

## Posudek disertační práce

Název práce: **Příprava strukturovaných proteinových povrchů**

Autorka: **Ing. Karolína Kocourková**

Vývoj tkáňových náhrad zaznamenal v posledních desetiletích výrazný posun od tradičních materiálů representovaných kovy či keramikou, přes synteticky připravené polymery až po biopolymery. Na tuto skutečnost autorka poukazuje v kapitole „**Současný stav řešené problematiky**“ s tím, že se zaměřuje na živočišně proteiny kolagen a hedvábný protein, které patří mezi nejvýznamnější biopolymery s výbornými mechanickými vlastnostmi, biokompatibilitou, biodegradací (s možností její adjustace) a zpracovatelností širokou škálou technik (lití, zvlákňování, lyofilisace či 3D tisk). Doktorandka se v literární studii soustředila dále na modifikaci zpracovatelských a užžitných vlastností (nejen mechanické, ale i optické) uvedených základových polymerních matric, např. mísením s jinými polymerními systémy či úpravou povrchového vzoru. Rovněž také vzájemným mísením uvedených biopolymerů s chitosanem ke zlepšení buněčné adheze.

Na základě zhodnocení vysokého potenciálu hedvábných proteinů pro využití v tkáňovém inženýrství si doktorandka stanovila **cíle disertační práce**, které reagují na aktuální know-how přípravy 3D matric elektrospinningem a 3D tiskem, avšak s nedostatečnými informacemi týkající se zpracování hedvábného proteinu, změnami sekundární struktury fibroinu, strukturou připravených konstruktů, či možnostmi přípravy směsí s polykaprolaktonem. Mezi další cíle patřilo např. sledování proliferace buněčných linií na připravených texturovaných površích.

**Teoretický rámec** disertační práce velmi dobře koresponduje se stanovenými cíli práce. V první části doktorandka diskutuje vliv materiálového složení, chemických a fyzikálních vlastností povrchu a topografie na interakci s biologickým prostředím. V další části se věnuje významu bílkovin nejen jako základového substrátu pro tvorbu konstruktů, ale rovněž jako regulátorů buněčných procesů a materiálů na tvorbu povlaků s funkčními vlastnostmi (adheze, migrace buněk). Podstatná část teoretického rámce je zaměřena na produkci hedvábného proteinu domestikovaným bourcem morušovým, izolaci fibroinu separací doprovodných složek vhodnými rozpouštědly a následně rozpuštěním fibroinu. Aminokyselinové složení a molekulová hmotnost ovlivňují rheologické a zpracovatelské vlastnosti fibroinu. Mezi nejčastěji diskutované způsoby zpracování izolovaného fibroinu patří lití jeho roztoků; volba použitého rozpouštědla ovlivňuje strukturu fibroinu, což má vliv na některé vlastnosti připravených filmů. Dále pak elektrostatické zvlákňování, výroba 3D struktur extrusním tiskem, často v kombinaci s kolagenem pro adjustaci mechanických vlastností.

Ve **zvolených metodách zpracování** polymerních systémů jsou popsány principy 3D tisku již zmíněným extrusním kontinuálním vytlačováním, rovněž dávkováním polymeru ve formě kapek na podkladový materiál (tzv. InkJet tisk); tvorba vláken v mikro-nano rozměrech elektrospinningem; příprava mikro-nano texturovaných vzorů metodou fázové separace.

Experimentální část je velmi obsáhlá. Ing. Kocourková si z dodané suroviny sama připravila isolát fibroinu, který byl pro následnou přípravu filmů rozpuštěn v hexafluoroisopropanolu na 2% roztok. U připravených filmů byla provedena texturizace povrchu dynamickým způsobem (sekvenované dávkování směsi rozpouštědel na rotující substrát) a statickým způsobem (v exsikátoru); poté selektivní značení povrchu. Ze zpracovatelských technik přípravy fibroinových matric je popsán 3D tisk, před nímž byl fibroinový roztok smíchán s roztokem polykaprolaktonu v různých poměrech. Dále pak příprava vláken elektrospinningem, při němž doktorandka testovala různá rozpouštědla fibroinu a rovněž byla ověřena příprava vláken s příměsí polykaprolaktonu.

Ve **výsledkové části** zabývající se přípravou texturovaných filmů z fibroinu bylo ke studiu změn použito několik pokročilých charakterizačních metod. Stupeň transformace sekundární struktury byl analysován metodou FTIR, ke studiu změn hierarchických struktur povrchu byla využita mikroskopie atomárních sil (AFM). Buněčná proliferace byla měřena fluorescenčním mikroskopem. V další výsledkové části jsou zastoupeny filmy (3D tištěné mřížky) složené ze směsi fibroinu a PCL. SEM bylo potvrzeno zmenšení sférolitů PCL a prstencové uspořádání struktur v přítomnosti fibroinu. Tato skutečnost byla dále detailně prozkoumávána na stejných směsích, z nichž byly odléváním připraveny

filmy. Po překročení určité koncentrace fibroinu došlo k zastavení tvorby sférolitů. Elektrospinningem pak byla z fibroinu připravena vlákna; testovala se různá rozpouštědla a koncentrace fibroinu, čímž lze regulovat tloušťku a mechanické vlastnosti vláken, ale rovněž rychlost samotného zvlákňování. Dalším významným výsledkem je potvrzení samo-organisování makromolekul pavoučího proteinu do fyzikální sítě.

**Přínos disertační práce** pro praxi je věcně uveden na str. 84. Kromě aplikace studovaných matric např. při hojení ran lze do připravených konstruktů vázat aktivní látky pro cílené buněčné interakce. Disertace má přínos i v oblasti základního výzkumu – konformační studie fibroinu versus zpracovatelská technika.

Disertační práce je dobře strukturovaná a velmi pečlivě sepsaná. Nejen pro pročetí disertační práce, ale i z přehledu publikačních, projektových a jiných aktivit je zřejmé, že doktorandka se velmi dobře orientuje v problematice polymerů a biopolymerů používaných pro účely tkáňového inženýrství, současného know-how v oblasti přípravy texturovaných filmů a interakci buněk a pokročilých metod příprav matric pro účely tkáňového inženýrství.

Svémi publikačními výstupy (6 publikovaných článků v IF periodikách, 6 příspěvků na odborných konferencích; dále 3 IF články v recensním řízení), 9 řešenými projekty (např. IGA, GAČR, JUNG) ing. Kocourková převyšuje požadavky kladené na Ph.D. práci. Doktorandka v rámci své disertace dále vedla 3 bakalářské práce a velmi dobře tak propojila svoje aktuálně řešené vědecko-výzkumné téma s pedagogickou aktivitou. Byla zapojena rovněž do přímé pedagogické činnosti katedry, při níž se podílela na výuce seminářů a laboratorních cvičení. Část experimentů prováděla na zahraniční universitě (celkem 3 stáže) v Německu.

Pro prostudování disertační práce a z přehledu výstupů za 4 roky je zřejmé, že ing. Kocourková **jednoznačně prokázala schopnost samostatné vědecké práce**, a proto **doporučuji její práci k obhajobě a po úspěšném obhájení udělení titulu Ph.D.**

#### Otázky k diskusi:

1. Na základě čeho byl zvolen uvedený poměr dobrého (HFIP) a špatného (DMSO) rozpouštědla pro dynamickou texturizaci povrchu fibroinových filmů?
2. Jaké množství vody bylo použito v modifikační směsi na texturizaci povrchu fibroinu?
3. Čím je způsobena rozdílná rychlost proliferace lidských fibroblastů na fibroinovém povrchu za různých podmínek modifikace?
4. Blíže specifikujte varianty roztoků polykaprolaktonu s hedvábným proteinem pro 3D tisk. Jaká je kritická hranice těchto roztoků?
5. Mohla byste, na základě Vašich výsledků, blíže specifikovat aplikační potenciál fibroinových struktur na výrobu umělé kůže? Pokuste se zhodnotit tyto aspekty: technologie přípravy, vlastnosti, cena, limity.

Prof. Ing. Pavel Mokrejš, Ph.D.

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně / Fakulta technologická / Katedra inženýrství polymerů

Ve Zlíně dne 10. listopadu 2023.