

Teze disertační práce

Příprava strukturovaných proteinových povrchů

Preparation of structured protein surfaces

Autor: Ing. Karolína Kocourková, Ph.D.

Studijní program: Chemie a technologie materiálů P2808

Studijní obor: Technologie makromolekulárních látek 2808V006

Školitel: doc. Ing. Antonín Minařík, Ph.D.
Konzultant: doc. RNDr. Martin Humeník, Ph.D.

Oponenti: doc. MUDr. Marek Joukal, Ph.D.
prof. Ing. Pavel Mokrejš, Ph.D.
doc. Dr. Ing. Vladimír Pavlínek

Zlín, prosinec 2023

© Karolína Kocourková

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis Summary**.
Publikace byla vydána v roce 2024

Klíčová slova: *polymery, proteiny, fibroin, povrchová textura, texturované filmy, regenerace tkáně, buněčná proliferace*

Key words: *polymers, proteins, fibroin, surface texture, textured films, tissue regeneration, cell proliferation*

Plná verze disertační práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

ISBN 978-80-7678-223-5

Abstrakt

Práce se zaměřuje na přípravu strukturovaných proteinových povrchů pro aplikace v tkáňovém inženýrství. Hlavním cílem bylo vytvořit konstrukce na proteinové bázi s různými povrchovými texturami pomocí odlévání v kombinaci s fázovou separací a technikami 3D tisku a electrospinningu. Studie zohledňuje význam proteinů a dalších vybraných polymerní systémů v tkáňovém inženýrství a jejich klíčovou roli při interakci buněk s povrchem. V rámci experimentální činnosti byly připraveny samonosné hierarchicky texturované filmy pomocí fázové separace, přičemž byl prokázán pozitivní vliv připravených povrchů na proliferaci vybraných typů buněk umožňující jejich potenciální aplikaci v oblasti hojení ran. Pro zpracování metodou 3D tisku byly připravovány směsi fibroinu s polykaprolaktonem. V rámci této oblasti byl studován vliv přítomnosti fibroinu na mikro- a nanostrukturu polykaprolaktonu. Na připravených vlákněných konstruktech byla sledována buněčná proliferace a kontaktní vedení buněk s možným přesahem do neuroregenerace.

Abstract

The work focuses on the preparation of structured protein surfaces for tissue engineering applications. The main objective was to create protein-based structures with different surface textures using casting in combination with phase separation and 3D printing and electrospinning techniques. The study takes into account the importance of proteins and other selected polymer systems in tissue engineering and their key role in cell-surface interactions. As part of the experimental work, self-supporting hierarchically textured films were prepared using phase separation, demonstrating a positive impact of the prepared surfaces on the proliferation of selected cell types, enabling their potential application in wound healing. Mixtures of fibroin and polycaprolactone were prepared for processing using 3D printing, and the influence of the presence of fibroin on the micro- and nanostructure of polycaprolactone was studied in this area. Cell proliferation and cell contact guidance on the prepared fiber-based constructs were monitored, with potential implications for neuroregeneration.

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	7
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	9
4. TEORETICKÝ RÁMEC	10
4.1 VLIV POVRCHOVÝCH VLASTNOSTÍ NA CHOVÁNÍ BUNĚK.....	10
4.1.1 <i>Proteinová adsorpce.....</i>	<i>10</i>
4.1.2 <i>Morfologie a topografické vlastnosti</i>	<i>11</i>
4.1.3 <i>Chemické a fyzikální vlastnosti povrchu</i>	<i>12</i>
4.2 ROLE PROTEINŮ V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ.....	13
4.2.1 <i>Protein jako nosný substrát</i>	<i>13</i>
4.2.2 <i>Růstové faktory</i>	<i>13</i>
4.2.3 <i>Adhezivní proteiny.....</i>	<i>13</i>
4.2.4 <i>Rekombinantní proteiny.....</i>	<i>13</i>
4.3 HEDVÁBNÉ PROTEINY	14
4.3.1 <i>Makromolekulární struktura</i>	<i>14</i>
4.3.2 <i>Biokompatibilita a biodegradabilita</i>	<i>15</i>
4.4 ZPRACOVÁNÍ FIBROINU PRO ÚČELY TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ.....	15
4.4.1 <i>Texturované hedvábné filmy.....</i>	<i>15</i>
4.4.2 <i>Tištěné 3D struktury</i>	<i>15</i>
4.4.3 <i>Hedvábná vlákna</i>	<i>16</i>
4.4.4 <i>Užití hedvábí při hojení ran</i>	<i>16</i>
4.4.5 <i>Regenerace nervových vláken pomocí hedvábí.....</i>	<i>17</i>
5. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ	17
5.1 FÁZOVÁ SEPARACE.....	17
5.2 3D TISK.....	17
5.3 ELECTROSPINNING	18
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
6.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A TECHNOLOGIE.....	18
6.1.1 <i>Příprava a purifikace fibroinu</i>	<i>18</i>
6.1.2 <i>Příprava fibroinových filmů</i>	<i>18</i>
6.1.3 <i>Texturizace pomocí sekvenovaného dávkování.....</i>	<i>19</i>
6.1.4 <i>Statická texturizace.....</i>	<i>19</i>
6.1.5 <i>Selektivní značení povrchu</i>	<i>19</i>
6.1.6 <i>3D tisk směsí hedvábí – PCL.....</i>	<i>19</i>
6.1.7 <i>Příprava hedvábných vláken</i>	<i>20</i>
6.1.8 <i>Profilometrie.....</i>	<i>20</i>

6.1.9	<i>Mikroskopie atomárních sil</i>	20
6.1.10	<i>Skenovací elektronová mikroskopie</i>	20
6.1.11	<i>FTIR spektroskopie</i>	20
6.1.12	<i>Buněčná adheze a proliferace</i>	20
7.	VÝSLEDKY	21
7.1	PŘÍPRAVA TEXTUROVANÝCH FILMŮ Z HEDVÁBNÉHO PROTEINU	21
7.1.1	<i>Sekvenované dávkování za rotace</i>	21
7.1.2	<i>Statická modifikace</i>	26
7.1.3	<i>Buněčná proliferace na fibroinových filmech</i>	27
7.1.4	<i>Selektivní značení hedvábných filmů bioaktivními molekulami</i>	28
7.2	SAMO-ORGANIZACE MAKROMOLEKULÁRNÍCH ŘETĚZCŮ	29
7.1	3D TISK SMĚSI HEDVÁBÍ A POLYKAPROLAKTONU	30
7.2	PŘÍPRAVA FILMŮ ZE SMĚSÍ HEDVÁBNÉHO PROTEINU A PCL.....	31
7.1	PŘÍPRAVA VLÁKENNÝCH STRUKTUR NA BÁZI HEDVÁBNÉHO PROTEINU.....	33
8.	PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI	35
9.	ZÁVĚR	35
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	38
	SEZNAM OBRÁZKŮ	52
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	54
	PUBLIKAČNÍ AKTIVITY AUTORA	55
	ODBORNÝ ŽIVOTOPIS AUTORA	57

1. ÚVOD

V posledních desetiletích představuje tkáňové inženýrství nadějný přístup k regeneraci a obnově poškozených tkání a orgánů. Jednou z klíčových oblastí v tomto multidisciplinárním oboru je využití proteinů, které hrají zcela zásadní roli při interakci buněk s jejich okolím. Studium vlivu vlastností proteinových povrchů na chování buněk a adhezi proteinů otevírá nové perspektivy pro vývoj pokročilých materiálů a technik v tkáňovém inženýrství.

V živém organismu se buňky nachází v prostředí zvaném extracelulární matrix (ECM). Tato hmota je tvořena 3 hlavními složkami – strukturními proteiny (kolagen, elastin), komplexy proteinů a polysacharidů (proteoglykany) a adhezivními glykoproteiny (fibronectin a laminin). ECM poskytuje buňkám strukturní podporu, plní funkci média pro difúzi živin, přenos signálů nebo proudění kyslíku a její přesné složení závisí na typu tkáně a její funkci. Tkáňová náhrada vyvinutá pro účely regenerativní medicíny musí co nejvěrněji toto prostředí simulovat jak složením, tak architekturou, aby buňkám poskytla požadovanou mechanickou podporu, vyhovující topografii povrchu a stimulující biochemické prostředí. [1–3]

Tkáňová náhrada neboli scaffold je terapeutický prostředek sloužící k regeneraci nebo náhradě poškozené tkáně. Materiály vhodné pro výrobu scaffoldů a dalších prostředků přicházejících do kontaktu s buňkami a živou tkání se souhrnně označují jako biomateriály. Mohou být jak anorganického, tak organického původu a jejich hlavní charakteristikou je vynikající snášenlivost živým organismem bez vyvolávání imunitní odezvy. Delší historii užívání v oblasti regenerativní medicíny za sebou mají materiály anorganické (kovy a biokeramika), aplikované zejména v ortopedii či v ortodoncii. V těchto odvětvích dochází často k úplné náhradě tkáně cizím materiálem, přičemž je žádoucí, aby materiál v organismu nedegradoval. Komplikací kovových a keramických materiálů je zejména koroze v organismu. [4,5]

K anorganickým biomateriálům se záhy přidaly syntetické polymery, které nastínily nové směry v tkáňovém inženýrství. Kromě kombinování polymerů s kovy při výrobě kloubních hlavic [6] nebo s biokeramikou ve formě kompozitních dentálních pryskyřic [7] začaly být vyvíjeny čistě polymerní biomateriály ve formě hydrogelů [8] nebo vstřebatelných chirurgických nití. V této souvislosti se začaly zkoumat nové charakteristiky biomateriálů jako je biodegradabilita nebo bioaktivita. [9] Biodegradabilita neboli biologické odbourávání je stěžejní vlastností implantovaného zařízení, které má být po čase nahrazeno regenerovanou tkání. [10] Bioaktivitou se rozumí přidaná hodnota materiálu ve smyslu pozitivního působení na okolí nebo specifická stimulace buněčného růstu. Právě bioaktivita biomateriálu souvisí s interakcí povrchu materiálu a okolním prostředím prostřednictvím proteinů. [11]

Tato disertační práce se zaměřuje na využití proteinů v oblasti tkáňového inženýrství a studium jejich vlivu na chování buněk. Konkrétně se zabývá

přípravou konstrukcí na proteinové bázi s důrazem na hedvábný protein fibroin, přičemž je sledován vliv povrchové textury na chování buněk. Hedvábní je přírodní protein, který se vyznačuje unikátními vlastnostmi, jako je vysoká mechanická pevnost, biokompatibilita a biodegradabilita. Jsou studovány vlastnosti fibroinu, možnosti jeho zpracování pro účely tkáňového inženýrství se zaměřením na oblast hojení ran a neuroregeneraci. Literární přehled shrnuje výzkum a experimenty související s využitím fibroinu v tkáňovém inženýrství. Zabývá se studiem vlivu povrchových vlastností materiálů na chování buněk a adhezi proteinů.

V rámci této studie byla prováděna optimalizace metod zpracování fibroinu a dalších vybraných polymerních systémů do různých morfologií pro odlišné aplikační oblasti, a to odléváním filmů a přípravou specifických hierarchických povrchových textur pomocí fázové separace, elektrospinningem, působením samoorganizovaných toků kapaliny a 3D tiskem. V rámci posledního směru byly připravovány směsi hedvábného proteinu se syntetickým polymerem polykaprolaktonem (PCL) jakožto polymerem s vhodnými vlastnostmi pro biomedicínské aplikace a dobrou zpracovatelností. Byl studován vliv přítomnosti fibroinu na strukturu PCL s cílem vyvinout stabilní konstrukci s aktivními místy pro možné povrchové modifikace.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Výhodou polymerních materiálů je bezesporu jejich zpracovatelnost do celé řady morfologií a relativně snadné řízení mechanických a strukturních vlastností. [12] Právě polymerní materiály představují vhodnou matici pro tvorbu prostředí podobného ECM. V posledních letech se pro tyto účely intenzivně rozvíjí oblast zpracování polymerů přírodního původu. [13] Složením se biomateriály přírodního původu podobají přirozeným složkám organismu, což má zásadní vliv na kladné přijetí organismem a snadné odbourávání. Mezi významné materiály pro tkáňové inženýrství řadíme například kolagen, který je sám o sobě složkou ECM, podobně jako kyselina hyaluronová. Dále je to chitosan nebo fibrin. [14] Častým problémem scaffoldů složených z přírodních materiálů jsou jejich nedostatečné mechanické vlastnosti nebo nízká strukturní stabilita a rychlá degradace ve fyziologickém prostředí. Pro dosažení optimálních vlastností jsou vyvíjeny různé možnosti síťování nebo připravovány kompozity se syntetickými materiály. [15,16]

Další cestou je využití speciálních přírodních materiálů, jako jsou hedvábné a pavoučí proteiny. Tyto materiály v souvislosti se svou funkcí v přírodě disponují výjimečnými mechanickými vlastnostmi. [17,18] Jejich degradace ve fyziologickém prostředí je relativně pomalá a do jisté míry lze její rychlost řídit. [19]

Hedvábní produkované bourcem morušovým je v textilním odvětví prastarý materiál a v oblasti medicíny se desítky let užívá k šití ran. [20] V současné době jsou však rozvíjeny jeho pokročilé aplikace, např. při hojení ran jak na kůži, tak

na vnitřních orgánech, dále v oblasti ortopedie (regenerace kostní tkáně) nebo při podpoře či zpevnění vnitřních orgánů ve formě prsních implantátů a inkontinenčních pomůcek. [21,22]

Hedvábný protein lze zpracovávat do celé řady struktur lyofilizací, fázově separačními technikami, elektrostatickým zvlákněním, nebo 3D tiskem. [17,23–25]

Lyofilizace je poměrně jednoduchá technika pro výrobu 3D porézních fibroinových scaffoldů. Lyofilizací lze připravit jak porézní filmy, [26] tak mohutnější morfologie obsahující samoorganizovaná fibroinová nanovlákná. [27,28] Na výslednou strukturu má vliv rychlost zakoncentrování roztoku před lyofilizací, dále molekulová hmotnost fibroinu nebo teplota vymrazování. [29] Výslednou strukturu a mechanické či biologické vlastnosti výsledného porézního scaffoldu lze dále ovlivnit přidávkem jiného biokompatibilního materiálu. [30]

Za účelem zlepšení buněčné adheze nebo proliferace, ale také pro studium změny optických vlastností jsou vyvíjeny texturované hedvábné filmy. Nejčastějším způsobem přípravy povrchového vzoru na hedvábném filmu je přenesení tohoto vzoru ze šablony tvořené z polydimethylsulfoxidu (PDMS). [31–35].

Pomocí elektrostatického zvlákněvání lze připravit netkané fibrilární matrice o průměru vláken od desítek nanometrů po mikrometry. Vhodnými rozpouštědly pro zvlákněvání jsou kyselina mravenčí, [36–38] hexafluoroisopropanol (HFIP) [39–42] nebo voda. [43]

V závislosti na požadované aplikaci se fibroin pro zvlákněvání kombinuje s řadou dalších materiálů za účelem úpravy mechanických vlastností, zpracovatelnosti nebo biokompatibility. Pro zlepšení zvláknitelnosti se fibroin mísí s polyethylenglykolem (PEG), resp. polyethylenoxidem (PEO). Vodný roztok fibroinu s PEO se používá například při vývoji nanomateriálů pro léčbu popálenin. [44] Dále se z fibroinu v kombinaci s PEO elektrostatickým zvlákněním připravují membrány s antibakteriálními účinky. [45]

Kolagen se přidává k fibroinu zejména pro podporu buněčné adheze a genové exprese. [46,47] Z vodného roztoku kolagenu a fibroinu byly pomocí elektrostatického zvlákněvání připravovány například vaskulární štěpy. [48]

Dalším materiálem vhodným pro kombinování s fibroinem je chitosan. [49,50] Chitosan je pro aplikace v tkáňovém inženýrství zpracováván například do formy filmů, ale sám o sobě je obtížně zvláknitelný. Tento limit je překonán právě kombinací s fibroinem. Zároveň chitosan snižuje křehkost fibroinových vláken. Nanovláknenné scaffoldy na bázi chitosanu a fibroinu jsou cíleny pro aplikace při hojení ran nebo náhradách kostní tkáně. [51] Dále je tato kombinace vhodná pro tvorbu speciálních nano-náplastí, u kterých byl pozorován pozitivní účinek na remodelaci tkáně po infarktu myokardu. [52]

Elektrostatické zvlákňování fibroinu lze provést dále ze směsi s polykaprolaktonem. [53,54] Kombinace těchto dvou materiálů zlepšuje buněčnou adhezi k povrchu nanovláknenného substrátu [55], optimalizuje mechanické a biologické vlastnosti [56] a přítomnost polykaprolaktanu dále prodlužuje degradační čas scaffoldu. [57]

Nevýhodou výše zmíněných technologií je nemožnost přesně řídit a definovat vznikající strukturu. Proto se nejen v oblasti tkáňového inženýrství dostávají do popředí zpracovatelské technologie založené na aditivní výrobě neboli vytváření 3D objektů podle digitálního návrhu kladením materiálu vrstva po vrstvě.

3D tisk fibroinu komplikuje transformace sekundární struktury a předčasná krystalizace materiálu v průběhu tisku indukovaná mechanickým namáháním. Proto inkousty na bázi hedvábného proteinu potřebují aditivum zpravidla zlepšující zpracovatelské vlastnosti. [58,59] Častěji se lze setkat se situací, kdy je minoritní podíl fibroinu přidáván ke konvenčním syntetickým nebo přírodním materiálům pro zlepšení mechanických vlastností a stability textury. [60] Tištěné scaffoldy simulující chrupavku jsou například vyvíjeny z želatinových hydrogelů obohacených o hedvábný fibroin, který zde plní funkci strukturní matrice. [61]

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Na poli tkáňového inženýrství jsou v současné době hedvábné proteiny v centru pozornosti nejen pro své unikátní vlastnosti, ale také díky novým výzvám v možnostech jejich zpracování. Rozvoj metod 3D tisku spolu s novými poznatky popisujícími přirozený zvlákňovací proces hedvábného proteinu umožňuje vývoj definovaných hedvábných 3D konstrukcí. Zde je však třeba překonat řadu překážek spojených se zpracovatelskými vlastnostmi hedvábného proteinu a se strukturními vlastnostmi vytištěného materiálu.

Cíle práce:

- Prostudovat možnosti mikroextruzního 3D tisku fibroinu.
- Připravit směsi hedvábného proteinu s polykaprolaktonem a prostudovat možnosti jejich zpracování metodou 3D tisku a elektrospinningu.
- Vyhodnotit vliv hedvábného proteinu na strukturu polykaprolaktanu.
- Prostudovat vliv změn sekundární struktury fibroinového proteinu na možnosti fázově-separační modifikace povrchu.
- Prostudovat vliv organizovaných toků kapaliny na změnu uspořádání sekundární struktury fibroinu a hyaluronanu.
- Otestovat chování buněk na nově připravených konstruktech na bázi proteinu a syntetického polymeru.

4. TEORETICKÝ RÁMEC

4.1 Vliv povrchových vlastností na chování buněk

Optimalizace „biorozhraní“ je klíčová pro vývoj tkáňových náhrad, senzorů, implantátů a obecně všech systémů určených pro interakce s biologickým prostředím. Povrchové vlastnosti materiálu hrají stěžejní roli při jeho interakci s biologickým prostředím. Geometrie povrchu, jeho chemické a fyzikální vlastnosti výrazně ovlivňují chování buněk, jako je buněčná adheze k povrchu, proliferace nebo diferenciací. [62]

4.1.1 Proteinová adsorpce

Na povrchu biomateriálu dochází po umístění do fyziologického prostředí k interakci s molekulami vody a v závislosti na charakteru povrchu k jejich adsorpci a hydrataci povrchu. [63] Následně dochází k adsorpci proteinů, které zprostředkovávají interakci mezi povrchem a buňkami. Tyto proteiny regulují chování buněk prostřednictvím signálních drah. Při kultivaci *in vitro* rovněž dochází k adsorpci proteinů ECM z kultivačního média obsahujícího sérum na povrch substrátu. Povrchové vlastnosti nosného materiálu mají vliv na uspořádání této proteinové vrstvy, přičemž tato její organizace, koncentrace, složení a konformace adsorbovaných proteinů určuje počáteční buněčnou odpověď. [64,65] Například již zmíněný fibronectin se může vyskytovat v konformaci globulární nebo lineární podle toho, zda adhezuje k hydrofobnímu nebo hydrofilnímu povrchu. [66,67]

Adsorpce proteinů zahrnuje nekovalentní interakce – hydrofobní a elektrostatické, vodíkové vazby a van der Waalsovy síly. [68,69] Kromě vlastností povrchu a prostředí je ovlivněna velikostí, strukturou a stabilitou adsorbovaných proteinů. Přednostně se k povrchu váží proteiny s větší mobilitou, které jsou následně nahrazeny proteiny s větší afinitou k povrchu. V případě proteinů krevního séra se tento jev nazývá jako Vromanův efekt. Vznikající proteinová vrstva se také v čase mění, mění se rovněž struktura adherovaných proteinů, čímž dochází ke změnám v biologické aktivitě. [70]

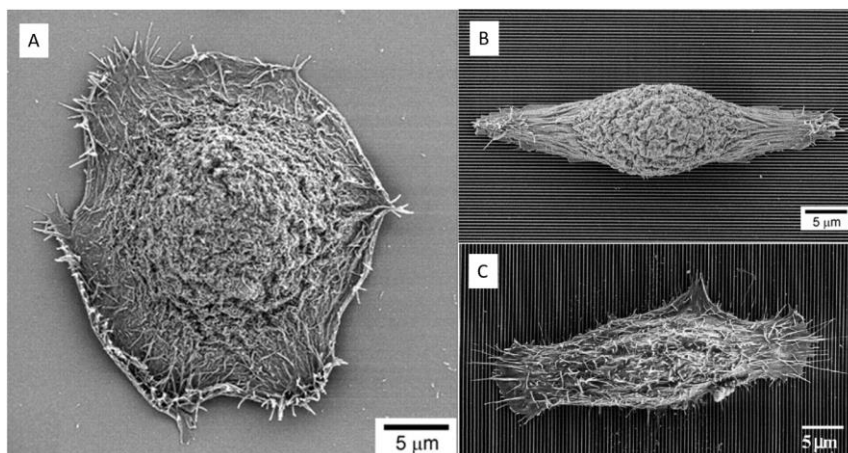
Nespecifická absorpce proteinů (i.e. fouling, biofouling) není založená na molekulární komplementaritě povrchu biomateriálu a buněk, ale na fyzikálně chemických vlastnostech a podmínkách prostředí (teplota, pH, biologické znečištění, topografie povrchu). [71,72]

Specifické interakce se uskutečňují mezi biomolekulami systému (například buněčnými receptory) a molekulami na povrchu nosného substrátu (například vazebné ligandy ECM, biologicky aktivní funkční skupiny na povrchu biomateriálu). Za specifické interakce buněk s povrchem jsou zodpovědné transmembránové proteiny integriny (tvořící již zmíněné fokální adheze), které jsou schopné rozeznat krátké peptidové sekvence přítomné v proteinech ECM nebo séra, jako je například tripeptid RGD (arginin-glycin-kyselina asparagová). [73]

4.1.2 Morfologie a topografické vlastnosti

Jedna z nejranějších zmínek o vlivu topografie na chování buněk pochází z roku 1912, kdy americký biolog R. G. Harrison položil základy vývoje kultivace živočišných tkání. Zabýval se mimo jiné studiem původu a vývoje nervového systému pomocí metod experimentální embryologie. Ve své studii pozoroval a popsal pohyblivost buněk umožněnou vláknitými pseudopodii a jejich variabilitu u různých typů buněk. Významné byly jeho experimenty s kultivací buněk na pavučí síti, kdy ukázal, že povrch má na růst buňky zásadní vliv a že specifické uspořádání pavučiny ovlivňuje tvar buněk, jejich organizaci a směr pohybu. [74] Na Harrisona navázal v roce 1945 P. A. Weiss, biolog zabývající se růstem buněk a jejich diferenciací, a to zejména v oblasti neurobiologie. Ve své studii použil pro růst buněk podél vzoru podkladu termín **kontaktní vedení**. [75]

Orientovaný růst a jev takzvaného kontaktního vedení buněk je stěžejní v aplikacích, kdy je orientace buněk rozhodující pro dosažení funkčního stavu tkáně (šlachy, nervy, rohovka). V současné době je studován na substrátech s drážkovaným vzorem o různých šířkách a rozestupech. [76] V několika studiích zabývajících se proliferací **epiteliálních buněk rohovky** na drážkovaných substrátech simulujících bazální membránu rohovky byl sledován výrazný vliv topografie povrchu a proteinů přítomných v kultivačním médiu na morfologii buněk. Obr. 1 znázorňuje morfologický rozdíl lidských epitheliálních buněk rohovky způsobený růstem na rozdílných podkladech. Zatímco na hladkém povrchu má buňka tvar kulatý (A), na povrchu drážkovaném dochází k výraznému protažení těla buňky ve směru drážkování (B). [77] Fraser *et al.* v další studii porovnávají vliv samotné topografie a adsorbované vrstvy proteinů ze séra na orientovaný růst buňky rohovky, kdy buňky získávají protaženou morfologii ve směru drážek nezávisle na šířce a vzdálenostech drážek, ale míru orientace buněk iniciovanou drážkovaním zvyšují právě adsorbované proteiny na hřebenech povrchového vzoru. Změnou kultivačního média s rozdílným proteinovým složením pak dochází k iniciaci kolmé orientace buněk na povrchový vzor (Obr. 1 C) [78,79]



Obr. 1: Morfologie lidských epitheliálních buněk rohovky na A) hladkém povrchu, B) na drážkovaném substrátu v prostředí DMEM, C) na drážkovaném substrátu o stejných rozměrech v prostředí Epilife. [77,79]

Kontaktní vedení buněk na drážkovaných površích je tedy na základě výše zmíněného vysvětlováno pomocí následujících mechanismů. Prvním z nich je indukovaná selektivní adsorpce proteinů ECM na anizotropním povrchu, která vede k vázání a adhezi buněk k těmto proteinům podle povrchového vzoru. [80,81] Roli zde však hrají i filopodia buněk, která nejsou schopná interagovat s úžlabími mezi hřebeny vzoru a iniciují lokomoci buňky po vrcholcích vzoru. [82] Od těchto dvou jevů se následně odvíjí tvorba fokálních adhezí, které se vzhledem k charakteru povrchu utváří výhradně na vrcholcích drážek. [83,84]

Nervové buňky ke správnému růstu a aktivitě rovněž potřebují přesné a orientované podklady ve formě drážek nebo vysoce uspořádaných sítí, [85] což se odvíjí od přirozené regenerace poškozené nervové tkáně. Nervové buňky při vývoji nebo při regeneraci v případě poškození migrují podél orientovaných vláken ECM nebo podél podpěrných gliových buněk. [86–88] Kontaktní vedení hraje roli jak v případě regenerace tkáně centrálního nervového systému (CNS), tak periferního nervového systému (PNS), ale způsob orientace je odlišný. Při neuroregeneraci je pro volbu vhodné podpěry tedy rozhodující konkrétní typ poškozené tkáně. V případě PNS převládá orientace nervových buněk ve směru povrchové textury, u neuroblastů CNS byla pozorována orientace kolmá. [89] Některé typy nervových buněk jsou rovněž schopné buněčného přemostění povrchových překážek prostřednictvím neuritů přichycených k povrchu. [90]

Při procesu **hojení ran** se uplatňují především fibroblasty, jejichž rychlost osídlení rány je určující pro zjizvení rány, stejně jako distribuce komponent utvářející se ECM. Chování fibroblastů lze rovněž řídit topograficky. Polarizaci a směrovost růstu buněk lze opět indukovat drážkovaným povrchem. Bylo zjištěno, že při aplikaci náplasti s drážkami kolmými na směr uměle vytvořené rány mezi lidskými dermálními fibroblasty došlo k rychlejšímu prorostení rány než v případě aplikace hladké náplasti nebo náplasti s rovnoběžným drážkovaním. Důvodem je rychlejší migrace fibroblastů orientovaně ve směru drážek z jednoho konce mezery na druhý (rozměry drážek jsou v jednotkách mikrometrů, jejich hloubka činila 600 nm). Další zajímavostí studie je aplikace náplasti nikoliv pod prolifерující buňky za účelem ovlivnění tvorby fokálních adhezí, ale na volný (apikální) buněčný povrch s cílem simulovat přiložení obvazového materiálu na ránu, přičemž nedochází k tvorbě fokálních adhezí mezi buňkami a texturovaným povrchem, který tak může být po srostení rány odstraněn. [91]

4.1.3 Chemické a fyzikální vlastnosti povrchu

Důležitou roli hraje smáčivost povrchu. To, zda je povrch hydrofilní nebo hydrofobní, ovlivňuje adsorpci proteinů a jejich konformaci, tím pádem i biologickou aktivitu. [92,93] Smáčivost lze ovlivnit topografií povrchu nebo modifikací povrchu funkčními skupinami. [94] Vybrané funkční skupiny mohou například zajistit v souvislosti s hydrofilním nebo hydrofobním charakterem povrchu protizánětlivé nebo anti-trombotické účinky povrchu. [95,96] Vysoce účinná z hlediska podpory afinity buněk k povrchu je jeho funkcionalizace

biomolekulami napodobujícími biologickou funkci, tedy peptidy nebo protilátkami specifickými pro konkrétní buněčné receptory. [97–99] Před vázáním peptidů k povrchu je pak u některých materiálů (např. polypropylen, nebo polyethylentereftalát) nezbytná jejich předchozí plazmatická úprava. [100]

4.2 Role proteinů v tkáňovém inženýrství

4.2.1 Protein jako nosný substrát

Výhodou proteinů jako nosného substrátu je jejich dostupnost a široká škála možností zpracování do libovolných forem od filmů přes hydrogely po hierarchické 3D struktury. Řada proteinů (například hedvábí nebo kolagen) vykazuje vysokou stabilitu ve vodě, a to díky schopnosti samo-organizace. Té je dosaženo vysoce organizovaným uspořádáním sekundární struktury do stabilní konformace nebo přirozeným nekovalentním síťováním. Tuto samo-organizaci proteinů lze podpořit volbou procesních parametrů v průběhu zpracování indukujících změny ve struktuře nebo fyzikální síťování, případně užitím síťovacích činidel. Nevýhodou síťovacích činidel je však zpravidla jejich vysoká cytotoxicita. Netoxickou alternativou je síťování pomocí enzymů. [101–103]

4.2.2 Růstové faktory

Funkčnost biomateriálového systému a schopnost obnovy tkáně výrazně zlepšuje přítomnost růstových faktorů. Růstové faktory jsou zpravidla proteiny regulující buněčné procesy a působící jako signální molekuly prostřednictvím vazby na specifické buněčné receptory. Růstové faktory jsou z tohoto důvodu specifické jen pro určité typy buněk. Jedná se například o epidermální růstový faktor (EGF), nervový růstový faktor (NGF) nebo fibroblastový růstový faktor (pro pojivovou tkáň, FGF). [104–106]

4.2.3 Adhezivní proteiny

Buněčné adhezivní glykoproteiny jako je laminin nebo vitronektin jsou schopné vázat se k jiným proteinům ECM a k buněčným receptorům, čímž zprostředkovávají adhezi a migraci buněk. Používají se k tvorbě adhezivních povlaků na povrchu biomateriálů. Pro stejné účely lze užít fibronektin, což je glykoprotein obsahující sekvenci RGD, skrze kterou zprostředkovává vazbu s integriny. [107–109]

4.2.4 Rekombinantní proteiny

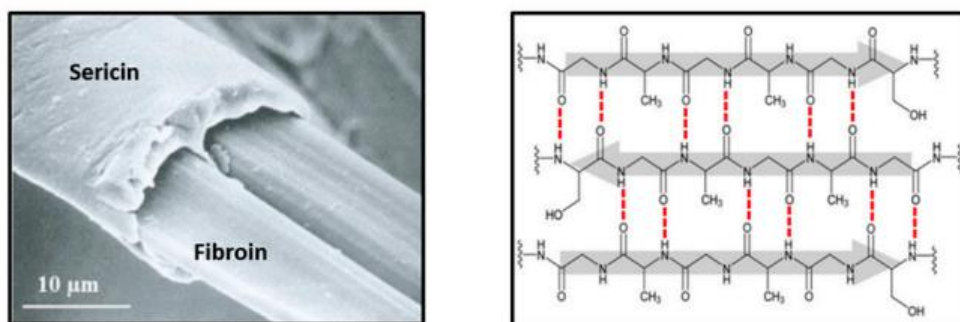
Proteiny lze izolovat z přírodních zdrojů, ze savčích či rostlinných tkání nebo produktů členovců. V případě jejich užití je zde však riziko imunitní odezvy, přenosu onemocnění nebo nejednotné kvality materiálu z různých zdrojů nebo šarží. [110] Řešením je chemická syntéza krátkých peptidů umožňující produkci přirozených peptidů, ale také zcela nových sekvencí. Generování nových proteinových sekvencí s laditelnými vlastnostmi inspirované přírodními materiály má za cíl optimalizovat mechanickou a strukturní podporu s tou biologickou a zajistit rovnoměrnou regeneraci tkáně při současné degradaci podpůrného materiálu. [111] Rekombinantní varianta proteinu je užívána

v případě proteinu pavoučího, kdy je obtížné protein vůbec získat z přírodního zdroje. Pomocí *E. coli* lze syntetizovat pavoučí proteiny typu MaSp1 a MaSp2 (*Major Ampullate Silk Protein*). [112]

4.3 Hedvábné proteiny

Z pavoučího hedvábí je zpracovatelsky a aplikačně významný pavoučí „dragline“ protein produkovaný některými druhy pavouků, například *Araneus diadematus* nebo *Nephila clavipes*. Pavoučí hedvábí se však obtížně získává z přírody – chov komplikuje zejména kanibalismus pavouků. Proto je pro výzkumné účely produkován rekombinantní pavoučí protein geneticky modifikovanými bakteriemi, což umožňuje technologicky škálovatelnou výrobu a kontrolovanou kvalitu produktu. [17,18]

Mnohem rozšířenější je produkce hedvábného proteinu produkovaného domestikovaným bourcem morušovým (*Bombyx mori*), odtud odvozena jedna z užívaných zkratk BMF – *Bombyx Mori Fibroin*. Hedvábné kokony bource morušového izolují larvu od vnějšího prostředí, chrání ji před predátory a mikroorganismy a fungují jako bariéra proti vlhkosti. [113] Protein tvořící kokon, označovaný rovněž jako fibroin, se izoluje přímo z kokonů larev bource morušového masově chovaných primárně pro textilní průmysl. [114] Vlákno tvořící kokon je složeno ze dvou fibroinových fibril obalených adhezivním proteinem sericinem (Obr. 2). [115,116]



Obr. 2: Vlevo složení hedvábného vlákna, vpravo uspořádání primární struktury aminokyselin do antiparalelního uspořádání β -skládaného listu. [115,116]

4.3.1 Makromolekulární struktura

Fibroinové vlákno se skládá z lehkého řetězce o molekulové hmotnosti 25 kDa a těžkého řetězce o molekulové hmotnosti 390 kDa, které jsou propojeny glykoproteinem P25. Těžký řetězec se skládá z repetitivních jednotek [Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser]_n. Řetězec se vyskytuje ve dvou konformacích – α -šroubovice (značený jako Silk I) nebo β -skládaný list (Silk II). Většina aminokyselin je nepolárních a hydrofobních. [117] Těžký řetězec obsahuje hydrofilní a hydrofobní bloky, které umožňují tvorbu micelární struktury ve vodě. Tvorbu micel s následným gelováním lze pozorovat jak v přirozeném procesu zvlákňování, tak u regenerovaného fibroinu po rozpuštění fibroinu v LiBr a dialýze. Při vyšších koncentracích fibroinu (s klesajícím obsahem vody v systému) dochází k tvorbě globulí. Tyto globule jsou při tvorbě vláken vlivem smykového namáhání zarovnávány a dluženy. Po rozpuštění se makromolekuly

fibroinu nachází ve formě náhodného klubka při převedení do pevného stavu může vzniknout konformační uspořádání α -šroubovice (Silk I). Tato konformace je rozpustná v řadě rozpouštědel včetně vody. Vlivem působení několika podnětů dochází k transformaci sekundární struktury ze stavu Silk I do stavu Silk II s organizovanými segmenty β -skládaného listu (Obr. 2 vpravo). Těmito podněty v laboratorním prostředí jsou přítomnost polárního organického rozpouštědla, mechanické namáhání, působení ultrazvuku nebo zvýšené teploty. [118]

4.3.2 Biokompatibilita a biodegradabilita

Fibroin je považován za biokompatibilní materiál, nevykazuje negativní účinky na organismus a podporuje buněčnou proliferaci. Zánětlivou odpověď organismu způsobuje v kombinaci se sericinem. Biokompatibilita proteinu je dále podporována přidávkem jiných biomateriálů, chemickou modifikací povrchu nebo jeho texturizací. Pro podporu buněčné adheze se na povrch fibroinu váže RGD peptidová sekvence složená z argininu, glycinu a kyseliny asparagové, která výrazně podporuje přichycení buněčných receptorů a přirozeně se vyskytuje v hedvábí divoce žijícího martináče čínského. [119]

Z hlediska imunitní odezvy organismu na hedvábný protein jsou závěry z řady studií nejednoznačné. Původně se předpokládalo, že fibroin vyvolává imunitní reakci organismu pouze v kombinaci se sericinem. Nebyl však prokázán zánětlivý účinek pouhého fibroinu na organismus, stejně tak samotný sericin nevykazuje imunogenicitu. Problém může nastat až při degradaci produktu z hedvábného proteinu, kdy v závislosti na velikosti a morfologii mohou odpadní částice hedvábí vyvolat imunitní reakci. [120]

4.4 Zpracování fibroinu pro účely tkáňového inženýrství

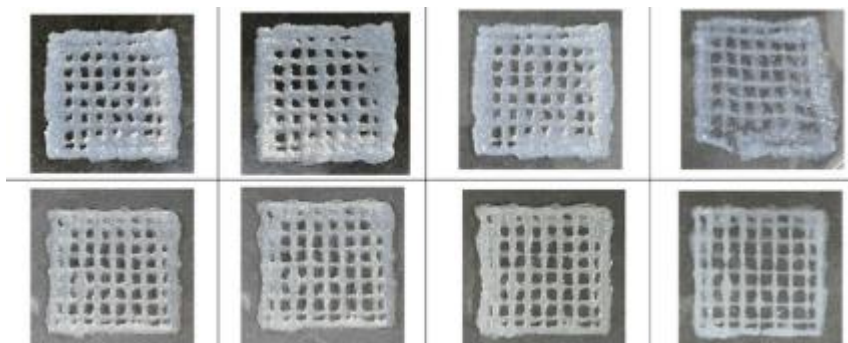
4.4.1 Texturované hedvábné filmy

Hedvábné filmy lze připravit odlitím roztoku a odpařením rozpouštědla, přičemž volba rozpouštědla ovlivňuje sekundární strukturu proteinu. Zatímco při užití hexafluoroisopropanolu obsahuje film vyšší podíl α -šroubovicových struktur, v případě kyseliny mravenčí se po odpaření rozpouštědla protein transformuje do β -skládaného listu. To, zda jsou filmy hydrofobní či hydrofilní do jisté míry ovlivňuje charakter povrchu, na který jsou odlévány. Fibroinové filmy na hydrofilním sklíčku mají hydrofobnější povrch než filmy na hydrofobním polystyrenovém podkladu, což plyne z amfifilní povahy fibroinu. [121] Filmy připravené z fluorovaných rozpouštědel se nachází v nestabilní konformaci Silk I s převahou struktur α -šroubovice. Tyto filmy lze transformovat a stabilizovat ošetřením pomocí vody nebo methanolu. Filmy, jejichž sekundární struktura byla transformována užitím methanolu, vykazují vyšší míru neuspořádanosti a vyšší schopnost přijímat vodu. [122]

4.4.2 Tištěné 3D struktury

Pro zpracování metodou extruzního 3D tisku lze připravit hedvábný protein ve formě hydrogelu chemicky indukovanou gelací, Obr. 3. [123]

Methakrylátované hedvábí lze zpracovat metodou DLP (*Digital Light Processing*). [124–126] Pomocí extruzního tisku byly připraveny porézní mřížky ze směsi hedvábí a voskových nebo PCL mikročastic. [127] Hedvábný protein se často kombinuje při 3D tisku s jinými biomateriály (například kolagen) pro zlepšení jejich mechanických vlastností. [128] 3D tisk samotného fibroinu komplikuje transformace jeho sekundární struktury, ke které dochází při vyšších koncentracích roztoku. Nižší koncentrace se zase pojí s příliš nízkou viskozitou nevhodnou pro tisk. [129]



Obr. 3: Ukázka 3D tištěné mřížky z fibroinového hydrogelu. [123]

4.4.3 Hedvábná vlákna

Hedvábí je velmi dobře zvláknitelný materiál. Elektrostatickým zvlákněním lze připravit vlákna z vodného roztoku fibroinu s regulovatelnou morfologií a tloušťkou v závislosti na koncentraci fibroinu. [130–132] Za účelem napodobení složení přírodního vlákna lze koaxiálním tiskem připravit kompozitní vlákno složené z fibroinu v jádře a sericinu ve formě pláště. [133]

Ve směsi s jinými materiály má fibroin často za následek vznik různých druhů nestabilit, například perlového toku. Přesto jsou však známy kombinace fibroinu s jinými polymery při přípravě vláken, přičemž při přípravě směsí je pro zachování stabilního toku důležité dodržet optimální poměr mezi jednotlivými složkami. [134]

4.4.4 Užití hedvábí při hojení ran

Kožní tkáň je schopná samoopravy, některé rány se však hojí obtížně a dlouho, například při diabetickém onemocnění, popáleninách nebo hluboké či plošné rány. Mezi materiály usnadňující a urychlující proces hojení s cílem dosáhnout menší jizvy patří hedvábí, řadu let užívané jako šicí materiál. Bylo prokázáno, že BMF ve formě β -skládaných listů působí na signální dráhy, podporuje expresi fibroinektinu a kolagenu typu III, stimuluje růst a migraci buněk a může příznivě ovlivnit hojení ran. [135–137] Problémem hladkých filmů pro hojení ran je nízká afinita buněk k povrchu, která je překonávána kombinací fibroinu s jinými materiály nebo modifikací jeho povrchu peptidovými sekvencemi, např. RGD. [138]

4.4.5 Regenerace nervových vláken pomocí hedvábí

Ze syntetických polymerů je pro výrobu nervových konduktů často užívaný PCL, doplněný o přírodní polymer, např. chitosan. Tyto materiály zajišťují umělému nervovému vedení dostatečnou pevnost a mechanickou odolnost. PCL musí být často modifikován peptidovými sekvencemi zlepšujícími buněčnou adhezi a proliferaci, jedná se například o sekvenci RGD, [139–141] dále růstové faktory, jako je NGF (*neural growth factor*), nebo FGF (*fibroblast growth factor*). [142,143]. Pro kombinaci vhodných mechanických vlastností, biokompatibility, rychlosti degradace a snadné modifikovatelnosti peptidovými sekvencemi se pro vývoj konduktů užívá i hedvábný protein, ze kterého lze připravit například kondukt s vnitřním drážkováním přeneseným z PDMS šablony. [144] Tubulární náhradu z hedvábí lze připravit rovněž pomocí elektrospinningu, [145] dále byly připraveny multikanálové konduity. [146] Nevýhodou těchto struktur jsou příliš velké rozměry čili nedostatečná jemnost a také organizovanost naváděcí textury.

5. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

5.1 Fázová separace

Pomocí fázově-separačních přístupů aplikovaných na polymerní systém lze připravit morfologie s mikro až nano texturovaným vzorem. Fázové separace lze docílit například změnou teploty, působením smykových sil nebo, jak je předmětem této práce, působením špatných rozpouštědel. Při tomto procesu dochází k tvorbě porézní textury působením špatného rozpouštědla ve směsi. [147] Kapky špatného rozpouštědla tvarují polymerní povrch zbotnalý rozpouštědlem dobrým. Toto špatné rozpouštědlo musí být navzájem mísitelné s rozpouštědlem dobrým, které dokáže zcela rozpustit daný polymer. Míru interakce polymerního řetězce s molekulami rozpouštědla popisuje Flory-Hugginsův interakční parametr χ . Pokud $\chi < 1/2$, polymer se nachází v dobrém rozpouštědle. Pokud $\chi > 1/2$, rozpouštědlo je pro polymer špatné. [148] Depozici rozpouštědel lze provést různými přístupy. V prvním případě dochází ke kondenzaci par špatného rozpouštědla na polymerní povrch zbotnalý rozpouštědlem dobrým. Tato metoda je známá jako *Breath figures*. Druhou možností je současná aplikace dobrého a špatného rozpouštědla na pevný polymerní povrch. Kromě vzájemné mísitelnosti obou rozpouštědel je pro účinnost této techniky podmínkou přednostní odpařování rozpouštědla dobrého. [149]

5.2 3D tisk

Principem 3D tisku je tvorba konstrukce kladením materiálu po jednotlivých vrstvách na základě počítačového modelu. Definované struktury z polymerních roztoků lze připravit metodou InkJet nebo extruzního 3D tisku. Při InkJet tisku dochází k dávkování materiálu na podložku kapku po kapce, zatímco při extruzním tisku dochází ke kontinuálnímu vytlačování inkoustu ve formě

taveniny nebo roztoku na podložku. Vytlačovací hlava může být pístová nebo pneumatická podle mechanismu vytlačování inkoustu. Proces tisku závisí na celé řadě parametrů, od teploty vytlačovací hlavy a tiskové podložky až po koncentraci a viskozitu polymerní směsi. Výtisk tuhne odpařením rozpouštědla nebo vytvrzením. [150]

5.3 Electrospinning

Electrospinning je metoda sloužící k tvorbě vláken z roztoků polymerů. Tímto procesem lze získat chaotickou síť vláken v mikro až nano rozměrech, přičemž jejich morfologii lze řídit celou řadou procesních parametrů od koncentrace roztoku po podmínky okolního prostředí jako je vlhkost a teplota. Princip spočívá ve zvlákňování z kapky polymerního roztoku působením elektrického pole mezi kladnou elektrodou a záporným kolektorem. Kladná elektroda je tvořena jehlou ukončující stříkačku s roztokem anebo kovovou tyčkou s volným povrchem. Kolektor funguje jako adsorbér vznikajících vláken. Při zvyšování napětí dochází k deformaci kapky polymerního roztoku na kladné elektrodě a tvorbě Taylorova kuželu, po překonání povrchového napětí dochází k vypuzení kapaliny s polymerními vlákny směrem ke kolektoru. Pokud je proud kontinuální, vznikají homogenní vlákna; při jeho přerušení dochází k pulznímu toku a tvorbě nestabilit. [151–153].

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V této kapitole budou charakterizovány použité materiály a zásadní operace jejich zpracování. Dále budou uvedeny hlavní charakterizační metody.

6.1 Použité materiály a technologie

6.1.1 Příprava a purifikace fibroinu

Regenerovaný Bombyx mori fibroin v lyofilizované formě byl připraven podle standardního protokolu dle Kaplana. [154] Výchozí surovina ve formě kokonů (poskytnuto Univerzitou Bayreuth) byla zbavena sericinu varem v 0,02 M Na_2CO_3 (p.a. Sigma Aldrich). Po propláchnutí vodou byla hmota rozpuštěna v roztoku 9.3 M LiBr (p.a. Sigma Aldrich) při zvýšené teplotě (60 °C) po dobu 4 h. Po rozpuštění byly nežádoucí ionty odstraněny dialýzou. Po centrifugaci a filtraci byl vytěžený fibroin lyofilizován a následně rozpouštěn v HFIP (p.a. abcr GmbH) na koncentraci 2 % (w/v).

6.1.2 Příprava fibroinových filmů

Fibroinové filmy byly připraveny odléváním 450 μl 2% roztoku fibroinu v HFIP do polystyrenových Petriho misek (TPP Techno Plastic Products AG) o průměru 3,4 cm. Sušení bylo realizováno v atmosféře proudícího dusíku po dobu 12 h, přičemž v takto připravených filmech se fibroin nacházel v konformaci SILK I. Následně byly filmy umístěny do klimakomory s definovanou vlhkostí (60 %) nebo do par methanolu (metOH), čímž byla zajištěna transformace

sekundární struktury. Na filmech v rozdílných stupních transformace fibroinu byly následně generovány specifické “porézní“ povrchové textury metodou časově sekvenované fázové separace.

6.1.3 Texturizace pomocí sekvenovaného dávkování

Pro účely texturizace povrchů bylo použito zařízení sestavené na Ústavu fyziky a materiálového inženýrství FT UTB pro sekvenované dávkování rozpouštědla na rotující substrát. Povrch fibroinového filmu byl modifikován směsí dobrého rozpouštědla HFIP, špatného rozpouštědla DMSO (p.a. VWR) a vody v poměru 7:0,2:4 na rotující vzorek. Sledovanými procesními parametry byly otáčky vzorku v rozsahu 1500 až 2400 otáček/min, objem dávkovaného roztoku v intervalu 100 až 300 μ l, perioda dávkování 5 až 13 s a počet opakujících se dávek v rozmezí 10 až 40.

6.1.4 Statická texturizace

BMF filmy ve stavu Silk I byly pokryty vrstvou roztoku o objemu 450 μ l a složení HFIP : H₂O : DMSO v poměru jednotlivých složek 7 : 4 : x, kde x bylo 0,1/0,2/0,4. Vzorky byly umístěny do exsikátoru s mírným průtokem dusíku do vysušení. Druhým přístupem statické modifikace byl upravený postup *Breath figures*, kdy na fibroinový film byla nanášena vrstva HFIP, film se nechal povrchově nabotnat po dobu několika minut a poté byl umístěn do komůrky, kterou proudil dusík a páry DMSO.

6.1.5 Selektivní značení povrchu

Filmy ve stavu Silk I byly umístěny na 24 h do par methanolu a transformovány do stavu Silk II. Modifikace povrchu poté probíhala pomocí sekvenovaného dávkování roztoku na rotující substrát. Modifikační roztok obsahoval HFIP, vodu a DMSO v poměru 7:4:0,2, přičemž roztok DMSO byl upraven přidávkou dextran-RGD nebo dextran-fluoresceinu (poskytnuto Univerzitou Bayreuth) o koncentraci 0,1 nebo 0,5 %. Filmy byly následně touto směsí modifikovány při 2400 otáčkách po 200 μ l, 10 dávkách a 5 s. Pro srovnání byly připravovány filmy zcela pokryté RGD peptidem, kdy byly filmy texturovány výše popsaným postupem pouze s čistým DMSO a následně byly povrchy rovnoměrně pokryty roztokem dextran-RGD.

6.1.6 3D tisk směsí hedvábí – PCL

Pro tisk PCL-BMF mřížek byly připraveny roztoky PCL (p.a. Sigma Aldrich) a lyofilizovaného hedvábného proteinu v HFIP o různých poměrech. Rozpouštění probíhalo cca 6 h na třepačce při laboratorní teplotě (23°C). Samotný tisk probíhal na tiskárně BioX za použití pneumatické hlavy a kónické špičky o průměru 25 G. Byly tištěny mřížky o rozměru 10×10×0,3 mm, tisk probíhal při pokojové teplotě tiskové hlavy i podložky. Rychlost tisku byla volena v rozmezí 3-10 mm/s při tlaku 30-100 kPa v závislosti na koncentraci a viskozitě roztoku. Tisk probíhal ve flow boxu s odtahem, mřížky získaly pevný tvar rychlým odpařením rozpouštědla bezprostředně po tisku při laboratorní teplotě.

6.1.7 Příprava hedvábných vláken

Metodou elektrospinningu byly zpracovávány roztoky fibroinu v kyselině mravenčí (FA) nebo HFIP, dále směsné roztoky fibroinu a PCL v HFIP s příměsí DMSO. Roztoky byly připravovány na třepačce při laboratorní teplotě (23°C) po dobu 6-12 h. Zvlákňování bylo prováděno pomocí elektrospinneru s elektrodou ve formě kovové tyčinky z kapky roztoku při pokojové teplotě, napětí 15-30 kV a vzdálenosti kolektoru v rozmezí 9-13 cm. Vlákná byla spinnována na podklad ve formě slídy nebo uhlíkové pásy.

6.1.8 Profilometrie

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

6.1.9 Mikroskopie atomárních sil

Detailní topografie a mechanické vlastnosti povrchu byly charakterizovány pomocí mikroskopu skenující sondou, Dimension ICON (Bruker), v režimu Soft Tapping a PeakForce QNM. Měření byla prováděna rychlostí skenování 0,7 Hz s rozlišením 512×512 pixelů při pokojové teplotě ve vzduchu. Byla použita sonda s rezonanční frekvencí 70 kHz a konstantou tuhosti 0,4 N/m (ScanAsyst-Air, Bruker).

6.1.10 Skenovací elektronová mikroskopie

Filmy a vlákna byla zobrazována pomocí SEM Phenom Pro a Phenom XL 2 při urychlovacím napětí 10 kV. Vzorky byly pokoveny směsí paladia a zlata po dobu 60 s.

6.1.11 FTIR spektroskopie

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

6.1.12 Buněčná adheze a proliferace

Na vybraných texturovaných površích byla sledována proliferace těchto buněčných linií: myších embryonálních fibroblastů (BALB/3T3), keratinocytů (HaCaT), myoblastů (C2C12), pre-osteoblastů (MC3T3-E1) a lidských fibroblastů. Před *in vitro* testováním byly vzorky sterilizovány UV-zářením po dobu 1 h. Pro kultivaci osteoblastů bylo použito médium α -MEM s obsahem 10 % telecího séra a 0,1 % Gentamicinu, pro ostatní typy buněk médium DMEM s obsahem 10 % telecího séra, 1 % Glutaminu a 0,1 % Gentamicinu. V případě filmů byly buňky nanášeny na sterilní texturované povrchy v počátečním množství 5000 buněk/ cm^2 (22 500 buněk/ml). Buněčná proliferace byla hodnocena po vybraných časových intervalech testem alamarBlue. Buňky byly

následně fixovány standardním způsobem, jádra byla značena barvivem DAPI a cytoskelet barvivem ActinGreen, případně ActinRed. Snímky buněk byly pořízeny pomocí fluorescenčního (DMi8, Leica Microsystems GmbH, Germany) nebo konfokálního mikroskopu (model FV3000, Olympus, Tokyo, Japan). Pro testy na tištěných mřížkách byly vybrány lidské fibroblasty, na mřížky v kultivačních miskách bylo sazeno 5000 buněk ve 2 ml média. Po dvou dnech proliferace byly buňky fixovány a barveny. Testy byly prováděny na Univerzitě Bayreuth, v případě PS povrchů v Centru polymerních systémů Zlín.

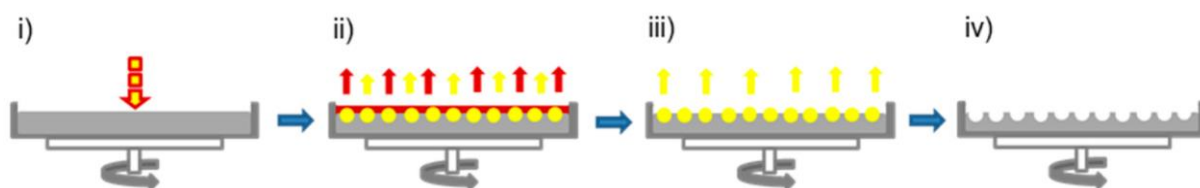
7. VÝSLEDKY

7.1 Příprava texturovaných filmů z hedvábného proteinu

K texturizaci BMF povrchů byla v rámci této studie použita řada fázově separačních přístupů. Prvním z nich bylo sekvenované (násobné) dávkování směsných roztoků na rotující substrát. Bylo zjištěno, že sekundární struktura BMF silně podmiňuje stabilitu a úroveň rozpustnosti upravovaných povrchů a s tím související formování povrchové textury. Druhým přístupem je dávkování rozpouštědel na nerotující (statický) substrát. V tomto případě byla textura na povrchu utvářena buď působením směsi rozpouštědel po aplikaci jedné dávky, nebo působením par DMSO na zbotnalý BMF film.

7.1.1 Sekvenované dávkování za rotace

Metodika přípravy texturovaných povrchů sekvenovaným dávkováním směsných roztoků znázorněná na Obr. 4 vychází ze studie E. Wrzecionka provedené na povrchu **polystyrenové misky pro tkáňové kultury**, kdy na rotující substrát byl v definovaných objemech dávkován směsný roztok obsahující **dobré a špatné rozpouštědlo** (i). [155] Dobré rozpouštědlo (tetrahydrofuran) botná povrch a špatné rozpouštědlo (2-ethoxyethanol) je separováno na povrchu (ii – iv), jehož texturu formuje mechanismem podobným *breath figures*.



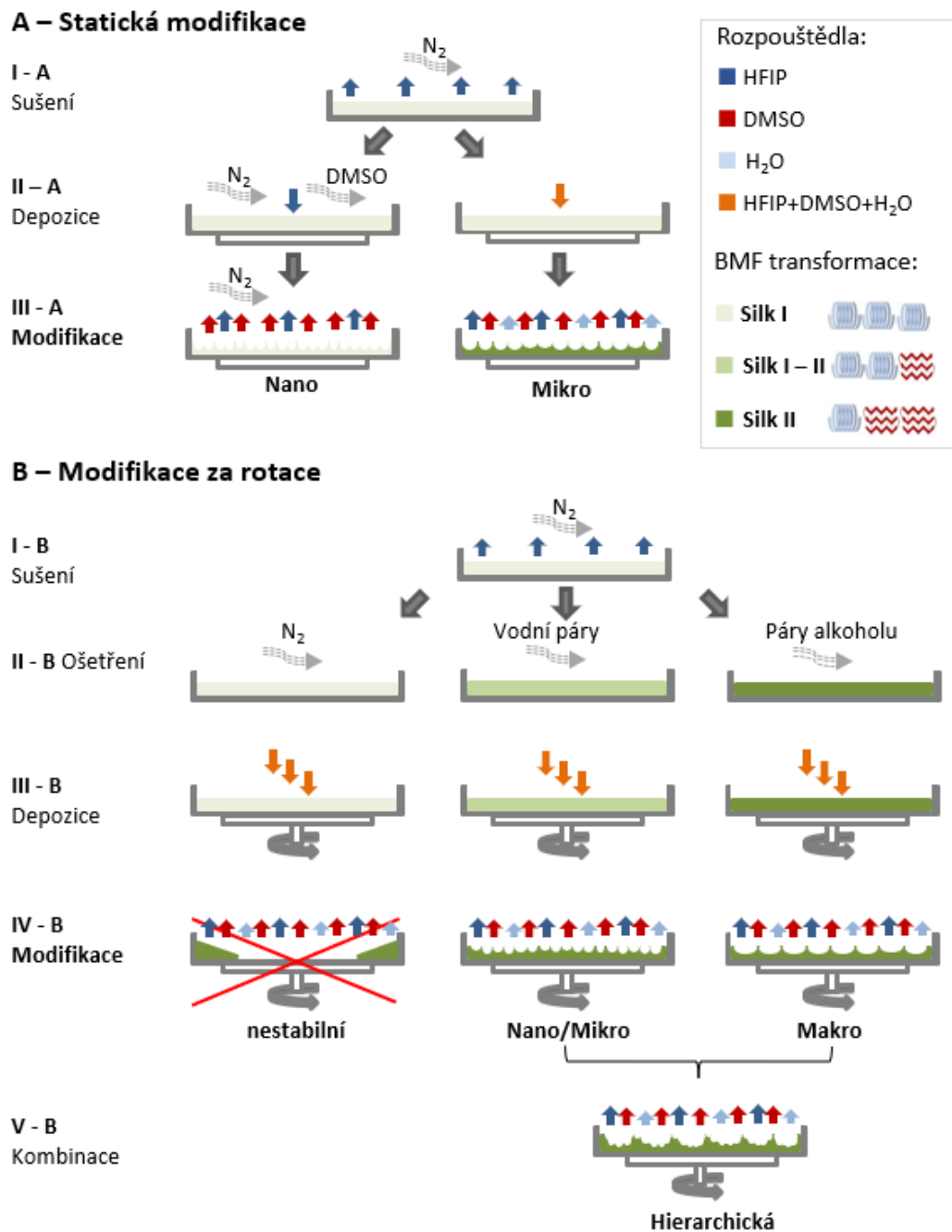
Obr. 4: Schéma znázorňující vznik povrchové topografie porézního charakteru na rotujícím polymerním substrátu v důsledku fázové separace vznikající díky rozdílné rychlosti odpařování rozpouštědel. [156]

V případě texturizace fibroinu byl jako dobré rozpouštědlo zvolen **hexafluoroisopropanol (HFIP)** a jako špatné **dimethylsulfoxid (DMSO)**. Modifikační směs navíc obsahovala vodu, která zabraňuje praskání filmu v průběhu odpařování rozpouštědel. Na rozdíl od polystyrenu lze v případě fibroinu texturovat filmy v různých výchozích stupních transformace sekundární struktury. Fibroinové filmy byly připravovány jednoduchým odléváním 2% roztoku fibroinu v HFIP do PS misek. Schéma následné úpravy povrchu je

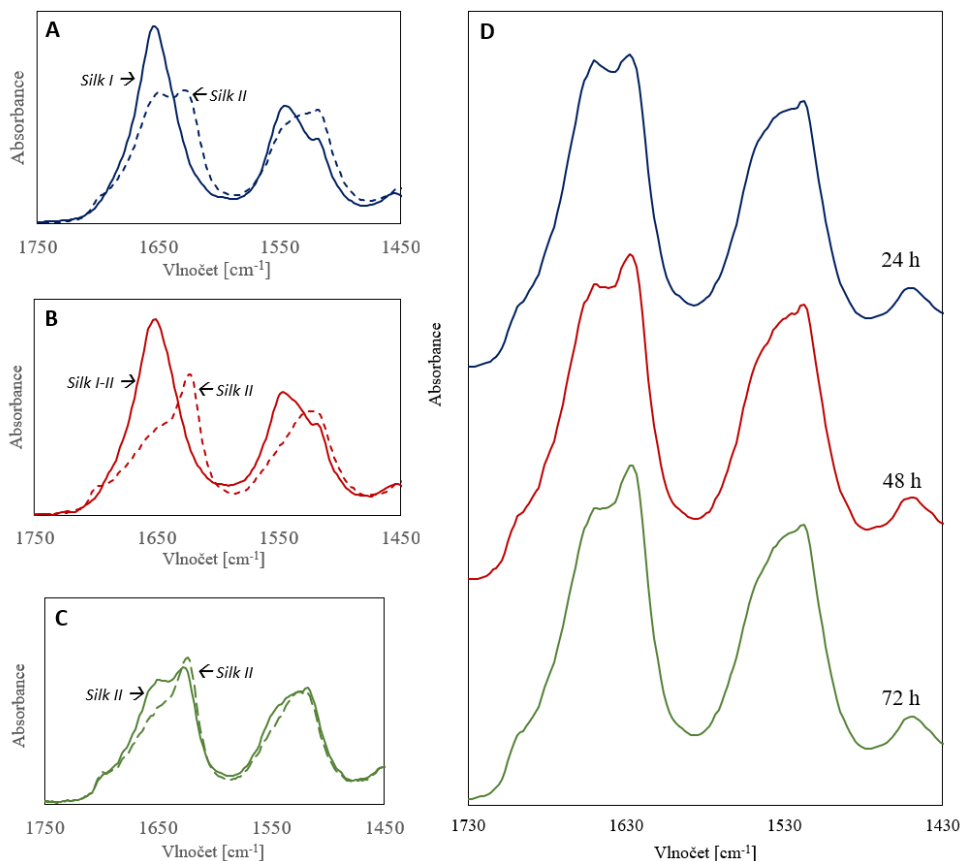
znázorněno na Obr. 5 B. Filmy byly sušeny v průtoku dusíku s absencí vlhkosti, čímž bylo dosaženo výsledné sekundární konformace Silk I. Při rychlém odpařování rozpouštědel docházelo na filmech ke vzniku nežádoucího zvrásnění vyvolaného teplotním a koncentračním gradientem. [157–159] Pro eliminaci tohoto jevu bylo nezbytné překrýt filmy víčkem a zpomalit tak odpařování rozpouštědla. Po vysušení byla transformována sekundární struktura fibroinu umístěním filmů do relativní vlhkosti 60 % na 48 h nebo do par methanolu, rovněž na 48 h, čímž bylo dosaženo kontrolovaného přeuspořádání sekundární struktury do přechodového stavu Silk I-II nebo transformovaného stavu Silk II. Takto ošetřené substráty byly následně modifikovány sekvenovaným dávkováním směsí rozpouštědel za rotace za vzniku samonosného polymerního texturovaného filmu.

Konformační přechody byly kontrolovány pomocí FTIR (Obr. 6), přičemž posuny charakteristických absorpčních pásů byly posuzovány na základě literárně dostupných údajů. [118] Vliv působení par methanolu na hladký film lze pozorovat na modrých spektrech (přechod Silk I → Silk II), kdy dochází k tvorbě struktury β -skládaného listu (absorpční pás s maximem cca 1620 cm^{-1}). Červené FTIR spektrum je přechodovým stavem Silk I-II po ošetření v RH 60, zelené spektrum znázorňuje stav Silk II po ošetření methanolem. Čárkovaná spektra (červené a zelené) pak znázorňují stavy po následné modifikaci povrchové textury.

Metoda sekvenovaného dávkování byla aplikována na oba typy filmů s rozdílnou mírou transformace (Silk I-II a Silk II), stejně tak jako na filmy bez ošetření methanolem či definovanou vlhkostí ve stavu Silk I. Pro filmy v nestabilizovaném stavu Silk I se způsob dávkování za rotace ukázal jako nevhodný, protože vlivem působení rozpouštědel docházelo ke smývání filmu k okrajům misky. Na tyto filmy proto byly posléze aplikovány statické přístupy, jak bude diskutováno dále. Stačilo však vystavit BMF film definované vlhkosti anebo methanolu a při modifikaci byly na povrchu utvářeny rozdílné textury.



Obr. 5: Schéma znázorňující proces přípravy proteinových filmů: A – Statická modifikace: I-sušení v proudící atmosféře dusíku, II-působení par DMSO/směsi rozpouštědel, III-odpaření rozpouštědel a vznik povrchové topografie; B – Modifikace za rotace: I – sušení v proudící atmosféře dusíku, II – transformace sekundární struktury působením vodní páry nebo par metOH, III – depozice směsi rozpouštědel za rotace, IV – odpaření rozpouštědel a vznik povrchové topografie, V – kombinovaný postup.

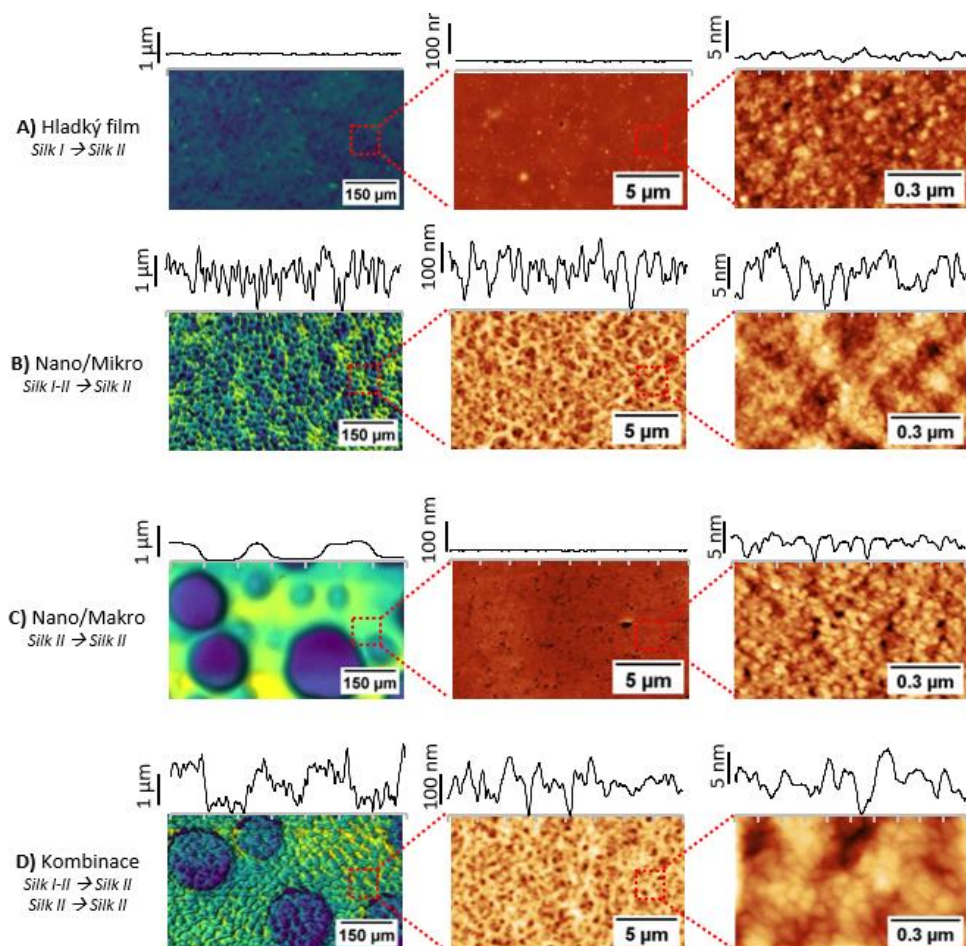


Obr. 6: FTIR analýza BMF filmů v různých stupních transformace sekundární struktury v průběhu přípravy filmů a jejich texturizace: A) přechod ze Silk I do Silk II působením metOH, B) přechod ze Silk I-II po působení RH 60 do Silk II provedením modifikace za rotace, C) přechod ze Silk II po působení metOH do koncového Silk II provedením modifikace za rotace a D) vliv doby působení par methanolu 24, 48 a 72 h na konformaci fibroinu.

Přehled připravených povrchových vzorů je znázorněn na Obr. 7. Architektura vznikajících povrchových textur byla podmíněna výchozím konformačním stavem BMF filmu před modifikací. Při aplikaci rotačního sekvenovaného dávkování na film v přechodném stavu **Silk I - II** vznikala na povrchu hierarchická textura porézního charakteru za současné transformace sekundární konformace, značená jako **Nano/Mikro**, Obr. 7 B. Textura se vizuálně projevuje zamlžením povrchu filmu a její homogenita závisí na procesních parametrech dávkování rozpouštědel. Pro biologické testy je dále důležitá stabilita textur ve fyziologickém prostředí kultivačního média při 37 °C, přičemž lze konstatovat, že za těchto podmínek je textura stabilní po dobu 7 dní.

Na filmech v konformaci **Silk II** vznikala modifikací diametrálně odlišná textura tvořená kruhovými prohlubněmi o průměru 100 mikrometrů, značená jako **Nano/Makro**, Obr. 7 C. Rozdíl ve strukturách naznačuje odlišné mechanismy jejich vzniku. Zatímco v případě částečně transformovaného filmu předpokládáme, že textura vzniká rozpouštěním a vymýváním amorfních složek fibroinu, v případě plně transformované konformace dochází ke zbotnění povrchu a jeho deformaci působením zkoagulovaných kapek DMSO. To může mít

za následek skutečnost, že Nano/Makro textura generovaná tímto způsobem na rozdíl od Nano/Mikro textury nemá tvarovou stabilitu v methanolu ani ve vodě, kdy dochází ke zbotnění povrchu a k téměř úplnému vymizení prohlubní, což pravděpodobně souvisí i s větší tendencí hedvábí vázat vodu po ošetření methanolem. [122] Tuto metodu však lze dále rozvinout a využít k selektivnímu značení povrchu, jak bude popsáno dále.



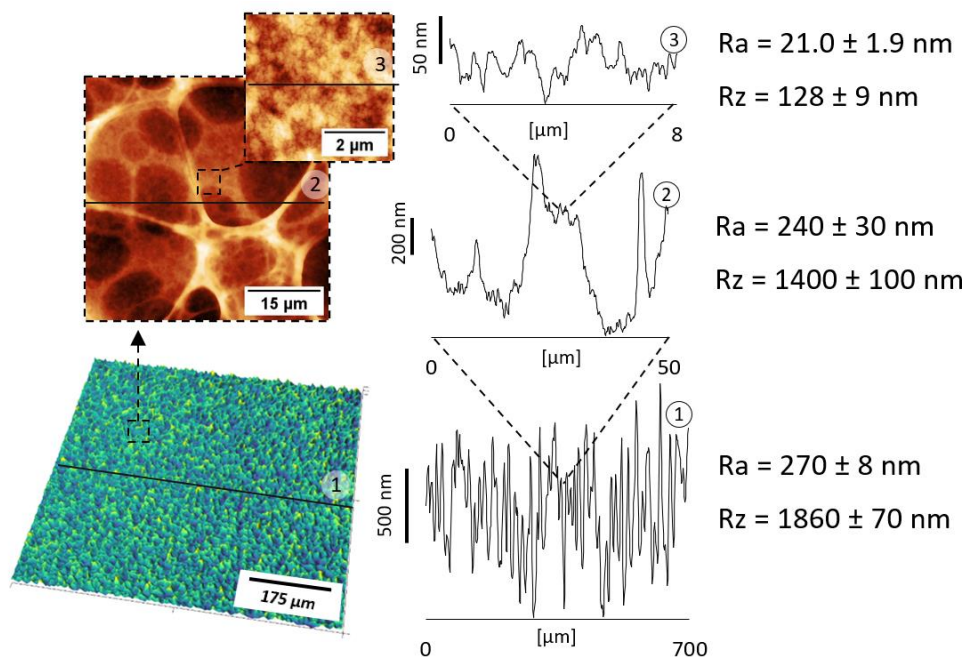
Obr. 7: Srovnání specifických hierarchických struktur generovaných na fibroinových filmech v různých stupních transformace dávkováním směsi rozpouštědel za rotace (B-D) s hladkým fibroinovým filmem (A), snímky pořízeny pomocí optického profilometru a AFM.

Sériovým provedením dvou výše prezentovaných dávkovacích postupů lze připravit kombinovanou texturu (Obr. 7 D), která sestává z obou typů prohlubní. Poté, co je na povrchu vytvořen Nano/Mikro vzor, je povrch opět podroben rotačnímu dávkování směsného roztoku za účelem tvorby Nano/Makro vzoru. Vytvoření této sekundární textury při současném zachování primárního Nano/Mikro vzoru opět potvrzuje domněnku, že dochází pouze k tvarování povrchu kapkami, a nikoliv ke smývání vrstev.

7.1.2 Statická modifikace

Dobré a špatné rozpouštědlo v jedné dávce

Z důvodu smývání fibroinového filmu ve stavu Silk I v průběhu rotačního dávkování směsných roztoků byly pro tento typ povrchu zvoleny statické přístupy modifikace, schematicky znázorněné na Obr. 5 A. Prvním typem je jednorázové nadávkování směsi s dobrým a špatným rozpouštědlem (Obr. 8). Fibroinový film s nanosenou modifikační směsí v uzavřené polystyrenové misce byl na 24 h umístěn do exsikátoru s mírným průtokem dusíku. Voda v modifikační směsi podporuje v průběhu utváření textury transformaci fibroinu ze stavu Silk I do stavu Silk II v průběhu vytváření povrchové textury.

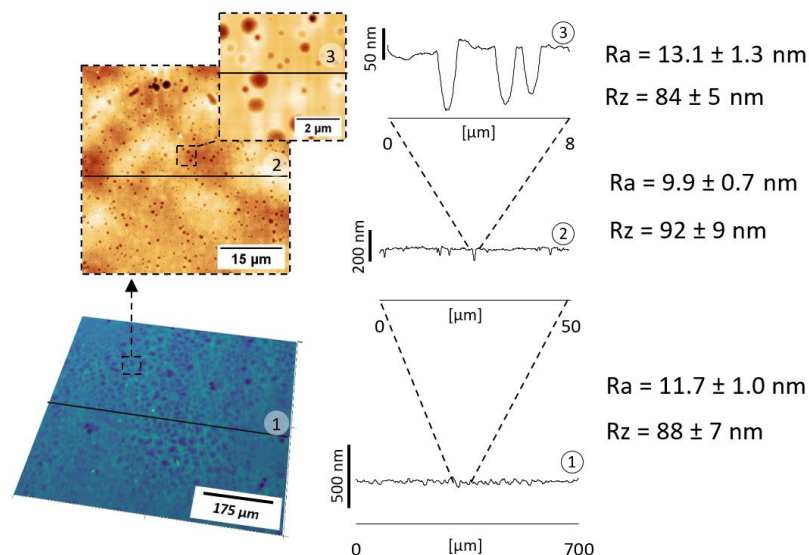


Obr. 8: Topografie povrchových vzorů připravených postupem statické modifikace působením směsi rozpouštědel, měřeno pomocí optického profilometru a AFM.

Takto připravená hierarchická topografie vykazuje tvarovou stabilitu ve vodném prostředí a ve fyziologickém prostředí do 7. dne. Při tomto procesu stejně jako v případě Nano/Mikro textury nedochází pouze k tvarové úpravě fibroinového povrchu, ale ke změně topografie spolu s konformačním přechodem.

Přístup založený na Breath figures

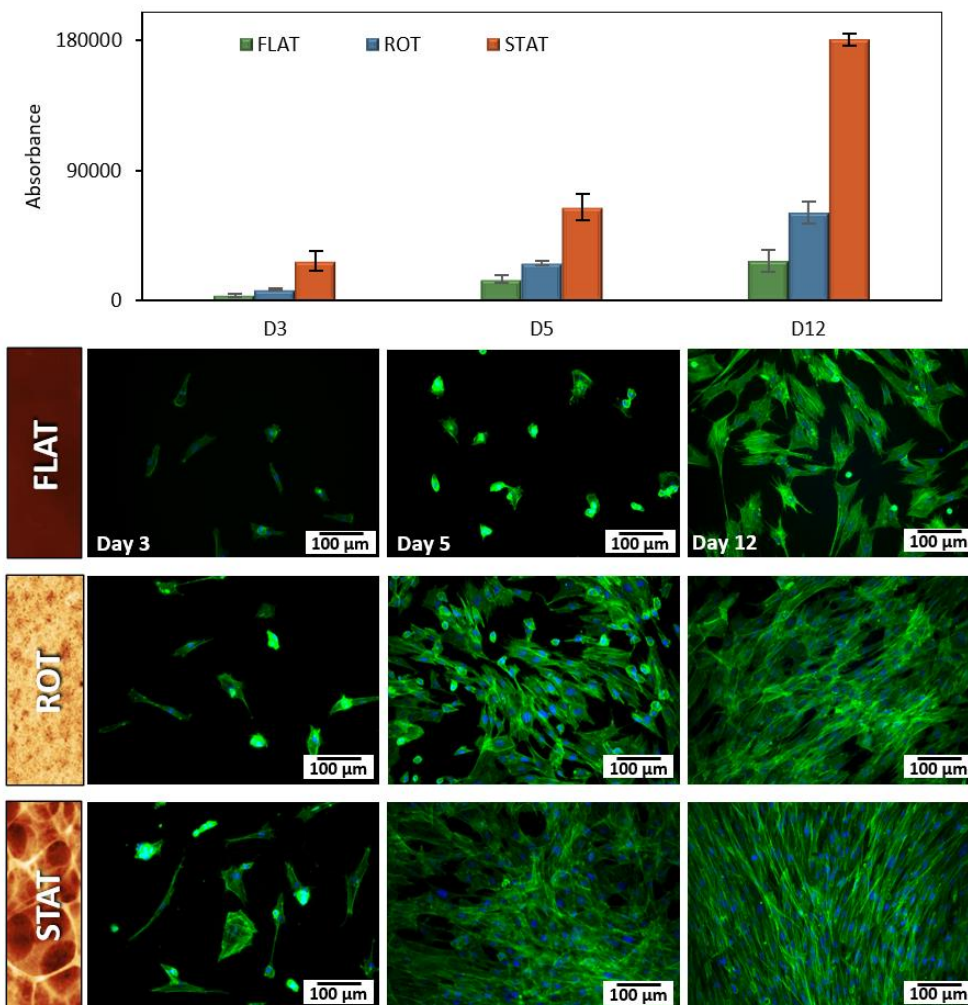
Dalším přístupem byla metoda systematicky odpovídající metodě *Breath figures*. Povrch fibroinového filmu byl v první řadě nabídnán pomocí 500 μl HFIP po dobu 10 min při 23 °C. Poté byl film umístěn do komůrky s protékajícím dusíkem obohaceným o páry DMSO. Páry DMSO plní podobnou funkci jako kondenzované kapky vody při klasickém procesu *Breath figures*. Kondenzace kapek DMSO na ochlazujícím se fibroinovém povrchu v důsledku odpařování HFIP má za následek tvorbu izolovaných kruhových prohlubní na fibroinovém filmu (Obr. 9). V důsledku nízkého obsahu vlhkosti v systému v průběhu texturizace tyto filmy zůstávají ve stavu Silk I. V rámci části tohoto výzkumného směru byla vypracována bakalářská práce P. Černé. [160]



Obr. 9: Topografie povrchových vzorů připravených postupem statické modifikace působením par DMSO, měřeno pomocí optického a mechanického profilometru a AFM.

7.1.3 Buněčná proliferace na fibroinových filmech

Navzdory dobré biokompatibilitě adheze buněk k podkladu z BMF není dostačující. Lze ji však podpořit právě specifickou povrchovou texturou. [161] Povrchová topografie s převýšeními v řádu desítek až stovek nanometrů zvyšuje kontaktní plochu mezi substrátem a buněčnými receptory, čímž může být usnadněno buněčné přichycení. Na strukturovaných fibroinových filmech byla studována proliferace několika buněčných linií. Vzhledem k charakteru samonosného filmu a pozitivního vlivu na růst keratinocytů a fibroblastů se nabízí zamýšlená aplikace těchto struktur v oblasti hojení ran nebo vývoje umělé kůže, proto byla kultivace těchto dvou buněčných linií podrobena důkladnější studii. Jako reference byl použit hladký BMF film. Dále byly buňky kultivovány na filmech s Nano/Mikro texturou připravených sekvenovaným rotačním dávkováním a na staticky modifikovaných filmech. Nano/Makro texturované filmy pro biologické testy nebyly vhodné z důvodu jejich tvarové nestability ve vodném prostředí. Na Obr. 10 je znázorněn záznam proliferace fibroblastů do 12. dne provádění testu. Je zřejmé, že připravené struktury mají pozitivní vliv na proliferaci buněk.

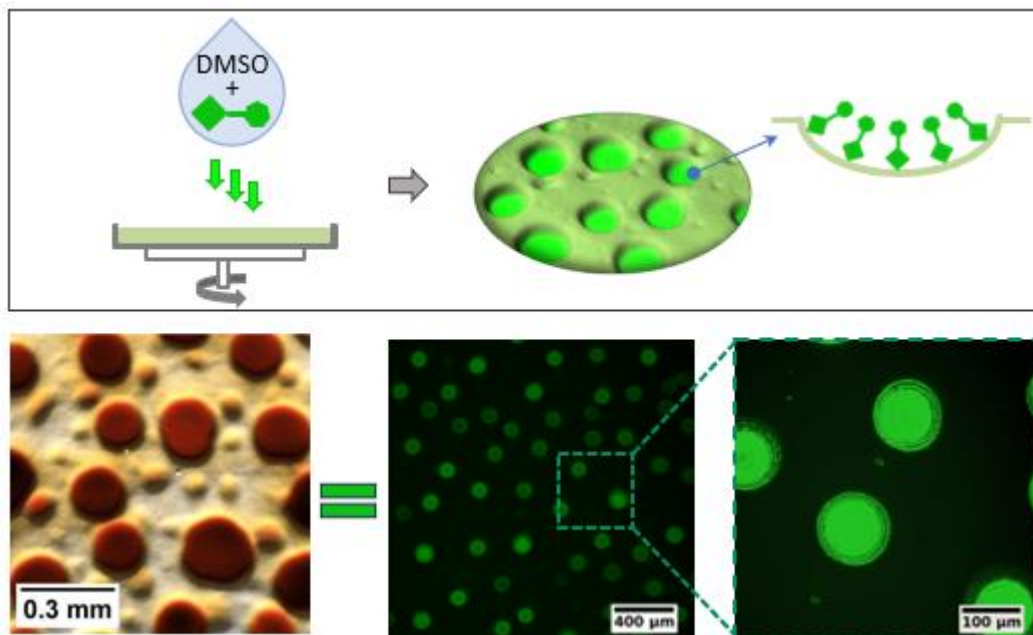


Obr. 10: Srovnání proliferace lidských fibroblastů na hladkém fibroinovém povrchu (FLAT) a na texturovaných fibroinových filmech (ROT – modifikace za rotace, Nano/Mikro na Obr. 7 B a STAT – statická modifikace, na Obr. 8), měřeno fluorescenčním mikroskopem.

7.1.4 Selektivní značení hedvábných filmů bioaktivními molekulami

Značení filmů fluorescenčním barvivem

Hypotéza o pórotvorné funkci DMSO v systému byla podpořena na základě experimentu s fluorescein-isothiokyanát-dextranem (FITC-Dextran). Modifikace probíhala výše popsaným postupem sekvenovaného dávkování směsí rozpouštědel, přičemž DMSO v modifikační směsi byl obohacen o FITC-Dextran v koncentracích 0,05 / 0,1 / 0,5 mg/ml. Bylo zjištěno, že použité barvivo se v průběhu modifikace koncentruje ve vznikajících prohlubních, Obr. 11.



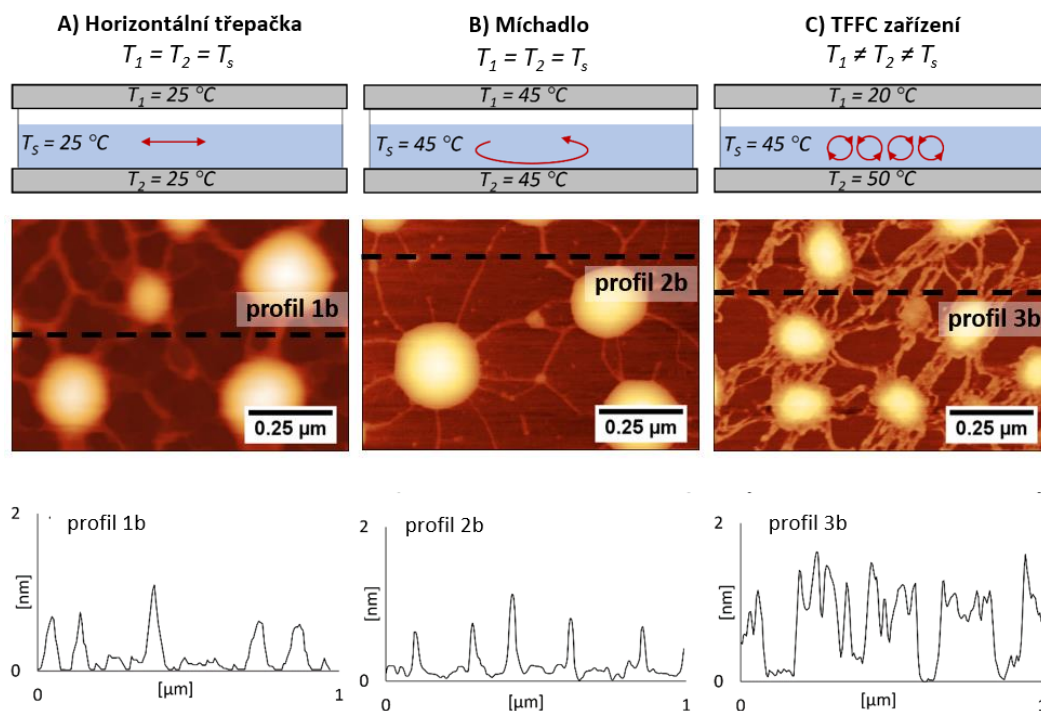
Obr. 11: Selektivní značení proteinového filmu pomocí FITC-dextranu, snímky z optického profilometru a konfokálního mikroskopu.

7.2 Samo-organizace makromolekulárních řetězců

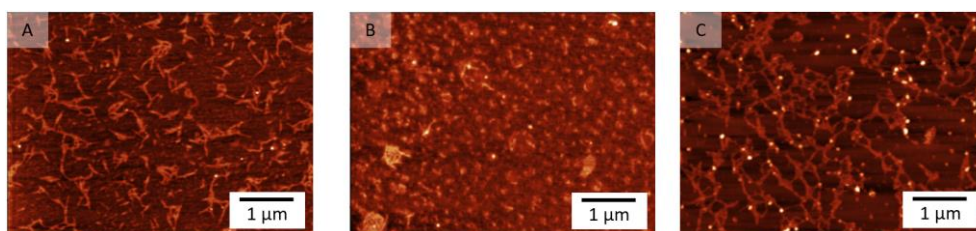
V rámci samostatné studie byly zkoumány možnosti přeuspořádání vybraných polymerních systémů pomocí samoorganizovaných toku kapaliny vznikajících v důsledku teplotního gradientu. Prvním systémem byl hyaluronan. Bylo zjištěno, že imobilizovaný hyaluronan z vodného roztoku tvoří na pevném povrchu agregované shluky propojené fibrilami, přičemž charakter této síťové struktury je ovlivněn teplotní historií a podmínkami rozpouštění roztoku hyaluronanu. Nejvýraznější rozdíl lze pozorovat právě po rozpouštění tohoto polysacharidu v teplotním spádu v TFFC zařízení¹. Vlivem Bénard-Marangoniho proudění indukovaného teplotním gradientem při rozpouštění polymeru dochází ke zmenšení průměru agregátů a znásobení počtu fibril propojujících jednotlivé agregáty, viz Obr. 12. Tato problematika je podrobně popsána v naší studii. [162]

Vliv organizovaného toku byl následně vyšetřen na organizaci fibroinových fibril, přičemž byla sledována změna morfologie makromolekul z nanovláken (Obr. 13 A) do agregovaných shluků (Obr. 13 B) nebo propojených fibrilárních sítí (Obr. 13 C). Pozorování souhlasí se studií prokazující indukci agregace fibroinových fibril vlivem smykového proudění. [163] V rámci tohoto výzkumného směru byla vypracována bakalářská práce A. Navrátilové [164].

¹ speciální zařízení pro úpravu roztoků polymerů, kde lze nastavit na topných deskách nad a pod upravovaným roztokem rozdílné teploty ohřevu/chlazení [169]



Obr. 12: AFM znázornění solidifikovaných hyaluronových sítí na povrchu slídy z roztoků rozpouštěných A) na třepačce při 24 °C, B) na magnetickém míchadle při 45 °C a C) v teplotním gradientu s teplotou spodní desky 50 °C a horní desky 20 °C. [162]



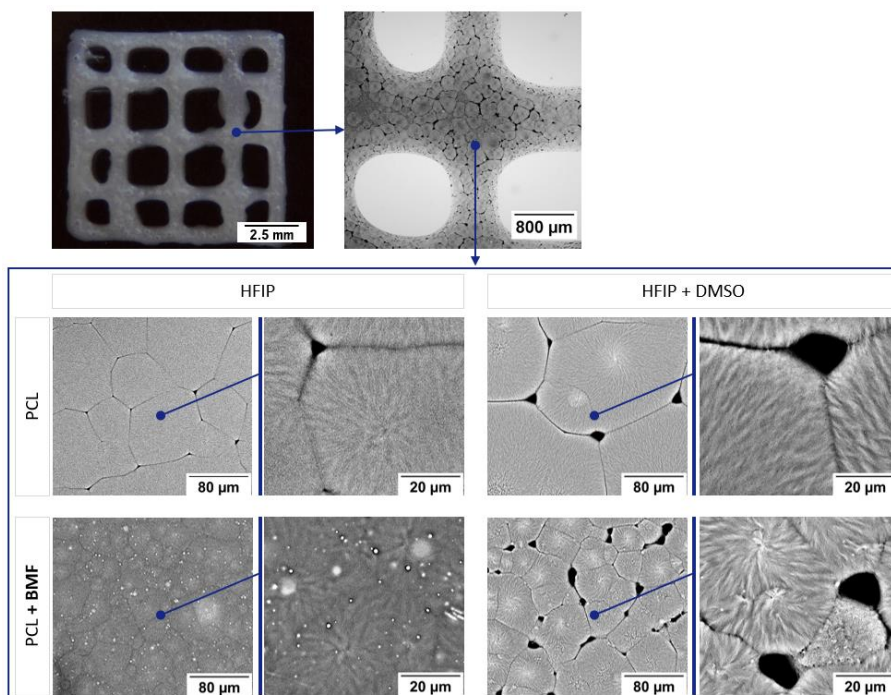
Obr. 13: AFM znázornění fibroinových fibril na povrchu slídy z roztoků rozpouštěných A) na třepačce při 24 °C, B) v teplotním gradientu s teplotou spodní desky 50 °C a horní desky 40 °C a C) v teplotním gradientu s teplotou spodní desky 50 °C a horní desky 10 °C.

7.1 3D tisk směsi hedvábí a polykaprolaktonu

Agregace a krystalizace hedvábného proteinu vlivem smykového namáhání komplikuje jeho zpracování 3D tiskovými metodami. Proto byl zvolen přístup užití fibroinu jako bioaktivního aditiva k syntetickému dobře zpracovatelnému polymeru. Jako tato nosná matrice byl zvolen polykaprolakton (PCL), díky jeho biokompatibilitě a dlouhému času degradace. [165] Přídavek fibroinu k polykaprolaktonu může výrazně zlepšit adhezi buněk k jeho povrchu, ovlivnit mechanické vlastnosti a umožnit vázání dalších bioaktivních látek k povrchu.

Byly připraveny různé varianty roztoků polykaprolaktonu v kombinaci s hedvábným proteinem v HFIP jakožto dobrým rozpouštědlem pro oba polymery, ze kterých byly následně tištěny jednoduché mřížky, Obr. 14.

Mikroskopickou charakterizací bylo zjištěno, že BMF tvoří v matrici PCL částice, které narušují uspořádání klasických PCL sférolitů a ovlivňují jejich velikost.

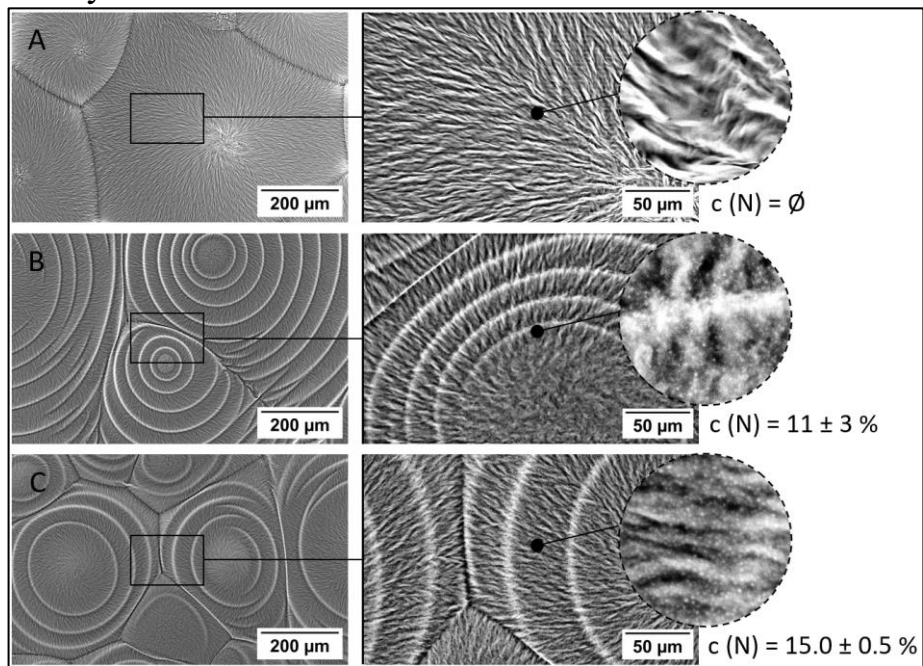


Obr. 14: Nahoře příklad designu 3D tištěné mřížky ze směsi BMF a PCL a její mikroskopické struktury s viditelnými sférolity PCL, dole SEM snímky srovnávající detailní strukturu mřížek z čistého PCL a obohaceného o BMF z různých systémů rozpouštědel, snímky z digitálního a konfokálního mikroskopu a SEM.

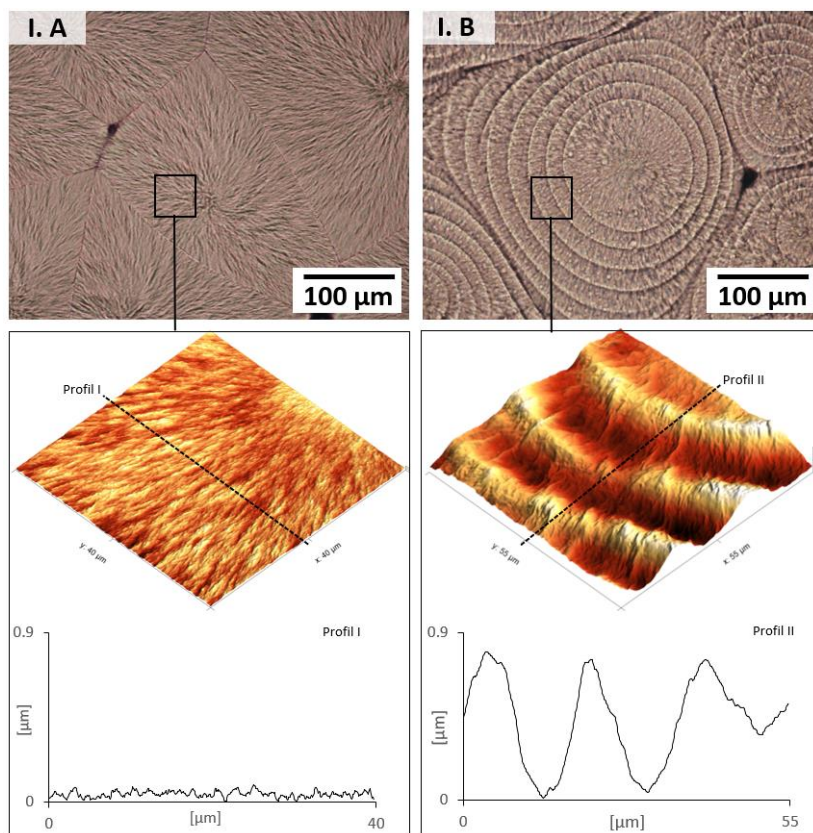
7.2 Příprava filmů ze směsi hedvábného proteinu a PCL

Při přípravě 3D tištěných mřížek ze směsi hedvábného proteinu a polykaprolaktonu byl pozorován významný vliv částic hedvábí ve směsi na sférolitické uspořádání polykaprolaktonu. Pro důkladnější prozkoumání tohoto jevu byly ze směsi připravovány filmy, které jsou odlévané a sušené za definovaných podmínek. Obr. 15 prezentuje prvotní výsledky získané z filmů s podílem 0, 10 a 20 hm. % fibroinu vůči PCL. Filmy byly odlévány z 10% roztoku BMF-PCL v HFIP do kultivačních PS misek v objemu 600 μ l a sušeny pod víčky v exsikátoru za průtoku suchého vzduchu při laboratorní teplotě 23 $^{\circ}$ C cca 20 h. Pomocí SEM bylo možné pozorovat na filmech z čistého PCL standardní krystalické uspořádání mikroskopické struktury ve formě radiálních sférolitů. U filmů s příměsí BMF však dochází v první řadě ke zmenšení sférolitů podobně jako u 3D tisku prezentovaného výše, ale zároveň se sférolity uspořádávají do prstencových struktur, ve kterých lze opět pozorovat v detailu částice fibroinu. Přítomnost fibroinu byla prokázána pomocí SEM prvkové analýzy detekující přítomnost dusíku. Na Obr. 16 je znázorněna detailní struktura radiálního a prstencového sférolitu. Studie Kellera, Keitha a Paddena vysvětlují princip vzniku prstencové struktury sférolitů zjednodušeně jako důsledek spirálového stáčení lamel při radiální krystalizaci [166,167] Pro překročení určité koncentrace fibroinu ve směsi ustává tvorba PCL sférolitů. U směsi s přebytkem fibroinu, Obr. 17, dochází k vzniku porézní struktury na povrchu, která je

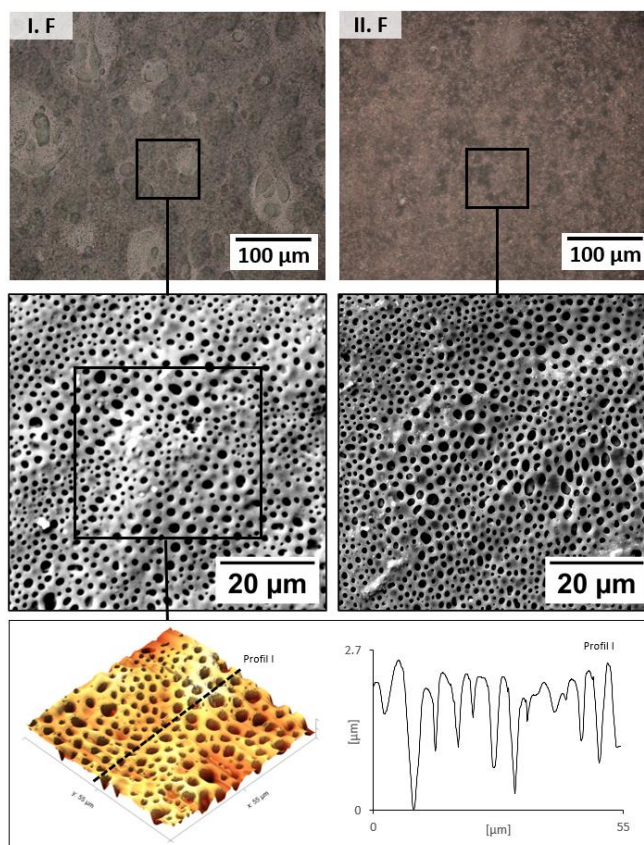
pravděpodobně způsobena separací fází při vysychání polymerní vrstvy, při které zcela zaniká krystalická struktura PCL, jak plyne z preliminárních výsledků krystalografických měření.



Obr. 15: SEM analýza filmů připravených ze směsi BMF a PCL s obsahem BMF vůči PCL: A) 0 %, B) 10 %, C) 20 %; vpravo výřezy o průměru 3 μm.



Obr. 16: Detailní zobrazení povrchu A s podílem BMF 0 % a B s podílem BMF 10 %; I. rozpouštění při 24 °C, měřeno optickým mikroskopem a AFM.

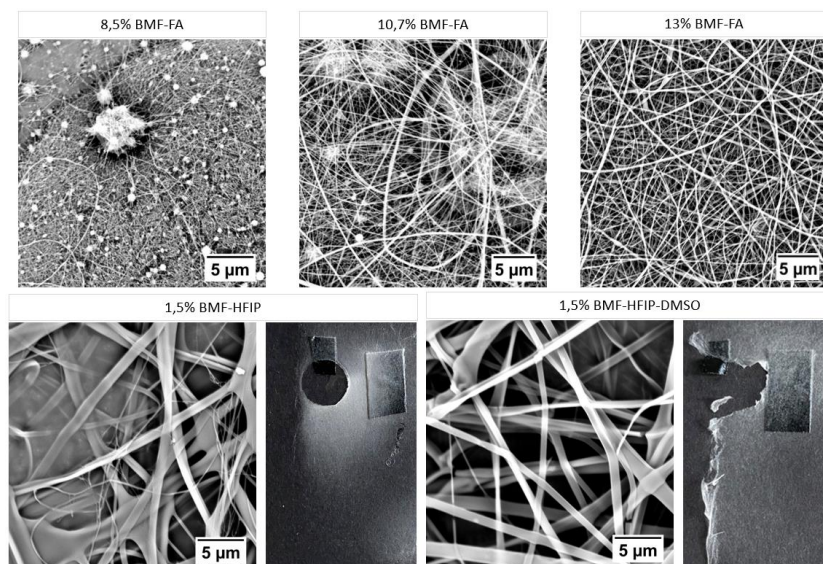


Obr. 17: Detailní SEM a AFM zobrazení povrchu s podílem BMF 67 %; I. rozpouštění při 24 °C, II. rozpouštění při 40 °C.

7.1 Příprava vlákněných struktur na bázi hedvábného proteinu

Zpracování hedvábí pomocí electrospinningu

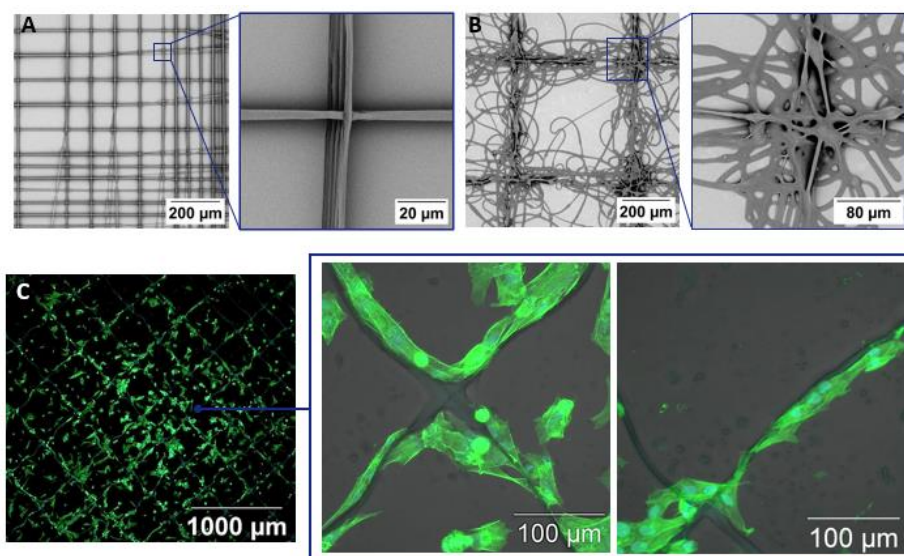
Z roztoků hedvábného proteinu byly připravovány vlákněné struktury metodou electrospinningu za užití několika systémů rozpouštědel – kyseliny mravenčí, HFIP a HFIP v kombinaci s DMSO, Obr. 18. Zvlákňování z kyseliny mravenčí je velmi snadné a získané výsledky odpovídají literatuře. [37] Pro dosažení homogenní vlákněné struktury je však nezbytná koncentrace fibroinu nad 10 hm.%. Vznikající vlákna mají tloušťku v řádu stovek nanometrů. Zvlákňování z roztoku HFIP je podstatně náročnější, a to z důvodu velmi rychlého odpařování rozpouštědla, proto byla také volena nižší koncentrace proteinu v roztoku od 1,5 do 3 %, přičemž při nižší koncentraci byly získány lepší výsledky. Ve srovnání s kyselinou mravenčí mají vlákna výrazně větší průměr přes 1 μm. Zvlákňování rovněž probíhá rychleji a jeho výsledkem je vznik samonosné sítě, které v případě zvlákňování z kyseliny mravenčí nebylo dosaženo. Příměs dimethylsulfoxidu do směsi výrazně zlepšila rychlost zvlákňování a tvorbu pevné sítě. V rámci tohoto výzkumného směru byla vypracována bakalářská práce A. Bulgurovské. [168]



Obr. 18: Vlákna hedvábného proteinu znázorněná pomocí SEM připravená metodou elektrospinningu z různých systémů rozpouštědel.

Orientovaný růst buněk podél vláknenných struktur

Roztoky PCL v HFIP a PCL s BMF v HFIP připravené pro extruzní tisk byly následně zpracovány technologií, která není stěžejním předmětem této práce, a to elektrickým polem asistovaným 3D tiskem. Na srovnání znázorněném na Obr. 19 lze pozorovat vliv příměsi fibroinu na stabilitu toku tiskové směsi v průběhu procesu. Zatímco s pomocí čistého PCL lze připravit velmi jemné vysoce organizované mřížky, příměs fibroinu zapříčiní chaotické ukládání vláken a vyžaduje náročnější optimalizaci procesu. Dále byl testován předpoklad, zda budou mít připravené struktury vliv na orientaci růstu lidských fibroblastů. Na snímcích z fluorescenčního mikroskopu lze pozorovat preferenční růst fibroblastů podél naváděcí struktury. Orientovaná mřížková struktura představuje perspektivní podklad pro sledování růstu nervových buněk.



Obr. 19: Mřížky připravené technikou elektrickým polem asistovaného 3D tisku A) z čistého PCL v HFIP, B) ze směsi PCL a BMF v HFIP, C) orientovaný růst buněk podél tištěných mřížek z PCL, snímky ze SEM a konfokálního mikroskopu.

8. PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI

Provedená studie je přínosná jak v oblasti základního výzkumu, tak pro možné praktické aplikace. Nabízí nové poznatky v oblasti pochopení vlivu sekundární struktury polymerů na jejich zpracování a zároveň prezentuje potenciálně funkční modely pro budoucí aplikace v regenerativní medicíně.

V oblasti základního výzkumu je tato studie přínosná zejména z důvodu prokázání vlivu výchozí konformace proteinu na následné zpracování pomocí fázově separačních technik.

Přínos práce plyne z přenesení fázově-separační modifikační techniky z jednoduchého systému syntetického polymeru na komplexní proteinovou strukturu. Připravované samonosné filmy se specifickými hierarchickými povrchovými texturami podporujícími buněčnou proliferaci pak představují užitečný systém aplikovatelný v oblasti hojení ran a studií spojených s epitelovou nebo vazivovou tkání.

Metoda selektivního značení proteinového povrchu principiálně vysvětluje proces utváření povrchového reliéfu dávkováním směsí rozpouštědel a zároveň představuje možný nástroj ke specifickému vázání buněk.

Studie věnované popisu vlivu samo-organizovaných toků kapaliny na biopolymerní systémy přináší nové informace o chování makromolekul v roztoku a na rozhraní s pevnou látkou. Tyto poznatky budou dále aplikovány při přípravě filmů s laditelnými mechanickými vlastnostmi, rozpustností a stabilitou.

Další důležité poznání plyne ze studie věnované směsím hedvábného proteinu s polykaprolaktonem, kde byla sledována jak přirozená tvorba částic fibroinu v roztoku v přítomnosti polykaprolaktonu, tak zásadní vliv na krystalizaci tohoto syntetického polymeru. Matrice syntetického polymeru s laditelnou krystalinitou obohacená částicemi přírodního polymeru pak představuje zajímavý prvek pro řadu aplikací v oblasti regenerativní medicíny, zejména z hlediska optimalizace mechanických vlastností, rychlosti degradace a vlivu na biologický systém. Tyto směsi jsou vhodné jak pro zpracování do podoby filmů, tak pro zpracování metodou 3D tisku nebo elektrospinningu, což umožňuje přípravu hierarchicky organizovaných multikomponentních struktur vhodných pro vázání aktivních látek vyvolávajících specifické buněčné interakce.

9. ZÁVĚR

V teoretické části práce byla provedena rešerše popisující důležitou roli proteinů v tkáňovém inženýrství z různých úhlů pohledu a významný vliv povrchových vlastností materiálů na interakce na buněčné úrovni. Dále byl představen hedvábný protein, jeho vlastnosti a význam pro regenerativní medicínu. Byly popsány možnosti jeho zpracování a potenciální aplikace.

V poslední řadě byly stručně představeny stěžejní technologie využívané při experimentální činnosti.

Cílem experimentální části předložené práce byla příprava originálních struktur vhodných pro aplikace v tkáňovém inženýrství. Tento cíl byl naplněn na několika úrovních.

V první řadě byla prezentována příprava texturovaných filmů na bázi hedvábného proteinu pomocí několika rozdílných postupů založených na fázové separaci, a to sekvenovaným dávkováním rozpouštědel na rotující substrát, jednorázovým nanesením směsi rozpouštědel na statický substrát, nebo působením par rozpouštědel na zbotnalou polymerní vrstvu. Bylo zjištěno, že proveditelnost těchto technik a s tím související uspořádání vytvářeného reliéfu podmiňuje sekundární konformace proteinu. Analýzou povrchu bylo zjištěno, že vznikají povrchové nerovnosti na více úrovních od nano- přes mikro- až po makro- rozměr. Dále byl prokázán pozitivní účinek připravených povrchů na růst lidských fibroblastů a keratinocytů při současných antibakteriálních účincích připouštějící možnost budoucích aplikací při hojení ran.

Modifikace sekvenovaným dávkováním za rotace fibroinového filmu ve stavu Silk II byla dále popsána v kontextu selektivního vázání bioaktivních látek na povrch. Na modelovém systému s fluorescenčním značením byl nastíněn princip utváření porézního povrchu a následně byl povrch selektivně modifikován pomocí adhezivní peptidové sekvence RGD. Na povrchích byly následně provedeny testy buněčné proliferace prokazující pozitivní vliv RGD peptidu na adhezi buněk a naznačující selektivní adhezi buněk k izolovaným oblastem s RGD peptidem.

V rámci studia vlivu samo-organizovaných toků kapaliny na hyaluronan a fibroin byl prokázána možnost modifikace uspořádání těchto makromolekulárních systémů bez nutnosti zasáhnout do chemického složení disperzního systému. Tento postup se ukázal jako účinný nástroj pro úpravu fyzikálně-chemických vlastností biopolymerů stejně jako strukturních a mechanických vlastností polymerních vrstev a pokročilých konstrukcí z takto upravených materiálů.

V další části práce byla popsána příprava směsi fibroinu se syntetickým polymerem polykaprolaktonem a možnosti jejich zpracování metodou 3D tisku. Byly nalezeny optimální koncentrace pro snadné zpracování těchto směsí. Ve formě filmu byly následně studovány změny ve sférolitických strukturách polykaprolaktonu v důsledku inkorporace částic hedvábí. Z vybraných směsí byly připraveny různě dimenzované mřížky pro studium orientovaného růstu buněk. Dále byly prezentovány výsledky zpracování směsí hedvábí do vláknenných struktur metodou elektrospinningu.

Směr věnující se přípravě směsí hedvábného proteinu s polykaprolaktonem bude dále studován s ohledem na změny uspořádání krystalických částí v důsledku inkorporace částic hedvábí do matric tvořených převážně syntetickým

polymerem. Dále budou rozvíjeny možnosti zpracování těchto směsí pokročilými 3D tiskovými metodami za účelem přípravy hierarchicky texturovaných multikomponentních struktur na bázi hedvábí pro specifické biologické aplikace.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] J.M. Aamodt, D.W. Grainger, Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response, *Biomaterials*. 86 (2016) 68–82. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.02.003.
- [2] F. Rosso, A. Giordano, M. Barbarisi, A. Barbarisi, From Cell-ECM Interactions to Tissue Engineering, *J. Cell. Physiol.* 199 (2004) 174–180. doi: 10.1002/jcp.10471.
- [3] N.K. Karamanos, A.D. Theocharis, Z. Piperigkou, D. Manou, L. Duca, M. Durbeej, A guide to the composition and functions of the extracellular matrix, 288 (2021) 6850–6912. doi: 10.1111/febs.15776.
- [4] R. Langer, J.P. Vacanti, Tissue Engineering, *Science* (80-.). 260 (1993) 920–926. doi: 10.1126/science.8493529.
- [5] M. Geetha, A.K. Singh, R. Asokamani, A.K. Gogia, Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review, *Prog. Mater. Sci.* 54 (2009) 397–425. doi: 10.1016/j.pmatsci.2008.06.004.
- [6] T. Moro, Y. Takatori, K. Ishihara, T. Konno, Y. Takigawa, T. Matsushita, U. Chung, K. Nakamura, H. Kawaguchi, Surface grafting of artificial joints with a biocompatible polymer for preventing periprosthetic osteolysis, *Nat. Mater.* 3 (2004) 829–836. doi: 10.1038/nmat1233.
- [7] M.B. Blatz, A. Sadan, M. Kern, Resin-ceramic bonding: A review of the literature, *J. Prosthet. Dent.* 89 (2003) 268–274. doi: 10.1067/mpr.2003.50.
- [8] A.C. Jen, M.C. Wake, A.G. Mikos, Review: Hydrogels for cell immobilization, *Biotechnol. Bioeng.* 50 (1996) 357–364. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960520)50:4<357::AID-BIT2>3.3.CO;2-F.
- [9] K. Rezwani, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, A.R. Boccaccini, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*. 27 (2006) 3413–3431. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.039.
- [10] L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biodegradable polymers as biomaterials, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 762–798. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.
- [11] J. Hubbell, Bioactive biomaterials, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (1999) 123–129. doi: 10.1016/S0958-1669(99)80021-4.
- [12] S. Bose, D. Ke, H. Sahasrabudhe, A. Bandyopadhyay, Additive manufacturing of biomaterials, *Prog. Mater. Sci.* 93 (2018) 45–111. doi: 10.1016/j.pmatsci.2017.08.003.
- [13] S. Bose, C. Koski, A.A. Vu, Additive manufacturing of natural biopolymers and composites for bone tissue engineering, *Mater. Horizons*. 7 (2020) 2011–2027. doi: 10.1039/d0mh00277a.
- [14] F.-M. Chen, X. Liu, Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering, *Prog. Polym. Sci.* 53 (2016) 86–168. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004.
- [15] A. Sionkowska, Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review, *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 1254–

1276. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.05.003.
- [16] W. Hu, Z. Wang, Y. Xiao, S. Zhang, J. Wang, Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels, *Biomater. Sci.* 7 (2019) 843–855. doi: 10.1039/C8BM01246F.
- [17] C. Vepari, D.L. Kaplan, Silk as a biomaterial, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 991–1007. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013.
- [18] G.H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R.L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, D.L. Kaplan, Silk-based biomaterials, *Biomaterials.* 24 (2003) 401–416. doi: 10.1016/S0142-9612(02)00353-8.
- [19] D. Umuhoza, F. Yang, D. Long, Z. Hao, J. Dai, A. Zhao, Strategies for Tuning the Biodegradation of Silk Fibroin-Based Materials for Tissue Engineering Applications, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 6 (2020) 1290–1310. doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b01781.
- [20] T.M. Muffly, A.P. Tizzano, M.D. Walters, The history and evolution of sutures in pelvic surgery, *J. R. Soc. Med.* 104 (2011) 107–112. doi: 10.1258/jrsm.2010.100243.
- [21] D.J.H. Gregory H. Altman, Jingsong Chen, Rebecca L. Horan, Methods for making biocompatible, implantable, substantially sericin free silk fabric, U.S. 8,685,426, 2014.
- [22] D.J.H. Gregory H. Altman, Jingsong Chen, Rebecca Horan, Sericin extracted fabrics, US 9,066,884 B2, 2015.
- [23] X. Mu, V. Fitzpatrick, D.L. Kaplan, From Silk Spinning to 3D Printing: Polymer Manufacturing using Directed Hierarchical Molecular Assembly, *Adv. Healthc. Mater.* 9 (2020) 1901552. doi: 10.1002/adhm.201901552.
- [24] F.P. Seib, Emerging Silk Material Trends: Repurposing, Phase Separation and Solution-Based Designs, *Materials (Basel).* 14 (2021) 1160. doi: 10.3390/ma14051160.
- [25] Q. Wang, S. Zhou, L. Wang, R. You, S. Yan, Q. Zhang, M. Li, Bioactive silk fibroin scaffold with nanoarchitecture for wound healing, *Compos. Part B Eng.* 224 (2021) 109165. doi: 10.1016/j.compositesb.2021.109165.
- [26] L. Bai, D. Wu, J. Xu, H. Liu, M. Xie, G. Guan, Z. Sun, X. Tan, On model of angiogenesis and the mechanism in porous silk fibroin films, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22 (2011) 927–933. doi: 10.1007/s10856-011-4258-y.
- [27] Z. Fan, L. Xiao, G. Lu, Z. Ding, Q. Lu, Water-insoluble amorphous silk fibroin scaffolds from aqueous solutions, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 108 (2020) 798–808. doi: 10.1002/jbm.b.34434.
- [28] Z. Zhengshi, D. Zhaozhao, H. Jiwei, Q. Jianzhong, S. Yixin, Z. Feng, Z. Baoqi, Green process to prepare water-insoluble silk scaffolds with silk I structure, *Int. J. Biol. Macromol.* 117 (2018) 144–151. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.175.
- [29] J. Nam, Y.H. Park, Morphology of regenerated silk fibroin: Effects of freezing temperature, alcohol addition, and molecular weight, *J. Appl. Polym. Sci.* 81 (2001) 3008–3021. doi: 10.1002/app.1751.
- [30] A. Teimouri, M. Azadi, R. Emadi, J. Lari, A.N. Chermahini, Preparation,

- characterization, degradation and biocompatibility of different silk fibroin based composite scaffolds prepared by freeze-drying method for tissue engineering application, *Polym. Degrad. Stab.* 121 (2015) 18–29. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.08.004.
- [31] M.K. Gupta, S.K. Khokhar, D.M. Phillips, L.A. Sowards, L.F. Drummy, M.P. Kadakia, R.R. Naik, Patterned silk films cast from ionic liquid solubilized fibroin as scaffolds for cell growth, *Langmuir*. 23 (2007) 1315–1319. doi: 10.1021/la062047p.
- [32] F. Galeotti, A. Andicsova, S. Yunus, C. Botta, Precise surface patterning of silk fibroin films by breath figures, *Soft Matter*. 8 (2012) 4815–4821. doi: 10.1039/c2sm25089f.
- [33] H. Perry, A. Gopinath, D.L. Kaplan, L. Dal Negro, F.G. Omenetto, Nano- and Micropatterning of Optically Transparent, Mechanically Robust, Biocompatible Silk Fibroin Films, *Adv. Mater.* 20 (2008) 3070–3072. doi: 10.1002/adma.200800011.
- [34] C. Malinowski, F. He, Y. Zhao, I. Chang, D.W. Hatchett, S. Zhai, H. Zhao, Nanopatterned silk fibroin films with high transparency and high haze for optical applications, *RSC Adv.* 9 (2019) 40792–40799. doi: 10.1039/C9RA07391D.
- [35] D. Wang, Y. Sun, X. Ding, G. Peng, T. Zou, H. Liu, Y. Fan, Influence of Micropatterned Silk Fibroin Films on Human Umbilical Endothelial Cell Behaviors, *J. Med. Biol. Eng.* 37 (2017) 750–759. doi: 10.1007/s40846-017-0249-x.
- [36] S.H. Kim, Y.S. Nam, T.S. Lee, W.H. Park, Silk Fibroin Nanofiber. Electrospinning, Properties, and Structure, *Polym. J.* 35 (2003) 185–190. doi: 10.1295/polymj.35.185.
- [37] B.-M. Min, G. Lee, S.H. Kim, Y.S. Nam, T.S. Lee, W.H. Park, Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro, *Biomaterials*. 25 (2004) 1289–1297. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.08.045.
- [38] S. Sukigara, M. Gandhi, J. Ayutsede, M. Micklus, F. Ko, Regeneration of *Bombyx mori* silk by electrospinning—part 1: processing parameters and geometric properties, *Polymer (Guildf)*. 44 (2003) 5721–5727. doi: 10.1016/S0032-3861(03)00532-9.
- [39] S. Zarkoob, D.H. Reneker, D. Ertley, R.K. Eby, S.D. Hudson, Synthetically spun silk nanofibers and a process for making the same. U.S. Patent No. 6,110,590. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office., (2000).
- [40] S. Zarkoob, R. Eby, D.H. Reneker, S.D. Hudson, D. Ertley, W.W. Adams, Structure and morphology of electrospun silk nanofibers, *Polymer (Guildf)*. 45 (2004) 3973–3977. doi: 10.1016/j.polymer.2003.10.102.
- [41] L. Jeong, K.Y. Lee, J.W. Liu, W.H. Park, Time-resolved structural investigation of regenerated silk fibroin nanofibers treated with solvent

- vapor, *Int. J. Biol. Macromol.* 38 (2006) 140–144. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2006.02.009.
- [42] H. Zhao, X. Ren, Y. Zhang, L. Huang, Influence of self-assembly regenerated silk fibroin nanofibers on the properties of electrospun materials, *Biomed. Mater. Eng.* 26 (2015) S89–S94. doi: 10.3233/BME-151293.
- [43] Y. Kishimoto, T. Kobashi, S. Yamanaka, H. Morikawa, Y. Tamada, Comparisons between silk fibroin nonwoven electrospun fabrics using aqueous and formic acid solutions, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 67 (2018) 462–467. doi: 10.1080/00914037.2017.1342253.
- [44] H.W. Ju, O.J. Lee, J.M. Lee, B.M. Moon, H.J. Park, Y.R. Park, M.C. Lee, S.H. Kim, J.R. Chao, C.S. Ki, C.H. Park, Wound healing effect of electrospun silk fibroin nanomatrix in burn-model, *Int. J. Biol. Macromol.* 85 (2016) 29–39. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.12.055.
- [45] D. Lan, Z. Liu, J. Zhou, M. Xu, Z. Li, F. Dai, Preparation and characterization of silk fibroin/polyethylene oxide nanofiber membranes with antibacterial activity, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 110 (2022) 287–297. doi: 10.1002/jbm.a.37285.
- [46] Q. Lv, Q. Feng, K. Hu, F. Cui, Three-dimensional fibroin/collagen scaffolds derived from aqueous solution and the use for HepG2 culture, *Polymer (Guildf).* 46 (2005) 12662–12669. doi: 10.1016/j.polymer.2005.10.137.
- [47] J. Yao, Design, Expression and Characterization of Collagen-Like Proteins Based on the Cell Adhesive and Crosslinking Sequences Derived from Native Collagens, *J. Biochem.* 136 (2004) 643–649. doi: 10.1093/jb/mvh172.
- [48] J. Zhou, C. Cao, X. Ma, J. Lin, Electrospinning of silk fibroin and collagen for vascular tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.* 47 (2010) 514–519. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2010.07.010.
- [49] J. Chen, Y. Zhan, Y. Wang, D. Han, B. Tao, Z. Luo, S. Ma, Q. Wang, X. Li, L. Fan, C. Li, H. Deng, F. Cao, Chitosan/silk fibroin modified nanofibrous patches with mesenchymal stem cells prevent heart remodeling post-myocardial infarction in rats, *Acta Biomater.* 80 (2018) 154–168. doi: 10.1016/j.actbio.2018.09.013.
- [50] J. He, Y. Cheng, P. Li, Y. Zhang, H. Zhang, S. Cui, Preparation and characterization of biomimetic tussah silk fibroin/chitosan composite nanofibers, *Iran. Polym. J.* 22 (2013) 537–547. doi: 10.1007/s13726-013-0153-3.
- [51] G.-J. Lai, K.T. Shalumon, S.-H. Chen, J.-P. Chen, Composite chitosan/silk fibroin nanofibers for modulation of osteogenic differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells, *Carbohydr. Polym.* 111 (2014) 288–297. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.04.094.
- [52] J. Chen, Y. Zhan, Y. Wang, D. Han, B. Tao, Z. Luo, S. Ma, Q. Wang, X. Li, L. Fan, C. Li, H. Deng, F. Cao, Chitosan/silk fibroin modified

- nanofibrous patches with mesenchymal stem cells prevent heart remodeling post-myocardial infarction in rats, *Acta Biomater.* 80 (2018) 154–168. doi: 10.1016/j.actbio.2018.09.013.
- [53] M.A. Nazeer, E. Yilgor, I. Yilgor, Electrospun polycaprolactone/silk fibroin nanofibrous bioactive scaffolds for tissue engineering applications, *Polymer (Guildf)*. 168 (2019) 86–94. doi: 10.1016/j.polymer.2019.02.023.
- [54] H. Zhao, X. Ren, Y. Zhang, L. Huang, Influence of self-assembly regenerated silk fibroin nanofibers on the properties of electrospun materials, *Biomed. Mater. Eng.* 26 (2015) S89–S94. doi: 10.3233/BME-151293.
- [55] J.S. Lim, C.S. Ki, J.W. Kim, K.G. Lee, S.W. Kang, H.Y. Kweon, Y.H. Park, Fabrication and evaluation of poly(epsilon-caprolactone)/silk fibroin blend nanofibrous scaffold, *Biopolymers*. 97 (2012) 265–275. doi: 10.1002/bip.22016.
- [56] I.F. Cengiz, F.R. Maia, A. da Silva Morais, J. Silva-Correia, H. Pereira, R.F. Canadas, J. Espregueira-Mendes, I.K. Kwon, R.L. Reis, J.M. Oliveira, Entrapped in cage (EiC) scaffolds of 3D-printed polycaprolactone and porous silk fibroin for meniscus tissue engineering, *Biofabrication*. 12 (2020) 025028. doi: 10.1088/1758-5090/ab779f.
- [57] G. Cheng, J. Chen, Q. Wang, X. Yang, Y. Cheng, Z. Li, H. Tu, H. Deng, Z. Li, Promoting osteogenic differentiation in pre-osteoblasts and reducing tibial fracture healing time using functional nanofibers, *Nano Res.* 11 (2018) 3658–3677. doi: 10.1007/s12274-017-1934-3.
- [58] M.K. Włodarczyk-Biegun, A. del Campo, 3D bioprinting of structural proteins, *Biomaterials*. 134 (2017) 180–201. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.04.019.
- [59] E. DeSimone, K. Schacht, T. Jungst, J. Groll, T. Scheibel, Biofabrication of 3D constructs: fabrication technologies and spider silk proteins as bioinks, *Pure Appl. Chem.* 87 (2015) 737–749. doi: 10.1515/pac-2015-0106.
- [60] S. Sakai, A. Yoshii, S. Sakurai, K. Horii, O. Nagasuna, Silk fibroin nanofibers: a promising ink additive for extrusion three-dimensional bioprinting, *Mater. Today Bio.* 8 (2020) 100078. doi: 10.1016/j.mtbio.2020.100078.
- [61] W. Shi, M. Sun, X. Hu, B. Ren, J. Cheng, C. Li, X. Duan, X. Fu, J. Zhang, H. Chen, Y. Ao, Structurally and Functionally Optimized Silk-Fibroin-Gelatin Scaffold Using 3D Printing to Repair Cartilage Injury In Vitro and In Vivo, *Adv. Mater.* 29 (2017) 1701089. doi: 10.1002/adma.201701089.
- [62] S. Mitragotri, J. Lahann, Physical approaches to biomaterial design, *Nat. Mater.* 8 (2009) 15–23. doi: 10.1038/nmat2344.
- [63] K. Nishida, T. Anada, S. Kobayashi, T. Ueda, M. Tanaka, Effect of bound water content on cell adhesion strength to water-insoluble polymers, *Acta Biomater.* 134 (2021) 313–324. doi: 10.1016/j.actbio.2021.07.058.
- [64] N. Nath, J. Hyun, H. Ma, A. Chilkoti, Surface engineering strategies for

- control of protein and cell interactions, *Surf. Sci.* 570 (2004) 98–110. doi: 10.1016/j.susc.2004.06.182.
- [65] A.J. García, Interfaces to control cell-biomaterial adhesive interactions, *Adv. Polym. Sci.* 203 (2006) 171–190. doi: 10.1007/12_071.
- [66] B.G. Keselowsky, D.M. Collard, A.J. García, Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 66A (2003) 247–259. doi: 10.1002/jbm.a.10537.
- [67] A.J. García, M.D. Vega, D. Boettiger, Modulation of Cell Proliferation and Differentiation through Substrate-dependent Changes in Fibronectin Conformation, *Mol. Biol. Cell.* 10 (1999) 785–798. doi: 10.1091/mbc.10.3.785.
- [68] M.J. Penna, M. Mijajlovic, M.J. Biggs, Molecular-Level Understanding of Protein Adsorption at the Interface between Water and a Strongly Interacting Uncharged Solid Surface, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 5323–5331. doi: 10.1021/ja411796e.
- [69] V.P. Zhdanov, B. Kasemo, Van der Waals Interaction during Protein Adsorption on a Solid Covered by a Thin Film, *Langmuir.* 17 (2001) 5407–5409. doi: 10.1021/la0104222.
- [70] P. Tengvall, 4.6 Protein Interactions With Biomaterials ☆, in: *Compr. Biomater. II*, Elsevier, 2017: pp. 70–84. doi: 10.1016/B978-0-12-803581-8.10110-9.
- [71] W. Norde, D. Gage, Interaction of Bovine Serum Albumin and Human Blood Plasma with PEO-Tethered Surfaces: Influence of PEO Chain Length, Grafting Density, and Temperature, *Langmuir.* 20 (2004) 4162–4167. doi: 10.1021/la030417t.
- [72] J.. Kim, S.. Kim, PEO-grafting on PU/PS IPNs for enhanced blood compatibility—effect of pendant length and grafting density, *Biomaterials.* 23 (2002) 2015–2025. doi: 10.1016/S0142-9612(01)00330-1.
- [73] A.J. García, C.D. Reyes, Bio-adhesive Surfaces to Promote Osteoblast Differentiation and Bone Formation, *J. Dent. Res.* 84 (2005) 407–413. doi: 10.1177/154405910508400502.
- [74] R.G. Harrison, The cultivation of tissues in extraneous media as a method of morpho-genetic study, *Anat. Rec.* 6 (1912) 181–193. doi: 10.1002/ar.1090060404.
- [75] P. Weiss, Experiments on cell and axon orientation in vitro, *J. Exp. Zool.* 1 (1945) 353–386.
- [76] F. Zhou, L. Yuan, H. Huang, H. Chen, Phenomenon of “contact guidance” on the surface with nano-micro-groove-like pattern and cell physiological effects, *Chinese Sci. Bull.* 54 (2009) 3200–3205. doi: 10.1007/s11434-009-0366-1.
- [77] A.I. Teixeira, G.A. Abrams, P.J. Bertics, C.J. Murphy, P.F. Nealey, Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 1881–1892. doi: 10.1242/jcs.00383.

- [78] S.A. Fraser, Y. Ting, K.S. Mallon, A.E. Wendt, C.J. Murphy, P.F. Nealey, Sub-micron and nanoscale feature depth modulates alignment of stromal fibroblasts and corneal epithelial cells in serum-rich and serum-free media, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 86A (2008) 725–735. doi: 10.1002/jbm.a.31519.
- [79] A.I. Teixeira, G.A. McKie, J.D. Foley, P.J. Bertics, P.F. Nealey, C.J. Murphy, The effect of environmental factors on the response of human corneal epithelial cells to nanoscale substrate topography, *Biomaterials*. 27 (2006) 3945–3954. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.044.
- [80] E.T. den Braber, J.E. de Ruijter, L.A. Ginsel, A.F. von Recum, J.A. Jansen, Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* 40 (1998) 291–300. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(199805)40:2<291::AID-JBM14>3.0.CO;2-P.
- [81] A.F. Von Recum, T.G. Van Kooten, The influence of micro-topography on cellular response and the implications for silicone implants, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 7 (1996) 181–198. doi: 10.1163/156856295X00698.
- [82] T.P. O'Connor, D. Bentley, Accumulation of actin in subsets of pioneer growth cone filopodia in response to neural and epithelial guidance cues in situ., *J. Cell Biol.* 123 (1993) 935–948. doi: 10.1083/jcb.123.4.935.
- [83] J. Meyle, K. Gultig, M. Brich, H. Hammerle, W. Nisch, Contact guidance of fibroblasts on biomaterial surfaces, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 5 (1994) 463–466. doi: 10.1007/BF00058984.
- [84] K. Matsuzaka, F. Walboomers, A. Ruijter, J.A. Jansen, Effect of microgrooved poly-l-lactic (PLA) surfaces on proliferation, cytoskeletal organization, and mineralized matrix formation of rat bone marrow cells, *Clin. Oral Implants Res.* 11 (2000) 325–333. doi: 10.1034/j.1600-0501.2000.011004325.x.
- [85] J.C. Chang, G.J. Brewer, B.C. Wheeler, Modulation of neural network activity by patterning, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 527–533. doi: 10.1016/S0956-5663(01)00166-X.
- [86] Z. Horn, H. Behesti, M.E. Hatten, N-cadherin provides a cis and trans ligand for astrotactin that functions in glial-guided neuronal migration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (2018) 10556–10563. doi: 10.1073/pnas.1811100115.
- [87] S.J. Franco, U. Müller, Extracellular matrix functions during neuronal migration and lamination in the mammalian central nervous system, *Dev. Neurobiol.* 71 (2011) 889–900. doi: 10.1002/dneu.20946.
- [88] S. Joo, J. Yeon Kim, E. Lee, N. Hong, W. Sun, Y. Nam, Effects of ECM protein micropatterns on the migration and differentiation of adult neural stem cells, *Sci. Rep.* 5 (2015) 1–12. doi: 10.1038/srep13043.
- [89] I. Nagata, K. Ono, A. Kawana, J. Kimura-Kuroda, Aligned neurite bundles of granule cells regulate orientation of Purkinje cell dendrites by perpendicular contact guidance in two-dimensional and three-dimensional

- mouse cerebellar cultures, *J. Comp. Neurol.* 499 (2006) 274–289. doi: 10.1002/cne.21102.
- [90] J.S. Goldner, J.M. Bruder, G. Li, D. Gazzola, D. Hoffman-Kim, Neurite bridging across micropatterned grooves, *Biomaterials.* 27 (2006) 460–472. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.06.035.
- [91] A. Marmaras, T. Lendenmann, G. Civenni, D. Franco, D. Poulidakos, V. Kurtcuoglu, A. Ferrari, Topography-mediated apical guidance in epidermal wound healing, *Soft Matter.* 8 (2012) 6922. doi: 10.1039/c2sm00030j.
- [92] M. Lin, H. Wang, C. Ruan, J. Xing, J. Wang, Y. Li, Y. Wang, Y. Luo, Adsorption Force of Fibronectin on Various Surface Chemistries and Its Vital Role in Osteoblast Adhesion, *Biomacromolecules.* 16 (2015) 973–984. doi: 10.1021/bm501873g.
- [93] R.M. do Nascimento, S.M.M. Ramos, I.H. Bechtold, A.C. Hernandez, Wettability Study on Natural Rubber Surfaces for Applications as Biomembranes, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (2018) 2784–2793. doi: 10.1021/acsbiomaterials.8b00723.
- [94] S. Kumar, S. Raj, E. Kolanthai, A.K. Sood, S. Sampath, K. Chatterjee, Chemical Functionalization of Graphene To Augment Stem Cell Osteogenesis and Inhibit Biofilm Formation on Polymer Composites for Orthopedic Applications, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 7 (2015) 3237–3252. doi: 10.1021/am5079732.
- [95] Y. Zhang, H. Pan, P. Zhang, N. Gao, Y. Lin, Z. Luo, P. Li, C. Wang, L. Liu, D. Pang, L. Cai, Y. Ma, Functionalized quantum dots induce proinflammatory responses in vitro: the role of terminal functional group-associated endocytic pathways, *Nanoscale.* 5 (2013) 5919. doi: 10.1039/c3nr01653f.
- [96] L. Wang, M. He, T. Gong, X. Zhang, L. Zhang, T. Liu, W. Ye, C. Pan, C. Zhao, Introducing multiple bio-functional groups on the poly(ether sulfone) membrane substrate to fabricate an effective antithrombotic bio-interface, *Biomater. Sci.* 5 (2017) 2416–2426. doi: 10.1039/C7BM00673J.
- [97] M.A. Wronska, I.B. O’Connor, M.A. Tilbury, A. Srivastava, J.G. Wall, Adding Functions to Biomaterial Surfaces through Protein Incorporation, *Adv. Mater.* 28 (2016) 5485–5508. doi: 10.1002/adma.201504310.
- [98] A. V. Bryksin, A.C. Brown, M.M. Baksh, M.G. Finn, T.H. Barker, Learning from nature – Novel synthetic biology approaches for biomaterial design, *Acta Biomater.* 10 (2014) 1761–1769. doi: 10.1016/j.actbio.2014.01.019.
- [99] A. Srivastava, I.B. O’Connor, A. Pandit, J. Gerard Wall, Polymer-antibody fragment conjugates for biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* 39 (2014) 308–329. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.09.003.
- [100] B.R. Coad, M. Jasieniak, S.S. Griesser, H.J. Griesser, Controlled covalent surface immobilisation of proteins and peptides using plasma methods, *Surf. Coatings Technol.* 233 (2013) 169–177. doi:

- 10.1016/j.surfcoat.2013.05.019.
- [101] S. Gopalakrishnan, J. Xu, F. Zhong, V.M. Rotello, Strategies for Fabricating Protein Films for Biomaterial Applications, *Adv. Sustain. Syst.* 5 (2021) 2000167. doi: 10.1002/adsu.202000167.
- [102] K. Song, H. Xu, B. Mu, K. Xie, Y. Yang, Non-toxic and clean crosslinking system for protein materials: Effect of extenders on crosslinking performance, *J. Clean. Prod.* 150 (2017) 214–223. doi: 10.1016/j.jclepro.2017.03.025.
- [103] B. Jayachandran, T.N. Parvin, M.M. Alam, K. Chanda, B. MM, Insights on Chemical Crosslinking Strategies for Proteins, *Molecules.* 27 (2022) 8124. doi: 10.3390/molecules27238124.
- [104] K. Ulubayram, EGF containing gelatin-based wound dressings, *Biomaterials.* 22 (2001) 1345–1356. doi: 10.1016/S0142-9612(00)00287-8.
- [105] R. Khurana, M. Simons, Insights from Angiogenesis Trials Using Fibroblast Growth Factor for Advanced Arteriosclerotic Disease, *Trends Cardiovasc. Med.* 13 (2003) 116–122. doi: 10.1016/S1050-1738(02)00259-1.
- [106] A. Blesch, P. Lu, M.H. Tuszynski, Neurotrophic factors, gene therapy, and neural stem cells for spinal cord repair, *Brain Res. Bull.* 57 (2002) 833–838. doi: 10.1016/S0361-9230(01)00774-2.
- [107] R. Pankov, K.M. Yamada, Fibronectin at a glance, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 3861–3863. doi: 10.1242/jcs.00059.
- [108] I. Schwartz, D. Seger, S. Shaltiel, Vitronectin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31 (1999) 539–544. doi: 10.1016/S1357-2725(99)00005-9.
- [109] M. Durbeej, Laminins, *Cell Tissue Res.* 339 (2010) 259–268. doi: 10.1007/s00441-009-0838-2.
- [110] N.H. Romano, D. Sengupta, C. Chung, S.C. Heilshorn, Protein-engineered biomaterials: Nanoscale mimics of the extracellular matrix, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1810 (2011) 339–349. doi: 10.1016/j.bbagen.2010.07.005.
- [111] S. Gomes, I.B. Leonor, J.F. Mano, R.L. Reis, D.L. Kaplan, Natural and genetically engineered proteins for tissue engineering, *Prog. Polym. Sci.* 37 (2012) 1–17. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.07.003.
- [112] C. Vendrely, T. Scheibel, Biotechnological Production of Spider-Silk Proteins Enables New Applications, *Macromol. Biosci.* 7 (2007) 401–409. doi: 10.1002/mabi.200600255.
- [113] N.P.C. Horrocks, F. Vollrath, C. Dicko, The silkmoth cocoon as humidity trap and waterproof barrier, *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 164 (2013) 645–652. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.01.023.
- [114] L.C. Hao, S.M. Sapuan, M.R. Hassan, R.M. Sheltami, Natural fiber reinforced vinyl polymer composites, in: *Nat. Fibre Reinf. Vinyl Ester Vinyl Polym. Compos.*, Elsevier, 2018: pp. 27–70. doi: 10.1016/B978-0-08-102160-6.00002-0.

- [115] Z. Shao, F. Vollrath, Surprising strength of silkworm silk, *Nature*. 418 (2002) 741–741. doi: 10.1038/418741a.
- [116] A.R. Murphy, D.L. Kaplan, Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 6443. doi: 10.1039/b905802h.
- [117] E.S. Sashina, A.M. Bochek, N.P. Novoselov, D.A. Kirichenko, Structure and solubility of natural silk fibroin, *Russ. J. Appl. Chem.* 79 (2006) 869–876. doi: 10.1134/S1070427206060012.
- [118] A.I. Susanin, E.S. Sashina, V. V. Zakharov, M. Zaborski, D.A. Kashirskii, Conformational Transitions of Silk Fibroin in Solutions under the Action of Ultrasound, *Russ. J. Appl. Chem.* 91 (2018) 1193–1197. doi: 10.1134/S1070427218070194.
- [119] Z. Kang, Y. Wang, J. Xu, G. Song, M. Ding, H. Zhao, J. Wang, An RGD-Containing Peptide Derived from Wild Silkworm Silk Fibroin Promotes Cell Adhesion and Spreading, *Polymers (Basel)*. 10 (2018) 1193. doi: 10.3390/polym10111193.
- [120] B. Kundu, R. Rajkhowa, S.C. Kundu, X. Wang, Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 457–470. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.043.
- [121] C.B. Borkner, M.B. Elsner, T. Scheibel, Coatings and films made of silk proteins, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 6 (2014) 15611–15625. doi: 10.1021/am5008479.
- [122] B.D. Lawrence, S. Wharram, J.A. Kluge, G.G. Leisk, F.G. Omenetto, M.I. Rosenblatt, D.L. Kaplan, Effect of Hydration on Silk Film Material Properties, *Macromol. Biosci.* 10 (2010) 393–403. doi: 10.1002/mabi.200900294.
- [123] W. Pudkon, C. Laomeephol, S. Damrongsakkul, S. Kanokpanont, J. Ratanavaraporn, Comparative Study of Silk Fibroin-Based Hydrogels and Their Potential as Material for 3-Dimensional (3D) Printing, *Molecules*. 26 (2021) 3887. doi: 10.3390/molecules26133887.
- [124] S.H. Kim, Y.K. Yeon, J.M. Lee, J.R. Chao, Y.J. Lee, Y.B. Seo, M.T. Sultan, O.J. Lee, J.S. Lee, S. Il Yoon, I.S. Hong, G. Khang, S.J. Lee, J.J. Yoo, C.H. Park, Precisely printable and biocompatible silk fibroin bioink for digital light processing 3D printing, *Nat. Commun.* 9 (2018) 1–14. doi: 10.1038/s41467-018-03759-y.
- [125] H. Hong, Y.B. Seo, D.Y. Kim, J.S. Lee, Y.J. Lee, H. Lee, O. Ajiteru, M.T. Sultan, O.J. Lee, S.H. Kim, C.H. Park, Digital light processing 3D printed silk fibroin hydrogel for cartilage tissue engineering, *Biomaterials*. 232 (2020) 119679. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119679.
- [126] K. Na, S. Shin, H. Lee, D. Shin, J. Baek, H. Kwak, M. Park, J. Shin, J. Hyun, Effect of solution viscosity on retardation of cell sedimentation in DLP 3D printing of gelatin methacrylate/silk fibroin bioink, *J. Ind. Eng. Chem.* 61 (2018) 340–347. doi: 10.1016/j.jiec.2017.12.032.
- [127] M.R. Sommer, M. Schaffner, D. Carnelli, A.R. Studart, 3D Printing of

- Hierarchical Silk Fibroin Structures, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 8 (2016) 34677–34685. doi: 10.1021/acsami.6b11440.
- [128] H. Lee, G.H. Yang, M. Kim, J. Lee, J. Huh, G. Kim, Fabrication of micro/nanoporous collagen/dECM/silk-fibroin biocomposite scaffolds using a low temperature 3D printing process for bone tissue regeneration, *Mater. Sci. Eng. C*. 84 (2018) 140–147. doi: 10.1016/j.msec.2017.11.013.
- [129] Q. Wang, G. Han, S. Yan, Q. Zhang, 3D printing of silk fibroin for biomedical applications, *Materials (Basel)*. 12 (2019). doi: 10.3390/ma12030504.
- [130] H. Cao, X. Chen, L. Huang, Z. Shao, Electrospinning of reconstituted silk fiber from aqueous silk fibroin solution, *Mater. Sci. Eng. C*. 29 (2009) 2270–2274. doi: 10.1016/j.msec.2009.05.012.
- [131] H. Wang, Y. Zhang, H. Shao, X. Hu, Electrospun ultra-fine silk fibroin fibers from aqueous solutions, *J. Mater. Sci.* 40 (2005) 5359–5363. doi: 10.1007/s10853-005-4332-2.
- [132] H. Wang, H. Shao, X. Hu, Structure of silk fibroin fibers made by an electrospinning process from a silk fibroin aqueous solution, *J. Appl. Polym. Sci.* 101 (2006) 961–968. doi: 10.1002/app.24024.
- [133] Y. Hang, Y. Zhang, Y. Jin, H. Shao, X. Hu, Preparation of regenerated silk fibroin/silk sericin fibers by coaxial electrospinning, *Int. J. Biol. Macromol.* 51 (2012) 980–986. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.08.010.
- [134] G. Wei, C. Li, Q. Fu, Y. Xu, H. Li, Preparation of PCL/silk fibroin/collagen electrospun fiber for urethral reconstruction, *Int. Urol. Nephrol.* 47 (2015) 95–99. doi: 10.1007/s11255-014-0854-3.
- [135] T. Lehmann, A.E. Vaughn, S. Seal, K.W. Liechty, C. Zgheib, Silk Fibroin-Based Therapeutics for Impaired Wound Healing, *Pharmaceutics*. 14 (2022) 651. doi: 10.3390/pharmaceutics14030651.
- [136] M.T. Sultan, O.J. Lee, S.H. Kim, H.W. Ju, C.H. Park, Silk Fibroin in Wound Healing Process, in: 2018: pp. 115–126. doi: 10.1007/978-981-13-0947-2_7.
- [137] Ł. Mazurek, M. Szudzik, M. Rybka, M. Konop, Silk Fibroin Biomaterials and Their Beneficial Role in Skin Wound Healing, *Biomolecules*. 12 (2022) 1852. doi: 10.3390/biom12121852.
- [138] M.R. Ceccarini, V. Palazzi, R. Salvati, I. Chiesa, C. De Maria, S. Bonafoni, P. Mezzanotte, M. Codini, L. Pacini, F. Errante, P. Rovero, A. Morabito, T. Beccari, L. Roselli, L. Valentini, Biomaterial Inks from Peptide-Functionalized Silk Fibers for 3D Printing of Futuristic Wound-Healing and Sensing Materials, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 947. doi: 10.3390/ijms24020947.
- [139] L. Zhu, K. Wang, T. Ma, L. Huang, B. Xia, S. Zhu, Y. Yang, Z. Liu, X. Quan, K. Luo, D. Kong, J. Huang, Z. Luo, Noncovalent Bonding of RGD and YIGSR to an Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone) Conduit through Peptide Self-Assembly to Synergistically Promote Sciatic Nerve Regeneration in Rats, *Adv. Healthc. Mater.* 6 (2017) 1600860. doi:

- 10.1002/adhm.201600860.
- [140] A.C. de Luca, A. Faroni, S. Downes, G. Terenghi, Differentiated adipose-derived stem cells act synergistically with RGD-modified surfaces to improve neurite outgrowth in a co-culture model, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 10 (2016) 647–655. doi: 10.1002/term.1804.
- [141] M. Cavanaugh, E. Silantjeva, G. Pylypiv Koh, E. Malekzadeh, W.D. Lanzinger, R.K. Willits, M.L. Becker, RGD-Modified Nanofibers Enhance Outcomes in Rats after Sciatic Nerve Injury, *J. Funct. Biomater.* 10 (2019) 24. doi: 10.3390/jfb10020024.
- [142] X. Yu, D. Zhang, C. Liu, Z. Liu, Y. Li, Q. Zhao, C. Gao, Y. Wang, Micropatterned Poly(D,L-Lactide-Co-Caprolactone) Conduits With KHI-Peptide and NGF Promote Peripheral Nerve Repair After Severe Traction Injury, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9 (2021). doi: 10.3389/fbioe.2021.744230.
- [143] C.-W. Huang, S.-Y. Lu, T.-C. Huang, B.-M. Huang, H.S. Sun, S.-H. Yang, J.-I. Chuang, Y.-Y. Hsueh, Y.-T. Wu, C.-C. Wu, FGF9 induces functional differentiation to Schwann cells from human adipose derived stem cells, *Theranostics.* 10 (2020) 2817–2831. doi: 10.7150/thno.38553.
- [144] X. Tang, X. Gu, T. Huang, X. Chen, Z. Zhou, Y. Yang, J. Ling, Anisotropic Silk-Inspired Nerve Conduit with Peptides Improved the Microenvironment for Long-Distance Peripheral Nerve Regeneration, *ACS Macro Lett.* 10 (2021) 1501–1509. doi: 10.1021/acsmacrolett.1c00533.
- [145] A. Alessandrino, F. Fregnan, M. Biagiotti, L. Muratori, G.A. Bassani, G. Ronchi, V. Vincoli, P. Pierimarchi, S. Geuna, G. Freddi, SilkBridge™: a novel biomimetic and biocompatible silk-based nerve conduit, *Biomater. Sci.* 7 (2019) 4112–4130. doi: 10.1039/C9BM00783K.
- [146] R. You, Q. Zhang, X. Li, S. Yan, Z. Luo, J. Qu, M. Li, Multichannel Bioactive Silk Nanofiber Conduits Direct and Enhance Axonal Regeneration after Spinal Cord Injury, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 6 (2020) 4677–4686. doi: 10.1021/acsbiomaterials.0c00698.
- [147] L.D. Gelb, K.E. Gubbins, Studies of binary liquid mixtures in cylindrical pores: phase separation, wetting and finite-size effects from Monte Carlo simulations, *Phys. A Stat. Mech. Its Appl.* 244 (1997) 112–123. doi: 10.1016/S0378-4371(97)00221-5.
- [148] T. Tadros, Flory-Huggins Interaction Parameter, in: *Encycl. Colloid Interface Sci.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013: pp. 523–524. doi: 10.1007/978-3-642-20665-8_89.
- [149] A. Muñoz-Bonilla, M. Fernández-García, J. Rodríguez-Hernández, Towards hierarchically ordered functional porous polymeric surfaces prepared by the breath figures approach, *Prog. Polym. Sci.* 39 (2014) 510–554. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.08.006.
- [150] S. V Murphy, A. Atala, 3D bioprinting of tissues and organs, *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 773–785. doi: 10.1038/nbt.2958.

- [151] J. Xue, T. Wu, Y. Dai, Y. Xia, *Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications*, *Chem. Rev.* 119 (2019) 5298–5415. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00593.
- [152] P.D. Dalton, C. Vaquette, B.L. Farrugia, T.R. Dargaville, T.D. Brown, D.W. Hutmacher, *Electrospinning and additive manufacturing: converging technologies*, *Biomater. Sci.* 1 (2013) 171–185. doi: 10.1039/C2BM00039C.
- [153] A. Rogina, *Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery*, *Appl. Surf. Sci.* 296 (2014) 221–230. doi: 10.1016/j.apsusc.2014.01.098.
- [154] D.N. Rockwood, R.C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M.L. Lovett, D.L. Kaplan, *Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin*, *Nat. Protoc.* 6 (2011) 1612–1631. doi: 10.1038/nprot.2011.379.
- [155] E. Wrzecionko, A. Minařík, P. Smolka, M. Minařík, P. Humpolíček, P. Rejmontová, A. Mráček, M. Minaříková, L. Gřundělová, *Variations of Polymer Porous Surface Structures via the Time-Sequenced Dosing of Mixed Solvents*, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 9 (2017) 6472–6481. doi: 10.1021/acsami.6b15774.
- [156] M. Kadlečková, K. Skopalová, B. Ptošková, E. Wrzecionko, E. Daďová, K. Kocourková, A. Mráček, L. Musilová, P. Smolka, P. Humpolíček, A. Minařík, *Hierarchically Structured Surfaces Prepared by Phase Separation: Tissue Mimicking Culture Substrate*, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 2541. doi: 10.3390/ijms23052541.
- [157] S. Sakurai, C. Furukawa, A. Okutsu, A. Miyoshi, S. Nomura, *Control of mesh pattern of surface corrugation via rate of solvent evaporation in solution casting of polymer film in the presence of convection*, *Polymer (Guildf).* 43 (2002) 3359–3364. doi: 10.1016/S0032-3861(02)00156-8.
- [158] A. Minařík, P. Smolka, L. Lapčík, *Preliminary investigation of factors determining self-organised structures preparation in polymer layers*, *Int. J. Heat Mass Transf.* 54 (2011) 4135–4142. doi: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2011.03.025.
- [159] A. Minařík, M. Rafajová, E. Rajnohová, P. Smolka, A. Mráček, *Self-organised patterns in polymeric films solidified from diluted solutions – The effect of the substrate surface properties*, *Int. J. Heat Mass Transf.* 78 (2014) 615–623. doi: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2014.07.032.
- [160] P. Černá, *Úprava a charakterizace biopolymerních povrchů*. Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2020.
- [161] A. Leal-Egaña, T. Scheibel, *Interactions of cells with silk surfaces*, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 14330. doi: 10.1039/c2jm31174g.
- [162] K. Kocourková, L. Musilová, P. Smolka, A. Mráček, M. Humeník, A. Minařík, *Factors determining self-assembly of hyaluronan*, *Carbohydr. Polym.* 254 (2021) 117307. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117307.
- [163] A. Kamada, Z. Toprakcioglu, T.P.J. Knowles, *Kinetic Analysis Reveals*

the Role of Secondary Nucleation in Regenerated Silk Fibroin Self-Assembly, *Biomacromolecules*. 24 (2023) 1709–1716. doi: 10.1021/acs.biomac.2c01479.

- [164] A. Navrátilová, Charakterizace fibrilárních proteinů. Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta Technologická, 2020.
- [165] M. Gao, X. Liu, B. Ji, R. Hua, G. Li, Y. Zhao, L. Zhang, Y. Yang, Electrospun Silk Fibroin/Polycaprolactone Biomimetic Scaffold for Peripheral Nerve Regeneration, *J. Biomater. Tissue Eng.* 6 (2016) 902–909. doi: 10.1166/jbt.2016.1517.
- [166] H.D. Keith, F.J. Padden, The optical behavior of spherulites in crystalline polymers. Part I. Calculation of theoretical extinction patterns in spherulites with twisting crystalline orientation, *J. Polym. Sci.* 39 (1959) 101–122. doi: 10.1002/pol.1959.1203913509.
- [167] H.D. Keith, F.J. Padden, The optical behavior of spherulites in crystalline polymers. Part II. The growth and structure of the spherulites, *J. Polym. Sci.* 39 (1959) 123–138. doi: 10.1002/pol.1959.1203913510.
- [168] A. Bulgurovská, Strukturované vrstvy na bázi hedvábného proteinu a jejich aplikace v regenerativní medicíně. Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2021.
- [169] A. Minařík, P. Smolka, M. Minařík, A. Mráček, E. Rajnohová, M. Minaříková, L. Grundělová, M. Foglarová, V. Velebný, A special instrument for the defined modification of polymer properties in solutions and polymer layers, *Measurement*. 97 (2017) 218–225. doi: 10.1016/j.measurement.2016.11.006.

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Morfologie lidských epitelálních buněk rohovky na A) hladkém povrchu, B) na drážkovaném substrátu v prostředí DMEM, C) na drážkovaném substrátu o stejných rozměrech v prostředí Epilife. [77,79].....</i>	<i>11</i>
<i>Obr. 2: Vlevo složení hedvábného vlákna, vpravo uspořádání primární struktury aminokyselin do antiparalelního uspořádání β-skládaného listu. [115,116].....</i>	<i>14</i>
<i>Obr. 3: Ukázka 3D tištěné mřížky z fibroinového hydrogelu. [122].....</i>	<i>16</i>
<i>Obr. 4: Schéma znázorňující vznik povrchové topografie porézního charakteru na rotujícím polymerním substrátu v důsledku fázové separace vznikající díky rozdílné rychlosti odpařování rozpouštědel. [156].....</i>	<i>21</i>
<i>Obr. 5: Schéma znázorňující proces přípravy proteinových filmů: A – Statická modifikace: I-sušení v proudící atmosféře dusíku, II-působení par DMSO/směsi rozpouštědel, III-odpaření rozpouštědel a vznik povrchové topografie; B – Modifikace za rotace: I – sušení v proudící atmosféře dusíku, II – transformace sekundární struktury působením vodní páry nebo par metOH, III – depozice směsi rozpouštědel za rotace, IV – odpaření rozpouštědel a vznik povrchové topografie, V – kombinovaný postup.</i>	<i>23</i>
<i>Obr. 6: FTIR analýza BMF filmů v různých stupních transformace sekundární struktury v průběhu přípravy filmů a jejich texturizace: A) přechod ze Silk I do Silk II působením metOH, B) přechod ze Silk I-II po působení RH 60 do Silk II provedením modifikace za rotace, C) přechod ze Silk II po působení metOH do koncového Silk II provedením modifikace za rotace a D) vliv doby působení par methanolu 24, 48 a 72 h na konformaci fibroinu.</i>	<i>24</i>
<i>Obr. 7: Srovnání specifických hierarchických struktur generovaných na fibroinových filmech v různých stupních transformace dávkováním směsi rozpouštědel za rotace (B-D) s hladkým fibroinovým filmem (A), snímky pořízeny pomocí optického profilometru a AFM.</i>	<i>25</i>
<i>Obr. 8: Topografie povrchových vzorů připravených postupem statické modifikace působením směsi rozpouštědel, měřeno pomocí optického profilometru a AFM.</i>	<i>26</i>
<i>Obr. 9: Topografie povrchových vzorů připravených postupem statické modifikace působením par DMSO, měřeno pomocí optického a mechanického profilometru a AFM.</i>	<i>27</i>
<i>Obr. 10: Srovnání proliferace lidských fibroblastů na hladkém fibroinovém povrchu (FLAT) a na texturovaných fibroinových filmech (ROT – modifikace za rotace, Nano/Mikro na Obr. 7 B a STAT – statická modifikace, na Obr. 8), měřeno fluorescenčním mikroskopem.</i>	<i>28</i>
<i>Obr. 11: Selektivní značení proteinového filmu pomocí FITC-dextranu, snímky z optického profilometru a konfokálního mikroskopu.</i>	<i>29</i>
<i>Obr. 12: AFM znázornění hyaluronových sítí na povrchu slídy z roztoků rozpouštěných A) na třepačce při 24 °C, B) na magnetickém míchadle při 45 °C a C) v teplotním gradientu s teplotou spodní desky 50 °C a horní desky 20 °C. [162].....</i>	<i>30</i>

<i>Obr. 13: AFM znázornění fibroinových fibril na povrchu slídy z roztoků rozpouštěných A) na třepačce při 24 °C, B) v teplotním gradientu s teplotou spodní desky 50 °C a horní desky 40 °C a C) v teplotním gradientu s teplotou spodní desky 50 °C a horní desky 10 °C.</i>	30
<i>Obr. 14: Nahoře příklad designu 3D tištěné mřížky ze směsi BMF a PCL a její mikroskopické struktury s viditelnými sférolity PCL, dole SEM snímky srovnávající detailní strukturu mřížek z čistého PCL a obohaceného o BMF z různých systémů rozpouštědel, snímky z digitálního a konfokálního mikroskopu a SEM.</i>	31
<i>Obr. 15: SEM analýza filmů připravených ze směsi BMF a PCL s obsahem BMF vůči PCL: A) 0 %, B) 10 %, C) 20 %; vpravo výřezy o průměru 3 μm.</i>	32
<i>Obr. 16: Detailní zobrazení povrchu A s podílem BMF 0 % a B s podílem BMF 10 %; I. rozpouštění při 24 °C, měřeno optickým mikroskopem a AFM.</i>	32
<i>Obr. 17: Detailní SEM a AFM zobrazení povrchu s podílem BMF 67 %; I. rozpouštění při 24 °C, II. rozpouštění při 40 °C.</i>	33
<i>Obr. 18: Vlákná hedvábného proteinu znázorněná pomocí SEM připravená metodou elektrospinningu z různých systémů rozpouštědel.</i>	34
<i>Obr. 19: Mřížky připravené technikou elektrickým polem asistovaného 3D tisku A) z čistého PCL v HFIP, B) ze směsi PCL a BMF v HHIP, C) orientovaný růst buněk podél tištěných mřížek z PCL, snímky ze SEM a konfokálního mikroskopu.</i>	34

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AFM	Atomic Force Microscopy
CaCl ₂	Chlorid vápenatý
CNS	Centrální nervová soustava
DLP	Digital Light Processing
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extracellular matrix
EGF	Epidermal growth factor
FGF	Fibroblast growth factor
FID	Fluorescein isothiocyanate dextran
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
HCl	Kyselina chlorovodíková
HFIP	Hexafluoroisopropanol
IKVAV	Izoleucin-lysin-valin-alanin-valin
LiBr	Bromid lithný
MAP	Mussle Adhesive Protein
MaSp1	Major Ampullate Spidroin 1
MaSp2	Major Ampullate Spidroin 2
Na ₂ CO ₃	Uhličitan sodný
NaOH	Hydroxid sodný
NGF	Neural Growth Factor
PCL	Polykaprolakton
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglykol
PEO	Polyehtylenoxid
PLA	Kyselina polymléčná
PNS	Periferní nervová soustava
PS	Polystyren
RGD	Arginin-glycin-kyselina asparagová
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
TGF- α	Transforming Growth Factor- α
TGF- β	Transforming Growth Factor – β
YIGSR	Tyrosin-isoleucin-glycin-serin-arginin
Obj. %	Objemová procenta
metOH	Methanol
rpm	Revolutions per minute = otáčky za minutu

PUBLIKAČNÍ AKTIVITY AUTORA

Články publikované v impaktovaných časopisech

1. **K. Kocourková**, L. Musilová, P. Smolka, A. Mráček, M. Humeník, A. Minařík, Factors determining self-assembly of hyaluronan, *Carbohydr. Polym.* 254 (2021) 117307. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117307. **Q1, IF = 10,723**
2. M. Kadlečková, K. Skopalová, B. Ptošková, E. Wrzecionko, E. Daďová, **K. Kocourková**, A. Mráček, L. Musilová, P. Smolka, P. Humpolíček, A. Minařík, Hierarchically Structured Surfaces Prepared by Phase Separation: Tissue Mimicking Culture Substrate, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 2541. doi: 10.3390/ijms23052541. **Q1, IF = 6,208**
3. C. Heinritz, Z. Lamberger, **K. Kocourková**, A. Minařík, M. Humeník, DNA Functionalized Spider Silk Nanohydrogels for Specific Cell Attachment and Patterning, *ACS Nano.* 16 (2022) 7626–7635. doi: 10.1021/acsnano.1c11148. **Q1, IF = 18,027**
4. Z. Lamberger, **K. Kocourková**, A. Minařík, M. Humeník, Dual Patterning of Self Assembling Spider Silk Protein Nanofibrillar Networks, *Adv. Mater. Interfaces.* (2022) 1–8. doi: 10.1002/admi.202201173. **Q1, IF = 6,389**
5. P. Smolka, M. Kadlečková, **K. Kocourková**, M. Bartoňová, F. Mikulka, E. Knechtová, A. Mráček, L. Musilová, M. Humeník, A. Minařík, Controlled Structuring of Hyaluronan Films by Phase Separation and Inversion, *Langmuir.* 39 (2023) 13140–13148. doi: 10.1021/acs.langmuir.3c01547. **Q2, IF = 4.331**
6. L. Vítková, N. Kazantseva, L. Musilová, P. Smolka, K. Valášková, **K. Kocourková**, M. Humeník, A. Minařík, P. Humpolíček, A. Mráček, I. Smolková, Magneto-responsive hyaluronan hydrogel for hyperthermia and bioprinting: Magnetic, rheological properties and biocompatibility, *APL Bioeng.* 7 (2023). doi: 10.1063/5.0147181 **Q1, IF = 6.586**

Články v recenzních řízení v impaktovaných časopisech / manuskripty

7. M. Kadlečková, **K. Kocourková**, P. Smolka, A. Mráček, T. Sedláček, L. Musilová, M. Humeník, A. Minařík, Release of Contaminants from Polymer Surfaces under Condition of Organized Fluid Flows, *Engineering*
8. **K. Kocourková**, M. Kadlečková, E. Wrzecionko, E. Knechtová, P. Černá, M. Humeník, A. Minařík, Textured Surfaces Prepared by Phase Separation Approach
9. **K. Kocourková**, M. Kadlečková, F. Mikulka, T. Zvoníček, D. Jaška, P. Smolka, A. Mráček, M. Humeník, A. Minařík, Silk Protein as a Modifier of

Příspěvky na konferencích

1. 3D printing of silk/polycaprolactone composite scaffolds, **K. Kocourková**, M. Kadlečková, M. Humeník, A. Minařík, The 4th International Conference on Materials: Advanced and Emerging Materials (ICM 2022), 19–21 October 2022, Barcelona, Španělsko
Poster
2. Structuring of silk-fibroin surfaces by phase separation, **K. Kocourková**, M. Kadlečková, M. Humeník, A. Minařík, The 4th International Conference on Materials: Advanced and Emerging Materials (ICM 2022), 19–21 October 2022, Barcelona, Španělsko
Poster
3. Microstructured arrays based on self-assembled fibrillar networks for specific cell immobilization, M. Humeník, Z. Lamberger, C. Heinritz, **K. Kocourková**, A. Minařík, The 4th International Conference on Materials: Advanced and Emerging Materials (ICM 2022), 19–21 October 2022, Barcelona, Španělsko
Talk
4. Influence of self-organized fluid flows on structure and network formation in self-supporting layers made of hyaluronan, **K. Kocourková**, M. Kadlečková, L. Musilová, P. Smolka, A. Mráček, M. Humeník, A. Minařík, Bayreuth Polymer Symposium 2023, September 17-19, 2023, Bayreuth, Německo
Poster
5. Fabrication of textured silk films via phase separation approach for applications in regenerative medicine, **K. Kocourková**, M. Kadlečková, M. Humeník, A. Minařík, Bayreuth Polymer Symposium 2023, September 17-19, 2023, Bayreuth, Německo
Poster and short talk
6. Preparation of silk / polycaprolactone porous scaffolds, **K. Kocourková**, Markéta Kadlečková, Filip Mikulka, Martin Humeník, Antonín Minařík, SPE – Emerging Trends in Medical Plastics MiniTec, October 18-19, 2023, Zlín, Česká republika
Poster

ODBORNÝ ŽIVOTOPIS AUTORA

Jméno: Ing. Karolína Kocourková, Ph.D.
Datum narození: 16. března 1994
Adresa: Tečovice 254, 763 02 Zlín 4
Email: kkocourkova@utb.cz
Telefon: +420 737 528 838
ORCID: 0009-0002-2691-6829

Vzdělání:

2019 – dosud Doktorské studium – Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav fyziky a materiálového inženýrství; doktorský studijní program: Technologie makromolekulárních látek.
Téma disertační práce: Příprava strukturovaných proteinových povrchů

2017 – 2019 Magisterské studium – Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav inženýrství polymerů; magisterský studijní program: Chemie a technologie materiálů – Inženýrství polymerů.
Diplomová práce: Příprava strukturovaných biopolymerních povrchů a studium jejich interakce s buňkami
Cena děkana Fakulty technologické, Cena ředitele ústavu

2014 – 2017 Bakalářské studium – Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav inženýrství polymerů; bakalářský studijní program: Chemie a technologie materiálů – Polymerní materiály a technologie
Bakalářská práce: Charakterizace hyaluronanu sodného pomocí AFM
Cena ředitele ústavu

Pracovní zkušenosti:

2023 – dosud Výzkumný projektový pracovník
Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

2022 – dosud Výzkumný projektový pracovník
Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

2021 – dosud Pedagogický pracovník / Lektor
Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

2019 – 2020 Výzkumný projektový pracovník
Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Zahraníční stáže:

- 2022 Měsíční stáž na Univerzitě Bayreuth, Německo, Ústav Biomateriálů, ředitel prof. T. Scheibel, pod vedením doc. M. Humeníka, Studium přípravy nanohydrogelů z pavoučího proteinu
- 2019 Měsíční stáž na Univerzitě Bayreuth, Německo, Ústav Biomateriálů, ředitel prof. T. Scheibel, pod vedením doc. M. Humeníka, Příprava hedvábných proteinových povrchů a studium jejich interakce s buňkami
- 2018 2 + 1 měsíc na Univerzitě Bayreuth, Německo, Ústav Biomateriálů, ředitel prof. T. Scheibel, pod vedením doc. M. Humeníka, Studium hedvábných proteinů pro biologické aplikace

Zahraníční konference:

- 2023 Bayreuth Polymer Symposium 2023, Bayreuth, Německo
- 2022 The 4th International Conference on Materials: Advanced and Emerging Materials (ICM 2022), Barcelona, Španělsko

Projekty:

- 2023 NU23-08-00243 (AZVČR)
Funkční náhrady pro regeneraci nervových tkání připravované pomocí pokročilých 3D tiskových technik, člen řešitelského týmu
- 2023 GAČR 23-07425S
Anisotropní a elektricky vodivé biomateriály, člen řešitelského týmu
- 2023 IGA/FT/2023/006
Studium a návrh nových zpracovatelských postupů polymerních materiálů pro pokročilou aditivní výrobu, člen řešitelského týmu
- 2022 IGA/FT/2022/009
Materiály na bázi kyseliny hyaluronové a proteinů pro 3D tisk z hlediska teoretické i aplikované chemie, člen řešitelského týmu
- 2022 GAČR 22-33307S
Vývoj nových 3D hierarchicky strukturovaných polysacharidových a proteinových porézních systémů, člen řešitelského týmu
- 2021 IGA/FT/2021/010
Příprava pokročilých biopolymerních systémů, **hlavní řešitel**
- 2020 JUNG-2020-001
Smart biomaterials based on conducting polymers, člen řešitelského týmu
- 2020 IGA/FT/2020/005
Příprava strukturovaných materiálů na bázi biopolymerů, člen řešitelského týmu

Pedagogická činnost:

Vyučující semináře předmětu *Zpracování experimentu I a Biomateriály* laboratorních cvičení předmětu *Mikroskopické metody*, a předmětů *Seminář k bakalářské práci a Pokročilé materiály a technologie II*.

Vedené bakalářské práce:

1. A. Trtek, 3D tisk polymerních směsí na bázi hedvábného proteinu, Zlín, 2022, Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
2. A. Bulgurovská, Strukturované vrstvy na bázi hedvábného proteinu a jejich aplikace v regenerativní medicíně, Zlín, 2022, Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
3. M. Martinec, Aplikace hedvábného proteinu v aditivní výrobě, Zlín, 2021, Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.

Ing. Karolína Kocourková, Ph.D.

Příprava strukturovaných proteinových povrchů

Preparation of structured protein surfaces

Teze disertační práce

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,
nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín.

Náklad: vyšlo elektronicky

Sazba: Ing. Karolína Kocourková, Ph.D.

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2024

Pořadí vydání: první

ISBN 978-80-7678-223-5