

ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ МІКРОПЛІВОК НА ОСНОВІ ФІБРОЇНУ ШОВКУ

© Матвійків С. О., Петріна Р. О., Новіков В. П., 2015

Пошкодження чи втрата будь-якого органу або тканини є однією з найбільш поширених, руйнівних і дорогих проблем охорони здоров'я людини. Безперервний розвиток біомедичних наук підсилює дослідження в області біоматеріалів, які можуть успішно стимулювати регенерацію тканин. Сьогодні значну увагу звертають на матеріали на основі фіброїну шовку, який є одним з перспективних кандидатів для використання у тканинній інженерії. Метою дослідження було виготовити та охарактеризувати плівки на основі фіброїну шовку і порівняти вплив різних методів обробки та стабілізації на їх структуру і властивості. Було досліджено вторинну структуру матеріалу за допомогою інфрачервоної спектроскопії (ІЧ). Крім того, зв'язок між різними методами обробки плівок та адсорбцією білків було розглянуто в цьому дослідженні.

Ключові слова: фіброїн шовку, біоматеріали, тканинна інженерія, ІЧ-спектроскопія, адсорбція білків.

The damage or loss of an organ or tissue is one of the most common, devastating and costly problems of human healthcare. Continuous development of biomedical sciences enhances research in biomaterials field that can successfully stimulate tissue regeneration. In recent years, much attention is paid to silk fibroin (SF) based materials, which is one of the promising candidates for usage in tissue engineering. The aim of this study was to prepare and characterize silk fibroin films and compare the effect of different treatment and stabilization methods on their properties and structure. The secondary structure of the material using infrared spectroscopy (FTIR) was investigated. Moreover, the relationship between different treatment methods and protein adsorption of SF films was examined in this study.

Key words: silk fibroin, biomaterials, tissue engineering, IR spectroscopy, protein adsorption.

Вступ. Кожного дня тисячі хірургічних процедур виконують для заміни або відновлення тканин, що були пошкоджені внаслідок хвороби або травми. Пацієнтів з захворюваннями тканин та органів можна лікувати методами трансплантації. Проте кількість хворих, які потребують донорства, значно перевищує пропозицію органів, і цей дефіцит органів, як очікується, посилиться внаслідок прогресуючого старіння населення. Галузь тканинної інженерії прагне відновити пошкоджені тканини, об'єднуючи клітини організму з біологічно активними матеріалами, які діють як шаблони, для регенерації тканин та їх направленого росту.

Сьогодні серед найпоширеніших видів біоматеріалів регенерації тканин – природні й синтетичні полімери, біоактивна кераміка, композитні матеріали. Природні біоматеріали мають потенційну перевагу біологічного розпізнавання, що позитивно впливає на адгезію клітин та їхні функції. Також такі природні біополімери, як колаген, фібрин, фіброїн шовку, хітозан і крохмаль забезпечують хорошу біосумісність та біоактивність, деградують під час процесів ферментації, не містять токсичних побічних продуктів, проявляють низьку імуногенність [1].

Шовк – поширений природний білковий полімер, продукт залоз екскреції гусениць шовкопрядів, який формується в волокна під час їх метаморфозу. Шовкові волокна отримують з різних джерел; найвідоміший тип шовку отримують з коконів тутового шовкопряда *Bombyx mori*, вирощеного в неволі. Коли шовк природно екструдований з комах, він складається з основної нитки

білка, що називається фіброїном (70–80 %), та клеєподібного покриття, що складається з білків серицину (20–30 %) [2] (рис. 1).

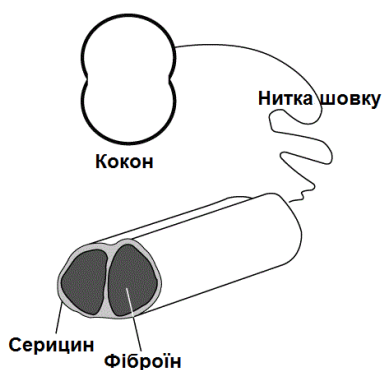


Рис. 1. Структурна будова шовку

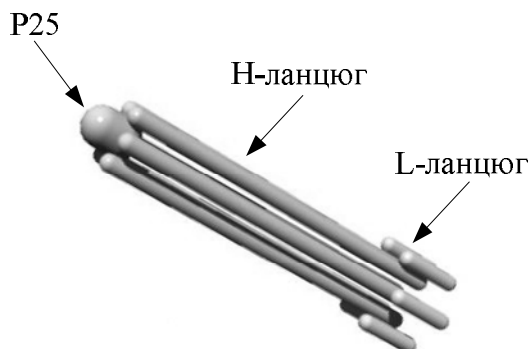


Рис. 2. Схематичне зображення структури фіброїну [4]

Фіброїн шовку має надмолекулярну структуру, що складається з важкого ланцюга 350 кДа, легкого ланцюга 26 кДа, зв'язаних разом дисульфідним зв'язком, і глікопротеїну P25 - 30 кДа, нековалентно зв'язаного з цими ланцюгами [3] (рис. 2).

Структурно фіброїн шовку характеризується як природний блок кополімерів, що складаються з гідрофобних областей, які перериваються малими гідрофільними групами [3]. Шовк може існувати в декількох поліморфних формах, які впливають на його розчинність у воді. Відомо, що фіброїн шовку може виявляти чотири різні структури: шовк I, шовк II, шовк III і неупорядковані фрагменти [5]. Структура шовк I існує в залозах перед кристалізацією. Це забезпечує хорошу розчинність фіброїну у воді. Під час спінінгу фіброїн шовку зазнає структурного переходу із суміші неупорядкованих фрагментів і α -спіралей (шовк I) в організовані β -листи (шовк II) [2], що забезпечує хорошу стійкість до розчинності у воді [5].

Природні конформації фіброїну шовку – це, як правило, неупорядковані фрагменти і α -спіралі, які можуть бути змінені або модульовані в структуру β -листів за допомогою конкретних методів і умов обробки (температура, pH, застосування стресу або зсуву, обробка розчинниками) [6]. Модифікації обробки призводять до змін у вторинній структурі білка, вмісту води, кристалічності і, як наслідок, змін біологічної активності і механічних властивостей кінцевої конструкції. Зазвичай коли фіброїн повністю денатурується, утворюються нові проміжні конформації, такі як β -згини та β -повороти.

Конформація структури шовк III – це потрібна спіральна кристалічна структура, що спостерігається в плівках на межі з повітрям. Ця структура є важкорозчинною [5]. Неупорядковані фрагменти, як правило, існують, коли фіброїн шовку знаходиться в розчині [5]. Структура шовк I є водорозчинна, але при нагріванні або фізичному прядінні змінює свою конформацію до структури шовк II. Крім того, *in vitro*, структура шовк I перетворюється на β -листи під час обробки метанолом або калій хлоридом [2]. За відповідних умов ці чотири структури можуть перетворюватись одна на одну. Справді, обробка фіброїну шовку відновлювальним агентом знижує дисульфідні зв'язки та кристалічність. Обробка за допомогою протеаз каталізує гідроліз пептидних зв'язків, руйнує білки на дрібніші пептиди. В цьому випадку молекулярна маса є нижчою, і майже неможливо сформувати кристалічну структуру.

Сьогодні матеріали на основі фіброїну шовку виготовляють, використовуючи різні методи обробки і різноманітні комбінації матеріалів для того, щоб поліпшити їхні властивості. Серед них відомі литі плівки, що передбачають обробку метанолом, який викликає стійкішу конфігурацію β -листів [7]; термообробка при 80 °C призводить до переходу з неупорядкованих фрагментів/ α -спіралей до стійкіших β -листів [8]; хімічна модифікація плівок зшивальним агентом (crosslinking agent) поліпшує водостійкість без утворення стійкої конфігурації β -листів [9]; суміші фіброїну

шовку і хітозану підтверджують перехід конформації фіброїну в стабільнішу форму, спричинену додаванням хітозану [10].

Метою науково-дослідної роботи було дослідити вплив методів стабілізації і зниженої молекулярної маси на конформаційні зміни вторинної структури фіброїну та здатність до адсорбції білків.

З метою вивчення конформаційних змін у вторинній структурі зразків, використовують інфрачервону спектроскопію з перетворенням Фур'є (ІЧ). Аналізуючи інфрачервоний спектр, можна визначити структурну конформацію фіброїну шовку залежно від місцезростання смуг поглинання амідів I, II і III.

Вивчення адсорбції білків є важливим методом аналізу, оскільки це початковий момент при контакті імплантованого матеріалу з біологічним середовищем. Склад шару білка, адсорбованого на фіброїновій плівці, можна дослідити за допомогою гель-електрофорезу (SDS-PAGE) [11].

Матеріали і методи. Приготування розчину фіброїну шовку. Розчин отримують відповідно до протоколу Rockwood і співавт. [5].

- Дегумування:

Кокони *Bombyx mori* було порізано, розділено на 3 шари і знеклеєно подвійною обробкою водним розчином Na_2CO_3 із концентрацією 1,1 г/л і 0,4 г/л при 98 °C (1,5 год для кожної обробки), щоб видалити серицин. Потім знеклеєний фіброїн шовку ретельно промивали в деіонізованій воді і сушили на повітрі. Втрата маси становила ~ 28 %.

- Водний розчин фіброїну:

Висушений фіброїн шовку розчиняли в 9,3 м LiBr (Sigma-Aldrich, США) при 65 °C протягом 4 годин з подальшим діалізом проти деіонізованої води протягом 48 годин, використовуючи касету для діалізу Slide-A-Lyzer (MWCO3500, Pierce, США). Потім концентрацію фіброїну вимірювали за допомогою NanoDrop ND-1000 спектрофотометра при довжині хвилі 280 нм. Для того, щоб зменшити концентрацію, розчин розбавляли. Остаточна концентрація розчину фіброїну була ≈ 4 %.

- Обробка водного розчину фіброїну:

Розчин фіброїну обробляли трипсином або відновлювальним агентом, щоб знизити молекулярну масу білка. Трипсин-оброблений розчин отримували відповідно до наступного протоколу. 0,5 мл трипсину додавали до 5 мл 4 % розчину фіброїну і витримували в термостаті при 37 °C протягом 30 хвилин для активації ферменту. Опісля, щоб зупинити гідроліз, 300 мкл ембріональної бичачої сироватки (ЕБС) додавали до розчину. 4 мл обробленого розчину виливали у чашку Петрі і залишали у ламінарному боксі на ніч (чашка була напіввідкрита).

Для розчину обробленого відновником 0,5 мл відновлювального агента додавали до 5 мл 4 % розчину фіброїну і нагрівали при 65 °C протягом 12 хв 4 мл обробленого розчину виливали у чашку Петрі і залишали у ламінарному боксі на ніч (чашка була напіввідкрита).

Плівки було отримано методом лиття на чашках для тканинних культур (ТСР), спеціально оброблених для підвищення адгезії клітин (Sarstedt 60x15 мм). 4 мл розчину фіброїну виливали на тарілку, і плівки висихали при кімнатній температурі на повітрі протягом ночі.

Виготовлення плівок на основі фіброїну шовку

- Стабілізація плівок:

Оскільки стійкість литих плівок є низькою, метод відпалу водяною парою і занурення у спирт було використано для поліпшення кристалічності структури. Одну чашку зі зразком було стабілізовано водяною парою протягом 24 год. Іншу було стабілізовано зануренням в 80 % метанол протягом 20 хв і потім промито декілька разів у деіонізованій воді.

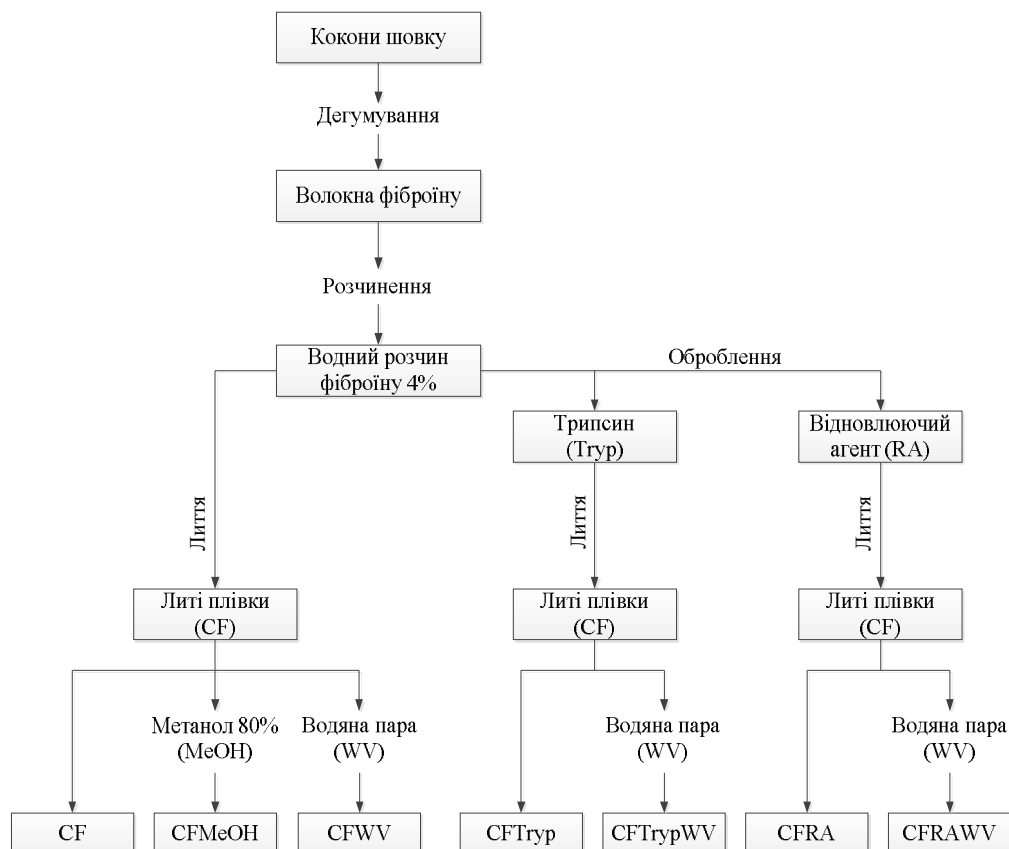


Рис. 3. Схема підготовки зразків та їх кодування

Характеристика зразків

- Вторинна конформація:

Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є (FTIR). Зміни в конформації матеріалу в результаті обробки було проаналізовано за допомогою FTIR (Spectrum One, Perkin-Elmer, США). Області спектра було зібрано в діапазоні 650–4000 cm^{-1} . Спектр, що охоплює регіони амідів I, II і III (1000–1800 cm^{-1}), було отримано за допомогою програмного забезпечення Spectrum v5.0.1.

- Тест на адсорбцію білків:

Підготовка зразків. Кожну плівку розрізали на 5 кіл Ø 6 мм. Плівки помістили в 48-лунковий полістирольний планшет (Iwaki® non-treated microplate) та інкубували у 200 мкл ембріональної бичачої сироватки (ЕБС) протягом 5 хв або 15 хв при 37 °С. Після інкубації сироватку плівок збирали в пробірки. Ці зразки назвали контактною сироваткою і використовували для гель-електрофорезу. Контрольною вважали ЕБС інкубовану в порожній лунці. Після збирання сироватки всі зразки було промито дистильованою водою і вміщено в новий 48-лунковий планшет. Пізніші зразки інкубували у 200 мкл додецилсульфату натрію (SDS) протягом 1 години при 37 °С. Для контролю SDS інкубували в тих самих порожніх лунках, що і ЕБС. На цьому етапі було створено додаткову лінію зразків – контрольний фіброїн: по 1 колу Ø 6 мм кожної плівки було вирізано і інкубовано з SDS за тих самих умов. Після інкубації розчин SDS зібрали в пробірки і назвали десорбованим розчином білків, який згодом використовували для гель-електрофорезу.

Для підготовки електрофорезу було використано NuPAGE 4–12 % Bis-Tris гелі (1,0 мм 12 лунок) для білків з нижчою молекулярною масою. Процедура електрофорезу проводили відповідно до стандартних інструкцій. Після електрофорезу гелі фарбували Colloidal Blue Staining Kit (Novex®) відповідно до протоколу виробника. Шаплони SDS-PAGE аналізували за допомогою програмного забезпечення KODAK Gel Logic 100 Imaging System.

Результати та обговорення. Аналіз конформації методом ІЧ спектроскопії. Білкові вторинні структури всіх 5 зразків (CF, CFMeOH, CFWV, CFTrypWV, CFRAWV) було проаналізовано за

допомогою ІЧ спектроскопії з перетворенням Фур'є. Спектр зразка CF (рис. 4 А) показав смуги при 1636, 1515 і 1235 cm^{-1} , що відповідають конформаційним областям амиду I (1600–1690 cm^{-1}), амиду II (1480–1575 cm^{-1}) і амиду III (1229–1301 cm^{-1}) [12]. Пік, що відповідає амиду I, показав смугу близько значення 1640–1635 cm^{-1} – це означає, що структура складається переважно із невпорядкованих α -спіралей, деяких β -листів. Структура є не повністю аморфна або організована, але, ймовірно, стабільна, оскільки плівки було приготовлено на субстраті, спеціально обробленому для клітинних культур. Можливо, цей факт викликав автостабілізацію плівок. Смуга при аміді II була навколо 1515 cm^{-1} і пік був різким, що означає, що структура орієнтована на β -листи. Порівняно з чистим фіброїном шовку (амід II при 1540 cm^{-1}) [13], амід II при 1515 cm^{-1} плівки CF, продемонстрував, що деякі молекулярні ланцюги змінили конформацію з невпорядкованої структури до β -листів. Смугу, що відповідає амиду III, було отримано при 1235 cm^{-1} , але пік не мав плеча. Це підтверджує, що структура стабільна, але все ще невпорядкована.

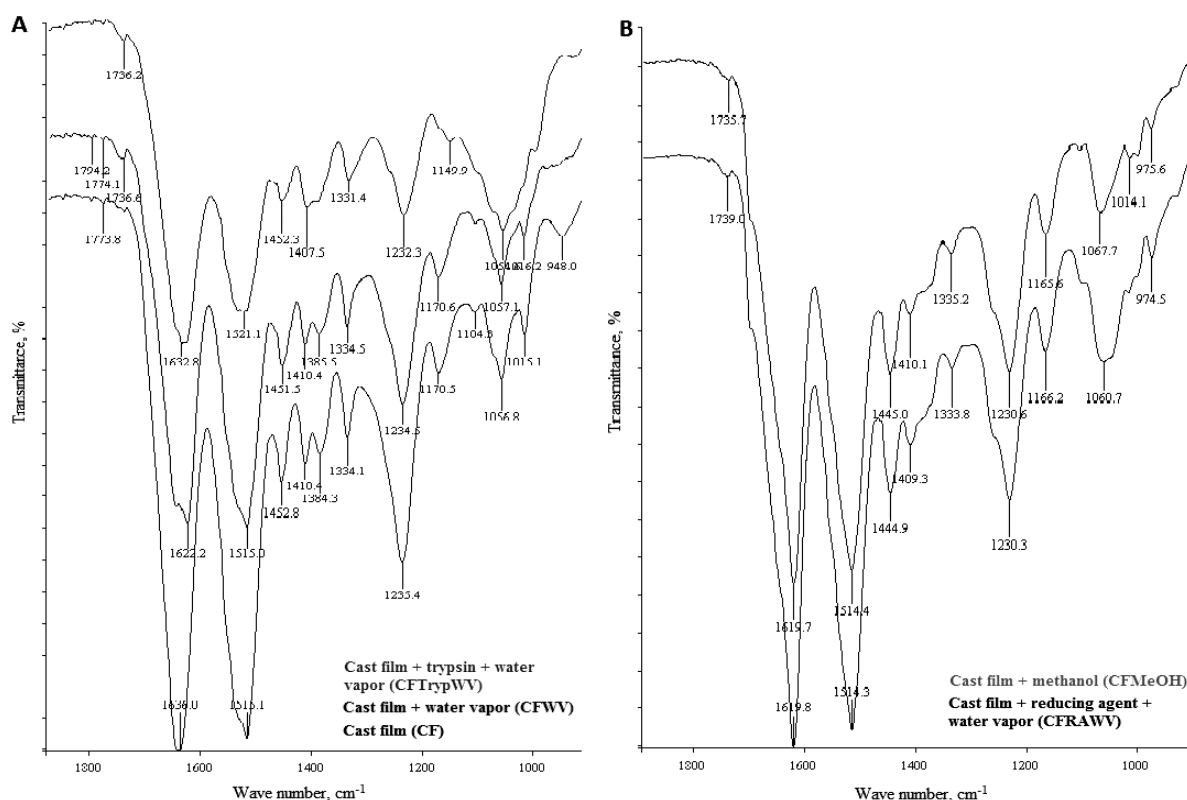


Рис. 4. FTIR спектр зразків (A) CF, CFWV, CFTrypWV; (B) CFMeOH, CFRAWV

Після обробки плівки CFMeOH метанолом, спектр показав смуги при 1619, 1514 і 1230 cm^{-1} (рис. 4 В). Всі піки були спрямовані на β -структури, вказуючи, що занурення у 80 % метанол викликає структурні зміни від невпорядкованих α -спіралей, до більш організованих β -листів. Раніше було продемонстровано, що оброблення метанолом викликало зсув адсорбційних груп з вищого до нижчого хвильового числа, що відображає формування структури β -листів [14].

Спектр плівки, стабілізованої водяною парою (CFWV), показав смуги при 1622, 1515 і 1234 cm^{-1} (рис. 4 А). Порівняно з CF, смуга амиду I CFWV змістилася ближче до значення, що стосується структури β -листів. Але оскільки пік був великим, це означає, що були присутні й інші компоненти – суміш β -поворотів, але більш дезорганізованих, з більш невпорядкованими і проміжними структурами. Також смугу амиду II було сфокусовано на β -листах. Пік, що відповідає амиду III, мав плече, яке підтверджує наявність інших компонентів β -листів.

Розглядаючи цей самий метод стабілізації, з'ясували, що інша плівка на основі фіброїну шовку мала знижену молекулярну масу внаслідок обробки трипсином. Спектр CFTrypWV показав смуги при 1632, 1521 і 1232 cm^{-1} (рис. 4, а). Через знижену молекулярну масу система була не в змозі

організуватися в β -листи, і невпорядкованість була вищою. З цієї причини пік був більший і не такий близький до значення, що відповідає структурі β -листів. Пік, відповідний аміді II, продемонстрував значення, ближче до β -листів. Цей пік був великим, що означає, що була присутня суміш інших структур. Присутність плеча на піку аміді III підтвердила наявність інших компонентів β -листів. У зв'язку з низькою молекулярною масою система не могла набути надто впорядкованої структури. Для культури клітин таке середовище є позитивним, оскільки матеріал є стабільним і без високого ступеня кристалічності, в результаті – з високим вмістом води, що є бажаною властивістю для клітин.

Інша плівка на основі фіброїну шовку, стабілізована з водяною парою, мала знижену молекулярну масу внаслідок обробки зразка відновником (CFRAWV). Спектр показав смуги при 1619, 1513 і 1230 cm^{-1} (рис. 4, в). Пік на аміді I був дуже різким і зосереджений на нижчому хвильовому числі – близькому до структури β -листів. Крім того, пік мав невелике плече при 1700 cm^{-1} , і відповідно до [15], хвильове число навколо 1700–1690 cm^{-1} демонструє присутність β проміжних структур (β -повороти і β -згини). Піки при аміді II і III були схожі на піки плівки CFMeOH. Це підтвердило присутність β -листів. Також плече при аміді III було дуже помітним, що вказує на присутність β -компонентів. Ця ситуація була несподіваною, оскільки молекулярна маса була знижена. Але метод стабілізації водяною парою є доволі повільним процесом, і якщо мати достатньо часу, то система зможе переорганізуватись залежно від хімічного середовища. Ймовірно, це ущільнило поліпептидний ланцюг, і сформувало β -листи. Це було причиною того, що структура є більш кристалічна.

Тест на адсорбцію білків за допомогою SDS-PAGE

Контактна сироватка 5 хв інкубації в ЕБС. При молекулярній масі 60 кДа присутній альбумін – основний компонент сироватки (рис. 5). Форма смуги в вигляді краплі. Всі зразки були здатні поглинати доволі велику кількість альбуміну. У плівці CF смуга при 70–75 кДа була доволі низької інтенсивності, але дуже насичена у CFRAWV. Досліджуваний матеріал є білком, тому додецилсульфат натрію, що використовується для десорбції білка, може вплинути навіть на деякі компоненти, вивільнені з матеріалу. В зразку CFRAWV, який був оброблений відновником, була присутня смуга при 70–75 кДа особливо високої інтенсивності, що свідчить про те, що, можливо, частина молекули фіброїну була вивільнена. Контроль фіброїну плівки CFRAWV підтверджує наявність слабкої смуги при 70–75 кДа, що означає, що деякі частини білків були вивільнені з матеріалу. Смуга при 160 кДа була відсутня в CF, CFMeOH і присутня у всіх інших зразках, окрім контролю. Отже, ми можемо припустити, що ця смуга походить не від фіброїну, а від сироваткових білків, або з тих білків, які були активовані в сироватці. Схоже, що залежно від використовуваного методу обробки, матеріал адсорбує різні білки. Дуже ясні смуги присутні у всіх зразках при 68–70 кДа. Це молекулярна маса, що відповідає гемоглобіну, а це означає, що зразки були здатні адсорбувати його у великих кількостях. Дуже цікаві, чіткі і помітні смуги присутні при нижчій молекулярній масі в діапазоні 23–33 кДа в зразку CFTrypWV. Це можуть бути деякі пептиди, вивільнені з фіброїну; однак у контрольному зразку смуги не спостерігаються. Це явище може трапитися, якщо деяка кількість трипсину не була деактивована, після чого білок проявляється у вигляді смуги на гелі. Насправді молекулярна маса трипсину становить ≈ 23 кДа.

Контактна сироватка 15 хв інкубації в ЕБС. Альбумін і гемоглобін доволі інтенсивно адсорбувалися усіма зразками при 60 кДа і 68–70 кДа відповідно (рис. 5). Спостерігалось зменшення інтенсивності смуги при 70–75 кДа в CFWV, CFTrypWV, порівняно з попередньою серією зразків. Однак ця смуга, як і раніше, була невидимою в CF, CFMeOH. Також смуга при 160 кДа зникає в CFWV, CFTrypWV, враховуючи, що, можливо, концентрація деяких білків була зменшеною або вони деградували. Цікаво, що після 15 хв інкубації дуже чіткі дві близькі смуги при 260 кДа з'явилися в CF, CFMeOH, CFWV замість одної інтенсивної смуги, як це було після 5 хв інкубації. Крім того, CFTrypWV показує такої ж інтенсивності смуги при 25–35 кДа, які, як раніше, були відсутні у гелі зразків десорбованого білка. Це означає, що навіть після 15 хв інкубації в розчині фіброїну деяка кількість трипсину була активною і могла вивільнити деякі пептиди в матеріал.

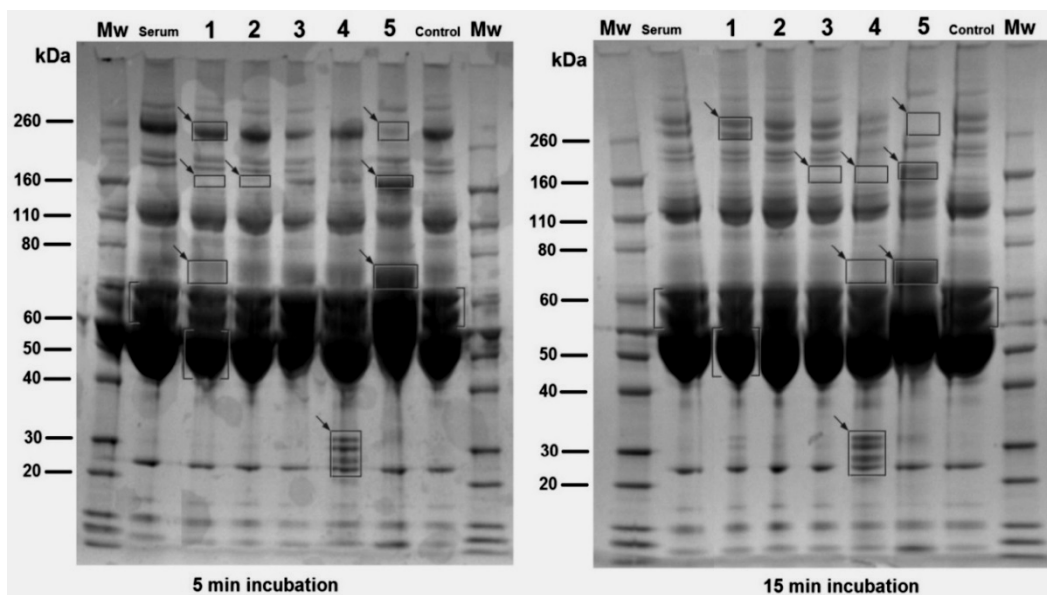


Рис. 5. Гель електрофорез-контактної сироватки після 5 хв і 15 хв інкубації:
1 – CF; 2 – CFMetOH; 3 – CFWV; 4 – CFTrypWV; 5 – CFRAWV

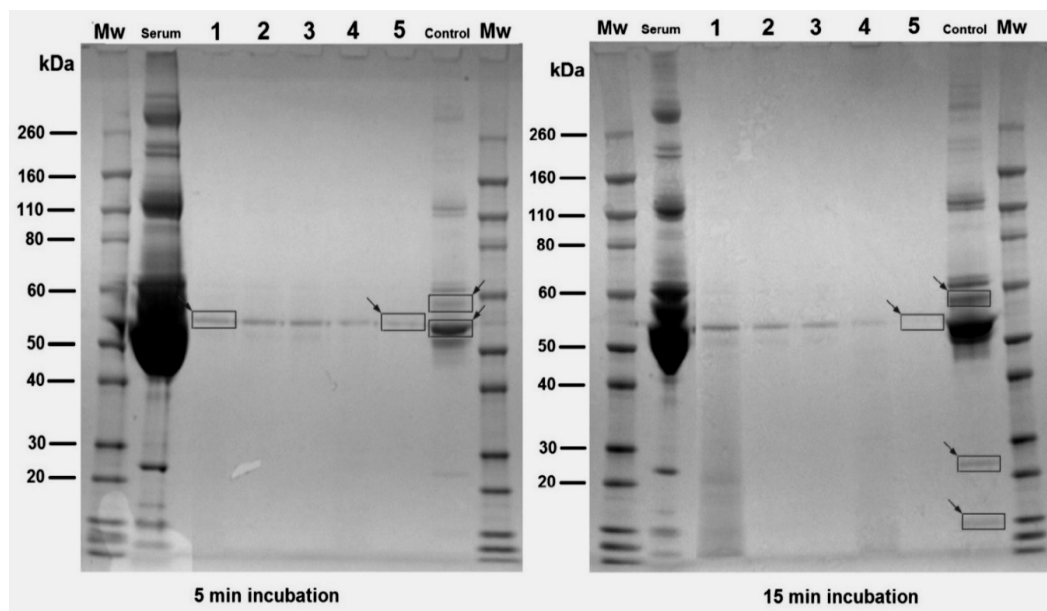


Рис. 6. Гель електрофорез-десорбованого білка після 5 хв і 15 хв інкубації:
1 – CF; 2 – CFMetOH; 3 – CFWV; 4 – CFTrypWV; 5 – CFRAWV

Десорбований білок після 5 хв інкубації. Було помічено, що контрольний зразок адсорбував найбільшу кількість білків (рис. 6). Це має сенс, тому що для контрольного зразка використовували субстрат, оброблений спеціально для збільшення адсорбції білка і поліпшення адгезії клітин. Ще раз отримали підтвердження, що найбільш адсорбованим білком був альбумін, який є основним білком сироватки, хоча адсорбція білка була доволі низькою після 5 хв інкубації. Можливо, концентрація зразків була занадто низькою, і альбумін продемонстрував дуже світлі та ненасичені смуги.

Десорбований білок після 15 хв інкубації. Єдиною відмінністю між зразками було те, що в CFRAWV смуга, яка відповідає за адсорбцію альбуміну, зникла або була дуже слабкою (рис. 6). У такому випадку рекомендується збільшити концентрацію зразків, щоб побачити смуги з більшою інтенсивністю. Також є цікавим провести дослідження на основі імуноаналізу, щоб визначити, які

білки були присутні в зразках, а які зникли. Оскільки залежно від використовуваного типу обробки плівка адсорбує різні види білків і, як наслідок, спостерігається різний біологічний результат.

Висновки. У роботі було виготовлено і охарактеризовано просту систему на основі біоматеріалу фіброїну шовку. Ми оцінили ефективність різних методів стабілізації на біологічний результат. Зокрема ми вивчали роль зниженої молекулярної маси на формування вторинної структури білка.

Результати аналізу підтвердили, що обробка 80 % метанолом індукувала більш кристалічну і організовану β -структуру порівняно з необробленим зразком чи стабілізованим водяною парою. ІЧ-аналіз показав, що фіброїн присутній в менш стабільній формі після обробки трипсином, демонстрував більш неупорядковану структуру, без високого ступеня кристалічності. Плівки були використані як субстрат для проведення тесту на визначення рівня адсорбції білка інкубацією в ембріональній бичачій сироватці (ЕБС). Результати показали різний ступінь адсорбції білків сироватки залежно від способу обробки і стабілізації. Загалом дослідження показали, що вторинна структура, теплові параметри і рівень адсорбції білка у матеріалах на основі фіброїну шовку може бути регульований шляхом зниження молекулярної маси і відповідною зміною умов стабілізації. Отримані таким чином конформаційні зміни грають головну роль в біосумісності кінцевої конструкції.

1. Hubbell J. A., *Biomaterials in tissue engineering*. Biotechnology (N Y), 1995. 13(6): p. 565-76.
2. Y. Wang, H.-J. Kim, G. Vunjak-Novakovic, D. L. Kaplan. *Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials*. *Biomaterials* 27 (2006) 6064–6082.
3. B. Kundu, R. Rajkhowa, S. C. Kundu, X Wang. *Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations*. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65 (2013) 457–470.
4. Y. Kuwana, H. Sezutsu, K. Nakajima, Y. Tamada, K. Kojima. *High-Toughness Silk Produced by a Transgenic Silkworm Expressing Spider (Araneus ventricosus) Dragline Silk Protein*. *J. Plos One*, Volume 9, Issue 8 e105325, 2014.
5. D. N. Rockwood, R. C Preda, T. Yücel, X. Wang, M. L. Lovett, D. L. Kaplan. *Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin*. *Nature Protocols* 6, 1612–1631 (2011).
6. R. Chollakup, W. Smitthipong. *Evolution of Mulberry and non-Mulberry silk fibers for textile applications. Silk: properties, production and uses*, Nova Science Publishers, Incorporated, 2012, pp. 41-86.
7. Minoura N., Tsukada M., Nagura M. *Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial*. *Biomaterials*. 1990 Aug;11(6):430-4.
8. A. Motta, L. Fambri, C. Migliaresi. *Regenerated Silk Fibroin Films: Thermal and Dynamic Mechanical Analysis*. *Macromol. Chem. Phys.* 2002, 203, 1658–1665.
9. A. Motta, B. Barbatol, C. Foss, P. Torricelli, C. Migliaresi. *Stabilization of Bombyx mori silk fibroin/sericin films by crosslinking with PEG-DE 600 and genipin*. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 26, 130 (2011).
10. M. Moraes, G. Nogueira, R. Weska, M. Beppu. *Preparation and Characterization of Insoluble Silk Fibroin/Chitosan Blend Films*. *Polymers* 2010, 2, 719-727.
11. E. C. I. Veerman, R. J.F. Suppers, C. P.A. T. Klein, K. de Groat and A. V. Nieuw Amerongen. *SDS-PAGE analysis of the protein layers adsorbing in vivo and in vitro to bone substituting materials*. *Biomaterials* 1987, Vol 6 November.
12. Kong J, Yu S. 2007; *Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures*. *Acta Biochim Biophys Sinica* 39: 549–559.
13. Motta A, Migliaresi C, Faccioni F, et al. 2004; *Fibroin hydrogels for biomedical applications: preparation, characterization and in vitro cell culture studies*. *J Biomater Sci Polym Ed* 15: 851–864.
14. S. Prasong, S. Wilaiwan, K. Nualchai. *Structure and thermal characteristics of Bombyx mori silk fibroin films: effect of different organic solvents*. *International Journal of Chemical Technology* 2 (1): 21-27, 2010.
15. D. Wilson, R. Valluzzi, D. Kaplan. *Conformational transitions in model silk peptides*. *Biophysical journal* Volume 78 (2000), pp. 2690-2701.