímá potravu a během procesu domestikace ztratil schopnost létat.

Hedvábí vytvářejí housenky v pátém instaru vývoje, kdy dochází k jejich zakuklení. Během tohoto procesu produkují v hedvábných žlázách vlákno, které primárně slouží k ochraně vyvíjející se kukly. V epiteliálních buňkách snovacích žláz se začne vytvářet směs proteinů, ze kterých se následně vytvoří hedvábné vlákno.

Bourec morušový produkuje hedvábné vlákno, které je složené z vláknitého fibroinu a adhezivního sericinu. Hedvábí se používá především v textilním průmyslu, ale v dnešní době začíná být stále častější využití jeho složek v medicíně a kosmetice. [2]

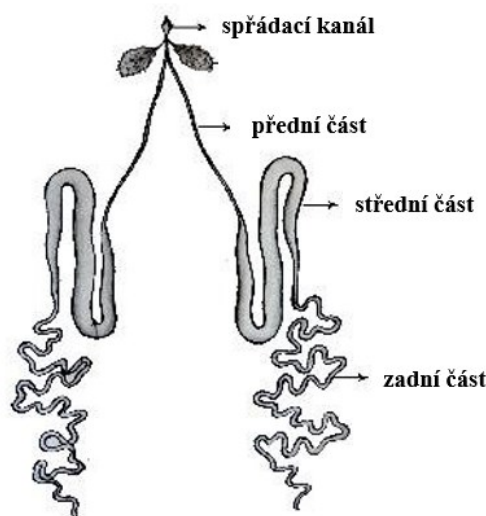
1.1.1 Vznik v přírodě

Životní cyklus bource morušového trvá 55 – 60 dní a mezitím projde čtyřmi vývojovými stádii – vajíčko, housenka, kukla (kokon) a dospělec. Vývin housenky z vajíčka ovlivňují klimatické podmínky, nicméně trvá 8–12 dní. Housenka je jediné stádium motýla, které má

vyvinuté trávicí ústrojí a živí se potravou, především listí z moruše. Během tohoto období se housenka zvětšuje a zvyšuje svoji hmotnost, maximální délka je 8 cm a váha 45 g. Když je housenka dostatečně velká a připravená k zakuklení, přestane přijímat potravu, převléká se a poté začne vytvářet kokon. Jeho tvorba trvá 1–4 dny. V průběhu toho se ze dvou otvorů na spodní části hlavy uvolňuje v polotekutém stavu vlákno. Dochází k působení různých tlaků, proto vlákno nemá po celé délce stejnou tloušťku a jeho délka bývá 1200–1500 m, ale jsou i případy, kdy vlákno dosáhlo délky 3000 m [3].

K syntéze hedvábí procesem zvlákňování jsou určeny hedvábné žlázy larev (Obr. 1) [4]. Jedná se o párový orgán, který se dělí na tři části a jeho činnost je řízena hormonálně [5]. V zadní části hedvábné žlázy dochází k syntéze fibroinu. V této fázi má gelovitý roztok fibroinu koncentraci 12 hm. % a pH je 6,9. Následně se roztok přesune do střední části o pH 5,2, kde dochází k syntéze sericinu a zakoncentrování původního roztoku fibroinu na 25 hm. %. Z této rozšířené části je proteinový roztok vtlačován do zužující se přední části žlázy o pH 5,0, kde se z vodného roztoku stává gel [6]. Při průchodu přední částí dochází ke snížení obsahu vody v roztoku na 70 hm. %. Na konci tohoto kanálu se tekuté krystaly přemění na tenké vlákno v konformaci β -skládaný list, která je nerozpustná ve vodě. Přední část slouží pouze jako trubice, kterou hedvábí postupuje, sama nemá syntetickou funkci. Je zakončena spřádacím kanálem, který funguje jako lis vystřikující hedvábí ven z těla housenky. V této fázi se tekuté hedvábí přeměňuje na pevné vlákno.

Celý tento proces je podporován smykovými silami, které způsobí pohyb hlavy larvy při procesu zakuklení. Nejprve si bourec vytvoří jemné hnízdo, které následně oplétá a tak okolo sebe vytvoří vodotěsný zámotek. Tvorba kokonu trvá tři dny a housenka během toho vykoná asi 300 000 krouživých pohybů hlavou [6, 7].



Obr. 1 Schéma hedvábné žlázy [4]

1.1.2 Struktura

Hedvábné vlákno je tvořené dvěma fibroinovými vlákny, které obaluje vrstva sericinu. Sericin je adhezivní glykoprotein, který tvoří až 30 % celkové hmotnosti zámotku a funguje jako ochranná vrstva vláken fibroinu. Fibroin i sericin jsou vysokomolekulární látky tvořené aminokyselinami (AMK).

1.1.2.1 Fibroin

Vláknitý fibroin je produkován zadní částí snovacích žláz. Zároveň s fibroinem se v této části žláz syntetizuje také několik bílkovin, jejichž funkce není jasná, ale pravděpodobně jsou nápomocné při přeměně fibroinu z tekuté formy na vlákno a ochraně před mikrobiálním rozpadem. U některých minoritních proteinů předpokládáme, že chrání kokony s housenkami před predátory. Mezi nápomocné bílkoviny zahrnujeme seroiny a dvě třídy proteinových inhibitorů [9].

Samotný fibroin se skládá ze dvou polypeptidových řetězců, těžkého (H) o molekulové hmotnosti 350 kDa a lehkého (L) o molekulové hmotnosti 25 kDa, které jsou spojeny disulfidovou vazbou. Pro tvorbu komplexu těžkého a lehkého řetězce je velmi důležitý N – glykoprotein P25, který s nimi interaguje nekovalentními vazbami. Primární struktura H-fibroinu tvoří vysoce repetitivní hydrofobní motivy, které jsou v sekvenci glycin – alanin – glycin – alanin – glycin – serin (GAGAGS) a dohromady tvoří téměř 90 % všech aminokyselin v hedvábném vláknu, které jsou zodpovědné za tvorbu antiparalelních β -

skládáných listů v polymerovaném řetězci. Toto uspořádání do krystalické struktury β -skládáných listů zajišťuje stabilitu a jedinečné mechanické vlastnosti hedvábného vlákna. Vlákna jsou vysoce odolná také z toho důvodu, že jsou spojena pouze slabými hydrofobními interakcemi postranních řetězců aminokyselin, kterými jsou tzv. R skupiny. Fibroin obsahuje také malé množství aminokyselin valinu a tyrosinu (GAGAGY, GAGAGVGY), které se v řetězci periodicky opakují a způsobují přerušení struktury β -skládáného listu, díky čemuž dodávají vláknu ohebnost nutnou k tvorbě kokonu [4, 7]. L – fibroin je tvořen 244 aminokyselinami s acetylovaným sericinem na N-konci [4, 9, 10].

1.1.2.2 *Sericin*

Ve střední části žlázy housenky *Bombyx mori* vzniká ve vodě rozpustná, vysokomolekulární látka (molekulová hmotnost od 20 do 400 kDa) sericin. Kokon je tvořen sericinem z asi 25 – 30 %. Sericin se skládá z 18 různých aminokyselin a obsahuje polární řetězce s hydroxylovou, karboxylovou a amino skupinou. Nejvyšší zastoupení AMK má serin, dále pak kyselina asparagová a glycin. Polární skupiny postranních řetězců aminokyselin, jejich organické složení, rozpustnost a strukturní organizace umožňují zesíťování, kopolymerizaci a kombinace s jinými polymery. Toto dává sericinu jedinečné vlastnosti, kterými jsou antioxidační schopnost, při aplikacích v kosmetice nebo medicíně zajišťuje hydrataci pokožce, rychlejší hojící funkci a antimikrobiální ochranu. Sericin má také velmi silnou afinitu ke keratinu [11, 12].

Sericin dělíme na základě rozpustnosti na tři formy, jedná se o sericin 1, sericin 2 a sericin 3. Vnější vrstvu tvoří sericin 1, který obsahuje 17,2 % dusíku a aminokyseliny serin, threonin, glycin a kyselinu asparagovou. Střední vrstva je tvořena sericinem 2. Tato frakce je tvořena z 16,8 % dusíkem, lysinem, kyselinou glutamovou, asparagovou a tryptofanen. Vnitřní vrstva, která přiléhá k fibroinu je ze sericinu 3, který obsahuje pouze 16,6 % dusíku, oproti předchozím typům sericinů obsahuje také prolin a je nerozpustný v horké vodě [13, 14].

S ohledem na molekulovou hmotnost klasifikujeme sericiny ze střední části hedvábné žlázy na sericiny A, M a P, které obsahují tři největší polypeptidy a které tvoří protein. Sericiny P a M jsou kódovány genem Ser1 a tvoří první a druhou sericinovou vrstvu, která zahrnuje fibroin. Expres genu Ser2 je detekována v přední části žlázy. Zatímco produkty genů Ser1 a Ser3 tvoří sericinové vrstvy v zámotku bource morušového, proteiny

kódované genem Ser2 jsou klasifikovány jako nekokonové a jsou příbuzné s larválním hedvábím [15, 16, 17].

1.1.3 Mechanické vlastnosti

Charakteristickými vlastnostmi hedvábného vlákna jsou vysoká míra biokompatibility s lidským tělem, pevnost, jemnost, špatná vodivost a dobrá zpracovatelnost. Také mechanické vlastnosti přírodního vlákna bource morušového jsou velmi dobré, protože sekundární struktura β -skládání list je tvořena krystalickými oblastmi s hydrofobními řetězci. Mechanické vlastnosti, např. pevnost vlákna, umožňují mnoho zpracovatelských možností. Bylo prokázáno, že pevnost a houževnatost hedvábí má tendenci se zvyšovat s klesajícím průměrem vláken, klesajícím hmotnostním obsahem sericinu a zvyšujícím se obsahem β -skládaných listů. Pevnost vláken bource morušového je v rozmezí 0,13 – 1,41 GPa. Časopis Nature uvádí, že pevnost komerčního hedvábí je okolo 0,5 GPa. Pevnost vláken nečesaného je okolo 1,3 GPa [19]. Průměr vláken je v rozmezí 15,01 – 24,16 μm [18, 19].

1.1.4 Izolace

Kokony se sbírají 8–10 den po zakuklení a poté se suší horkým vzduchem při 80 °C, aby došlo k usmrcení housenky. Vnější vrstva je nepravidelná, a tak se odstraňuje jako hedvábný odpad. Vnitřní vrstvu také nezpracováváme. Ideální strukturu má střední vrstva, protože je rovnoměrná [6, 20].

K získání čistého fibroinu, který se využívá v textilním průmyslu je nutné se nejprve zbavit sericinu. Jelikož je sericin dobře rozpustný v horké vodě, zbavíme se ho právě cestou povaření v horké vodě a přidávkem Na_2CO_3 , který přidáváme pro odstranění ve vodě nerozpustného sericinu [23].

Hedvábí se často míchá s vlnou nebo lnem a vzniklá příze se používá na módní tkaniny v textilním průmyslu. Fibroin i sericin se používají buď samotné, nebo ve směsi s dalšími látkami také v biomedicíně a kosmetickém průmyslu.

2 APLIKACE HEDVÁBNÝCH PROTEINŮ

Hlavní využití hedvábí stále zastává textilní průmysl. Už ve Starověké Číně začali zpracovávat kokony bource morušového do podoby vláken, ze kterých následně spřádali nitě a vyráběly textilie.

V poslední době je velmi oblíbené využití přírodních prekurzorů, strukturních a funkčních polymerů jako biomateriály. Hedvábí produkované právě *Bombyx mori* a pavouky je zvláště zajímavé. Díky přírodnímu původu hedvábí, jeho biokompatibilitě, neimunogenocitě, netoxicitě a pomalé/kontrolovatelné biologické rozložitelnosti je hedvábí vhodný k použití v regenerativní medicíně.

Roztoky hedvábí se dají využívat ve formě filmů, hydrogelů, vláken, porézních struktur a sericin také ve formě prášku [23, 24].

2.1 Aplikace fibroinu

Hedvábí je známé po tisíce let jako luxusní surovina v textilním průmyslu. Díky svým vlastnostem je uznáván jako královna textilií, protože má jedinečný lesklý vzhled, vynikající mechanickou pevnost, pružnost a prodyšnost. Každý rok se na celém světě vyrobí více než 120 000 metrických tun hedvábí a hlavní výrobci se nacházejí v Číně, Indii a Japonsku. Kromě výše uvedených charakteristik biokompatibilita také umožnila použití hedvábí jako chirurgického šití od roku 150 našeho letopočtu.

Skutečný potenciál tohoto sofistikovaného materiálu začínáme využívat v pokročilejších aplikačních oborech, jako je optika, elektronika a biomedicína. Hedvábí lze použít jako optický materiál pro aplikace v biomedicínském inženýrství, fotonice a nanofotonice. Z fibroinu lze vytvářet nanovlákná, což umožňuje výrobu struktur, jako jsou holografické mřížky, fázové masky, paprskové difuzory a fotonické krystaly z čistého proteinového filmu [25, 26]. Pokročilé technologie a moderní nástroje používané v chemii, materiálovém inženýrství, chemickém inženýrství, genetickém inženýrství a koncepčním modelování významně přispěly k analýze struktury a mimořádných vlastností hedvábí. Díky své hierarchické struktuře a všestrannosti se mnoho výzkumníků zaměřilo na hedvábí jako biologického kandidáta pro navrhování nových materiálů s modifikovatelnými vlastnostmi pro rozmanitou řadu specifických aplikací, jako jsou elektronická zařízení, systémy ultrafiltrace vody, biosenzory, systémy dodávání léků a aplikace v tkáňovém inženýrství. Vlákná přírodního hedvábí lze zpracovat na příze a netkané matrice, zatímco fibroinová

vlákna lze regenerovat a zpracovat na filmy, houby, hydrogely, mikrokuličky a tkané/netkané matrice. [26, 27, 28].

2.1.1 Regenerativní medicína

Regenerativní medicína je obor věnovaný aplikaci tkáňových nebo orgánových implantátů za účelem hojení nebo náhrady poškozených tkání nebo orgánů. Největším podoborem regenerativní medicíny je tkáňové inženýrství, což je výběr a prostorové uspořádání biomateriálů a buněk pro návrh umělé tkáně. Hedvábný fibroin je skvělým kandidátem pro použití v regenerativní medicíně, protože má jedinečné vlastnosti. Disponuje pomalou biologickou degradací a je hypoalergenní. Použití fibroinu je stále ve fázi vývoje, ale v budoucnu by se mohl využívat na výrobu scaffoldů pro náhradu různých orgánů a částí těla, např. kostní tkáně, chrupavek, a také za účelem vytvoření umělé kožní tkáně [29, 30, 31].

Potahy implantátů

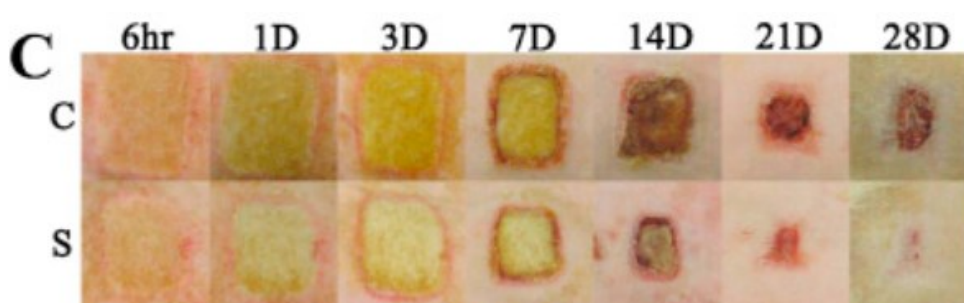
Zavedení implantátu do lidského těla může způsobit závažné zdravotní infekce. Z toho důvodu se vyvíjí povlakování implantátů regenerovaným hedvábným proteinem pomocí namáčení nebo sprejování. K tomu používáme vodné roztoky čistého fibroinu. Při použití jiných rozpouštědel by mohlo dojít k poškození materiálu implantátu [34].

Hojení ran

Kůže lidského těla slouží jako bariéra proti původcům infekce, dehydrataci a okolnímu prostředí. Při narušení pokožky dochází ke vzniku otevřené rány. Počáteční fází hojení je zánět, ke kterému dochází krátce po zranění. Další fází je vývoj nové tkáně, kdy dochází k ukládání kolagenu, kontrakci rány a ke znovuvytvoření poškozeného povrchového epitelu. V poslední fázi nastává přestavba epidermis a extracelulární matrix, což může trvat i rok. Je známo, že zvýšením buněčné proliferace a migrace různých typů buněk fibroin vyvolává a urychluje hojení ran. Pro tuto aplikaci můžeme fibroin využívat ve formě roztoků, filmů, nanovlákných podložek, hydrogelů a hydrokoloidních obvazů [28]. Velmi zajímavým použitím fibroinu v regenerativní medicíně je tvorba biokompatibilního obvazového materiálu, který zabrání dehydrataci rány, zachovává vlhké prostředí na jejím povrchu, ale zároveň slouží jako ochranná bariéra proti mikroorganismům a prachu. Na obr. 2 můžeme vidět výsledek studie, kdy se srovnávalo použití komerčně dostupné lékařské gázy a obvazu z fibroinu pro hojení popálenin, přičemž obvazový materiál na bázi

hedvábí výrazně urychloval hojení rány [34]. Další biomateriály, které se používají pro hojící obvazy jsou chitosan, polyuretan, kyselina hyaluronová a kolagen [33, 34].

Extracelulární matrix stimuluje hojení ran, proto při vývoji inovativních obvazových materiálů bývá konstrukčně i složením simulována právě extracelulární matrix. Lze toho docílit například kombinací paramylonu a hedvábného proteinu. Paaramylon je sacharid, který má široké spektrum biologických aktivit a má schopnost posílit imunitní odpověď. Fólie ze směsi fibroin/paramylon lze snadno vyrobit rozpuštěním lyofilizovaného SF a paramylonu v kyselině mravenčí, následovaným sušením při 40°C. Tato kompozitní fólie vykazuje vysokou tepelnou stabilitu, dobrou hydrofobnost a vysoké hodnoty tuhosti, přičemž je také netoxická a biokompatibilní. Proto lze tuto kompozitní membránu dále zvažovat pro aplikaci samoobslužných obvazových materiálů na rány na zvířecích modelech [37].



Obr. 2 Oblast rány ošetřená různými obvazovými materiály
(C: lékařská gáza, S: nanomatrix z hedvábného fibroinu) [33]

2.2 Sericin

Hedvábný sericin je přírodní polymer produkovaný bourcem morušovým, který obklopuje a drží pohromadě dvě fibroinová vlákna a dotváří hedvábné vlákno. V textilním průmyslu nemá sericin využití, protože je rozpustný ve vodě a sám vlákna netvoří, slouží pouze jako tzv. „lepidlo“.

Získávání a opětovné použití sericinu obvykle vyřazeného v textilním průmyslu nejen minimalizuje problémy životního prostředí, ale má také vysokou vědeckou a komerční hodnotu. Během zpracování surových hedvábných kokonů se každý rok vytvoří 50 000 tun sericinu, který představuje většinou odpad při zpracování hedvábí, nicméně díky svým

vlastnostem by mohl být dále využíván na výrobu biodegradabilních materiálů, membrán, lékařských biomateriálů a funkčních tkanin [11, 25, 26].

2.2.1 Využití sericinu

Fyzikálně-chemické vlastnosti molekuly umožňují četné aplikace v biomedicině a jsou ovlivněny extrakční metodou a druhem bource morušového, což může vést ke změnám v molekulové hmotnosti a poměru mezi aminokyselinami v sericinu. Přítomnost vysoce hydrofobních aminokyselin a jejich antioxidační potenciál umožňují použití sericinu v potravinářském a kosmetickém průmyslu [21].

Díky zvlhčujícím vlastnostem je dále možné užití při hojení ran, ke stimulaci buněčné proliferace, jako ochrana před ultrafialovým zářením a také v kosmetice. Antioxidační aktivita spojená s nízkou stravitelností sericinu umožňuje použití v lékařské oblasti, jako protinádorová, antimikrobiální a protizánětlivá látka, antikoagulant, přispívá ke správné funkci tlustého střeva a chrání tělo před obezitou prostřednictvím zlepšeného profilu plazmatických lipidů. Kromě toho vlastnosti sericinu umožňují jeho použití jako kultivačního média a při kryokonzervaci, v tkáňovém inženýrství a pro dodávání léčiv, což dokazuje jeho efektivní použití jako biomateriálu [20, 23, 24, 25].

2.2.1.1 Biodegradabilní materiály

Ekologicky rozložitelné polymery můžeme vyrobit smícháním sericinu s pryskyřicí. Polyuretanové pěny, ke kterým je přidán sericin mají skvělé absorpční vlastnosti. Po přidání sericinu je absorpce vlhkosti až pětinašobně vyšší než u samotné polyuretanové pěny. Sericin se přidává v koncentraci 0,01 – 50 % a polyuretanu dodává skvělé mechanické vlastnosti a je biologicky odbouratelný [7].

2.2.1.2 Membránové materiály

Membránové materiály jsou široce využívány např. při odsolování vody, výrobě ultračisté vody, v biozpracovatelském průmyslu a při některých chemických procesech. Při membránových separacích využíváme reverzní osmózu, dialýzu, ultrafiltraci a mikrofiltraci. Sericin by mohl být používán při separačních procesech. Samotný sericin není díky svým vlastnostem na výrobu membrán vhodný, nicméně po jeho zesíťování nebo kopolymeraci s jinými látkami to je možné. Jelikož obsahuje velké množství aminokyselin s polárními funkčními skupinami, jsou sericinové membrány značně hydrofilní a jsou selektivní pro vodu ve vodně-organické kapalně směsi. Tohoto se dá využít třeba při

výrobě separačních membrán pro vodu s ethanolem, kdy by právě tato membrána mohla účinně oddělit alkohol ze směsi [30, 31, 32].

2.2.1.3 Funkční biomateriály

Jak bylo zmíněno výše, ze sericinu je obtížné vyrobit membrány, nicméně jej lze formovat do tenkého filmu, který je připojen k jiné matici. Sericinové filmy lze využít v zobrazovací technice a u vizuálních teplotních senzorů, kdy v kombinaci s tekutými krystaly dochází k jejich orientaci a ke zvýšení kvality obrazu [33, 34].

Sericin se dá také použít na potažení různých materiálů ke zvýšení jejich povrchové ochrany a jejich funkčnosti. Materiály potažené sericinem mají výbornou odolnost proti povětrnostním vlivům a dobrou prodyšnost [7].

2.2.1.4 Lékařské biomateriály

Zajímavé je využití sericinu v regenerativní medicíně. Byl vyvinut obvaz pro hojení ran ze směsi fibroinu se sericinem, který měl stupeň krystalinity menší než 10 % a absorpci vody při teplotě místnosti 100 a více procent [46].

Membrána složená ze sericinu a fibroinu je účinným substrátem pro proliferaci adherentních živočišných buněk a může být použita jako náhrada kolagenu. Filmy z čistého sericinu umožňují uchycení a růst buněk srovnatelný s kolagenem, který je pro savčí buněčné kultury široce používaným materiálem [47].

Film vyrobený ze sericinu má výbornou propustnost pro kyslík a svými vlastnostmi je velmi podobný lidské rohovce. Pro výrobu tohoto filmu se hedvábný protein rozpustí v kyselině trifluoroctové (1 g kokonu ve 3 ml 98 % CF_3COOH) a vzniklá gelovitá látka se nalije do forem a následně formuje do filmu. Ztuhlý výlisek se potom opakovaně promyje vodou. Tato metoda by se dala využít i při výrobě kontaktních čoček a vysoce elastických umělých cév [48].

Sulfonací sericinu lze vytvořit materiál s antikoagulačními vlastnostmi. Sulfonace se provádí kyselinou sírovou o koncentraci 10 – 90 % při teplotě 20 – 100 °C po dobu několika hodin. Výsledný koagulant by mohl sloužit jako potenciální náhrada heparinu, k ošetření povrchů zdravotnických pomůcek. Také bylo zjištěno, že sulfonovaný protein interferuje s připojením viru lidské imunodeficience k imunocytům [39, 40, 41].

Bylo zjištěno, že sericin potlačuje peroxidaci lipidů a inhibuje aktivitu tyrosinázy *in vitro* [52].

2.2.1.5 Funkční vlákna a textilie

Funkční vlastnosti některých syntetických vláken lze zlepšit potažením přírodními makromolekulami, jako je chitin, chitosan, fibroin a sericin. Syntetická polyesterová vlákna mají mikropóry o průměru 0,001–10 μm. Molekula sericinu může být zavedena do těchto mikropórů a zesítna. Polyestrové vlákno modifikované sericinem je až pětkrát hygroskopičtější než neošetřený polyester a i po 50 praních zůstává až 85 % hygroskopičnost oproti původní. Další syntetická vlákna, která se mohou potahovat sericinem jsou vlákna polyaminová a polyolefinová [43, 44].

Vlákna potažená sericinem mohou zabránit abrazivnímu poranění kůže a rozvoji vyrážek. Tkaniny tkané z vláken potažených sericinem byly testovány ve výrobcích, jako jsou plenky, plenkové vložky a obvazy na rány [55].

Sericin také zajišťuje lepší biokompatibilitu kaučuku. Po smíchání hydrolyzovaného sericinu s kaučukem tvoří produkt, který má oproti přírodnímu kaučuku nižší iritační vlastnosti. Z této modifikované pryže lze vyrobit gumové rukavice, rukojeti jízdních kol a jiné podobné výrobky [56].

2.2.1.6 Kosmetika

Sericin má také široké zastoupení v kosmetickém průmyslu. Aminokyselinové složky sericinu zajišťují vynikající absorpci a udržení vlhkosti na pokožce. Velikost molekulové hmotnosti sericinu přímo ovlivní typy kosmetických aplikací. Výsledky ukazují, že sericin může účinně inhibovat aktivitu tyrosinu a tvorbu melanochromu.

Díky podobným vlastnostem a příbuznosti s keratinem má sericin adhezivní účinek na povrch lidské kůže, kde tvoří ochrannou bariéru, kůži zvláčňuje, zlepšuje její elasticitu, chrání před vnějšími vlivy, zadržuje v pokožce vlhkost a působí proti stárnutí kůže. Sericin můžeme použít také ve formě hydrolyzátu, který má regenerační schopnosti, a proto se do řady přípravků na kůži, vlasy i nehty přidává jako aktivní látka. Sericin je využíván ve formě krémů a mastí [14, 47].

Sericin obsahuje i jedinečný podíl sacharidů a unikátně se opakující sekvence aminokyselin, které dodávají sericinům jejich vysokou afinitu vůči bílkovinám. Tohoto se v kosmetickém průmyslu využívá k vyhlazování vrásek. Tvorba jednotného filmu po

aplikaci prostředků obsahujících sericiny je dána jejich vysokou molekulovou hmotností. Tato polopropustná vrstva zůstává zachována i po umytí a chrání pokožku před škodlivými vlivy prostředí. Sericin brání TEWL (transepidermální ztráta vody).

Díky vlastnostem je sericin vhodný pro suchou, citlivou a namáhanou pokožku a také je ideální do přípravků sloužících k opalování. Jelikož obsahuje serin a glycin, je vhodný i do hydratačních přípravků jako humektant. Dále můžeme sericin využít také v nehtové kosmetice proti praskání a lámání nehtů. V lacích na nehty se používá v koncentraci 0,02 – 2 % sericinu. V koncentraci 0,02 – 2 % se sericin přidává do vlasových a koupelových prostředků [58].

Sericinové gely také zvyšují obsah hydroxyprolinu ve *Stratum corneum*, který je používán při prevenci a redukci strií. Hydroxyprolin předchází vzniku vrásek, mírně rozjasňuje pleť a stimulací procesu lipolýzy podporuje eliminaci toxinů [59].

Sericiny jsou díky své všestrannosti skvělou přírodní složkou do mnoha kosmetických prostředků.

3 ELECTROSPINNING

Electrospinning, nebo také elektrostatické zvlákňování je proces, při kterém vznikají vlákna o průměru až desítek nanometrů. Do oblasti nanotechnologií se elektrostatické zvlákňování dostává mezi lety 1990 a 2000. Existuje několik způsobů výroby nanovláken, nicméně nejvíce vyniká právě tato metoda, jelikož pomocí ní můžeme vyrábět nejjemnější vlákna, a také patří mezi relativně ekonomickou výrobní techniku. Je také velmi univerzální, protože jsme pomocí ní schopni zpracovávat velkou škálu materiálů, např. organické a anorganické polymery a biopolymery, a to v různých formách, jako jsou emulze, roztoky nebo také taveniny. Electrospinning závisí na velmi složité souhře povrchů, reologii materiálu i na elektrickém náboji. Tyto jevy se vzájemně ovlivňují různými způsoby a vytvářejí elektrifikované proudy polymerních roztoků a roztavených polymerů. Technologie polymerních nanovláken se stále velmi rychle vyvíjí, protože jsou velmi užitečné v mnoha oblastech [51, 52, 53, 54].

3.1 Princip electrospinningu

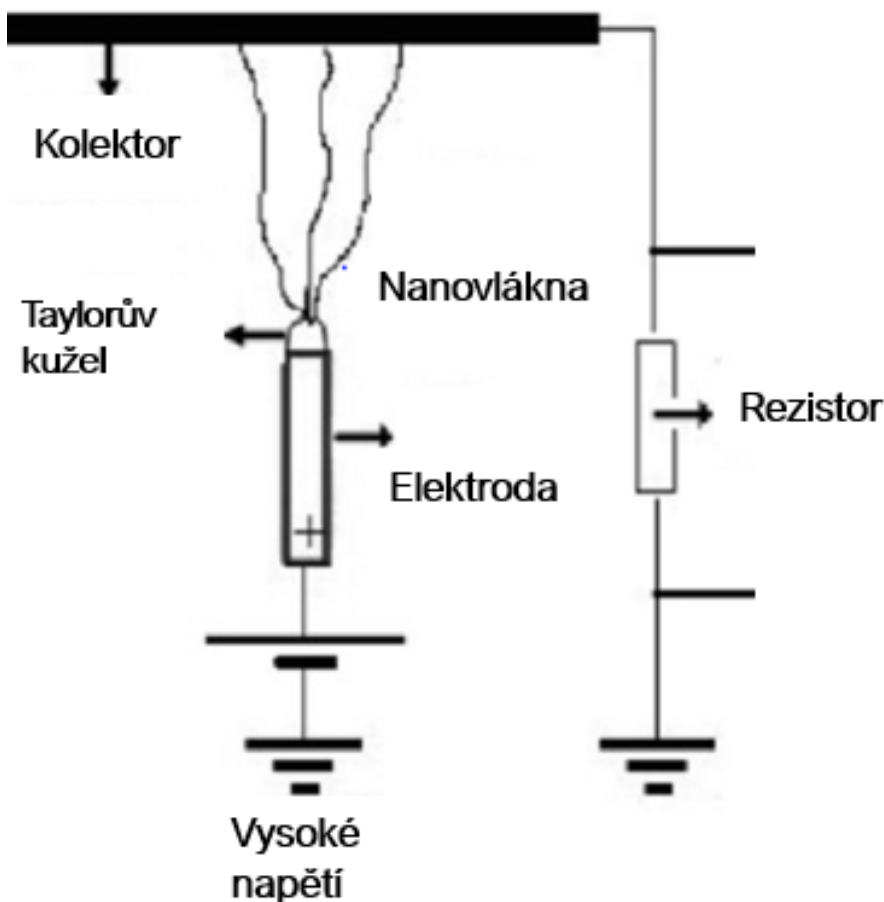
Elektrostatické zvlákňování je účinnou technikou pro výrobu polymerních vláken v průměru mikrometrů až nanometrů. Touto technikou jsme schopni vytvářet ultra jemná vlákna z různých druhů polymerů. Proces electrospinningu může probíhat různými způsoby, mezi které řadíme zvlákňování z jehly a zvlákňování z volného povrchu – tyčka, struna a rotační váleček. Zařízení ve všech těchto případech fungují na podobném principu. Před výběrem vhodné metody pro zvlákňování je důležité zvážit výhody a nevýhody obou. Při bezjehlovém elektrostatickém zvlákňování se výchozí roztok polymeru přenesou do otevřené nádoby, kde jsou vlákna generována ze stacionární nebo rotační platformy. Jednou z výhod bezjehlového procesu elektrostatického zvlákňování je hromadná výroba materiálu. Nevýhodou je, že morfologie a kvalita vláken nejsou přesně kontrolovány, suroviny, které lze použít, jsou omezené, což zase omezuje všestrannou výrobu vláken a parametry procesu, jako je průtok, nelze kontrolovat. Při elektrostatickém zvlákňování na bázi jehly je výchozí roztok polymeru obvykle obsažen ve vzduchotěsně uzavřeném zásobníku, což minimalizuje a zabraňuje odpařování rozpouštědla. Tento důležitý rozdíl umožňuje snadné zpracování široké škály materiálů, včetně vysoce těkavých rozpouštědel. Elektrostatické zvlákňování na bázi jehly má mnoho výhod, včetně flexibility pro zpracování různých struktur, jako jsou jádro-plášť a multiaxiální vlákna. Toto rozlišení umožňuje začlenění aktivních farmaceutických složek (API) do vlákna. Dalšími výhodami

jehlového elektrostatického zvlákňování je přesně řízený průtok, počet trysek a minimalizace plýtvání roztokem. Tyto výhody elektrostatického zvlákňování na bázi jehly zvýšily popularitu této techniky, což má za následek vysoký počet publikovaných prací o elektrostatických vláknech, které nabízejí širokou variabilitu receptur řešení.

Během tohoto procesu využíváme vysoké napětí (v řádu desítek kV), které slouží k vytvoření elektricky nabitého proudu polymerního roztoku nebo taveniny [65, 66].

3.2 Aparatura

Aparatura pro elektrické zvlákňování se skládá ze tří základních částí, kterými jsou adsorbér, zdroj vysokého napětí a extrudér. Jako adsorbér slouží nějaký kolektor, většinou se jedná o elektricky vodivý prvek (kovová destička), na kterou je uchycen černý papír nebo vodivá lepicí páska. Na destičku je přiveden záporný pól elektrického napětí. Kladnou elektrodu tvoří kovová tyčka, na kterou je nanesen roztok spinnované látky. Pomocí elektrického proudu dochází k tvorbě sil v nabitém roztoku a změně tvaru kapky v kužel, tzv. Taylorův kužel. Při dalším zvýšení elektrického pole dochází k překonání povrchového napětí roztoku a z kuželu je vypuzen nabitý proud kapaliny. Ten vytváří na kolektoru změť naspinnovaných nanovláken [66].



Obr. 3 Electrospinning

3.3 Elektrostatické zvlákňování hedvábného proteinu

Biomateriál z hedvábného fibroinu se stal oblíbeným materiálem pro tkáňové inženýrství kvůli jeho nízké zánětlivé reakci *in vivo* a jeho schopnosti podporovat buněčnou adhezi, růst a proliferaci. Pro zlepšení mechanických a biologických vlastností biomateriálů pro použití v tkáňovém inženýrství se biomateriály SF obecně mísí s chitosanem, agarózou, gellanovou gumou, růstovými faktory nebo buňkami [73, 74, 75, 76, 77].

3.3.1 Rozpouštědla vhodná pro zvlákňování fibroinu

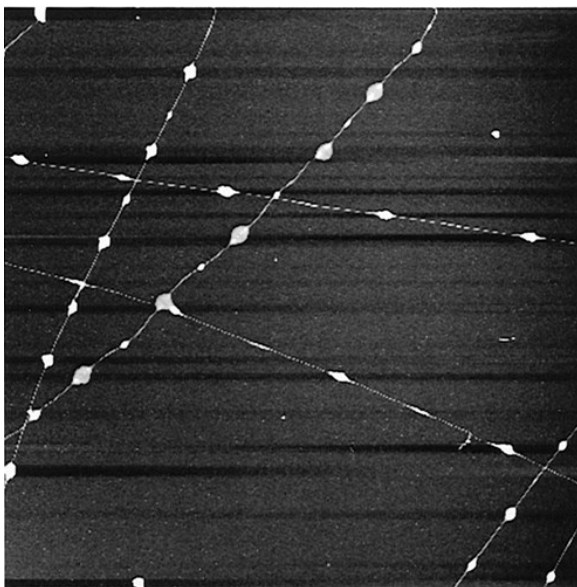
Vlákna přírodního hedvábí se ve srovnání s globulárními proteiny rozpouštějí pouze v omezeném množství rozpouštědel, a to kvůli přítomnosti velkého množství intramolekulárních a intermolekulárních vodíkových vazeb ve fibroinu, jeho vysoké krystalinitě a specifickým fyzikálně-chemickým vlastnostem. Fibroin lze rozpustit v koncentrovaných vodných roztocích kyselin (fosforečná, mravenčí, sírová a chlorovodíková) a vodných roztocích solí s vysokou iontovou silou, jako je chlorid

vápenatý (CaCl_2), chlorid zinečnatý (ZnCl_2), bromid lithný (LiBr) a chlorid hořečnatý (MgCl_2) [66, 67].

K získání regenerovaných materiálů scaffoldů je obvykle vyžadováno předběžné rozpuštění nativních vláken SF. Rozsah dostupných rozpouštědel zahrnuje minerální a organické kyseliny, organická rozpouštědla, iontové kapaliny, koncentrované roztoky minerálních solí a také různé směsi voda/rozpouštědlo/sůl.

Čistá kyselina mravenčí sice nerozpouští nativní SF vlákna, ale je účinným rozpouštědlem pro regenerované fibroinové materiály, jako jsou filmy. Způsob rozpuštění SF filmů pro přípravu elektrostatických zvlákňovacích látek byl široce využíván k výrobě elektrostaticky zvlákňovaných fibroinových podložek. Kyselina mravenčí se také používá pro vznik nanovláken. FA je vysoce těkavé rozpouštědlo, jehož většina se během elektrostatického zvlákňování odpařuje [74].

Typ použitého rozpouštědla i výsledná koncentrace roztoku mají vliv na výsledné vlastnosti vláken a také na jejich strukturu. V případě nízké koncentrace roztoku fibroinu dochází ke vzniku tzv. korálek na vláknech (Obr. 4). Zvyšováním koncentrace můžeme tuto vadu odstranit za vzniku hladkých vláken, nicméně při zvýšené koncentraci také roste průměr vzniklého vlákna [70, 71]



Obr. 4 AFM obrázek elektrospinnovaných vláken z materiálu PEO [72]

3.3.2 Použití příměsí

Použití příměsí při zvlákňování fibroinu pomáhá zlepšovat jeho vlastnosti. Pro výrobu fibroinových scaffoldů se jako příměsí používají poloxamer 407, který pomáhá zvyšovat adhezi lidských dermálních fibroblastů, a manuka med, který zvyšuje absorpci vody a hustotu buněk na scaffoldech [77].

Pro přípravu kostních tkání se jako aditivum přidává hydroxyapatit, který zlepšuje biologické a mechanické vlastnosti fibroinu. Tyto kompozity jsou velmi podobné přirozené kostní struktuře, protože napodobují anorganickou i organickou část kostní tkáně. Použití tohoto hybridního kompozitu zlepšuje flexibilitu, mechanickou pevnost a také houževnatost vzniklé kostní tkáně [74, 75].

3.3.3 Procesní parametry zvlákňování hedvábí

Vlastnosti vyrobených vláken i celý proces zvlákňování ovlivňuje řada parametrů. Jedním z parametrů, které mají na elektrostatické zvlákňování vliv je vzdálenost mezi elektrodou s naneseným roztokem a kolektorem. Je důležité mít nastavenou takovou vzdálenost, aby došlo k dostatečnému odpaření rozpouštědla. Při kratší vzdálenosti nám nevzniknou samostatná vlákna, ale objevují se na nich korálky, nebo se vlákna slévají dohromady. Mezi vliv prostředí řadíme teplotu a vlhkost. S rostoucí teplotou se průměr vláken snižuje, což je způsobeno závislostí viskozity na teplotě. Se zvyšující se vlhkostí dochází k tvorbě malých pórů ve vláknech [79]. Důležitá je také plocha, na které je umístěn roztok. Je důležité, aby byla vodivá a dostatečně velká, aby na vzniklých vláknech nevznikaly vady ve formě korálků. Dalším procesním parametrem je velikost použitého napětí.

Mezi systémové parametry se řadí vlastnosti spinnovaného polymeru, typ použitého rozpouštědla a také viskozita, koncentrace a povrchové napětí použitého roztoku [77, 78, 79].

3.3.4 Aplikace hedvábných nanovláken

Hedvábný fibroin (SF) je přírodní biopolymer, který je biokompatibilní, biodegradabilní, flexibilní, má dobré antitrombogenní a mechanické vlastnosti. SF porézní materiály byly široce zkoumány v systémech řízeného dodávání léků, antikoagulačních krevních materiálech, biosenzorech, umělých vazech, umělých šlachách, umělé kůži, opravách rohovky a obvazech ran.

Srdeční náplasti z fibroinu jsou v současné době široce používány k zahájení regenerace myokardu. Electrospinning je výkonná technika, která dokáže vytvořit matici vzájemně propojených nanovláken, které napodobují architekturu extracelulární matrice. V současnosti se většina biomateriálů SF používaných v srdečních náplastech připravuje právě elektrostatickým zvlákňováním. Polyvinylalkohol (PVA) je běžně používaný polymer při elektrostatickém zvlákňování SF díky své elasticitě, hydrofilitě a biokompatibilitě. Začlenění SF a PVA náplastí prokázalo vynikající pevnost v tahu, modul v tahu a dobré přichycení a proliferaci buněk [71].

Oprava a rekonstrukce poškozené kůže je důležitým tématem v oblasti kosmetické a plastické chirurgie. Použití obvazu na otevřenou ránu je důležitým faktorem v prevenci bakteriální infekce a udržování vlhkého prostředí kolem místa rány pro dosažení hojení rány. Biomateriály na bázi kolagenu jsou užitečné díky své vynikající schopnosti podporovat hojení ran, jsou však příliš křehké na to, aby byly aplikovány přímo na místo poranění kůže, aby je chránily, dokud není kůže rekonstruována. Ve srovnání s kolagenem bylo prokázáno, že biomateriály na bázi fibroinu více přispívají k hojení ran a rekonstrukci kůže a mohou snížit tvorbu jizevnaté tkáně během hojení ran [83].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 POPIS EXPERIMENTU

Cílem experimentální části práce byla příprava roztoků hedvábného fibroinu a jejich následné zpracování pomocí elektrostatického zvlákňování. Za tímto účelem byly připravovány roztoky hedvábného proteinu v kyselině mravenčí a hexafluoroisopropanolu. Byl sledován vliv složení roztoku a procesních parametrů zvlákňování na strukturu vláknitých substrátů. Připravená vlákna byla charakterizována pomocí skenovací elektronové mikroskopie a konfokální mikroskopie.

4.1 Materiály

Kokony bource morušového byly dodány Univerzitou Bayreuth. Pro izolaci fibroinu ze surového materiálu byl použit uhličitan sodný Na_2CO_3 , bromid lithný LiBr (Sigma Aldrich) a ultračistá voda. Pro přípravu roztoků z regenerovaného fibroinu byla používána kyselina mravenčí FA (Sigma Aldrich), hexafluoroisopropanol HFIP p.a. 99% (abcr GmbH) a dimethylsulfoxid DMSO p.a. 99,99% (VWR Chemicals). Pro fluorescenční značení vláken byl použit fluorescein isothiokyanát dextran FITCD (Mw 59 000 – 77 000, Sigma Aldrich).

4.2 Izolace fibroinu

Pro použití fibroinu (BMF) v medicínských aplikacích je velmi důležité hedvábný protein efektivně purifikovat z kokonů *Bombyx mori* tak, aby došlo k odstranění sericinu. Tento proces se nazývá „degumming“. Odstranění sericinu je velmi důležitým krokem pro další využití fibroinu. Dříve se u některých osob předpokládalo, že hedvábí a použití hedvábného fibroinu způsobuje alergickou reakci. Následný výzkum ale ukázal, že příčinou imunitních reakcí byl sericin. Pro zajištění biokompatibility, lepší zpracovatelnost a dosažení vyšší čistoty musí být sericin z hedvábí odstraněn [23].

Fibroin lze z hedvábí izolovat různými způsoby [84], v této práci byl s mírnými úpravami aplikován nejčastěji užívaný postup dle protokolu D. L. Kaplana, D. N. Rockwood et al. [23].

Nastříhané kokony byly vařeny po dobu 1 h v 0,02 M roztoku Na_2CO_3 za účelem odstranění sericinu z vláken. Následně byla vlákna opakovaně proplachována ultračistou vodou a vysušena. Po usušení byl degumovaný fibroin rozpuštěn v 9,3 M roztoku LiBr (1 g fibroinu na 4 ml LiBr) při teplotě 60 °C (po dobu 4 h). Poté došlo k odstranění

nežádoucích iontů pomocí dialýzy. Posledním krokem byla centrifugace a následná lyofilizace fibroinu.

4.3 Příprava roztoků

Pro přípravu roztoků byl použit lyofilizovaný fibroin. Jako dobrá rozpouštědla byla použita kyselina mravenčí a HFIP. Jako špatné rozpouštědlo dimethylsulfoxid, který se přidával do roztoku fibroinu v HFIP. Pro fluorescenční barvení vláken byl připraven roztok FITCD v DMSO, který byl přidáván k roztoku fibroinu v HFIP. Fibroin byl rozpouštěn na třepačce při pokojové teplotě po dobu 6-12 h. Přesná složení roztoku budou popsána v jednotlivých kapitolách.

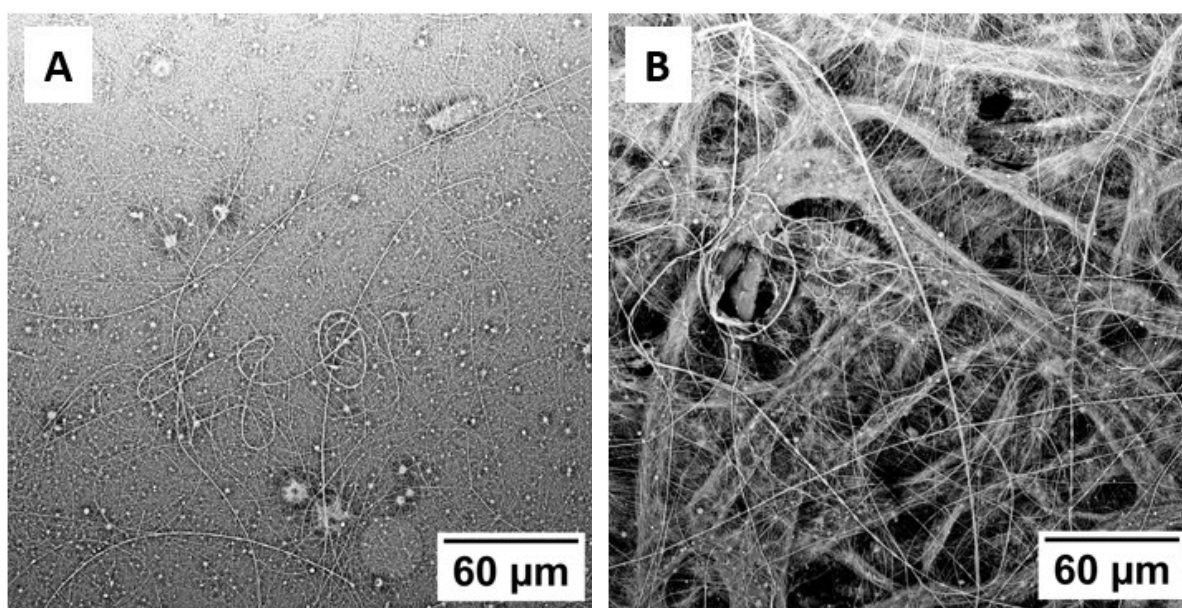
4.4 Příprava a charakterizace fibroinových substrátů

K přípravě nanovláknenných vrstev z fibroinu byl použit přístroj pro elektrostatické zvlákňování (znázorněný na obr. 5). Elektrospinner je složen ze zdroje vysokého napětí, uzemněného kolektoru a elektrody ve formě kovové tyčinky. Elektrostatické zvlákňování probíhalo z kapky roztoku při napětích 15 – 30 kV, pokojové teplotě a vzdálenosti kolektoru od 9 do 13 cm.



Obr. 5 Zařízení pro electrospinning

Jako vhodný podklad pro přípravu vláknenných substrátů byl testován papír, slída a oboustranně lepicí vodivá uhlíková páska. Papír není vhodný podklad pro spinnování vláken vzhledem k tomu, že vlákna podkladu zkreslují výsledek zvlákňování. Uhlíková lepicí páska se ukázala jako praktický nosný podklad z toho důvodu, že je relativně hladká, nezkrasuje tedy výsledný obraz, zajišťuje dobrou adhezi fibroinových vláken k podkladu a vzorek je takto připraven k přímé aplikaci pro měření elektronovým mikroskopem. Dalším použitým podkladem byla slída, která je vhodná pro zobrazování pomocí optického a konfokálního mikroskopu. Vliv podkladu na výslednou kvalitu vláken je znázorněn na obr. 6.



Obr. 6 SEM snímky fibroinových vláken na různých podkladech:

A – oboustranná vodivá páska; B – papír

4.4.1 Skenovací elektronový mikroskop

Morfologie vláken byla pozorována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) Phenom Pro (Phenom World). SEM slouží k topografické analýze různých materiálů. Využívá principu odrazu svazku elektronů od vzorku. Interakcí dopadajících elektronů s materiálem vzorku vznikají různě detekovatelné složky, ze kterých je sestavován výsledný obraz [85]. Vzorky byly upevněny na terčík pomocí oboustranné uhlíkové pásky a pokoveny směsí paladia a zlata po dobu 60 s v argonovém plazmatu. Snímky byly pořizovány při urychlovacím napětí 10 kV. Následná obrazová analýza byla provedena v programu ImageJ, verze 1.6_0_24.

4.4.2 Konfokální mikroskop

Fluorescenčně značená vlákna byla zobrazována pomocí konfokálního mikroskopu Fluoview FV3000 (Olympus). Principem konfokálního mikroskopu je odraz laserových paprsků, které osvětlují preparát, a jejich následná detekce ve fotonásobiči. Zdrojem světla je laser, který prochází přes konfokální clonu a osvětluje preparát. Odražené světlo nebo emitované fluorescenční záření přes clonu do fotonásobiče a následně do detektoru. Výhodou konfokálního mikroskopu je možnost snímání jednotlivých optických řezů a rekonstrukce preparátu do 3D modelu [86].

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Zvlákňování z kyseliny mravenčí

Prvním použitým rozpouštědlem byla kyselina mravenčí (85 %). Roztoky pro zvlákňování byly připravovány v koncentraci 8,5, 10,7 a 13 hm. % (tab. 1).

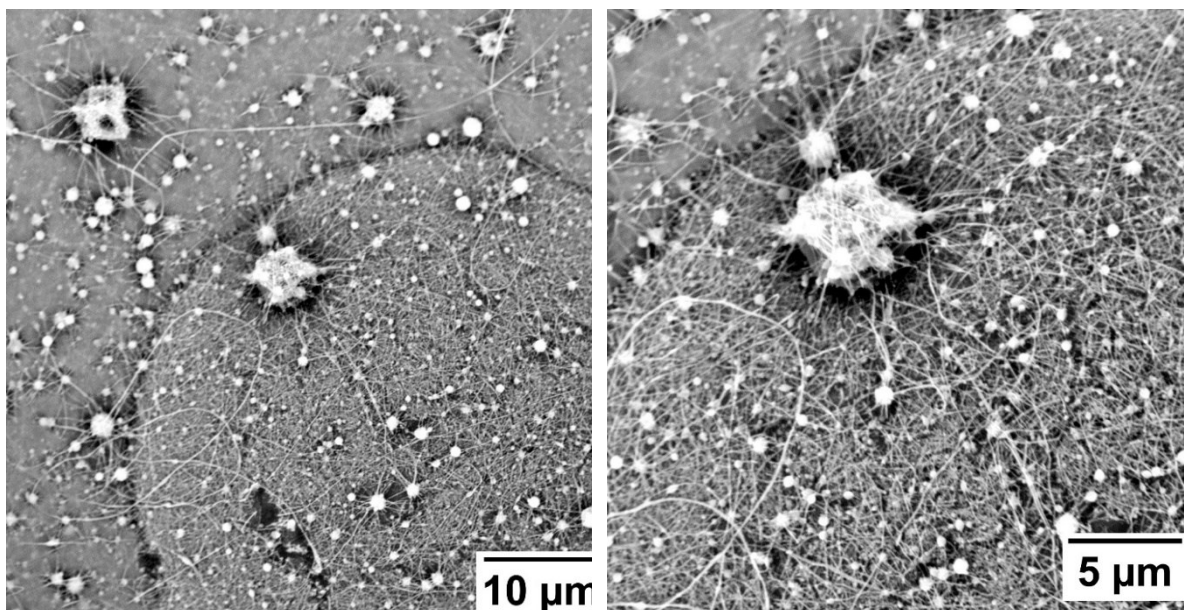
Z těchto roztoků byla pomocí electrospinningu vytvářena vlákna. Použité napětí bylo 30 kV. Celý proces byl ovlivňován koncentrací fibroinu, vzdáleností elektrody od kolektoru, ale také dobou procesu. Následně byl porovnáván vliv těchto parametrů na morfologii vláken pomocí SEM.

5.1.1 Vliv koncentrace

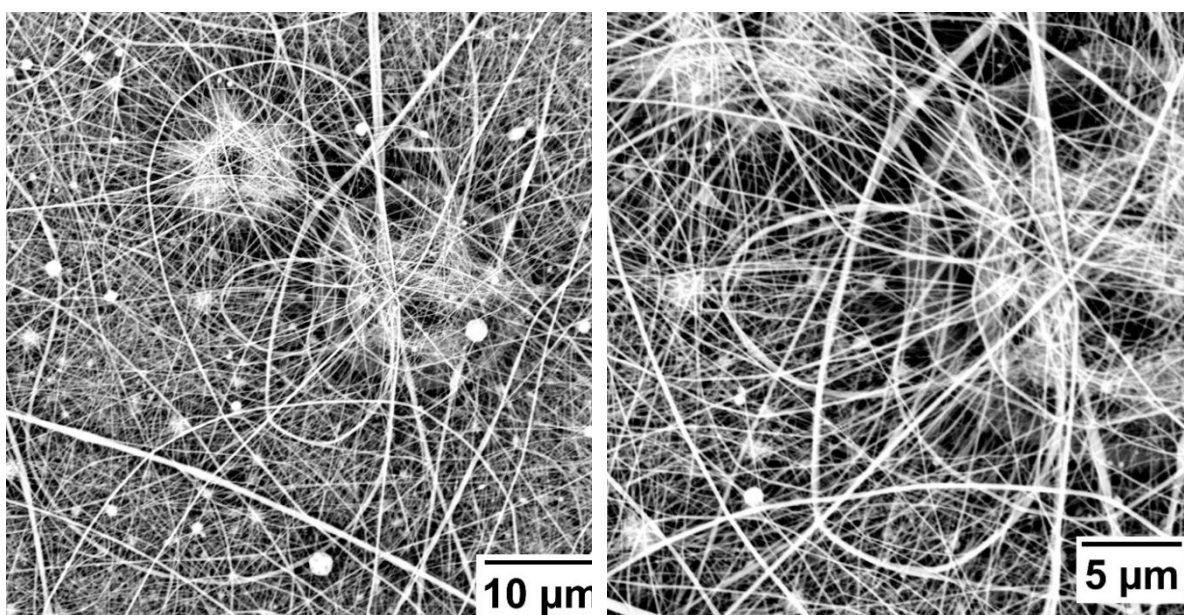
První část výsledků ukazuje vliv použité koncentrace fibroinu na výslednou morfologii vláken. Snímky pro srovnání těchto vláken byly pořízeny pomocí SEM a jsou znázorněny na obr. 6, 7 a 8. Ostatní parametry zvlákňování byly zachovány u všech roztoků stejné, viz tabulka 1.

Tabulka 1 Parametry přípravy fibroinových vláken o různých koncentracích a srovnání jejich průměru

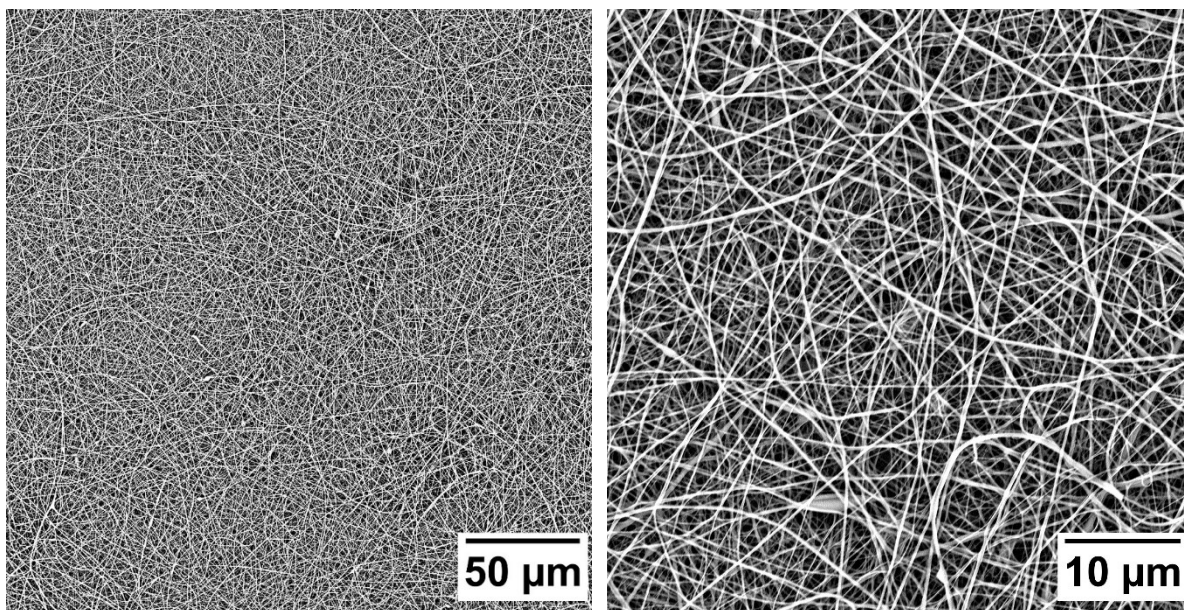
Rozpouštědlo	Koncentrace fibroinu [hm. %]	Napětí [kV]	Vzdálenost elektrody a kolektoru [cm]	Doba zvlákňování [s]	Průměr vláken [nm]
Kyselina mravenčí	8,5	30	10	240	180 ± 8
Kyselina mravenčí	10,7	30	10	240	410 ± 11
Kyselina mravenčí	13	30	10	240	350 ± 14



Obr. 7 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku o koncentraci 8,5 hm. %



Obr. 8 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku o koncentraci 10,7 hm. %



Obr. 9 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku o koncentraci 13 hm. %

Při porovnání snímků lze vidět, že použití vyšší koncentrace fibroinu je pro tvorbu vláken lepší. Na obr. 6 a 7, při 8,5 a 10,7 hm. % koncentraci, můžeme pozorovat vznik nežádoucích útvarů – korálků, což bylo způsobeno pulzováním kapky při zvlákňování nízké koncentrace fibroinu [72]. Souvislá vlákna nám vznikala pouze při koncentraci 13 hm. %. Ze srovnání různých koncentrací plyne, že s vyšší koncentrací dochází k homogennějšímu pokrytí povrchu a k eliminaci nestabilit.

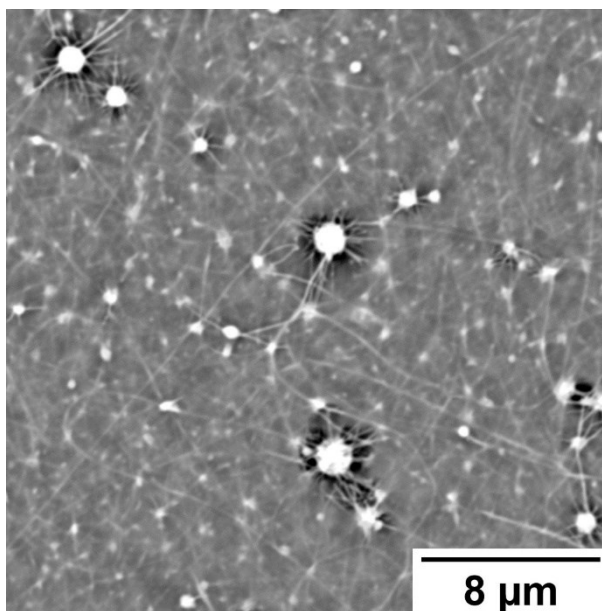
Nejmenší průměr vláken (180 ± 8) nm měl 8,5 hm. % roztok fibroinu. Oproti tomu roztok s koncentrací 10,7 hm. % měl průměr vláken nejvyšší.

5.1.2 Vliv vzdálenosti kolektoru a elektrody

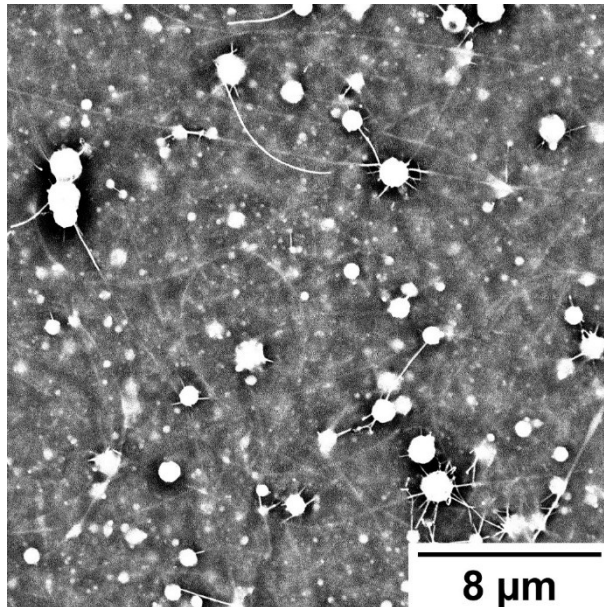
Vliv vzdálenosti kolektoru od elektrody při elektrostatickém zvlákňování roztoků na morfologii výsledných vláken a jejich průměr byl pozorován u roztoků o koncentraci 8,5 hm. % a pro vzdálenosti 9, 11 a 13 cm. Ostatní parametry zvlákňování byly zachovány stejné, viz tabulka 2.

Tabulka 2 Parametry přípravy fibroinových vláken o různých koncentracích a srovnání jejich průměru

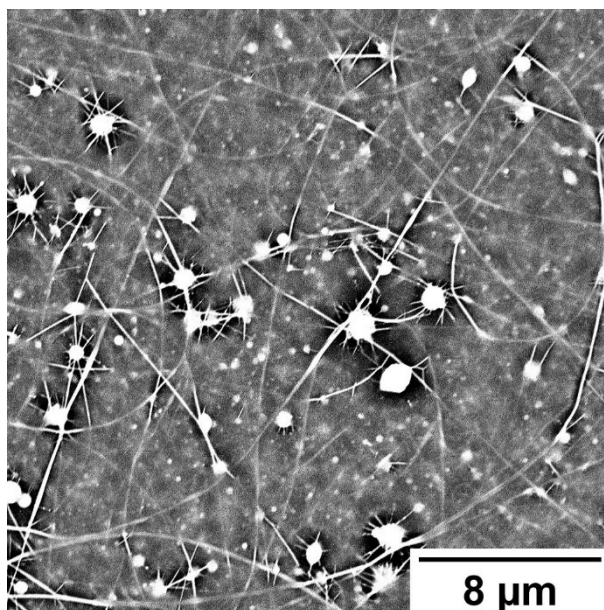
Rozpouštědlo	Koncentrace fibroinu [hm. %]	Napětí [kV]	Vzdálenost elektrody a kolektoru [cm]	Doba zvlákňování [s]	Průměr vláken [nm]
Kyselina mravenčí	8,5	30	9	240	130 ± 6
Kyselina mravenčí	8,5	30	11	240	180 ± 8
Kyselina mravenčí	8,5	30	13	240	240 ± 8



Obr. 10 SEM snímek fibroinových vláken při vzdálenosti elektrody od kolektoru 9 cm



Obr. 11 SEM snímek fibroinových vláken při vzdálenosti elektrody od kolektoru 11 cm



Obr. 12 SEM snímek fibroinových vláken při vzdálenosti elektrody od kolektoru 13 cm

Po porovnání fotek srovnávaných roztoků můžeme pozorovat, že při kratší vzdálenosti kolektoru od elektrody (obr. 9) vlákna nestíhají během spinnování uschnout, a tak vypadají slitá do vrstvy. Při aplikování větší vzdálenosti (obr. 11), vlákna lépe proschla a jsou lépe viditelná.

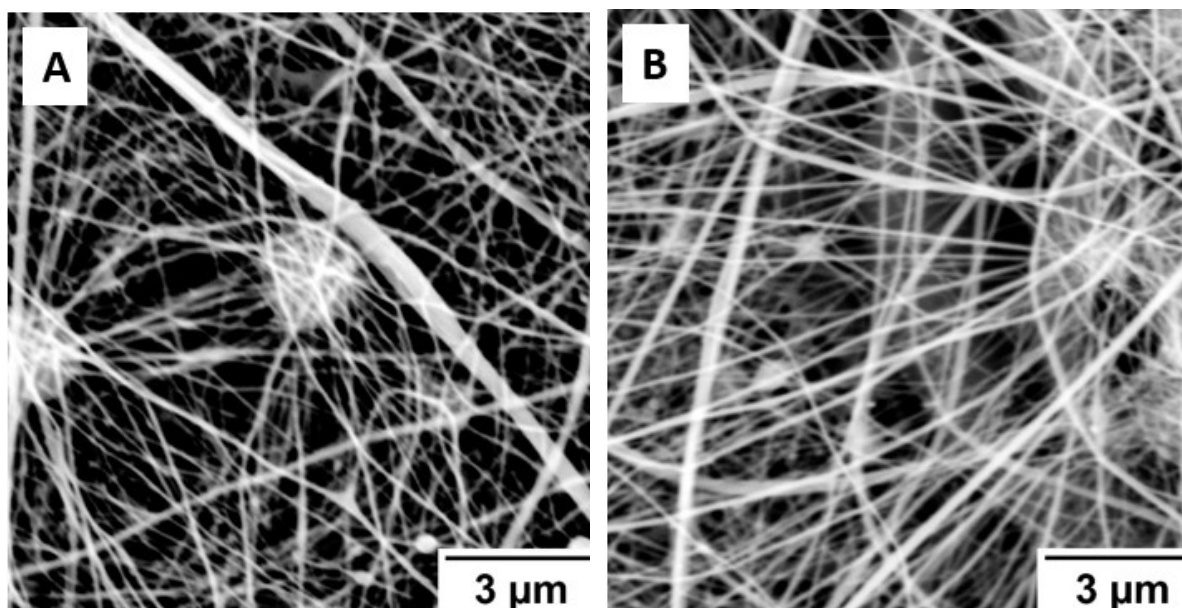
Nejmenší průměr vláken (130 ± 6) nm měl vzorek, pro který byla použita nejmenší vzdálenost kolektoru a elektrody (9 cm). Oproti tomu největší průměr byl pozorován u vláken při největší vzdálenosti kolektoru od elektrody (13 cm). Čím byla tedy menší vzdálenost kolektoru a elektrody, tím byl nižší průměr vláken.

5.1.3 Vliv času depozice při zvlákňování

Pro získání samonosné vrstvy bylo třeba dosáhnout hustého pokrytí substrátu sítí vláken. Jedním z důležitých faktorů je zde samozřejmě doba trvání zvlákňování. Pro sledování vlivu různé doby spinnování na hustotu sítě byl pro toto porovnání použit roztok v koncentraci 10,7 hmot. %. Vzdálenost kolektoru od elektrody byla 10 cm, použité napětí 30 kV. Stanovený čas depozice 120 a 240 s.

Tabulka 3 Parametry přípravy fibroinových vláken o různých koncentracích a srovnání jejich průměru

Rozpouštědlo	Koncentrace fibroinu [hm. %]	Napětí [kV]	Vzdálenost elektrody a kolektoru [cm]	Doba zvlákňování [s]	Průměr vláken [nm]
Kyselina mravenčí	10,7	30	10	120	350 ± 7
Kyselina mravenčí	10,7	30	10	240	410 ± 11



*Obr. 13 SEM snímky fibroinových vláken při různé době zvlákňování
A – čas depozice 120 s; B – čas depozice 240 s*

Při srovnání snímků na obr. 13 vidíme, že po delším čase depozice bylo pokrytí povrchu hustší. V tabulce 3 můžeme vidět, že při větším čase depozice dochází k tvorbě silnějších fibroinových vláken.

5.2 Zvlákňování z roztoku fibroinu s hexafluoroisopropanolem

Hexafluoroisopropanol (HFIP) je běžné rozpouštědlo používané pro elektrostatické zvlákňování, je používán pro electrospinning syntetických i přírodních polymerů včetně tropoelastinu, kolagenu a polykaprolaktonu.

Pro zvlákňování z čistého HFIP byly vybrány poměry BMF:HFIP 1:40 (1,5 hm. %), 1:30 (2,1 hm. %), 1:20 (3 hm. %) a 1:10 (5,9 hm. %). U koncentrace 5,9 hm. % byla použita koncentrace příliš vysoká, takže kapka rychle vysychala a tento roztok nebylo možné spinnovat. Tomuto jevu by se dalo zabránit při zvlákňování z jehly [87]. Ostatní parametry u zvlákňování se neměnily a bylo použito napětí 20 kV, vzdálenost elektrody od kolektoru 10 cm, čas depozice 30 s, jako podklad byla zvolena vodivá páska pro SEM a slída pro konfokální mikroskop.

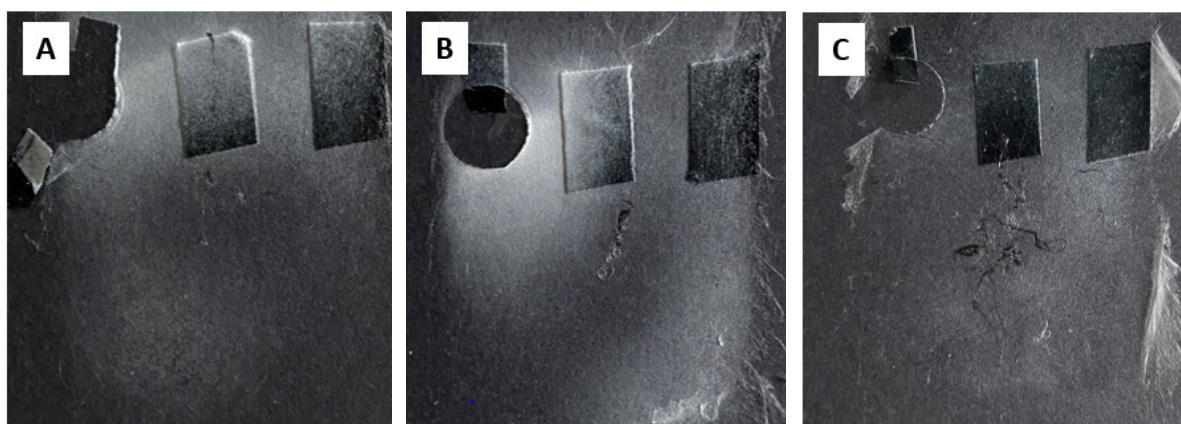
Morfologie získaných vláken byla porovnáвана pomocí skenovacího elektronového mikroskopu a následně byly opět změřeny průměry vláken.

5.2.1 Vliv koncentrace proteinu v roztoku

Při použití HFIP byl porovnáván vliv koncentrace roztoků na výslednou strukturu vláken. Byla porovnána morfologie vláken a jejich průměry, které jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4 Parametry přípravy fibroinových vláken o různých koncentracích a srovnání jejich průměru

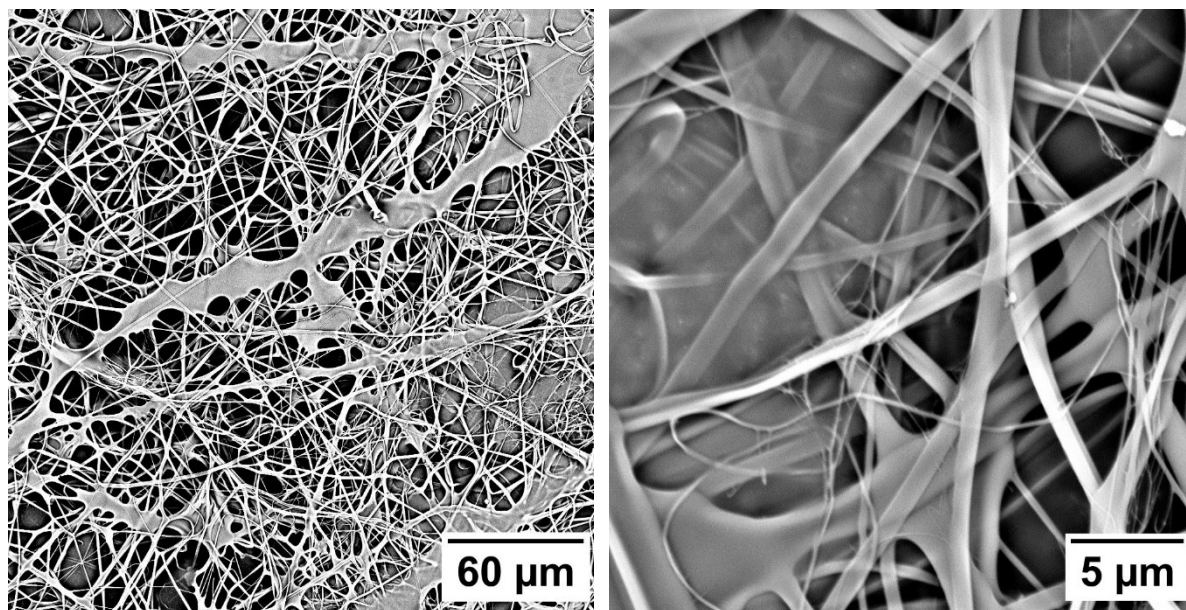
Rozpouštědlo	Koncentrace fibroinu [hm. %]	Napětí [kV]	Vzdálenost elektrody a kolektoru [cm]	Doba zvláknění [s]	Průměr vláken [nm]
HFIP	1,5	20	10	30	(1000 ± 20)
HFIP	2	20	10	30	(1220 ± 40)
HFIP	3	20	10	30	(2000 ± 70)



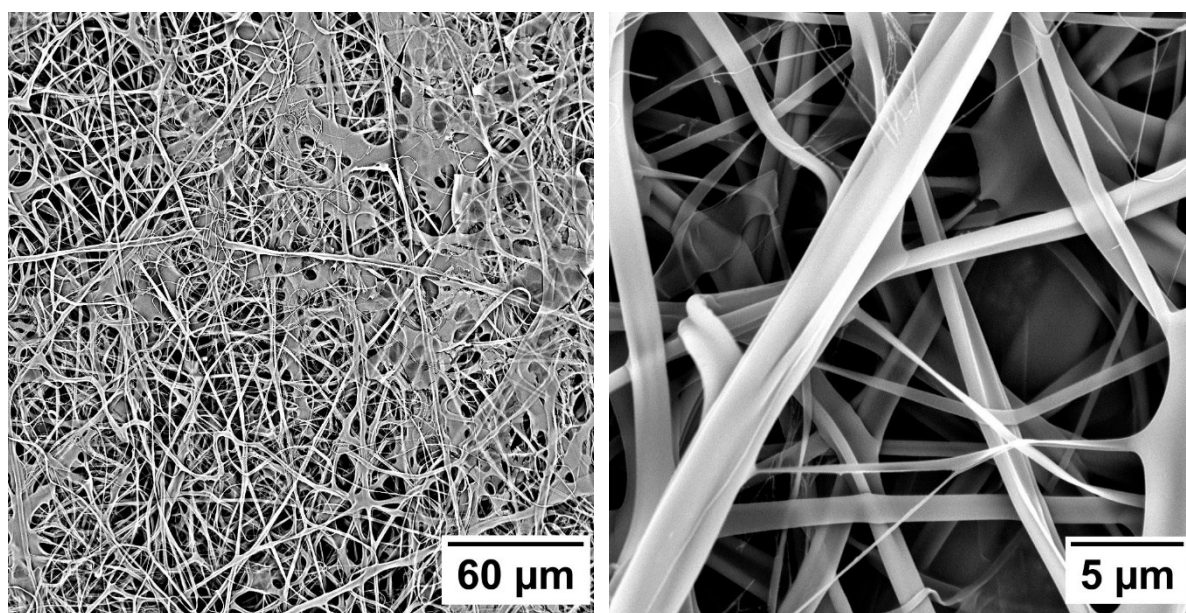
Obr. 14 Srovnání fotek naspinnovaných fibroinových vláken s HFIP

A – koncentrace 1,5 hm. %; **B** – koncentrace 2 hm. %; **C** – koncentrace 3 hm. %

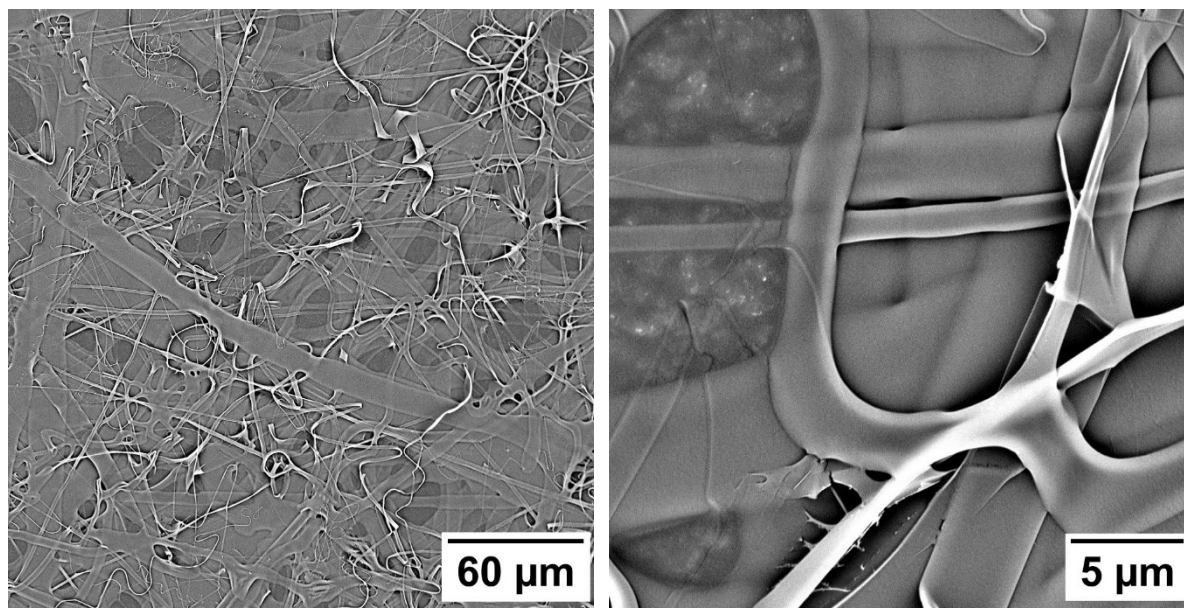
Na obr. 14 vidíme srovnání fibroinových vláken o různých koncentracích ihned po elektrostatickém zvláknění na papír. Můžeme pozorovat, že největší pokrytí povrchu vláknou bylo při koncentraci 2 hm. %. Připravená vlákna byla velmi jemná.



Obr. 15 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku o koncentraci 1,5 hm. %



Obr. 16 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku o koncentraci 2,1 hm. %



Obr. 17 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku o koncentraci 3 hm. %

Na SEM snímcích připravených vláken můžeme pozorovat, že při použití HFIP jako rozpouštědla nedocházelo k tvorbě homogenního pokrytí povrchu a vlákna mají mnohem větší průměr než při použití kyseliny mravenčí. Při koncentraci 3 hm. % (obr. 16) vidíme, že na vláknech vznikají četné defekty.

Při použití koncentrace fibroinu 1,5 hm. % vznikaly vlákna o průměru (1000 ± 20) nm, po použití vyšší koncentrace fibroinu (3 hm. %) byl průměr vláken mnohem vyšší, a to (2000 ± 70) nm.

5.3 Zvláknění z roztoku s přídavkem špatného rozpouštědla

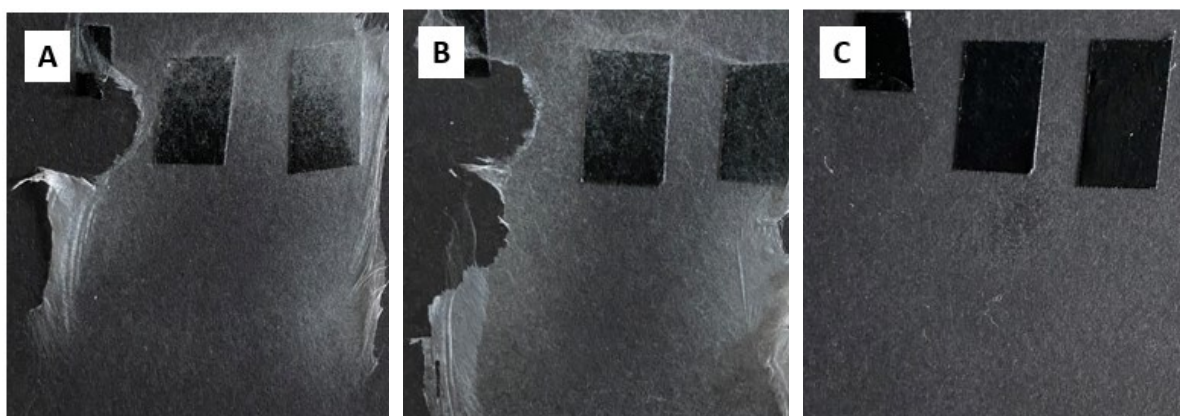
Špatné rozpouštědlo bylo k roztoku přidáváno s cílem vytvořit pomocí fázové separace porézní vlákna [88]. Při fázové separaci se dobré rozpouštědlo HFIP odpařuje rychleji než špatné rozpouštědlo DMSO. Kapky pomaleji se odpařujícího DMSO by poté měly vytvářet ve struktuře vlákna porézní strukturu.

Roztoky se připravovaly tak, že se nejprve připravil roztok fibroinu s HFIP v koncentracích, jaké byly použity v minulé kapitole (1,5, 2 a 3 hm. %). Dále byl připraven roztok DMSO s HFIP v objemovém poměru 1:5. Tyto roztoky byly následně smíchány v poměru 10:1, jak je uvedeno v tabulce 5. Tento postup byl zvolen z toho důvodu, že při přidání samotného DMSO k roztoku fibroinu s HFIP kapka DMSO vytvořila nerozpustnou micelu.

Při použití DMSO byl opět sledován vliv koncentrace roztoků na výslednou strukturu vláken.

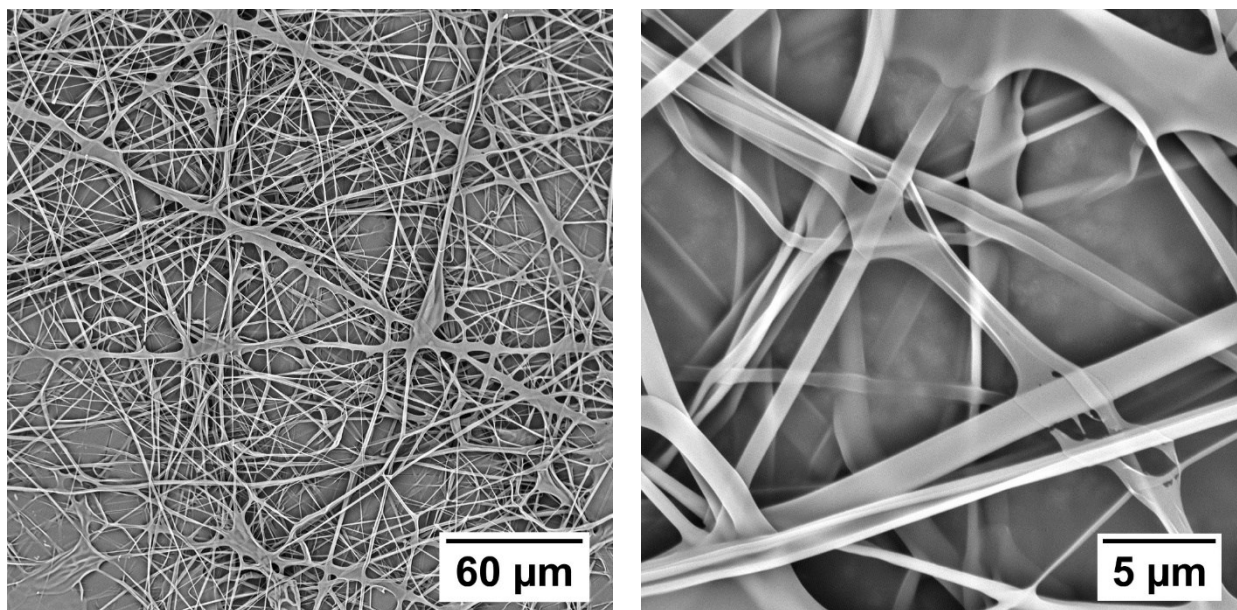
Tabulka 5 Složení roztoků fibroinu s HFIP a průměry vzniklých vláken

Výchozí koncentrace BMF v HFIP [hm. %]	Složení DMSO : HFIP	Složení BMF/HFIP : DMSO/HFIP	Průměr vláken [nm]
1,5	1:5	10:1	(1400 ± 60) nm
2	1:5	10:1	(1730 ± 40) nm
3	1:5	10:1	(7200 ± 30) nm

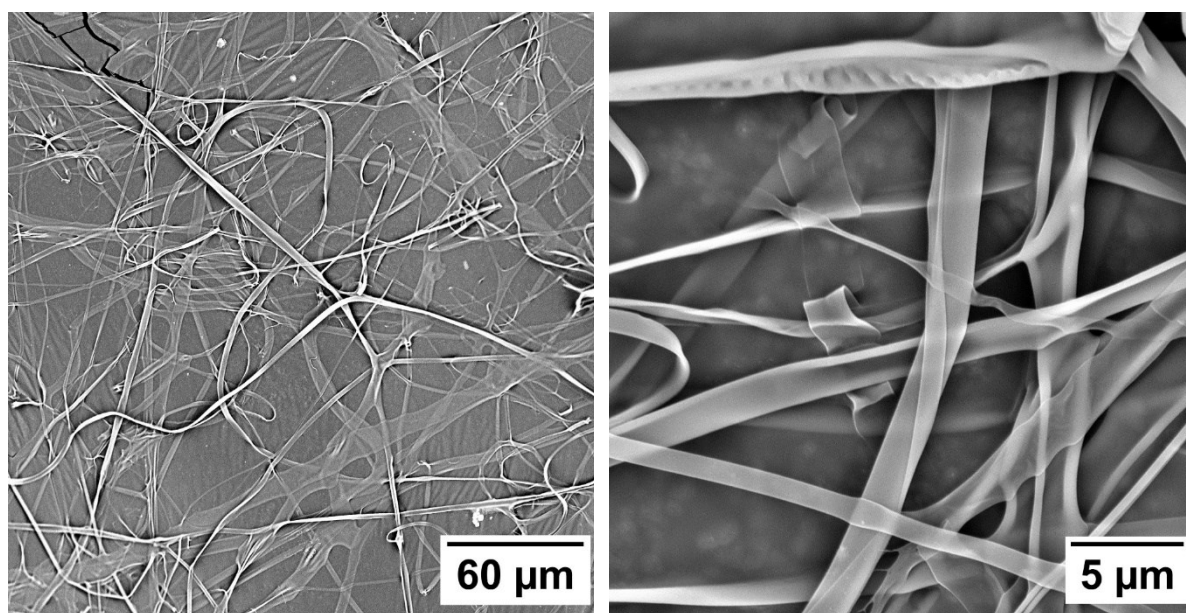


*Obr. 18 Srovnání fotek naspinnovaných fibroinových vláken s HFIP a DMSO
A – koncentrace 1,5 hm. %; B – koncentrace 2 hm. %; C – koncentrace 3 hm. %*

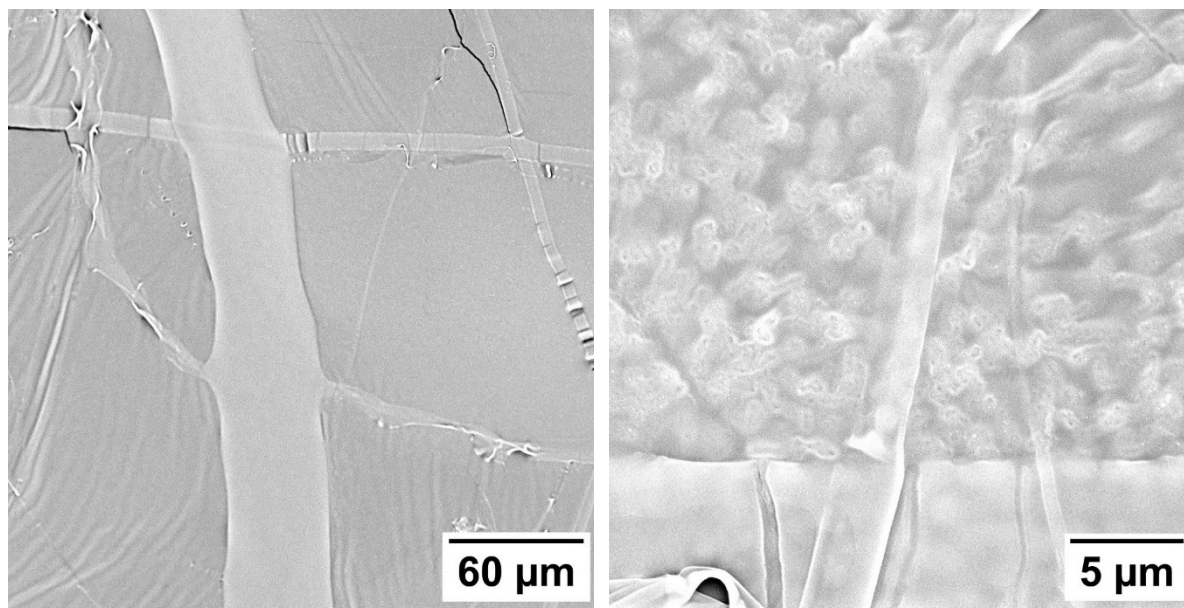
Na obr. 18 je uvedeno srovnání fibroinových vláken o různých koncentracích ihned po elektrostatickém zvlákňování na papír. Můžeme pozorovat, že při použití koncentrace 1,5 i 2 hm. % vznikala hustá síť pevných vláken. Se zvyšující se koncentrací fibroinu bylo pokrytí vláken slabší. Při porovnání obr. 14 a 18 lze vidět, že vlákna při použití špatného rozpouštědla tvoří pevnější samonosnou matici oddělitelnou od podložního materiálu.



Obr. 19 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku s DMSO o koncentraci BMF 1,5 hm. %



Obr. 20 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku s DMSO o koncentraci BMF 2,1 hm. %



Obr. 21 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku s DMSO o koncentraci BMF 3 hm. %

Po přidání špatného rozpouštědla – DMSO k fibroinu s HFIP vidíme, že při použití větší koncentrace fibroinu dochází k tvorbě širokých vláken a nehomogenně pokrytého substrátu. Se snižující se koncentrací vznikají tenčí vlákna. Vlákněné vrstvy zahrnují morfologické defekty.

Na obr. 20 si lze dále všimnout, že fibroin zvlákněný z HFIP má tendenci tvořit zvrásněná plochá vlákna, podobně jako poly(etherimid) rovněž zvlákněvaný z HFIP [89]. Ke zborcení vláken do plochých „stužek“ dochází při nárazu vlákna na sběrný substrát, přičemž záhyby na povrchu vlákna jsou spojeny s napětím na vnějším povrchu vlákna [60].

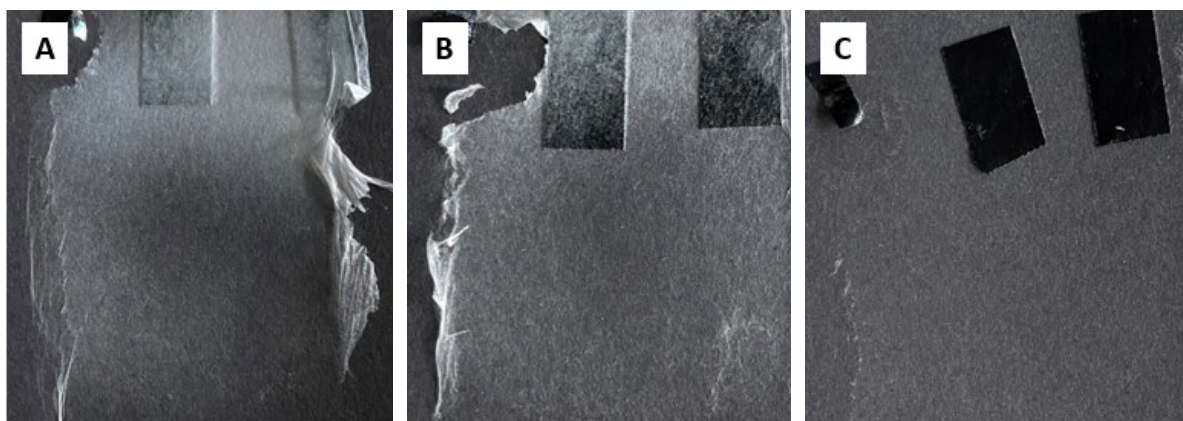
Průměr vláken s obsahem DMSO se se zvyšující koncentrací zvyšuje. Roztok o koncentraci 1,5 hm. % měl průměr vláken (1400 ± 60) nm, oproti tomu roztok o koncentraci 3 hm. % (7200 ± 30) nm.

5.4 Fluorescenční barvení hedvábných vláken

Při fluorescenčním barvení byl připraven roztok fluorescein isothiokyanát dextranu s dimethylsulfoxidem, který byl následně smíchán s hexafluoroisopropanolem v objemovém poměru 1:5. Roztoky fibroinu s HFIP byly připraveny v koncentracích 1,5, 2 a 3 hm. %. Roztoky fibroinu s HFIP byly následně smíchány s roztokem fluoresceinu v DMSO a HFIP v objemovém poměru 10:1, viz tabulka 6.

Tabulka 6 Složení roztoků s fluoresceinem a průměry vzniklých vláken

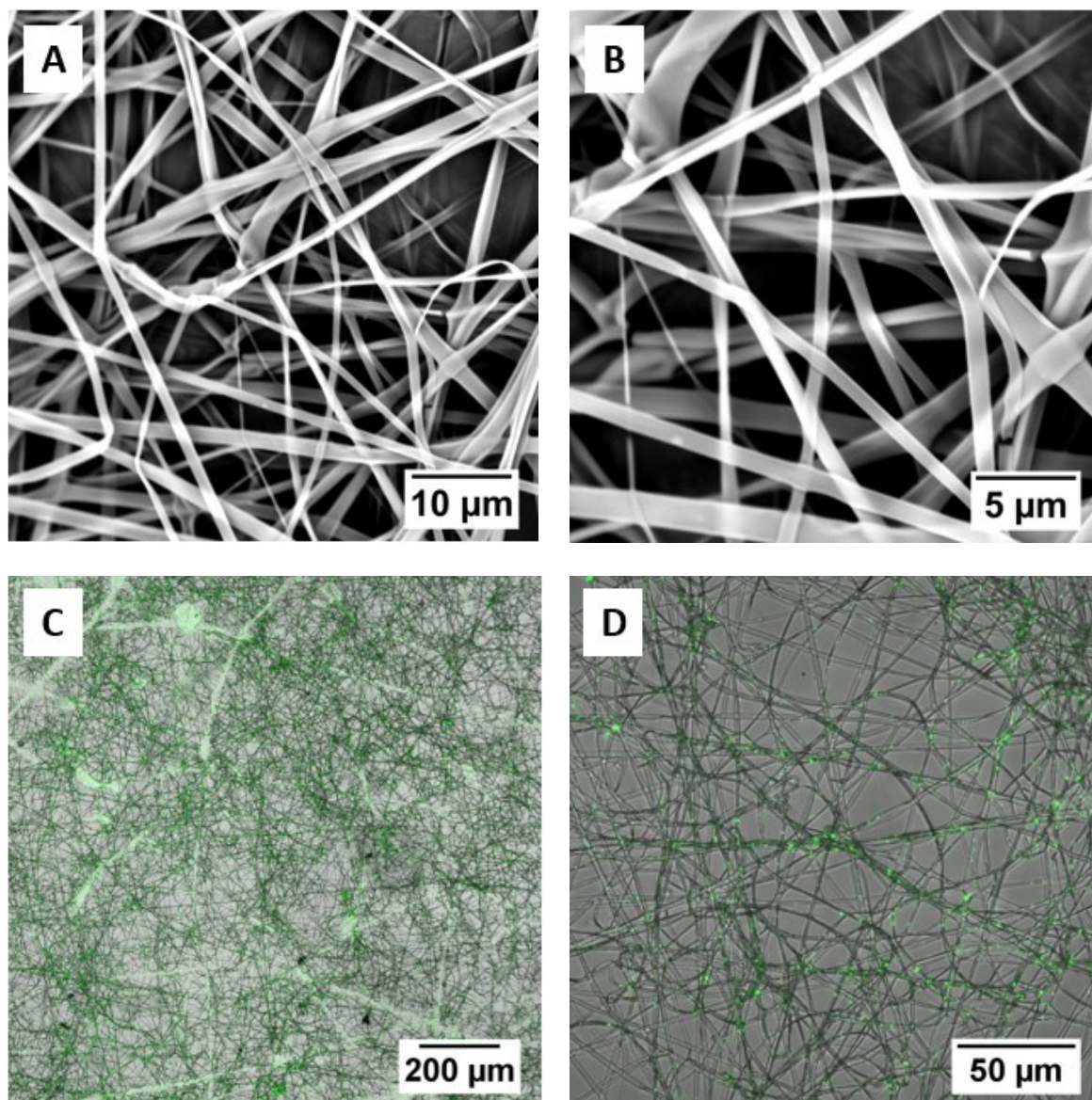
Výchozí koncentrace BMF v HFIP [hm. %]	Složení F : DMSO	Složení F-DMSO : HFIP	Složení BMF/HFIP : F-DMSO/HFIP	Průměr vláken [nm]
1,5	1:200	1:5	10:1	660 ± 20
2	1:200	1:5	10:1	2000 ± 70
3	1:200	1:5	10:1	7700 ± 300



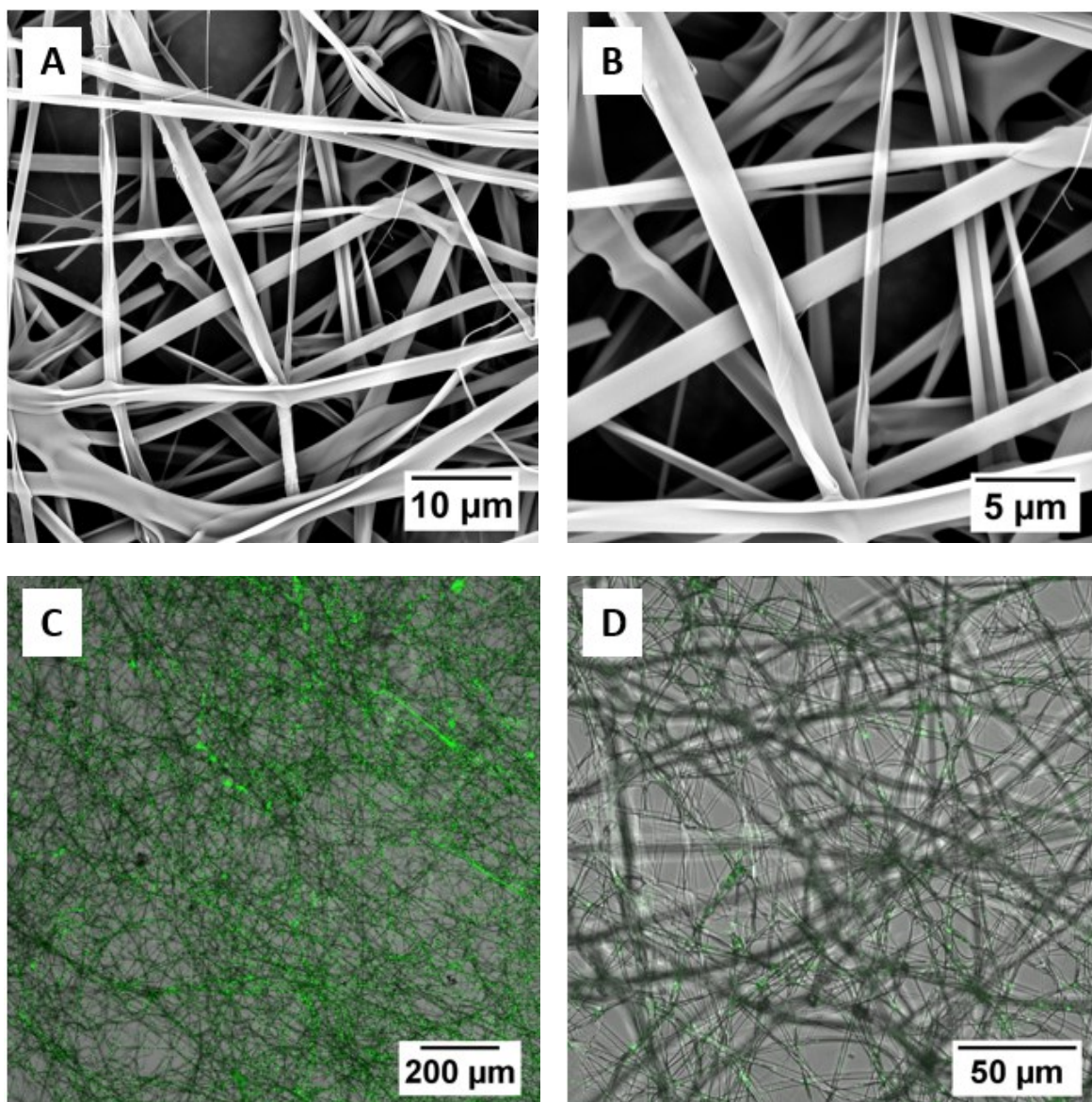
Obr. 22 Srovnání fotek naspinnovaných fibroinových vláken z roztoku s HFIP, DMSO a fluoresceinem

A – koncentrace 1,5 hm. %; *B* – koncentrace 2 hm. %; *C* – koncentrace 3 hm. %

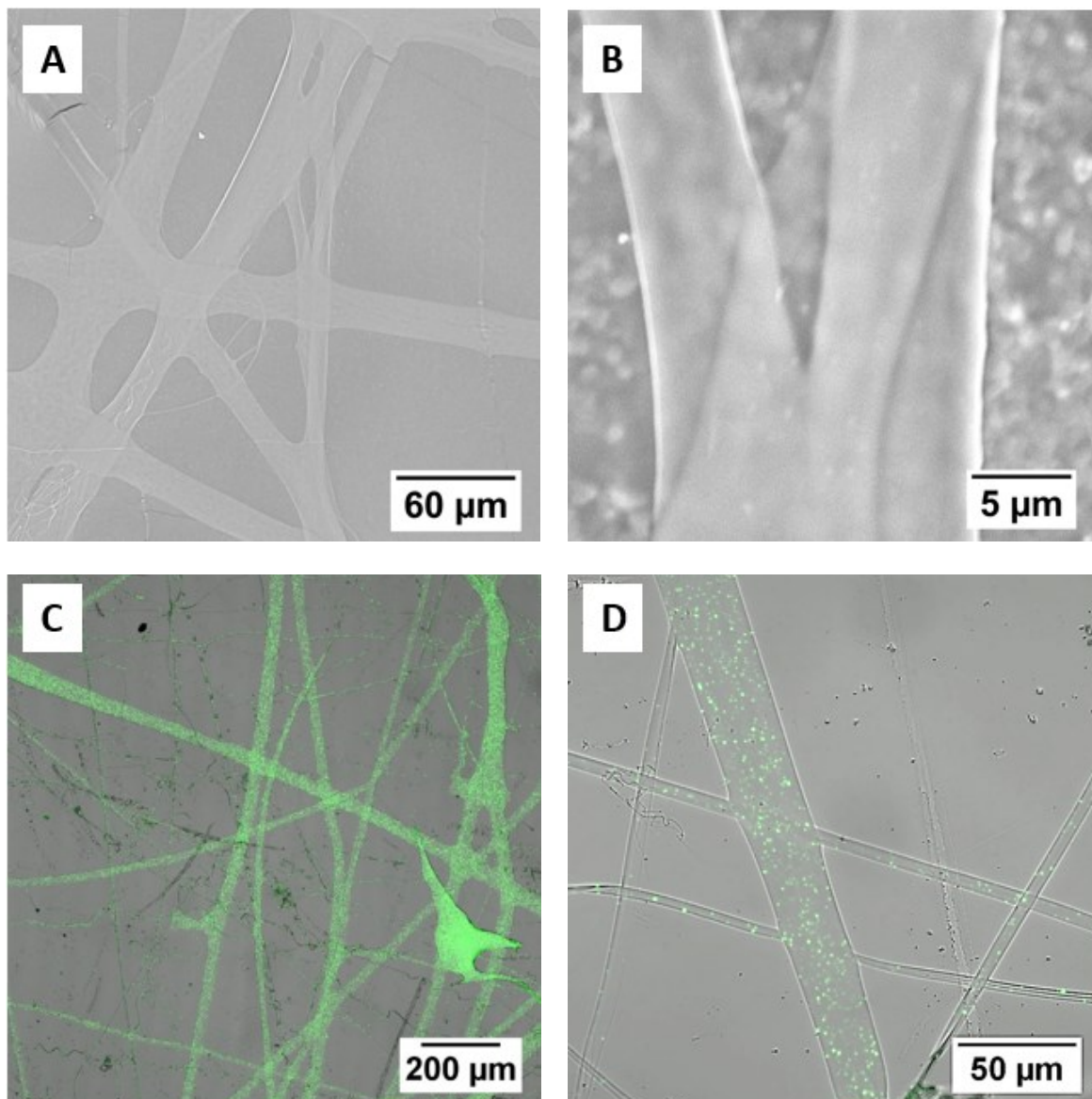
Na obr. 22 vidíme srovnání fibroinových vláken o různých koncentracích ihned po elektrostatickém zvlákňování. Můžeme pozorovat, že při použití koncentrace 1,5 hm. % vznikala hustá síť pevných vláken. Se zvyšující se koncentrací fibroinu bylo opět pokrytí vláken slabší.



*Obr. 23 Snímky fibroinových vláken z roztoku s F-DMSO o koncentraci BMF 1,5 hm. %
A, B – SEM; C, D – konfokální mikroskop*



*Obr. 24 Snímky fibroinových vláken z roztoku s F-DMSO o koncentraci BMF 2,1 hm. %
A, B – SEM; C, D – konfokální mikroskop*



Obr. 25 Snímky fibroinových vláken z roztoku s F-DMSO o koncentraci BMF 3 hm. %

A, B – SEM; C, D – konfokální mikroskop

Po analýze snímků roztoků můžeme pozorovat, že při použití DMSO s fluoresceinem jako špatným rozpouštědlem bylo pokrytí povrchu homogenní, průměr vláken je podobný jako v případě zvláknování z roztoku s DMSO bez fluoresceinu. Na obr. 23 a 24 pozorujeme vlákna připravená v koncentraci 1,5 a 2,1 hm. % charakterizována pomocí SEM a konfokálního mikroskopu. Můžeme vidět, že při použití nižší koncentrace fibroinu vzniká hustější síť vláken. Na obr. 25 pozorujeme vznik velmi silných vláken. I v tomto případě lze tedy s rostoucí koncentrací pozorovat nárůst průměru vláken.

Při použití koncentrace fibroinu 1,5 hm. % vznikala vlákna o průměru (660 ± 20) nm, po použití vyšší koncentrace fibroinu (3 hm. %) byl průměr vláken mnohem vyšší, a to (7700 ± 300) nm.

Z obrázků pořízených konfokálním mikroskopem je patrné, že fluorescenční značení hedvábného proteinu bylo úspěšné.

Z provedených experimentů plyne, že zvlákňování z kyseliny mravenčí poskytuje mnohem tenčí fibroinová vlákna, přičemž s rostoucí koncentrací fibroinu v roztoku dochází k potlačení vznikajících nestabilit na vláknech a dochází k tvorbě homogenní sítě (obr. 9). Při zvlákňování z hexafluoroisopropanolu musela být zvolena mnohem menší koncentrace fibroinu v roztoku z důvodu rychlejšího odpařování HFIP. Zde bylo možné sledovat opačný trend u vlivu koncentrace na homogenost pokrytí substrátu vlákny – s rostoucí koncentrací pokrytí vlákny klesalo (srovnání obr. 15, 16 a 17), tato skutečnost opět pravděpodobně souvisí s rychlostí odpařování rozpouštědla. Při rychlém odpaření rozpouštědla z roztoku o vyšší koncentraci docházelo k tvorbě proteinového filmu na zvlákňovací elektrodě a k nedostatečnému zvlákňování materiálu. Vlákna spinnovaná z HFIP dále mají větší tloušťku než vlákna z kyseliny mravenčí (tab. 1 a 4). Ačkoliv po přidavku špatného rozpouštědla nedošlo k očekávané tvorbě porézních vláken, přidavek DMSO do směsi, případně v kombinaci s FITCD, má za následek podporu zvlákňovatelnosti fibroinu a zlepšení mechanických vlastností vláknité matrice, viz srovnání obr. 14, 17 a 22. Pomocí FITCS lze fluorescenčně označit vlákna, což bude dále rozvíjeno v budoucím výzkumu při zvlákňování fibroinu s jinými polymery.

ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byly připraveny strukturované vrstvy na bázi hedvábného fibroinu za použití rozpouštědel kyseliny mravenčí, hexafluoroisopropanolu a dimethylsulfoxidu. Struktury tvořené fibroinovými vlákny byly připravovány pomocí elektrostatického zvlákňování. Následně byla porovnávána morfologie vzniklých vláken a jejich tloušťka. Zvlákněné vzorky byly charakterizovány pomocí SEM a konfokálního mikroskopu.

V rámci literární rešerše byla jako vhodná rozpouštědla vybrána kyselina mravenčí a hexafluoroisopropanol. V obou případech byl porovnáván vliv koncentrace na morfologii a tloušťku vzniklých vláken. Vlákna s použitím kyseliny mravenčí vznikala o průměrech 130–410 nm. Při koncentraci 13 hm. % docházelo k homogennímu pokrytí povrchu a připravená vlákna byla souvislá a netvořily se na nich nestability. Při nižších koncentracích fibroinu vznikaly nežádoucí útvary – korálky, což bylo způsobeno pulzováním kapky při zvlákňování. Při použití hexafluoroisopropanolu jako rozpouštědla docházelo ke vzniku vláken o průměru 1000 – 2000 nm. Při použití HFIP nedocházelo k tvorbě homogenního pokrytí povrchu a vlákna měla mnohem větší průměr než při použití kyseliny mravenčí. Při koncentraci 3 hm. % na vláknech vznikají defekty.

Dále byly připraveny roztoky fibroinu s HFIP a DMSO jako špatným rozpouštědlem a stejné roztoky s přidavkem fluorescenčního barviva. Po přidání špatného rozpouštědla DMSO k fibroinu s HFIP docházelo při použití vyšší koncentrace k tvorbě širokých vláken a nehomogenně pokrytého sběrného substrátu. Se snižující se koncentrací vznikala tenčí vlákna. Vlákenné vrstvy také obsahovaly morfologické defekty. Homogenní pokrytí vlákny bylo pouze u koncentrace 1,5 hm. %. Průměr výsledných vláken byl v rozmezí 1400 – 7200 nm a se zvyšující se koncentrací se zvyšoval. Při fluorescenčním barvení docházelo v porovnání vláken bez fluoresceinu k tvorbě homogenního pokrytí povrchu. U koncentrace 3 hm. % vznikala velmi silná vlákna o průměru (7700 ± 300) nm, pokrytí povrchu bylo nehomogenní. Při použití koncentrace 1,5 hm. % měla vlákna průměr (660 ± 20) nm a byla mnohem tenčí než vlákna bez přidání fluoresceinu, která měla průměr (1400 ± 60) nm.

Fluorescenční barvení bylo zvoleno z toho důvodu, že by se při spinnování z vícesložkového materiálu daly jednotlivé složky následně rozeznat mezi sebou. Vlákna z čistého fibroinu, případně v kombinaci s jinými polymery, by mohla představovat vhodné

substráty pro testy buněčné proliferace a následné aplikace v oblasti tkáňového inženýrství. Tyto směry budou rozvíjeny v dalších fázích výzkumu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] E. E. Kuzmina and V. H. Mair, *The prehistory of the Silk Road*. 2015. doi: 10.5860/choice.46-1569.
- [2] F. Sehnal, "Biotechnologies Based on Silk," in *Insect Biotechnology*, 2011. doi: 10.1007/978-90-481-9641-8_11.
- [3] K. Rajitha and P. Sowmya, "DERMESTID BEETLE [DERMESTES ATER (DE GEER)]: A PEST IN SILKWORM (BOMBYX MORI L.) SEED PRODUCTION," *Biochemical and Cellular Archives*, vol. 21, 2021.
- [4] M. A. Bhat, H. B. Manjunatha, and Punyavathi, "Electrophoretic separation and comparative analysis of silk gland proteins from Bombyx and Philosamia.," *International Journal of Bioassays*, vol. 3, no. 8, 2014.
- [5] C. Z. Zhou *et al.*, "Fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain gene," *Nucleic Acids Research*, vol. 28, no. 12, 2000, doi: 10.1093/nar/28.12.2413.
- [6] C. W. P. Foo, E. Bini, J. Hensman, D. P. Knight, R. v. Lewis, and D. L. Kaplan, "Role of pH and charge on silk protein assembly in insects and spiders," *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, vol. 82, no. 2, 2006, doi: 10.1007/s00339-005-3426-7.
- [7] Y. Q. Zhang, "Applications of natural silk protein sericin in biomaterials," *Biotechnology Advances*, vol. 20, no. 2, 2002, doi: 10.1016/S0734-9750(02)00003-4.
- [8] R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, and V. W. Rodwell, *Harperova Biochemie*. 2002.
- [9] X. Nirmala, D. Kodrik, M. Žurovec, and F. Sehnal, "Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor," *European Journal of Biochemistry*, vol. 268, no. 7, 2001, doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02084.x.
- [10] K. Kimura, F. Oyama, H. Ueda, S. Mizuno, and K. Shimura, "Molecular cloning of the fibroin light chain complementary DNA and its use in the study of the expression of the light chain gene in the posterior silk gland of Bombyx mori," *Experientia*, vol. 41, no. 9, 1985, doi: 10.1007/BF01951711.
- [11] Y. Suzuki and D. D. Brown, "Isolation and Identification of the messenger RNA for silk fibroin from Bombyx mori," *Journal of Molecular Biology*, vol. 63, no. 3, 1972, doi: 10.1016/0022-2836(72)90437-8.
- [12] J. H. Wu, Z. Wang, and S. Y. Xu, "Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater," *Food Chemistry*, vol. 103, no. 4, 2007, doi: 10.1016/j.foodchem.2006.10.042.
- [13] A. Nishida, M. Yamada, T. Kanazawa, Y. Takashima, K. Ouchi, and H. Okada, "Use of silk protein, sericin, as a sustained-release material in the form of a gel, sponge and film," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 58, no. 11, 2010, doi: 10.1248/cpb.58.1480.
- [14] M. Mondal and K. Trivedy, "The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, Bombyx mori Linn., - a review," *Caspian J. Env. Sci*, vol. 5, no. 2, 2007.
- [15] M. N. Padamwar and A. P. Pawar, "Silk sericin and its applications: A review," *Journal of Scientific and Industrial Research*, vol. 63, no. 4, 2004.
- [16] Y. Takasu, H. Yamada, and K. Tsubouchi, "Isolation of Three Main Sericin Components from the Cocoon of the Silkworm, Bombyx mori," *Bioscience*,

- Biotechnology and Biochemistry*, vol. 66, no. 12, 2002, doi: 10.1271/bbb.66.2715.
- [17] Y. Takasu, H. Yamada, H. Saito, and K. Tsubouchi, "Characterization of Bombyx mori sericins by the partial amino acid sequences," *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, vol. 74, no. 3, 2005, doi: 10.11416/jibs.74.103.
- [18] Y. Takasu, T. Hata, K. Uchino, and Q. Zhang, "Identification of Ser2 proteins as major sericin components in the non-cocoon silk of Bombyx mori," *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 40, no. 4, 2010, doi: 10.1016/j.ibmb.2010.02.010.
- [19] Z. Shao and F. Vollrath, "Surprising strength of silkworm silk," *Nature*, vol. 418, no. 6899, 2002, doi: 10.1038/418741a.
- [20] S. Chen, M. Liu, H. Huang, L. Cheng, and H. P. Zhao, "Mechanical properties of Bombyx mori silkworm silk fibre and its corresponding silk fibroin filament: A comparative study," *Materials and Design*, vol. 181, 2019, doi: 10.1016/j.matdes.2019.108077.
- [21] H. Y. Cheung, K. T. Lau, M. P. Ho, and A. Mosallam, "Study on the mechanical properties of different silkworm silk fibers," *Journal of Composite Materials*, vol. 43, no. 22, 2009, doi: 10.1177/0021998309345347.
- [22] M. C. Arango, Y. Montoya, M. S. Peresin, J. Bustamante, and C. Álvarez-López, "Silk sericin as a biomaterial for tissue engineering: a review," *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol. 70, no. 16, 2021, doi: 10.1080/00914037.2020.1785454.
- [23] D. N. Rockwood, R. C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M. L. Lovett, and D. L. Kaplan, "Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin," *Nature Protocols*, vol. 6, no. 10, 2011, doi: 10.1038/nprot.2011.379.
- [24] G. H. Altman *et al.*, "Silk-based biomaterials," *Biomaterials*, vol. 24, no. 3, 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(02)00353-8.
- [25] Y. Cao and B. Wang, "Biodegradation of silk biomaterials," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 10, no. 4, 2009. doi: 10.3390/ijms10041514.
- [26] B. D. Lawrence, M. Cronin-Golomb, I. Georgakoudi, D. L. Kaplan, and F. G. Omenetto, "Bioactive silk protein biomaterial systems for optical devices," *Biomacromolecules*, vol. 9, no. 4, 2008, doi: 10.1021/bm701235f.
- [27] G. Guidetti, Y. Wang, and F. G. Omenetto, "Active optics with silk," *Nanophotonics*, vol. 10, no. 1, 2020, doi: 10.1515/nanoph-2020-0358.
- [28] R. F. P. Pereira, M. M. Silva, and V. de Zea Bermudez, "Bombyx mori Silk Fibers: An Outstanding Family of Materials," *Macromolecular Materials and Engineering*, vol. 300, no. 12, 2015. doi: 10.1002/mame.201400276.
- [29] T. M. Muffly, A. P. Tizzano, and M. D. Walters, "The history and evolution of sutures in pelvic surgery," *Journal of the Royal Society of Medicine*, vol. 104, no. 3, 2011. doi: 10.1258/jrsm.2010.100243.
- [30] I. L. Good, J. M. Kenoyer, and R. H. Meadow, "New evidence for early silk in the Indus civilization," *Archaeometry*, vol. 51, no. 3, 2009, doi: 10.1111/j.1475-4754.2008.00454.x.
- [31] W. Sun, D. A. Gregory, M. A. Tomeh, and X. Zhao, "Silk fibroin as a functional biomaterial for tissue engineering," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 3, 2021, doi: 10.3390/ijms22031499.
- [32] N. Kasoju and U. Bora, "Silk fibroin in tissue engineering," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 1, no. 4, 2012, doi: 10.1002/adhm.201200097.

- [33] S. B. Levy and M. Bonnie, "Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses," *Nature Medicine*, vol. 10, no. 12S. 2004. doi: 10.1038/nm1145.
- [34] T. B. Aigner, E. DeSimone, and T. Scheibel, "Biomedical Applications of Recombinant Silk-Based Materials," *Advanced Materials*, vol. 30, no. 19. 2018. doi: 10.1002/adma.201704636.
- [35] M. Vidya and S. Rajagopal, "Silk Fibroin: A Promising Tool for Wound Healing and Skin Regeneration," *International Journal of Polymer Science*, vol. 2021. 2021. doi: 10.1155/2021/9069924.
- [36] A. Sugihara *et al.*, "Promotive effects of a silk film on epidermal recovery from full-thickness skin wounds (44552)," *Experimental Biology and Medicine*, vol. 225, no. 1, 2000, doi: 10.1046/j.1525-1373.2000.22507.x.
- [37] R. Arthe, D. Arivuoli, and V. Ravi, "Preparation and characterization of bioactive silk fibroin/paramylon blend films for chronic wound healing," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 154, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.010.
- [38] M. L. Gulrajani, "Sericin: A bio-molecule of value," *Indian Silk*, vol. 45, no. 2, 2006.
- [39] C. Fabiani, M. Pizzichini, M. Spadoni, and G. Zeddit, "Treatment of waste water from silk degumming processes for protein recovery and water reuse," *Desalination*, vol. 105, no. 1–2, 1996, doi: 10.1016/0011-9164(96)00050-1.
- [40] L. Lamboni, M. Gauthier, G. Yang, and Q. Wang, "Silk sericin: A versatile material for tissue engineering and drug delivery," *Biotechnology Advances*, vol. 33, no. 8. 2015. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.10.014.
- [41] G. Subramanian, *Bioseparation and bioprocessing*. 2008. doi: 10.1002/9783527619641.
- [42] X. Chen, W. Li, Z. Shao, W. Zhong, and T. Yu, "Separation of alcohol-water mixture by pervaporation through a novel natural polymer blend membrane-chitosan/silk fibroin blend membrane," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 73, no. 6, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-4628(19990808)73:6<975::AID-APP15>3.0.CO;2-#.
- [43] H. TOSHIHIRO and N. SHIGERU, "US4820418A Water-alcohol separating membrane and method for separation of water and alcohol by the use thereof," *Pat. US*, 1989.
- [44] V. Chigrinov, J. Sun, and X. Wang, "Photoaligning and photopatterning: New LC technology," *Crystals*, vol. 10, no. 4. 2020. doi: 10.3390/cryst10040323.
- [45] Z. Zhou *et al.*, "Liquid crystal Pancharatnam-Berry optical elements," 2019. doi: 10.1117/12.2528086.
- [46] T. KOZO, "JP11070160A OCCLUSIVE DRESSING CONSISTING ESSENTIALLY OF SILK FIBROIN AND SILK SERICIN AND ITS PRODUCTION," *Pat JP*, 1999.
- [47] N. Minoura, S. -I Aiba, Y. Gotoh, M. Tsukada, and Y. Imai, "Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein matrices," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 29, no. 10, 1995, doi: 10.1002/jbm.820291008.
- [48] M. MARIE, "JP6166850A METHOD FOR SOLUBILIZING AND MOLDING COCOON SILK, ARTIFICIAL ORGAN MADE OF COCOON SILK, AND MEDICAL ELEMENT MADE OF COCOON SILK," *Pat. JP*, 1994.

- [49] C. G C, K. M S, and S. A C, "Sericin, a Versatile Protein from Silkworm - Biomedical Applications," *Shanlax International Journal of Arts, Science and Humanities*, vol. 8, no. S1-Feb, 2021, doi: 10.34293/sijash.v8is1-feb.3924.
- [50] R. M. Reddy and G. V. Prasad, "Silk-The Prospective and Compatible Bio-Material for Advanced Functional Applications," *Trends in Applied Sciences Research*, vol. 6, no. 1, 2011, doi: 10.3923/tasr.2011.89.95.
- [51] E. I. Oduah, R. J. Linhardt, and S. T. Sharfstein, "Heparin: Past, present, and future," *Pharmaceuticals*, vol. 9, no. 3. 2016. doi: 10.3390/ph9030038.
- [52] N. Kato, S. Sato, A. Yamanaka, H. Yamada, N. Fuwa, and M. Nomura, "Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity," *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 62, no. 1, 1998, doi: 10.1271/bbb.62.145.
- [53] W. SOUHEE and S. MITSURU, "JP6017372A Synthetic fiber improved in hygroscopicity," *Pat. JP*, 1994.
- [54] Y. HIDEYUKI and M. AKIRA, "JP6017373A SYNTHETIC FIBER WOVEN OR KNITTED FABRIC IMPROVED IN HYGROSCOPICITY," *Pat. JP*, 1994.
- [55] Y. HIDEYUKI and N. MASAKAZU, "JP10001872A FIBROUS ARTICLE FOR CONTACT WITH SKIN," *Pat. JP*, 1998.
- [56] U. KAZUYUKI and M. MANABU, "JP2000169595A Rubber molding having durable skincare property," *Pat. JP*, 2000.
- [57] M. N. Padamwar, A. P. Pawar, A. v Daithankar, and K. R. Mahadik, "Silk sericin as a moisturizer: an in vivo study," *Journal of Cosmetic Dermatology*, vol. 4, no. 4, 2005, doi: 10.1111/j.1473-2165.2005.00200.x.
- [58] R. J. Patel and M. K. Modasiya, "Sericin: Pharmaceutical Applications," *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, vol. 2, no. 3, 2011.
- [59] T. L. da Silva, J. M. M. Vidart, M. G. C. da Silva, M. L. Gimenes, and M. G. A. Vieira, "Alginate and Sericin: Environmental and Pharmaceutical Applications," in *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides*, 2017. doi: 10.5772/65257.
- [60] D. H. Reneker and A. L. Yarin, "Electrospinning jets and polymer nanofibers," *Polymer*, vol. 49, no. 10. 2008. doi: 10.1016/j.polymer.2008.02.002.
- [61] R. Amna, K. Ali, M. I. Malik, and S. I. Shamsah, "A brief review of electrospinning of polymer nanofibers: History and main applications," *Journal of New Materials for Electrochemical Systems*, vol. 23, no. 3, 2020, doi: 10.14447/jnmes.v23i3.a01.
- [62] Z. M. Huang, Y. Z. Zhang, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites," *Composites Science and Technology*, vol. 63, no. 15, 2003, doi: 10.1016/S0266-3538(03)00178-7.
- [63] L. Persano, A. Camposo, C. Tekmen, and D. Pisignano, "Industrial upscaling of electrospinning and applications of polymer nanofibers: A review," *Macromolecular Materials and Engineering*, vol. 298, no. 5. 2013. doi: 10.1002/mame.201200290.
- [64] M. Toriello, M. Afsari, H. K. Shon, and L. D. Tijing, "Progress on the fabrication and application of electrospun nanofiber composites," *Membranes*, vol. 10, no. 9. 2020. doi: 10.3390/membranes10090204.

- [65] J. Xue, T. Wu, Y. Dai, and Y. Xia, "Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications," *Chemical Reviews*, vol. 119, no. 8, 2019. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00593.
- [66] J. M. Deitzel, J. D. Kleinmeyer, J. K. Hirvonen, and N. C. Beck Tan, "Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers," *Polymer (Guildf)*, vol. 42, no. 19, 2001, doi: 10.1016/S0032-3861(01)00336-6.
- [67] B. Heimbach, L. Yu, and M. Wei, "In vitro behavior of silk fibroin-based composite resorbable bone fixation devices," *Materialia (Oxf)*, vol. 9, 2020, doi: 10.1016/j.mtla.2020.100587.
- [68] Y. Choi, S. Y. Cho, D. J. Park, H. H. Park, S. Heo, and H. J. Jin, "Silk fibroin particles as templates for mineralization of calcium-deficient hydroxyapatite.," *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 100, no. 8, 2012, doi: 10.1002/jbm.b.32766.
- [69] L. Guan *et al.*, "Chitosan-functionalized silk fibroin 3D scaffold for keratocyte culture.," *J Mol Histol*, vol. 44, no. 5, 2013, doi: 10.1007/s10735-013-9508-5.
- [70] L. Wang *et al.*, "Fabrication and characterization of strontium-hydroxyapatite/silk fibroin biocomposite nanospheres for bone-tissue engineering applications," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 142, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.107.
- [71] M. M. Sayed *et al.*, "Enhancing mechanical and biodegradation properties of polyvinyl alcohol/silk fibroin nanofibers composite patches for Cardiac Tissue Engineering," *Materials Letters*, vol. 255, 2019, doi: 10.1016/j.matlet.2019.126510.
- [72] H. W. Ju *et al.*, "Wound healing effect of electrospun silk fibroin nanomatrix in burn-model," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 85, 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.12.055.
- [73] N. Sasithorn and L. Martinová, "EFFECT OF CALCIUM CHLORIDE ON ELECTROSPINNING OF SILK FIBROIN NANOFIBRES," 2012.
- [74] M. Biagiotti *et al.*, "Electrospun Silk Fibroin Scaffolds for Tissue Regeneration: Chemical, Structural, and Toxicological Implications of the Formic Acid-Silk Fibroin Interaction," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 10, 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.833157.
- [75] S. Sukigara, M. Gandhi, J. Ayutsede, M. Micklus, and F. Ko, "Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning - Part 1: Processing parameters and geometric properties," *Polymer (Guildf)*, vol. 44, no. 19, 2003, doi: 10.1016/S0032-3861(03)00532-9.
- [76] R. Jaeger, H. Schönherr, and G. J. Vancso, "Chain packing in electro-spun poly(ethylene oxide) visualized by atomic force microscopy," *Macromolecules*, vol. 29, no. 23, 1996, doi: 10.1021/ma9610673.
- [77] P. U. Kadakia, E. A. Growney Kalaf, A. J. Dunn, L. P. Shornick, and S. A. Sell, "Comparison of silk fibroin electrospun scaffolds with poloxamer and honey additives for burn wound applications," *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, vol. 33, no. 1, 2018, doi: 10.1177/0883911517710664.
- [78] E. Ko *et al.*, "Electrospun Silk Fibroin Nanofibrous Scaffolds with Two-Stage Hydroxyapatite Functionalization for Enhancing the Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells," *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 10, no. 9, 2018. doi: 10.1021/acsami.7b03328.

- [79] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique," *Biotechnology Advances*, vol. 28, no. 3, 2010. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
- [80] S. A. Theron, E. Zussman, and A. L. Yarin, "Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions," *Polymer (Guildf)*, vol. 45, no. 6, 2004, doi: 10.1016/j.polymer.2004.01.024.
- [81] V. Jacobs, R. D. Anandjiwala, and M. Maaza, "The influence of electrospinning parameters on the structural morphology and diameter of electrospun nanofibers," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 115, no. 5, 2010, doi: 10.1002/app.31396.
- [82] S. A. Theron, A. L. Yarin, E. Zussman, and E. Kroll, "Multiple jets in electrospinning: Experiment and modeling," *Polymer (Guildf)*, vol. 46, no. 9, 2005, doi: 10.1016/j.polymer.2005.01.054.
- [83] T. Hashimoto, K. Kojima, and Y. Tamada, "Gene expression advances skin reconstruction and wound repair better on silk fibroin-based materials than on collagen-based materials," *Materialia (Oxf)*, vol. 9, 2020, doi: 10.1016/j.mtla.2019.100519.
- [84] A. Bucciarelli, G. Greco, I. Corridori, N. M. Pugno, and A. Motta, "A Design of Experiment Rational Optimization of the Degumming Process and Its Impact on the Silk Fibroin Properties," *ACS Biomaterials Science and Engineering*, vol. 7, no. 4, 2021, doi: 10.1021/acsbiomaterials.0c01657.
- [85] M. Suga *et al.*, "Recent progress in scanning electron microscopy for the characterization of fine structural details of nano materials," *Progress in Solid State Chemistry*, vol. 42, no. 1–2, 2014. doi: 10.1016/j.progsolidstchem.2014.02.001.
- [86] A. D. Elliott, "Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices," *Current Protocols in Cytometry*, vol. 92, no. 1, 2020, doi: 10.1002/cpcy.68.
- [87] A. H. P. Chan *et al.*, "Altered processing enhances the efficacy of small-diameter silk fibroin vascular grafts," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-53972-y.
- [88] K. A. G. Katsogiannis, G. T. Vladislavljević, and S. Georgiadou, "Porous electrospun polycaprolactone (PCL) fibres by phase separation," *European Polymer Journal*, vol. 69, 2015, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2015.01.028.
- [89] S. Koombhongse, W. Liu, and D. H. Reneker, "Flat polymer ribbons and other shapes by electrospinning," *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, vol. 39, no. 21, 2001, doi: 10.1002/polb.10015.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMF	<i>Bombyx mori</i> fibroin
SF	Hedvábný fibroin
PEG	Polyethylenglykol
PEO	Polyethylenoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
PCL	Polykaprolaktam
HFIP	Hexafluorpropanol
FA	kyselina mravenčí
FITCD	fluorescein isothiokyanát dextran
TEWL	transepidermální ztráta vody
kV	kilovolt
kDa	kilodalton
AMK	aminokyselina/aminokyseliny
Ser1	3-fosfoserin aminotransferáza
GPa	gigapascal
nm	nanometr
μm	mikrometr
cm	centimetr
g	gram
m	metr

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 Schéma hedvábné žlázy [4].....</i>	13
<i>Obr. 2 Oblast rány ošetřená různými obvazovými materiály</i>	18
<i>Obr. 3 Electrospinning</i>	25
<i>Obr. 4 AFM obrázek elektrospinnovaných vláken z materiálu PEO [72].....</i>	26
<i>Obr. 5 Zařízení pro electrospinning</i>	31
<i>Obr. 6 SEM snímky fibroinových vláken na různých podkladech:</i>	32
<i>Obr. 7 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku o koncentraci 8,5 hm. %.....</i>	35
<i>Obr. 8 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku o koncentraci 10,7 hm. %.....</i>	35
<i>Obr. 9 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku o koncentraci 13 hm. %.....</i>	36
<i>Obr. 10 SEM snímek fibroinových vláken při vzdálenosti elektrody od kolektoru 9 cm</i>	37
<i>Obr. 11 SEM snímek fibroinových vláken při vzdálenosti elektrody od kolektoru 11 cm ...</i>	38
<i>Obr. 12 SEM snímek fibroinových vláken při vzdálenosti elektrody od kolektoru 13 cm ...</i>	38
<i>Obr. 13 SEM snímky fibroinových vláken při různé době zvlákňování</i>	40
<i>Obr. 14 Srovnání fotek naspinnovaných fibroinových vláken s HFIP</i>	41
<i>Obr. 15 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku o koncentraci 1,5 hm. %.....</i>	42
<i>Obr. 16 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku o koncentraci 2,1 hm. %.....</i>	42
<i>Obr. 17 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku o koncentraci 3 hm. %.....</i>	43
<i>Obr. 18 Srovnání fotek naspinnovaných fibroinových vláken s HFIP a DMSO</i>	44
<i>Obr. 19 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku s DMSO o koncentraci BMF 1,5 hm. %</i>	45
<i>Obr. 20 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku s DMSO o koncentraci BMF 2,1 hm. %</i>	45
<i>Obr. 21 SEM snímky fibroinových vláken z roztoku s DMSO o koncentraci BMF 3 hm. %</i>	46
<i>Obr. 22 Srovnání fotek naspinnovaných fibroinových vláken z roztoku s HFIP, DMSO a fluoresceinem</i>	47
<i>Obr. 23 Snímky fibroinových vláken z roztoku s F-DMSO o koncentraci BMF 1,5 hm. %</i>	48
<i>Obr. 24 Snímky fibroinových vláken z roztoku s F-DMSO o koncentraci BMF 2,1 hm. %</i>	49
<i>Obr. 25 Snímky fibroinových vláken z roztoku s F-DMSO o koncentraci BMF 3 hm. % ...</i>	50

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Parametry přípravy fibroinových vláken o různých koncentracích a srovnání jejich průměru	34
Tabulka 2 Parametry přípravy fibroinových vláken o různých koncentracích a srovnání jejich průměru	37
Tabulka 3 Parametry přípravy fibroinových vláken o různých koncentracích a srovnání jejich průměru	39
Tabulka 4 Parametry přípravy fibroinových vláken o různých koncentracích a srovnání jejich průměru	41
Tabulka 5 Složení roztoků fibroinu s HFIP a průměry vzniklých vláken	44
Tabulka 6 Složení roztoků s fluoresceinem a průměry vzniklých vláken	47