

Zpracování hydrogelů na bázi biopolymerů pomocí technologie 3D tisku

Stanislav Vaculík

Bakalářská práce
2021

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Stanislav Vaculík**
Osobní číslo: **T18089**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Materiálové inženýrství**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Zpracování hydrogelů na bázi biopolymerů pomocí technologie 3D tisku**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na dané téma.
2. Připravte několik typů hydrogelů na bázi biopolymerů.
3. Zpracujte připravené hydrogely pomocí dostupné 3D tiskárny do základních prostorových útvarů.
4. Diskutujte vliv vybraných parametrů 3D tisku na výslednou strukturu výtisku.

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

Seznam doporučené literatury:

1. ATALA, Anthony a James J. YOO. *Essentials of 3D biofabrication and translation*. Boston: Elsevier/Academic Press, [2015]. ISBN 978-0-12-800972-7.
2. MALKIN, Alexander Ya. and Avraam Isayev. *Rheology – Concepts, Methods, and Applications (3rd Edition)*. ChemTec Publishing, [2017]. ISBN 978-1-927885-21-5.
3. CHEN, Yu. *Hydrogels Based on Natural Polymers*. Elsevier, [2020]. ISBN 978-0-1281-6421-1.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Lenka Vítková**
Ústav fyziky a mater. inženýrství

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

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

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Ve Zlíně dne 19. února 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Hydrogely na bázi biopolymerů jsou v dnešní době široce zkoumány v souvislosti s tkáňovým inženýrstvím, konkrétně s 3D biotiskem. Proto se tato práce zabývá tvorbou chemicky síťovaných hydrogelů z kuřecí želatiny s cílem dosáhnout vhodné kompozice pro 3D tisk. Pro úspěšný biotisk je nutné, aby měl daný materiál vhodné vlastnosti nejen z hlediska biokompatibility, ale také mechaniky a tokového chování. Bylo provedeno měření viskozity, na jehož základě proběhl užší výběr gelů pro extruzi. Jako tiskový model posloužila pórovitá mřížka. Přesnost výtisku byla diskutována s ohledem na charakter polymerní sítě a mechanické namáhání během tisku. Bylo prokázáno, že daný systém je možné použít pro extruzní 3D tisk. Na základě výsledků této práce je možné pokračovat ve výzkumu tohoto materiálu s potenciální aplikací v biotisku.

Klíčová slova: 3D tisk, 3D biotisk, hydrogely, želatina, oxidovaný dextran

ABSTRACT

Hydrogels based on biopolymers are nowadays widely studied in connection with tissue engineering, specifically with 3D bioprinting. Due to this, the current work deals with the formation of chemically cross-linked hydrogels from chicken gelatin in order to achieve a suitable composition for 3D printing. For successful bioprinting, it is necessary that the material has suitable properties in terms of biocompatibility, but also mechanical and flow behavior. Viscosity measurement was conducted, and the results were used for fine selection of materials for extrusion. A porous grid served as a printing model. The accuracy of the print was discussed with respect to characteristics of the polymer network and the mechanical stress during printing. It has been proven that the system can be used for extrusion 3D printing. Based on the results of this work, it is possible to continue the research of this material with potential applications in bioprinting.

Keywords: 3D printing, 3D bioprinting, hydrogels, gelatin, oxidized dextran

V první řadě bych chtěl ze srdce poděkovat vedoucí mé práce Ing. Lence Vítkové za odborné rady, cenné informace a také za velkou motivační podporu, kde všechny tyto aspekty se projevily na celkové podobě práce. Dále bych chtěl poděkovat celé své rodině, která mě po celou dobu studia plně podporovala. Také velice děkuji svým spolužákům za vzájemnou podporu během studia.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 3D TISK.....	11
1.1 TECHNOLOGIE 3D TISKU	11
1.1.1 Technologie stereolitografie.....	11
1.1.2 Technologie Fused Deposition Modeling	12
1.1.3 Technologie selektivní laserové sintrování.....	13
1.2 3D BIOTISK	14
1.2.1 Počátky 3D biotisku	14
1.2.2 Technologie biotisku	15
2 HYDROGELY	18
2.1 SLOŽENÍ HYDROGELŮ.....	18
2.2 ROZDĚLENÍ PODLE ZPŮSOBU SÍŤOVÁNÍ.....	18
2.2.1 Fyzikální síťování	18
2.2.2 Chemické síťování	19
2.3 HYDROGELY NA BÁZI SYNTETICKÝCH POLYMERŮ.....	20
2.3.1 Polyethylenglykol	21
2.3.2 Kyselina polymléčná.....	21
2.4 HYDROGELY NA BÁZI PŘÍRODNÍCH POLYMERŮ.....	21
2.4.1 Alginát.....	21
2.4.2 Kolagen	21
2.5 HYDROGELY NA BÁZI ŽELATINY.....	22
2.5.1 Želatina.....	22
3.1 REOLOGIE	24
3.1.1 Dynamická viskozita	24
3.1.2 Kinematická viskozita	24
3.1.3 Pseudoplastické materiály	25
3.1.4 Princip rotační reometrie	25
3.1.5 Narůstání za hubicí.....	25
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	27
4 CÍL PRÁCE	28
5 PŘÍPRAVA MATERIÁLŮ	29
5.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	29
5.2 OXIDACE DEXTRANU	29
5.3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	30
5.4 TESTOVÁNÍ VHODNÉHO SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI PRO TVORBU HYDROGELŮ.....	31
5.5 POSTUP PŘÍPRAVY HYDROGELŮ PRO TISK	32

6	VÝSLEDKY	33
6.1	MĚŘENÍ TOKOVÉ KŘIVKY	33
6.2	VÝSLEDNÉ VÝTISKY MŘÍŽEK	34
6.2.1	Parametry tisku.....	34
6.2.2	Určení parametrů vytisknutých mřížek	37
6.3	VYHODNOCENÍ NARŮSTÁNÍ ZA HUBICÍ	39
7	DISKUZE	43
7.1	TOKOVÉ KŘIVKY	43
7.2	EXTRUZNÍ 3D TISK	43
7.3	NARŮSTÁNÍ ZA HUBICÍ	44
	ZÁVĚR	45
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	51
	SEZNAM OBRÁZKŮ	52
	SEZNAM TABULEK	53

ÚVOD

Tato bakalářská práce pojednává o materiálech využitelných v 3D biotisku, který je poslední dobou čím dál více rozšířenou technologií. Vděčí za to hlavně svému potenciálu v biomedicínských aplikacích.

Hlavním cílem 3D biotisku je vytvořit vhodné implantáty, které by byly schopny napodobit přirozené tkáňové vlastnosti. V poslední době vzhledem k potenciálu do budoucna probíhá po světě výzkum materiálů a jejich různých kombinací, které by vedly k vytvoření ideálního bioinku. K tomuto cíli vede dlouhá a složitá cesta, neboť materiál musí splňovat spoustu vlastností, např. nesmí být toxický, musí být biokompatibilní, aby ho tělo přijalo, a také musí mít tokové vlastnosti umožňující snadný tisk zvolenou metodou.

Tato práce se zabývá přípravou hydrogelů, konkrétně hydrogelů na bázi želatiny, které jsou síťovány pomocí oxidovaného dextranu pomocí Schiffových vazeb. Tento postup je výhodný díky nízké toxicitě síťovacího systému. Navíc jsou tyto vazby za specifických podmínek reverzibilní. Uvažuje se o tom, že reverzibilita umožňuje snadný tok materiálu při velkém smykovém napětí, a proto mohou mít velký potenciál z pohledu extruzního tisku.

3D tisk extruzní metodou představuje značné namáhání materiálu tokem. Charakterizace hydrogelů z pohledu tokových vlastností, zejména pak viskozity, je nutná pro nalezení ideálních podmínek pro tisk. Viskozitu želatinových hydrogelů může ovlivňovat řada parametrů, mimo jiné i způsob rozpouštění polymeru. Kvalita výtisku je pak dána souhrnem vnitřních vlastností gelu a vnějších parametrů 3D tisku.

Bakalářská práce je sestavena z teoretické a experimentální části. Teoretická část se skládá ze tří kapitol. V první kapitole nalezneme souhrn jednotlivých metod 3D tisku. Druhá kapitola pojednává o hydrogelech, konkrétně jejich rozdělení na základě síťování. Jsou zde i nastíněny hydrogely na bázi syntetických a přírodních polymerů. Třetí kapitola stručně uvádí vědní obor reologie, princip rotační reometrie a narůstání za hubicí. V praktické části se nachází nadefinované cíle práce, popisy provedených experimentů, zhodnocení výsledků včetně diskuze.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 3D TISK

3D tisk, aditivní, nebo také inkrementální (přírůstková) výroba, je metoda, která využívá principu postupného horizontálního nanášení materiálu vrstvu po vrstvě. Výsledkem tohoto procesu je vytvoření trojrozměrného pevného objektu. Touto technologií lze vytisknout objekty v milimetrových velikostech, ale také např. rodinný dům. [1], [2]

Náplň 3D tiskárny, může být plast (tisková struna), kov (ve formě prášku), sklo, keramika atd. Náplň tiskárny může tvořit i organický materiál, např. biopolymerní hydrogely. [1], [3]

Důležitým krokem při tvorbě 3D objektů je předchozí vymodelování virtuálního objektu v programu (např. Inventor, 3D builder), popřípadě lze objekt vytvořit pomocí 3D skeneru. Na základě tohoto modelu pak tiskárna nanáší jednotlivé vrstvy budoucího trojrozměrného objektu.[4]

Doposud je 3D tisk využíván převážně v průmyslu pro prototypování a vývoj výrobků. Zároveň ale dochází k prudkému rozvoji 3D tisku především s ohledem na objevování nových oblastí využití této technologie, např. v medicíně. [1], [4]

1.1 TECHNOLOGIE 3D TISKU

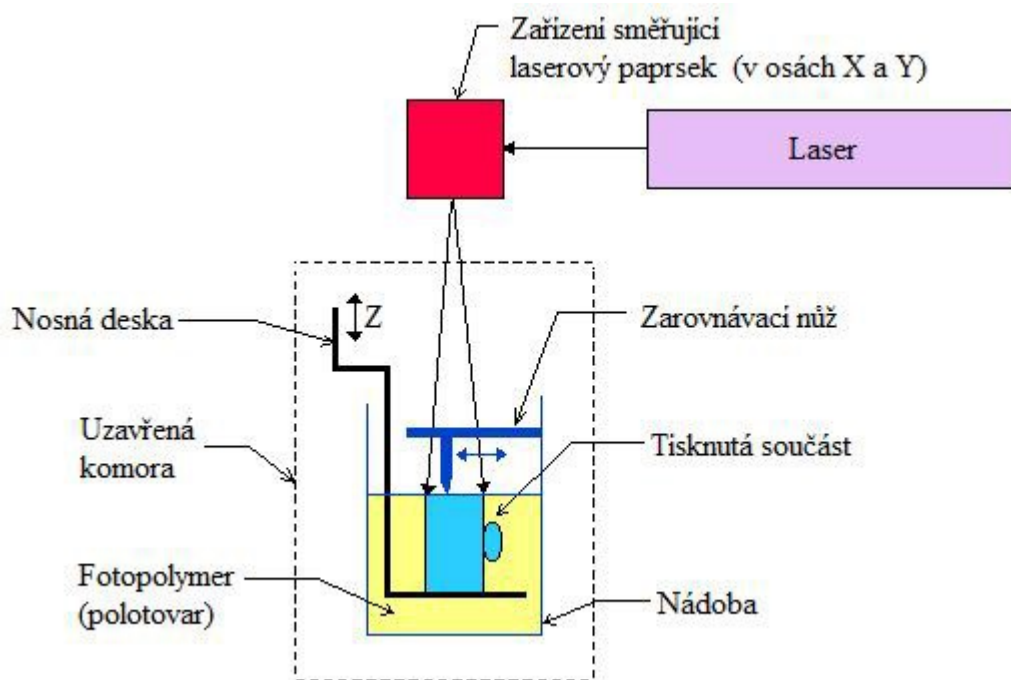
1.1.1 Technologie stereolitografie

Za jednu z prvních metod aditivní výroby je považována stereolitografie (SLA), kterou vyvinul a nechal si patentovat Charles Hull v roce 1986. Obecným principem SLA je selektivní vytvrzení matrice pomocí laseru. Matrice se skládá ze směsi monomerů, iniciátorů a dalších složek umožňující polymeraci. Častým přístupem v SLA je radikálová polymerace. Radikálová polymerace může být zahájena například pomocí fotoiniciátoru, který absorbuje dopadající fotony a produkuje volné radikály, které spouštějí polymerační reakci. Většina běžných fotoiniciátorů má absorpční délku v oblasti ultrafialového záření (UV), jejich výběr je proto nutné přizpůsobit rozsahu vlnových délek laserového zdroje, aby se zajistila efektivita provozu.

K iniciaci řetězové reakce na vrstvě roztoku pryskyřice, nebo monomeru se využívá UV nebo elektronový paprsek. Po aktivaci (radikalizaci) je nutné převést monomery na polymerní řetězce. Oblíbenými monomery jsou zejména ty, které jsou na akrylové či epoxidové bázi, jelikož jsou UV aktivní. Následným zaměřením záření na určité místo dochází ke vzniku vrstvy částečně vytvrzeného polymeru. Tloušťku každé vrstvy ovlivňuje

zejména energie světelného zdroje a doba expozice. Nezareagovaná pryskyřice se odstraní po dokončení tisku.

Výhodou této metody je, že SLA tiskne kvalitní součásti s rozlišením od 10 μm . Dále se dá využít i pro výrobu forem např. pro vstřikování. Naopak nevýhodou je nízká rychlost tisku, omezené množství vhodných materiálů a složitost procesu vytvrzování. [5]



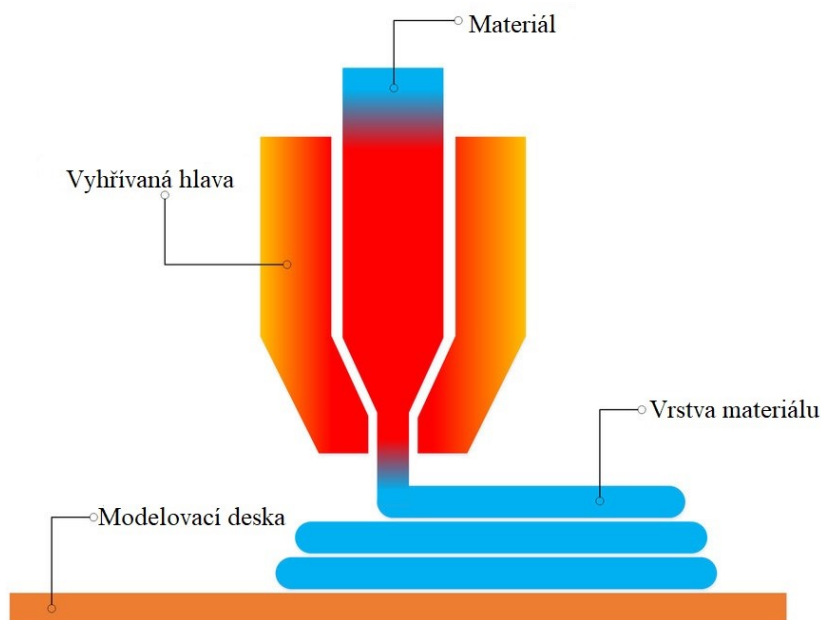
Obr. 1: Schéma fotopolymerace při SLA [6]

1.1.2 Technologie Fused Deposition Modeling

Technologie Fused Deposition Modeling (FDM) je jedna z nejrozšířenějších technologií aditivní výroby. Zařízení se skládá z modelovací desky a vytlačovací hlavy. Náplň 3D tiskárny tvoří termoplast ve formě strun, který je namotaný na cívce. Tento termoplast je postupně dávkován do vytlačovací hlavy, ve které dochází k zahřívání daného materiálu a následně nastává fáze vytlačování materiálu vrstvu po vrstvě na modelovací desku. Typická FDM tiskárna se skládá z tiskové hlavy, která je schopná se pohybovat ve směru os X, Y. Další součástí je modelovací deska, která se pohybuje ve směru osy Z. Dle požadavků na vytištěný produkt lze využít kombinaci dvou a více materiálů během tisku, kde jeden má za úkol řešit geometrii tisku a druhý se stará o vertikální podpora tištěného produktu, aby nedošlo k jeho zhroucení. [7]

Materiály, z kterých se tiskne můžou být různě barevné, ale závisí to na fyzikálním a chemickém složení. Nejčastěji se využívají k tisku následující polymery: akrylonitrilbutadienstyren (ABS), kyselina polymléčná (PLA), polykarbonát/akrylonitrilbutadien-styren (PC-ABS). [7]

Výhodou metody FDM je jednoznačně efektivita práce s tiskárnou, malé množství odpadu, dále široká dostupnost termoplastických materiálů a v neposlední řadě nízké finanční náklady. Mezi nevýhody se řadí poměrně velká tloušťka tištěné vrstvy, dále nutnost povrchové úpravy a omezená přesnost. Další nevýhodou, kterou má i metoda SLA, je, že po vytisknutí je potřeba využít šetrnou metodu pro odstranění podpory tak, aby nedošlo k porušení vytištěného produktu. [7]



Obr. 2: Schéma technologie FDM [8]

1.1.3 Technologie selektivní laserové sintrování

Technologie selektivní laserové sintrování (SLS) je metoda aditivní výroby, která byla vyvinuta v osmdesátých letech panem Carlem Robertem Deckardem, který si následně metodu nechal patentovat. [9]

Typická tiskárna SLS se skládá ze tří komor umístěných vedle sebe. Boční komory slouží k dávkování materiálu a prostřední komora slouží k vytváření 3D modelu. Dále se skládá z válečku, který nanáší vrstvu materiálu do prostřední komory, a také laseru a sady zrcátek. Nejčastěji používaným materiálem je práškový nylon nebo polyamid. [9]

Zdrojem energie je laser, který speče vrstvu prášku, která klesne o jednu tloušťku vrstvy a váleček přivede další tenkou vrstvu materiálu, který se působením laseru speče. Tento postup se opakuje, dokud nedostaneme finální model, který je obalen v nylonovém prášku. Prášek lze jednoduše očistit štětečkem, popřípadě za pomoci vzduchu. [9]

Výhodou této metody je, že nylonový prášek, který není slinutý, funguje zároveň jako podpůrný materiál. Výsledkem je získání plně funkčních pohyblivých sestav s velmi jemnými detaily, kde není potřeba tisknout různé součásti a následně je sestavovat. Dalšími výhodami je tuhost, pevnost, chemická odolnost, nebo rychlost tisku. [9]

Nevýhodou je vznik porézních povrchů, které se dají různými postupy utěsnit např. povlaky.[9]

1.2 3D BIOTISK

3D biotisk je metoda, při které dochází k ukládání biomateriálů a živých buněk na podložku, kterou může být pevný povrch, např. laboratorní sklíčko nebo Petriho miska. Následně nám vzniká 3D struktura, která čerpá data z 3D modelu, který je nahraný v tiskárně.[10]

Jako náplň do biotiskárny se používají speciální materiály, též zvané „bioinks“, které jsou nejčastěji tvořené kombinací polymerů a živých buněk. Ideální „bioink“ by měl splňovat určité parametry, jako jsou mechanické vlastnosti, tisknutelnost (vhodná viskozita a dobré síťovací mechanismy). Dalším parametrem bioinků je bioaktivita (biokompatibilita, vysoká životaschopnost buněk a podpora buněčné adheze). [11]

3D biotisk je poslední dobou velice rozšířeným odvětvím, zejména díky svému velkému potenciálu, jmenovitě v regenerativní medicíně. Předpokládá se, že v budoucnu bude možné vytisknout dlouhodobě životaschopné orgánové a tkáňové struktury.

1.2.1 Počátky 3D biotisku

Koncem 19. století se lord Rayleigh zabýval studiem způsobu pronikání nepřetržitého proudu vody a nestabilitou trysek. [12] Výsledek jeho práce byl velice přínosný, položil teoretické základy pro budoucí výzkum inkoustových tiskáren.

Na základě jeho teorie vznikla technologie nepřetržitého inkoustového tisku a později se objevily systémy drop-on-demand. Inkoustový tisk umožňuje vysunutí kapiček inkoustu a připojení na substráty, a to zcela bezkontaktně. Inkoustová technologie poskytuje vysoké

rozlišení a v roce 2018 byla využita pro komerční účely světovými společnostmi, konkrétně Hewlett-Packard (HP) a Canon. [13]

Vědci získali spoustu zkušeností a přišli na to, že metoda drop-on-demand se dá využít pro přesné vzorování biomateriálů, a také díky možnosti bezkontaktního tisku se mimo jiné eliminuje kontaminace již zmiňovaných biomateriálů. Inkjet nám umožňuje bezkontaktně dodat buňky na potřebná místa, a tím se otvírá možnost tvorby složitých struktur. Velikou výhodou je průměr trysek inkoustového zařízení, který bývá často 50 μm , stejného řádu je i velikost buněk. Koncem 20. století, díky všem perspektivním poznatkům vstoupil mezi širokou veřejnost pojem inkjet bioprinting, který posouvá výzkum v oblasti biotisku. [13]

1.2.2 Technologie biotisku

Metoda založená na tryskání

Jedním z příkladů metod 3D biotisku je jetting-based bioprinting, v překladu metoda na bázi tryskání, která spadá do kategorie inkjet. Tato technologie se dostává čím dál více do povědomí světa zejména díky svému využití ve 3D biotisku, kde slouží k výrobě scaffoldů, nebo biomedicínských zařízení. Metodu založenou na tryskání můžeme rozdělit do dvou skupin, a to piezoelektrický a termální typ.[14]

Piezoelektrický typ funguje na následujícím principu: tisková hlava způsobí aktivaci piezokrystalu, který následně vyšle pulz způsobený elektrickým vstupem, a tak je vytlačena mála kapka materiálu.[15]

Termální inkoustová biotiskárna využívá ohřívač, který má za úkol lokálně zvýšit teplotu materiálu, čímž se zapříčiní vznik a rozpínání bublin a následné vyslání kapky na požadované místo.[15]

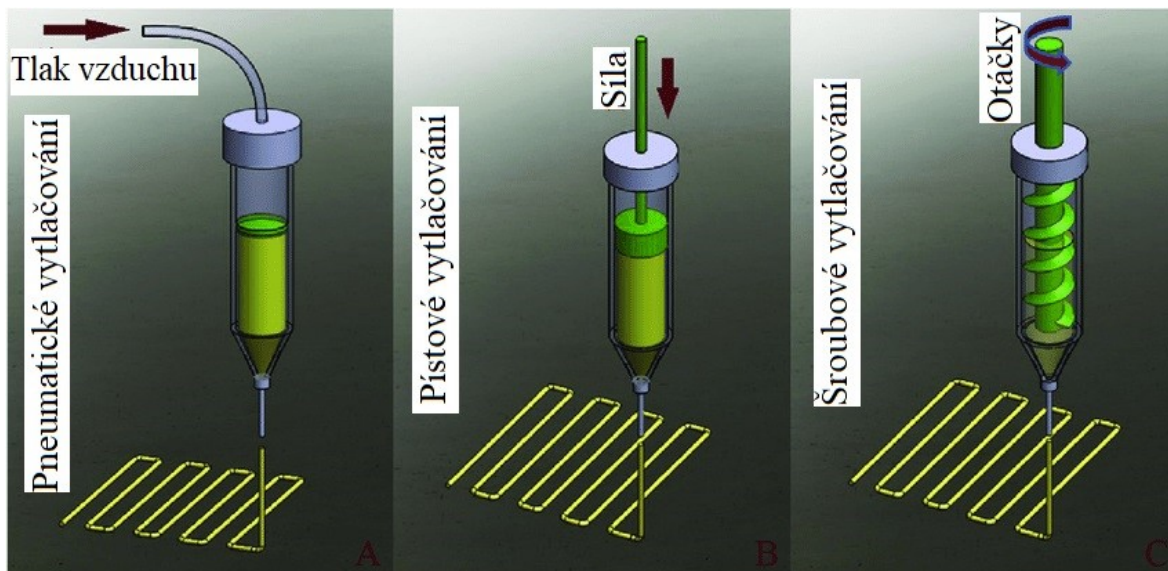
Hlavní výhodou metody založené na tryskání je jednoznačně nízká cena a vysoké rozlišení v řádech větších než 20 μm . Jedná se o bezkontaktní metodu 3D biotisku.

Nevýhodou je možnost volby materiálu, která je omezená na materiály s nízkou viskozitou.[14], [15]

Extruzní 3D Biotisk

V poslední době se těší pozornosti metoda na základě vytlačování, která otvírá nové možnosti a využití 3D biotisku v praxi. Metoda založená na vytlačování, je poměrně novou metodou, která byla komercializována roku 2002 společností Envisiontec Inc. [16]

Typická tiskárna založená na metodě vytlačování se skládá z automatizovaného robotického systému, dále pak z tiskových hlav, které se pohybují podél os X a Y, a vytápěné podložky schnopné se mohou pohybovat svisle nahoru a dolů. Samotný tisk pracuje na základě dat z počítačového modelu (CAD) modelu jako je např. tvoření různých struktur (mřížek), formování scaffoldů atd.[17]



Obr. 3: Schématické znázornění možností tisku založené na vytlačování. A-pneumatické vytlačování, B-pístové, C-šroubové [18]

Obecně můžeme říct, že vytlačovací hlavy v biotisku mají jeden společný cíl, a to je vytlačování materiálu, který je naplněný např. ve stříkačce, přes mikrotrysku, která může mít různý tvar, např. jehla, nebo kónická špička. Rozlišujeme tři druhy tiskových hlav: pneumatická, pístová a šroubová. [19]

Pneumatická vytlačovací hlava

Materiál, který je ve stříkačce pneumatické hlavy je vytlačován vzduchem. Nevýhodou této hlavy je nižší spolehlivost vytlačování materiálu, která je způsobena zpožděním posunu vlivem stlačeného plynu (vzduchu). Na druhou stranu jejich funkčnost je vhodnější pro vysoce viskózní látky.[19]

Pístová vytlačovací hlava

V případě pístové vytlačovací hlavy je materiál naplněný ve stříkačce vytlačován tlakem působícím seshora na píst stříkačky. Tento pístový způsob je efektivnější z pohledu kontroly nad průtokem a vytlačováním materiálu např. hydrogelů z trysky. [19]

Šroubová vytlačovací hlava

Šroubová vytlačovací hlava funguje na principu rotace šroubu, který následně vytlačuje materiál. Je vhodná spíše pro prostorovou kontrolu a pro vytlačování zejména značně viskózních hydrogelů.[19]

Výhodou techniky založené na vytlačování je jednoznačně tisk velkého množství materiálů, tzv. bioinků, dále také buněčných agregátů či hydrogelů obsahující buňky. Další výhodou je cenová dostupnost a široká nabídka technologií biotisku. Tato technika mimo jiné umožňuje tisknout složité porézní konstrukty.[20]

Nevýhoda této techniky je, že při tištění větších konstruktů dochází ke snižování životaschopnosti buněk vlivem časově náročného biotisku. Rozlišení se pohybuje v řádech nad stovku mikrometrů, tudíž je oproti jiným metodám poměrně nízké.

Jedna z omezujících věcí této techniky spočívá ve zpracovatelském oknu materiálu, které nás limituje při uplatnění většího množství hydrogelů, a je dáno rychlostí gelovatění a tuhnutí. V praxi to znamená, že je třeba věnovat pozornost nastavení vhodného procesu tuhnutí materiálu. [20]

2 HYDROGELY

Hydrogely jsou obecně řídké sesíťované polymerní řetězce, které absorbují vodu ve velkém množství. Vlivem toho dochází ke zvětšování hmotnosti, tzv. bobtnají. V poslední době se hydrogely staly přínosem v tkáňovém inženýrství, kde se dají využít v aplikacích např. jako nosiče pro buňky. [21], [22]

2.1 Složení hydrogelů

Jako základní materiály lze zvolit přírodní či syntetické polymery. Stěžejní součásti reakční směsi pro přípravu hydrogelů jsou monomer, iniciátor a síťovací činidlo, které se používá v případě chemického síťování. Běžně se dají hydrogely vyrobit různými metodami např. polymerační reakcí emulzní, suspenzní, které musí vést k síťování polymeru. Také je možné jako výchozí látky použít polymerní řetězce schopné tvořit síť na fyzikálním či chemickém principu. Typ a hustota síťování a chemická podstata gelů jsou významné pro jejich výsledné chování. [23]

2.2 Rozdělení podle způsobu síťování

2.2.1 Fyzikální síťování

Hydrogely vzniklé na základě fyzikálního síťování můžeme rozdělit do tří kategorií podle mechanismu vzniku sítě - tepelná kondenzace, iontové interakce a na základě self-assembly. [21]

V případě fyzikálního síťování je výhoda v tom, že není potřeba síťovací činidlo, protože hydrogely síťují na základě fyzikálních interakcí. V případě tepelné kondenzace je vznik takových interakcí indukován změnou teploty. [21]

Další možností fyzikálního síťování je gelace na základě self-assembly, kde dominují zejména vodíkové vazby, či elektrostatické interakce. Do této kategorie fyzikálního síťování spadají například některé hydrogely na bázi proteinů. [21]

Jednou z možností fyzikálního síťování jsou iontové interakce, kde je gelace zapříčiněna přítomností elektrostatických nábojů. Do této kategorie spadají tzv. polyelektrolyty, které vynikají svými elektrostatickými vlastnostmi. Příkladem může být poly(L-lysin), nebo alginát. [21]

2.2.2 Chemické síťování

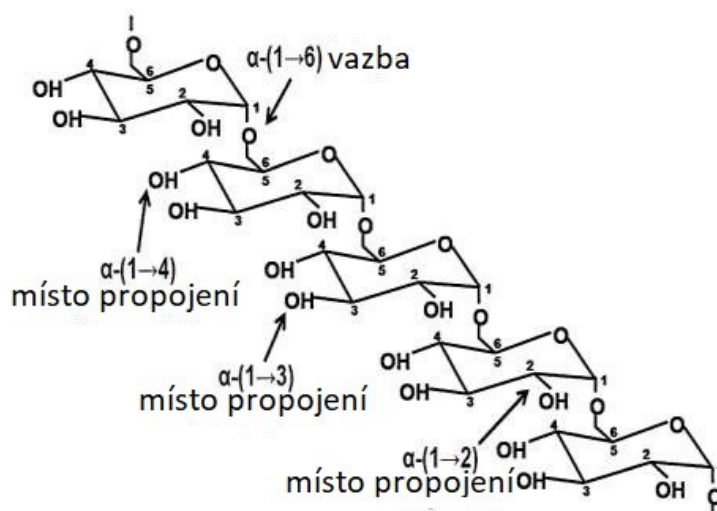
Z pohledu chemického síťování lze připravit hydrogely, které vynikají lepší stabilitou, rychlostí a lepší kontrolovatelností gelace oproti fyzikálnímu síťování. Jak již bylo zmíněno, z pohledu chemického síťování je možné hydrogely připravit různými mechanismy, například kondenzací, ozařováním aj. [23]

Zajímavou možností chemického síťování jsou Schiffovy vazby, které se získávají reakcí mezi aldehydovými a nukleofilními aminovými skupinami, tedy spadají do oblasti kondenzačních reakcí. Jedná o iminy, hydrazony a oximy, které jsou dílem, již zmiňovaných kondenzačních reakcí. Hydrogely, které obsahují takové vazby mají například skvělou biokompatibilitu, a také vynikají výraznou citlivostí na pH. [24]

V případě síťování hydrogelů pomocí iminových vazeb je nutná přítomnost aldehydových skupin. Jejich vzniku je možné docílit oxidací polysacharidových řetězců. Takto vzniklé polyaldehydy vynikají výrazně nižší toxicitou oproti jiným síťovacím činidlům na bázi aldehydů (např. glutaraldehyd) Oxidaci zprostředkovává oxidační činidlo např. jodistan sodný. Vhodným materiálem pro tuto úpravu je např. dextran. [24]

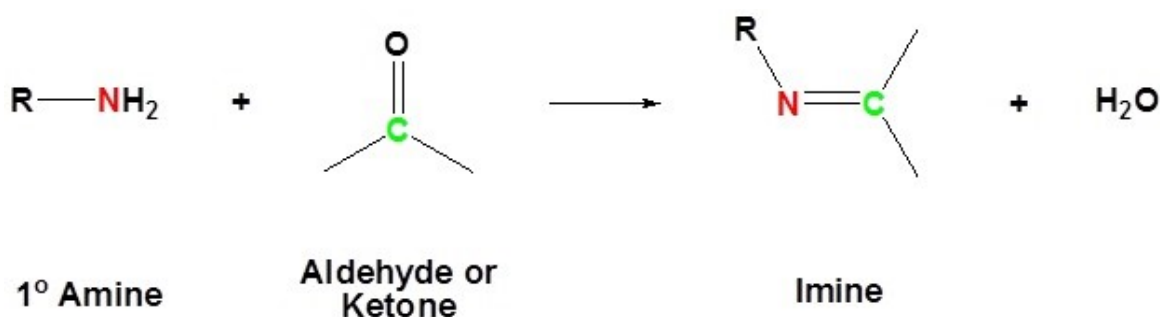
Dextran a jeho oxidace

Dextran spadá do skupiny polysacharidů, který se získává kondenzací jednoduchého cukru-glukózy. Obsahuje více než 95 % α -1,6 vazeb a vykazuje nízký stupeň rozvětvení. V porovnání například s glykogenem (α -1,4 vazba), je mnohem užitečnější v biologických aplikacích, čemuž vděčí právě α -1,6 vazbám díky nimž má pomalejší hydrolyzu způsobenou tělními enzymy. [25]



Obr. 4: Struktura dextransu poukazující na glykosidické vazby v hlavním řetězci včetně možných menších větví řetězců [26]

Oxidace dextransu za pomoci jodistanu probíhá ve vodném prostředí bez katalýzy. V principu funguje tak, že jodistanový iont atakuje dioly. Následně zbytky α - 1,6 vazeb v dextransu napadají vazby uhlík-uhlík, což způsobuje vznik aldehydových skupin. Tyto aldehydové skupiny mají reaktivní povahu vzhledem k N-nukleofilům, příkladem nukleofilů jsou aminy. [25]



Obr. 5: Popis tvorby iminů [27]

V posledních letech se vytvářejí a zdokonalují možnosti využití hydrogelů, které obsahují buňky zejména k testování, zda by se daly využít v regenerativní medicíně. [21], [28]

2.3 Hydrogely na bázi syntetických polymerů

Všeobecně můžeme říct, že kvalifikovaný pracovník ve výzkumu dokáže správně syntetizovat polymerní sítě a kontrolovat určité parametry jako je hustota síťování, nebo biologický rozklad, popřípadě také různé chemické či mechanické vlastnosti. Proto je pro řadu aplikací vhodné volit syntetické biomateriály. [29]

2.3.1 Polyethylenglykol

Jedním z příkladů syntetických hydrogelů je polyethylenglykol (PEG), který má velký potenciál pro biomedicínské aplikace nejen ve formě hydrogelu. Vzhledem ke svým vlastnostem neuvolňuje toxické látky. Další vlastností výhodnou pro uplatnění PEG v biotisku je biokompatibilita. [30]

2.3.2 Kyselina polymléčná

Jedním ze syntetických polymerů schopným tvořit hydrogely je PLA, která patří do skupiny nazývané poly-alfa-hydroxykyseliny a spadá do polyesterů. Jednou z vlastností PLA je, že neváže vodu, je tzv. hydrofobní. PLA se vyrábí syntézou z kyseliny mléčné. PLA je poměrně tepelně stabilní. Teplota skelného přechodu se pohybuje v rozmezí 60°C -70°C, teplota tání 130°C –180°C. [31], [32]

2.4 Hydrogely na bázi přírodních polymerů

Hydrogely na bázi přírodních polymerů mají poslední dobou velký potenciál konkrétně v biomedicínských aplikacích. Jejich potenciál spočívá v tom, že jsou velmi dobře biokompatibilní a také biologicky rozložitelné. Je nutné podotknout, že samotný čistý přírodní hydrogel má často špatné mechanické vlastnosti. V důsledku toho se provádí úprava hydrogelů na bázi přírodních polymerů, které tyto negativní mechanické vlastnosti eliminují.[33]

2.4.1 Alginát

Alginát spadá do kategorie přírodních polysacharidů. Získává se z mořských řas. Jeho potenciál spočívá v tom, že z něho lze poměrně jednoduše vytvořit iontově vázaný hydrogel, který nachází uplatnění v regenerativní medicíně. Výhodou síťování nemodifikovaného alginátu je jednoznačně rychlost a nízká cena sodné soli kyseliny alginové. K síťování se využívá síťovací činidlo obsahující Ca^{2+} , nebo jiné vícemocné ionty kovů. Vzhledem k jeho snadnému tvoření gelů a biokompatibilitě se stále nabízí jeho hlavní uplatnění zejména k enkapsulaci buněk.[19], [34]

2.4.2 Kolagen

Kolagen je nejznámější bílkovina, která se vyskytuje v těle všech savců. Je obsažen v těle v množství zhruba 30 %. [35] Tento polymer vykazuje hydrofilní a iontový charakter. Kolagen typu I je schopný tvořit gely v poměrně nízkých koncentracích (méně než 10 %). [36]

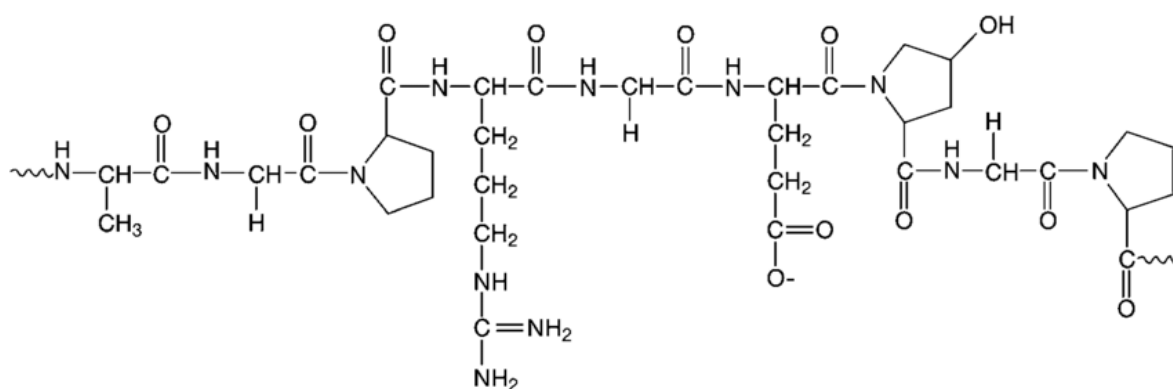
Důležitou vlastností kolagenových hydrogelů je míra hydrofility, která ovlivňuje například rychlost bobtnání. V regenerativní medicíně je prioritní znát mechanické vlastnosti, např. elasticita, pevnost.[36]

Důležitým poznatkem u kolagenu je jeho přínos v biologických aplikacích, ale je nutné brát v potaz, že kolagen je potřeba obohatit o složky jako jsou elastin, nebo fibrinogen. V případě, že bychom brali 100 % čistý kolagen, mohl by způsobovat nežádoucí účinky v podobě špatného přesunu buněk, který je způsoben silnou adhezí buněk. V případě použití hydrogelů jako implantátů je nevýhodou vylučování vody, což vede ke smrštění a zhoršení funkce implantátu. Z důvodu obtížného zpracování nativního kolagenu se v praxi často používají želatiny, které vznikají jeho hydrolyzou. Tomuto významnému materiálu pro výrobu biokompatibilních hydrogelů se věnuje kapitola následující níže. [19], [36]

2.5 Hydrogely na bázi želatiny

2.5.1 Želatina

Želatina spadá do kategorie přírodních polymerů a je odvozena od kolagenu jeho hydrolyzou. Želatinu je možné získat z různých zdrojů, jednou z možností je ze zvířat např. z kůže, pojivové tkáně, kuřecí nohy, nebo také je možné získat želatinu z ryb. Rozlišujeme želatinu typu A, která se vyrábí například pomocí kyseliny chlorovodíkové, obecně za použití kyselin, a želatinu typu B, kterou lze vyrobit alkalickým zpracováním, případně enzymatickou cestou. [37], [38]



Obr. 6: Chemická struktura želatiny[39]

Hydrogely na bázi želatiny vytvářejí gely pomocí síťování poměrně jednoduchého principu - tvorba vodíkových můstků za nižších teplot než 35°C – 37°C. Z této vlastnosti plyne nevýhoda, že teplota tání želatinových gelů je blízka tělesné teplotě. To snižuje samotný počet aplikací želatiny, proto se želatina různě kombinuje s jinými proteiny, nebo polymery. [19]

Želatina může být kombinovaná například s hyaluronanem, alginátem, nebo chitosanem. Tyto kombinace vykazují skvělé vlastnosti, jmenovitě biokompatibilitu a efektivní biologickou rozložitelnost, pro využití v medicínských aplikacích.

Želatina se může mimo jiné chemicky síťovat třeba také oxidovaným dextranem, který je podrobně popsán v teoretické části viz výše.

Nejzajímavější aplikací hydrogelů na bázi želatiny z hlediska potenciálu pro budoucnost je určitě medicínský výzkum. Hlavním důvodem jejich použití je kontrola nad kinetikou bobtnání a velké množství zadržované vody.[19], [37]

3 CHARAKTERIZACE HYDROGELŮ

3.1 Reologie

Reologie je vědní obor, který se zabývá vlastnostmi materiálů. Popisuje, jak materiál teče v závislosti na deformaci za působení síly. Reologie byla představena světu již v roce 1929. Je důležité podotknout, že každý materiál teče, ale míra tečení závisí na tom, jak velkou sílu použijeme, jak dlouho na daný materiál působíme, a také na vlastnostech daného materiálu. Reologie nám poskytuje užitečná data, které nám udávají, jak se bude materiál deformovat v závislosti na síle, čase a prostorové orientaci.[40]

3.1.1 Dynamická viskozita

Dynamická viskozita je míra odporu kapaliny vůči tečení při působení vnější síly.

Když uvažujeme materiál, který je ideálně viskózní, tak nám pro tečné napětí platí Newtonův zákon, který je definován podle vzorce:

$$\tau = \eta \cdot \frac{du}{dx} = \eta \cdot D$$

η = je dynamická viskozita, která charakterizuje vnitřní tření kapaliny [Pa·s]

du = nám vyjadřuje vzdálenost rychlosti pohybu rovin vzdálených o dx [$m \cdot s^{-1}$]

D = nám udává rychlost deformace [s^{-1}]

Dynamická viskozita je závislá na teplotě. V případě plynů nám s rostoucí teplotou roste a u kapalin nám klesá.[41], [42]

3.1.2 Kinematická viskozita

Kinematická viskozita je vyjádřena jako podíl dynamické viskozity ku hustotě.

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} = \left[\frac{m^2}{s} \right]$$

Obdobně jako u dynamické tak i kinematická viskozita vyjadřuje odpor kapaliny vůči tečení, ale v případě kinematické viskozity na kapalinu nepůsobí žádná vnější síla kromě gravitační.

3.1.3 Pseudoplastické materiály

Pseudoplastické materiály spadají do kategorie tzv. neneutonských kapalin, a mohou mít podobu např. roztoků, suspenzí, nebo polymerních tavenin.

Charakterizuje je obdobný vztah:

$$\tau = \eta \cdot D$$

η je zdánlivá viskozita, která je závislá na rychlosti deformace

U pseudoplastických kapalin nám v případě rostoucího gradientu rychlosti dochází ke snižování zdánlivé viskozity. Z toho důvodu jsou pseudoplastické materiály významné pro uplatnění v extruzním 3D biotisku. [41], [42]

3.1.4 Princip rotační reometrie

Jednou z metod měření viskozity kapalin je rotační reometrie. Rotační reometr nám umožňuje testování reologických vlastností materiálů ve formě past a gelů, suspenzí, emulzí, roztoků atp.

Rotační reometrie pracuje na principu takovém, že vzorky jsou vloženy mezi dva měřicí prvky, jmenovitě rotor a stator. Vzorky je vhodné během měření temperovat. K samotné kontrole teploty slouží stator. Otáčením rotor působí na vzorek silou a způsobuje jeho deformaci. Díky změření točivého momentu a úhlové rychlosti rotoru získáme smykové napětí a smykovou rychlost. Dynamická viskozita je dána jako poměr smykového napětí ku smykové rychlosti.

Pomocí rotační reometrie můžeme stanovit například jednoduché křivky viskozitního toku.

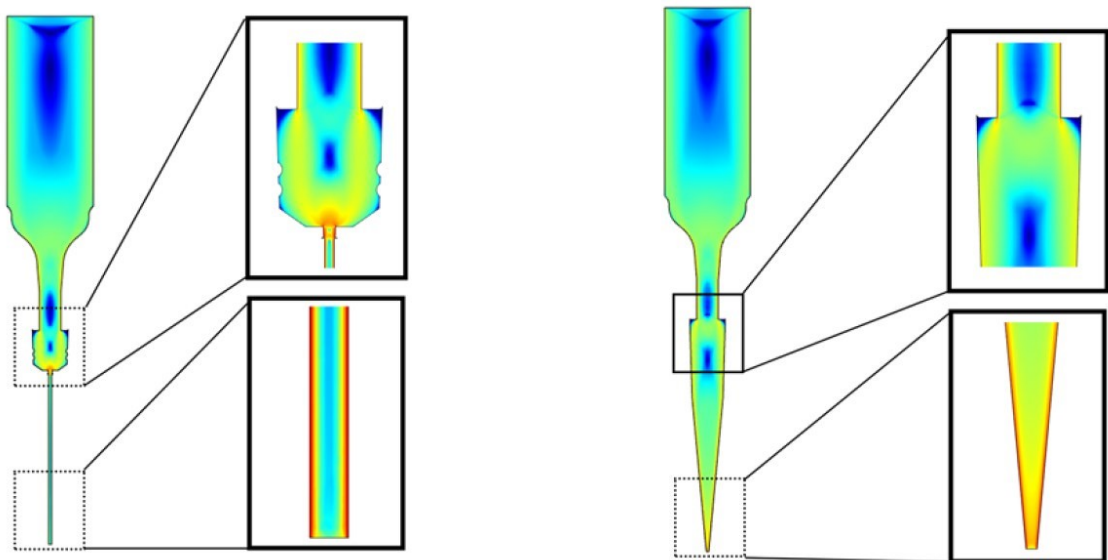
Zde popsaný rotační reometr byl v experimentální části použit pro měření tokové křivky připravených hydrogelů. [43], [44]

3.1.5 Narůstání za hubicí

Die swell, neboli v překladu narůstání za hubicí je jednou z charakteristik ovlivňující přesnost tisku. Je to jeden z problémů nastávající při extruzi. Při této výrobní technologii máme materiál, který je naplněný ve stříkačce a následně ho vytlačujeme přes mikrotrysku. Vytlačováním přes mikrotrysku nám dochází ke zvyšování rychlosti proudu polymeru. Takto namáhaný materiál ztrácí svůj sférický tvar a díky zvýšené rychlosti proudění se prodlužuje. Vlivem pomnutí smykového napětí při opuštění mikrotrysky dochází ke

zvětšování na jeho původní objem. Proto je průměr vytlačeného materiálu větší než průměr trysky. [45]

Pokud je k tisku použita špička, dochází k postupnému narůstání smykového napětí po celé délce. Oproti tomu v jehle je průběh smykového napětí stálý, což dává čas materiálu k relaxaci. Proto lze předpokládat nižší narůstání za hubic v případě jehly. [45]



Obr. 7: Průběh smykového napětí při použití jehly a špičky [46]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo vytvořit materiály na bázi biopolymerů vhodné pro zpracování metodou extruzního 3D tisku. Jako materiál byly zvoleny hydrogely na bázi želatiny síťované oxidovaným dextranem na principu vzniku iminových vazeb (viz teoretická část, kapitola 2.2.2 Chemické síťování). Po nalezení vhodné kompozice hydrogelu byl proveden experimentální 3D tisk a měření tokové křivky. Dále byl sledován vliv způsobu rozpouštění želatiny na výsledné chování hydrogelu.

5 PŘÍPRAVA MATERIÁLŮ

5.1 Použité chemikálie

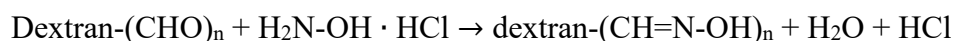
K přípravě hydrogelů byla použita želatina z kuřecích běháků připravená patentovanou metodou [47] o molekulové hmotnosti (9 kDa, 32 kDa, 210 kDa), který byl poskytnut doc. Mokrejšem z Ústavu inženýrství polymerů FT UTB Zlín. Dále pak dextran o molekulové hmotnosti 40 kDa, CAS:9004-54-0; jodistan sodný CAS: 7790-28-5; ACS reagent; $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}$, CAS: 7558-79-4, čistota > 98,5 %; NaH_2PO_4 , CAS: 7558-80-7, čistota > 98 % byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich. Čpavek 25 %, p.a.; hydroxid sodný, kvality pro analýzu; hydroxylamin hydrochlorid, CAS: 5470-11-1 pro analýzu, byly zakoupeny od firmy Penta. Pro přípravu demineralizované vody byl použit systém Milipore Direct-Q 3UV.

5.2 Oxidace dextranu

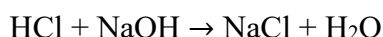
Nejprve proběhla příprava roztoku dextranu, který byl rozpuštěn ve vodě při teplotě 50°C po dobu 24 hodin. Koncentrace dextranu byla 13 % hm. Následně po 24 hodinách byla přidána směs rozpuštěného jodistanu do roztoku dextranu. Reakce probíhala 4 hodiny. Poté byla reakční směs vložena do dialyzačních membrán (cut-off 12-14 kDa) a nechal se dialyzovat proti demineralizované vodě po dobu 3 dnů. Výsledný produkt byl lyofilizován. Výtěžek reakce byl 48,5 %. Nízký výtěžek je způsoben protrhnutím jedné dialyzační membrány.

5.2.1 Určení stupně modifikace dextranu

Stupeň modifikace dextranu se určoval podle hydroxylamin hydrochloridové metody. Tato metoda probíhá na základě následující reakce:



Pro výpočet koncentrace aldehydových skupin je proto nutné určitě množství vzniklé kyseliny chlorovodíkové, a to pomocí neutralizační reakce.



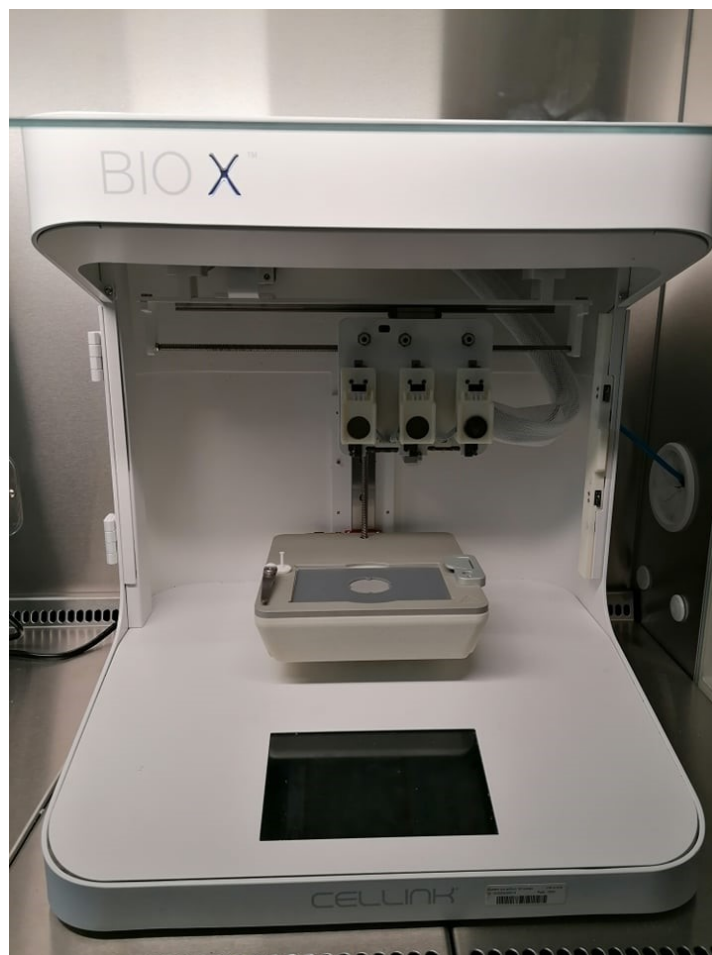
Zvážené vzorky oxidovaného dextranu o hmotnosti cca 0,1 g. Byly rozpuštěny v 25 ml 0,25 N roztoku hydroxylamin hydrochloridu s přidavkem methylovaného. Vzorky se nechaly reagovat po dobu dvou hodin. Následně byly titrovány pomocí 0,2 M roztoku hydroxidu sodného na pH 4.

Přesná hodnota koncentrace hydroxidu sodného byla stanovena na 0,1 M kyselinu šťavelovou. Tímto pokusem bylo zjištěna koncentrace 0,228 M hydroxidu sodného. Pro zlepšení přesnosti stanovení byl použit automatický titrátor Titronic universal. Bylo oxidováno 56,68 % glukózových jednotek dextranu.

5.3 Použité přístroje

5.3.1 Cellink BioX

Tisk hydrogelů probíhal na tiskárně BioX od firmy Cellink. Pro experimenty byla použita pístová extruzní hlava.



Obr. 8 Tiskárna Cellink BioX

5.3.2 Reometr Kinexus

Stanovení reologického chování hydrogelů bylo provedeno na reometru Kinexus od firmy Malvern.



Obr. 9 Reometr Kinexus [44]

Před měřením vzorků bylo provedeno nastavení parametrů reometru viz tabulka 1.

Tabulka 1: Parametry měření tokových křivek

Počáteční frekvence	0,1	[Hz]
Konečná frekvence	100	[Hz]
Smykové napětí	10	[%]
Teplota statoru	35	[°C]
Vzorky po dekádách	5	[-]
Pracovní mezera rotoru	2	[mm]

5.4 Testování vhodného složení reakční směsi pro tvorbu hydrogelů

Byla provedena příprava tří vzorků hydrogelů s různým obsahem želatiny (15 %, 25 %, 35 %). Jako rozpouštědlo byl použit fosfátový pufr (PBS) připravený v koncentraci 0,1 M a pH 7,4.

Nejprve byl proveden výpočet navážky hydrolyzátů pro patřičnou koncentraci, viz názorná ukázka výpočtu:

$$W_{0,15} = \frac{x}{1g} = x = 0,15 * 1 = 0,15 g = 15 \%$$

Po provedení navážky pro koncentrace želatiny (15 %, 25 %, 35 %) byl přidán roztok PBS, a následně se nechaly takto připravené hydrolyzáty kuřecích běháku ve zkumavkách rozpouštět v laboratorní sušárně přes noc při teplotě 37°C.

Následný den byla provedena zkouška ztuhnutí gelu. Zkouška se prováděla pro každý hydrolyzát o příslušné molekulové hmotnosti v následujících poměrech želatiny ku dextranu (2 hm. %):

Tabulka 2: Složení reakčních směsí pro tvorbu hydrogelů

Molekulová hmotnost hydrolyzátu	Poměr	Množství hydrolyzátu [μ l]	Množství dextranu [μ l]	Množství čpavku [ml]
9 kDa	1:1	300	300	0,15
9 kDa	2:1	300	150	0,15
9 kDa	3:1	300	100	0,15
32 kDa	1:1	300	300	0,15
32 kDa	2:1	300	150	0,15
32 kDa	3:1	300	100	0,15
210 kDa	1:1	300	300	0,15
210 kDa	2:1	300	150	0,15
210 kDa	3:1	300	100	0,15

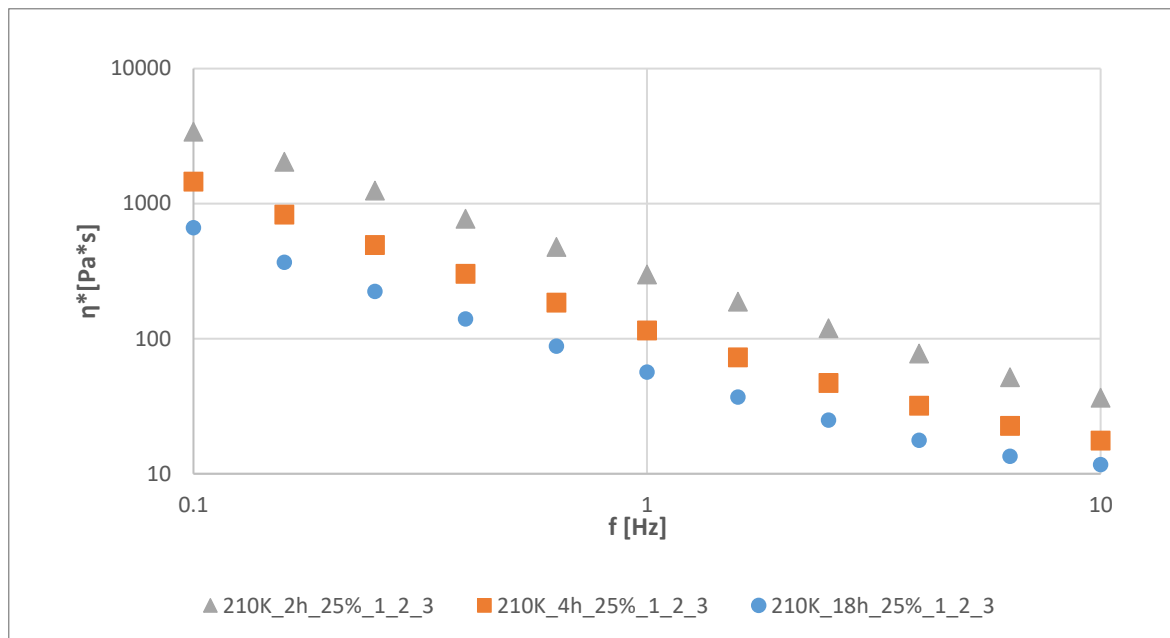
Výsledkem bylo ztuhnutí dvou gelů, konkrétně želatina 210 kDa 25 % v poměru 1:1 s 2 % roztokem oxidovaného dextranu a 210 kDa 35 % v poměru 1:1 s 2 % roztokem oxidovaného dextranu. Tyto směsi byly použity pro další experimenty.

5.5 Postup přípravy hydrogelů pro tisk

Postup přípravy byl téměř analogický jako v kapitole (6.2 Postup přípravy hydrogelů), s jediným rozdílem, že po přidání čpavku byl roztok natáhnut do stříkačky, kde bylo provedeno zbavení bublinek vzduchu a následně se nechal ztuhnout. Takto připravený materiál byl použitelný k tisku. Byl testován vliv různé teploty a času rozpouštění na tisknutelnost materiálů. Pro obě koncentrace probíhalo rozpouštění při teplotě 35°C po dobu 18 hodin, po dobu čtyř hodin při teplotě 45°C a na závěr po dobu dvou hodin při teplotě 55°C.

6 VÝSLEDKY

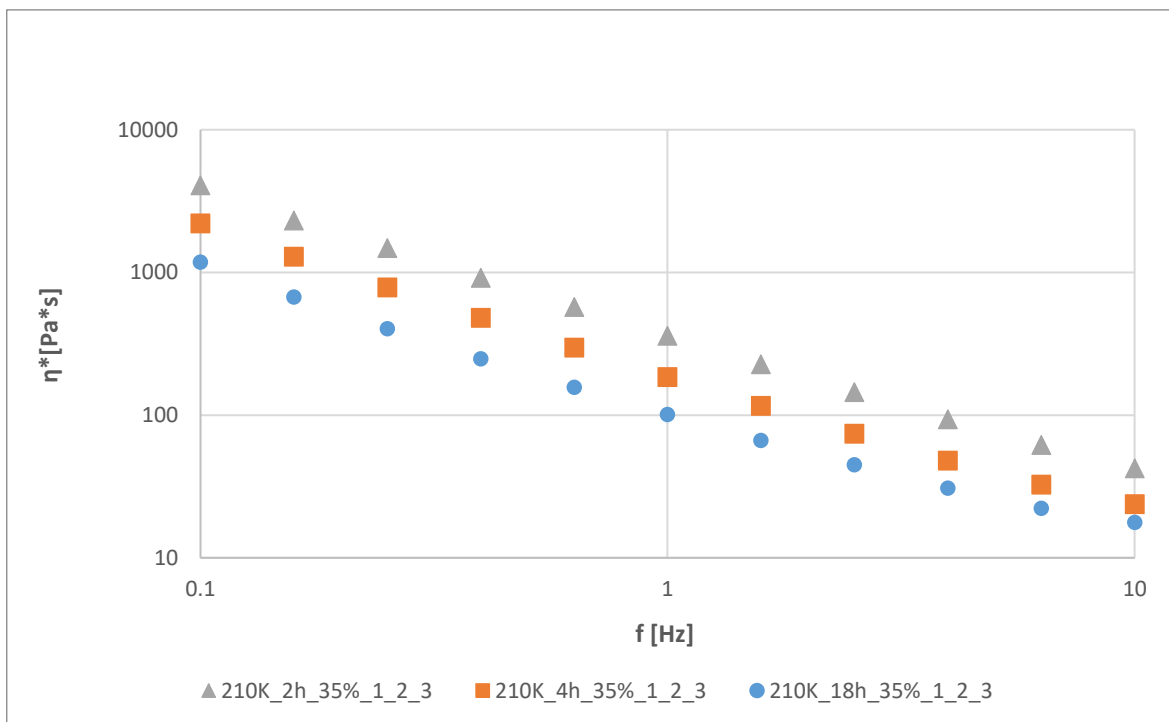
6.1 Měření tokové křivky



Obr. 10: Závislost viskozity (průměr ze tří vzorků) při stejné frekvenci pro koncentraci 25 % (doba rozpouštění 2,4,18 hod.)

V tomto případě se jedná o závislost viskozity na frekvenci při koncentraci hydrogelů 25 % viz Obr. 10.

Z Obr. 10 můžeme vidět, že v porovnání 210 K_18h_25 % ku 210 K_2h_25 %, je viskozita v případě 210 K_2h_25 % téměř trojnásobně větší než u hydrogelů 210 K_18h_25 %. V případě 210 K_2h_25 % ku 210 K_4h_25 %, je viskozita po dobu rozpouštění 2 hodin dvojnásobně nižší než u doby rozpouštění 4 hodiny.



Obr. 11: Závislost viskozity (průměr ze tří vzorků) při stejné frekvenci pro koncentraci 35 % (doba rozpouštění 2,4,18 hod.)

V tomto případě se jedná o závislost viskozity na frekvenci při koncentraci hydrogelů 35 % viz Obr. 11.

V případě Obr. 11, když vezmeme porovnání 210 K_2h_35 % ku 210 K_18h_35 %, je viskozita v čase rozpouštění 2 hodiny skoro trojnásobně nižší než u 210 K_18h_35 %. U hydrogelů 210 K_4h_35 % ku 210 K_18h_35 %, je viskozita dvojnásobně vyšší než u 210 K_18h_35 %.

6.2 Výsledné výtisky mřížek

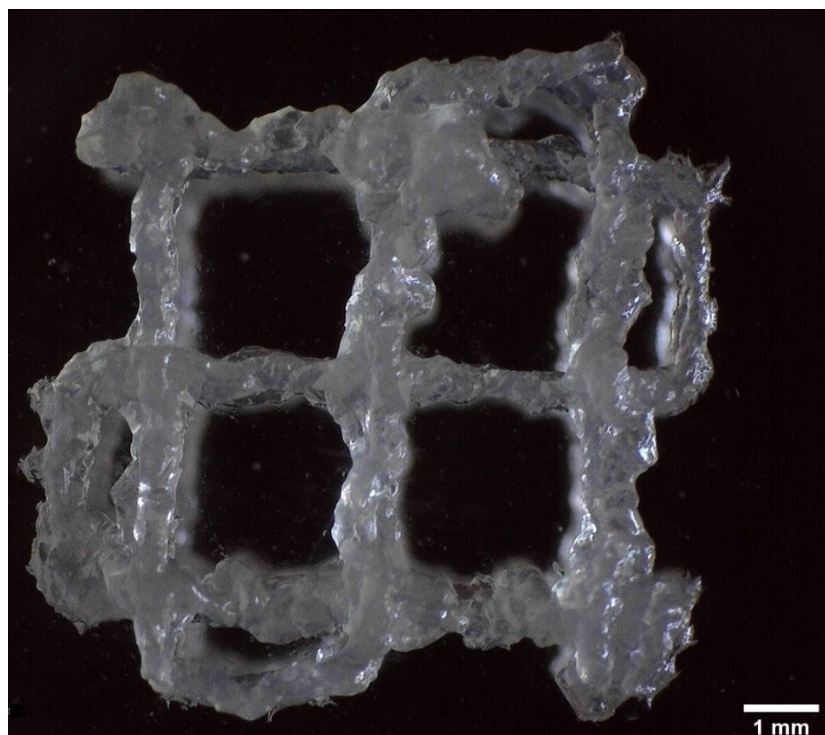
6.2.1 Parametry tisku

Před zahájením tisku bylo provedeno nastavení parametrů tisku pro každý materiál, ze kterého se podařilo vytisknout mřížku, viz tabulka 3.

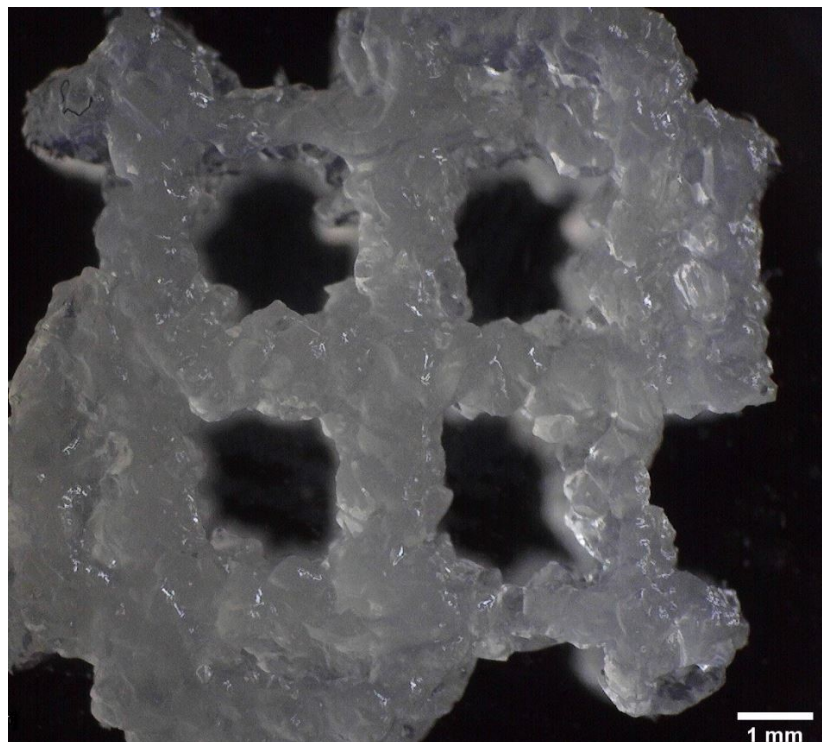
Tabulka 3: Nastavené parametry před zahájením tisku pro uvedené vytisknuté mřížky

	Teplota [°C]	Rychlost vytlačování [$\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$]	Retract volume [μl]	Rychlost pohybu hlavy [$\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$]
Jehla 210 K 35 %	30	2,22	9,30	2,00
Jehla 210 K 25 %	27,6	1,69	9,60	2,00
Špička 210 K 35 %	30,5	1,75	9,30	2,00
Špička 210 K 25 %	28,6	1,45	9,60	2,00

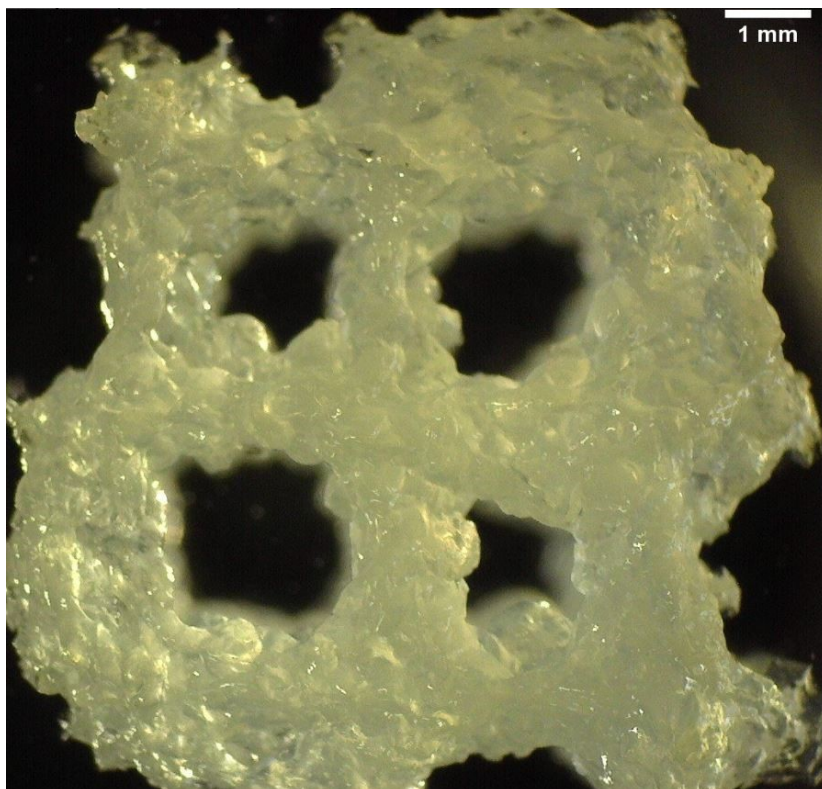
Byl proveden tisk na biotiskárně značky Cellink BioX, kde se podařilo vytisknout hydrogel popsáný výše. Tisklo se za daných parametrů tisku viz kapitola (6.2.1 Parametry tisku). K tisku byla využita jehla o vnitřním průměru 0,41 mm a špička o vnitřním průměru 0,41 mm.



Obr. 12: Výsledný výtisk mřížky na tiskárně Cellink BioX za pomoci jehly 210 kDa 35 %



Obr. 13: Výsledný výtisk mřížky na tiskárně Cellink BioX za pomoci jehly 210 kDa 25 %



Obr. 14: Výsledný výtisk mřížky na tiskárně Cellink BioX za pomoci špičky 210 kDa 25 %



Obr. 15: Výsledný výtisk mřížky na tiskárně Cellink BioX za pomoci špičky 210 kDa 35 %

6.2.2 Určení parametrů vytisknutých mřížek

Byl proveden výpočet parametru tisku P_r pro každou vytisknutou mřížku[48]. Stanovení obvodu (l) a obsahu (a) bylo provedeno v programu ImageJ. Stanovoval se každý pór vytvořený tiskem mřížky. Následně byl proveden výpočet podle vzorce:

$$P_r = \frac{l^2}{16 \cdot a}$$

Vzorový výpočet P_r levého horního póru pro jehlu 210 kDa 35 % po dobu rozpouštění 18 hodin.

$$P_r = \frac{9,217^2}{16 \cdot 5,892} \cdot 10^{-3} = 0,90$$

Tabulka 4: Naměřené hodnoty obsahu a obvodu pórů pro mřížku jehla 210 kDa 35 % doba rozpouštění 18 hodin

	Obsah	Obvod	P_r [1]
Levý horní pór	5,892	9,217	0,90
Levý dolní pór	4,983	8,850	0,98
Pravý horní pór	4,816	9,542	1,18
Pravý dolní pór	5,692	9,100	0,91
Průměr			1,00
Směrodatná odychlka			0,13

Tabulka 5: Naměřené hodnoty obsahu a obvodu pórů pro mřížku jehla 210 kDa 35 % doba rozpouštění 18 hodin

	Obsah	Obvod	P_r [1]
Levý horní pór	6,380	9,698	0,92
Levý dolní pór	5,653	9,134	0,92
Pravý horní pór	2,896	6,973	1,05
Pravý dolní pór	5,449	9,115	0,95
Průměr			1,00
Směrodatná odchylka			0,06

Tabulka 6: Naměřené hodnoty obsahu a obvodu pórů pro mřížku jehla 210 kDa 25 % doba rozpouštění 18 hodin

	Obsah	Obvod	P_r [1]
Levý horní pór	4,559	8,519	0,99
Levý dolní pór	3,695	7,629	0,98
Pravý horní pór	4,086	8,540	1,12
Pravý dolní pór	3,818	8,239	1,11
Průměr			1,05
Směrodatná odchylka			0,08

Tabulka 7: Naměřené hodnoty obsahu a obvodu pórů pro mřížku špička 210 kDa 25 % doba rozpouštění 18 hodin

	Obsah	Obvod	P_r [1]
Levý horní pór	2,219	5,691	0,91
Levý dolní pór	4,447	7,963	0,89
Pravý horní pór	3,935	7,568	0,91
Pravý dolní pór	2,018	5,679	1,00
Průměr			0,93
Směrodatná odchylka			0,05

Tabulka 8: Naměřené hodnoty obsahu a obvodu pórů pro mřížku špička 210 kDa 35 % doba rozpouštění 18 hodin

	Obsah	Obvod	P_r [1]
Levý horní pór	2,421	8,575	1,90
Levý dolní pór	2,086	6,257	1,17
Pravý horní pór	2,882	7,301	1,16
Pravý dolní pór	3,144	7,315	1,06
Průměr			1,4
Směrodatná odchylka			0,4

Tabulka 9: Naměřené hodnoty obsahu a obvodu pórů pro mřížku špička 210 kDa 35 %
doba rozpouštění 18 hodin

	Obsah	Obvod	Pr [1]
Levý horní pór	2,026	6,314	1,23
Levý dolní pór	2,070	7,152	1,54
Pravý horní pór	1,999	7,275	1,65
Pravý dolní pór	2,473	7,161	1,30
Průměr			1,5
Směrodatná odchylka			0,3

6.3 Vyhodnocení narůstání za hubicí

Vyhodnocení narůstání za hubicí bylo provedeno pro materiály, ze kterých se podařilo vytisknout mřížku. Stanovení bylo uskutečněno v programu ImageJ. Pro každou koncentraci bylo natočeno krátké video, kde se souvisle vytlačoval materiál z tiskové hlavy pomocí jehly, nebo špičky. Následně bylo vytvořeno deset snímků pro každou koncentraci a probíhalo samotné vyhodnocení, viz (Obr. 16: Názorná ukázka stanovení narůstání za hubicí).



Obr. 16: Názorná ukázka stanovení narůstání za hubicí 210 kDa 25 %

6.3.1 Postup vyhodnocení v programu ImageJ

Ve vzdálenosti 0,5 mm od ústí jehly (viz Obr. 16) byla změřena šířka vytlačovaného hydrogelu. Tímto způsobem probíhalo vyhodnocení pro každý snímek a každou koncentraci, s jediným rozdílem, kdy v případě špičky byl vnější průměr 0,81 mm.

Vzorový výpočet narůstání za hubicí (D_s)

$$D_s = \frac{D_{sk}}{D_{o\check{c}}} = \frac{0,54}{0,41} = 1,32$$

D_s = Narůstání za hubicí

D_{sk} = měřená šířka

$D_{o\check{c}}$ = nominální šířka (jehly/špičky) = 0,41 mm

Tabulka 10: Naměřené a vypočtené hodnoty pro jehlu 210 kDa 25 % doba rozpouštění 18 hodin

	D_{sk} [mm]	D_s
1	0,54	1,32
2	0,56	1,37
3	0,61	1,49
4	0,4	0,98
5	0,53	1,29
6	0,4	0,98
7	0,43	1,05
8	0,4	0,98
9	0,53	1,29
10	0,4	0,98
	Průměr	1,18
	Směrodatná odchylka	0,2

Tabulka 11: Naměřené a vypočtené hodnoty pro jehlu 210 kDa 35 % doba rozpouštění 18 hodin

	D_{sk} [mm]	D_s
1	0,61	1,49
2	0,62	1,51
3	0,68	1,66
4	0,54	1,32
5	0,58	1,41
6	0,53	1,29
7	0,45	1,10
8	0,54	1,32
9	0,58	1,41
10	0,6	1,46
	Průměr	1,4
	Směrodatná odchylka	0,16

Tabulka 12: Naměřené a vypočtené hodnoty pro špičku 210 kDa 25 % doba rozpouštění 18 hodin

	D_{sk} [mm]	D_s
1	0,63	1,54
2	0,7	1,71
3	0,74	1,80
4	0,66	1,61
5	0,63	1,54
6	0,68	1,66
7	0,85	2,07
8	1,55	3,78
9	0,71	1,73
10	0,54	1,32
	Průměr	1,9
	Směrodatná odchylka	0,7

Tabulka 13: Naměřené a vypočtené hodnoty pro špičku 210 kDa 35 % doba rozpouštění
18 hodin

	D_{sk} [mm]	D_s
1	0,73	1,78
2	0,81	1,98
3	0,75	1,83
4	1,39	3,39
5	1,26	3,07
6	0,77	1,88
7	1,45	3,54
8	1,1	2,68
9	0,99	2,41
10	0,71	1,73
	Průměr	2,5
	Směrodatná odchylka	0,7

7 DISKUZE

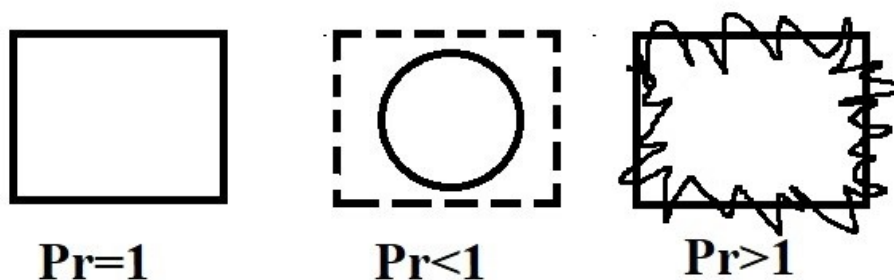
7.1 Tokové křivky

Z porovnání výsledků při koncentraci 25 % a 35 % je patrné, že vyšší koncentrace způsobuje nárůst viskozity, což není překvapivý výsledek vzhledem k literatuře. [49]

Z výsledků lze říct, že doba rozpouštění hydrolyzátů želatiny má vliv na jejich výslednou viskozitu a to takový, že čím déle probíhá rozpouštění tím nižší viskozity dosáhneme a naopak. Tento trend lze pozorovat pro koncentraci 25 % i 35 %. Lze usuzovat, že toto chování je dáno pomalým uvolňováním fyzikálních vazeb mezi molekulami želatiny. Na základě měření bylo zjištěno, že dostatečný čas rozpouštění nelze snadno nahradit zvýšenou teplotou. Použití delšího času rozpouštění nebylo využito při vyšších teplotách v důsledku možné degradace materiálu.

7.2 Extruzní 3D tisk

Vyhodnocení pórů mřížek bylo provedeno na základě metody, kterou nastínil Ouyang.[48] V tomto případě byl vyhodnocen parametr tisknutelnosti, P_r viz kapitola 6.2.1 Parametry tisku.



Obr. 17: Ukázka vyhodnocení výsledků P_r na daný tvar pórů

V případě Obr.12 je výsledný výtisk mřížky téměř dokonalý. Při nanášení vrstev nedocházelo k výraznému propadnutí spodních vrstev. V tomto případě se $P_r = 1$. Na základě výsledku rovnajícího se jedné můžeme tvrdit, že se s tímto hydrogelem za definovaných podmínek podařilo vytisknout ideální čtvercová mřížka. Hydrogel měl ideální podmínky gelovatění, tzn. došlo k vytlačování hladkých a rovnoměrných vláken.

Z Obr. 13 můžeme vidět, že nanášení vrstev není tak plynulé jako v případě Obr. 12, což může být přisuzováno nižší koncentraci, respektive nižší viskozitě. To vedlo k nutnosti nastavit vyšší rychlost vytlačování. V důsledku silné nanesené vrstvy hydrogelu je viditelné mírné zborcení spodní vrstvy. Vzhledem k výsledku $P_r > 1,05$ měl hydrogel vyšší stupeň gelace, tzn. dochází k lámání a tažení hydrogelu důsledkem čehož je nepravidelnost vláken.

Z Obr. 14 lze vidět, že nanesené vrstvy nejsou rovnoměrně navázané na sobě, což je způsobeno nanesením velké vrstvy, kde v případě špičky docházelo k prudkému vytlačování hydrogelu, který se nedal tak dobře redukovat jako v případě tisku s jehlou. Výsledek $P_r < 0,93$, na základě toho lze usoudit, že stupeň gelovatění byl nižší. V důsledku nižšího stupně docházelo na špičce k tvorbě kapiček, což mohlo přispět k vytvoření velké vrstvy.

Při pohledu na Obr. 15 můžeme vidět, že v případě vytlačování špičkou dochází ještě k většímu vytlačování hydrogelu, než u koncentrace 25 %. Takto mohutné nanesení hydrogelu způsobilo propadnutí spodních vrstev, čímž došlo ke snížení velikosti pórů. Výsledek $P_r > 1,4$ z čehož vyplývá, že stupeň gelace byl v tomto případě vyšší.

Dále je potřeba upozornit na omezení hodnocení tisknutelnosti podle Ouyang a kol.[48]. To spočívá především v tom, že tato studie byla provedena na fyzikálním hydrogelu a její závěry proto nemusí být zcela relevantní v chemicky síťovaném systému. Další nevýhodou je fakt, že postup vyhodnocuje pouze tři stavy gelu vzhledem k výsledkům měření – nedostatečná gelace, ideální gelace a nadměrná gelace. Při použití různých geometrií tiskové hlavy je však potřeba přihlídnout i k průběhu smykového namáhání. Z toho důvodu byl parametr P_r doplněn o měření narůstání za hubicí.

7.3 Narůstání za hubicí

V porovnání naměřených výsledků pro vytlačování jehlou oproti špičce lze říct, že v případě použití jehly vykazuje hydrogel menší nárůst za hubicí. Jedním z hlavních faktorů, který má vliv na vyšší nárůst za hubicí je jednoznačně menší prostor pro relaxaci hydrogelu v případě použití špičky. V případě špičky smykové namáhání hydrogelu neustále roste, kdežto v případě jehly má hydrogel větší možnost relaxace díky konstantnímu průběhu napětí, což pravděpodobně způsobuje jeho nižší vykázání nárustu za hubicí. Přestože použití jehly vede k lepší přesnosti výtisku, zároveň dochází k vyššímu smykové napětí na stěnách, což zvyšuje nebezpečí k porušení buněk v případném 3D biotisku.

ZÁVĚR

Pro tuto studii byly k dispozici tři typy kuřecích želatin lišících se molekulovou hmotností. Z experimentu bylo zjištěno, že gelaci umožnila vyšší molekulová hmotnost. Navíc bylo nutno použít relativně vysokou koncentraci želatiny (25 %, 35 %), a nejvyšší z testovaných objemů síťovacího činidla, tj. roztoku oxidovaného dextranu. Úspěšně vytvořené hydrogely byly dále charakterizovány z pohledu aplikace v extruzním 3D tisku.

Základní charakteristikou materiálu pro extruzní tisk je jeho toková křivka. Při vyhodnocení tokových křivek bylo zjištěno, že čas rozpouštění želatiny má vliv na viskozitu výsledných hydrogelů. Čím delší čas rozpouštění želatiny je, tím menší je viskozita gelu. Zvýšení teploty při kratším čase rozpouštění nevede ke stejně výraznému snížení viskozity. Viskozitní křivky posloužily k výběru vhodných materiálů pro tisk.

Vybrané hydrogely byly použity k extruznímu 3D tisku mřížek, a byla vyhodnocena přesnost tisku, a to pomocí parametru tisknutelnosti P_r . Nejvyšší přesnost tisku vykazoval hydrogel obsahující želatinu o molekulové hmotnosti 210 kDa 35 %, vytlačování probíhalo za pomoci jehly. V tomto případě vyšla průměrná hodnota $P_r=1$, což značí ideální stupeň gelace. Parametr P_r má jisté nedostatky, proto bylo navíc vyhodnoceno narůstání za hubicí. Bylo prokázáno, že v případě vytlačování hydrogelu pomocí jehly nastává menší narůstání za hubicí než v případě vytlačování za pomoci špičky. Předpokládanou příčinou je, že v případě jehly má hydrogel větší možnost relaxace než v případě špičky.

V této práci se podařilo úspěšně vytisknout hydrogely skládající se z kuřecí želatiny, které byly síťované oxidovaným dextranem pomocí Schiffových bází. Vzhledem k přírodnímu původu materiálů je pravděpodobné, že by se v budoucnu daly využít pro tisk s živými buňkami, což by rozšířilo možnosti biotisku. Proto lze na tuto práci navázat dalším výzkumem v této oblasti.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] “3D tisk (technologie, materiály a použití) – lukashavlina.cz.” <https://lukashavlina.cz/3d-tisk-uvod/> (accessed Jan. 25, 2021).
- [2] E. Kluska, P. Gruda, and N. Majca-Nowak, “The Accuracy and the Printing Resolution Comparison of Different 3D Printing Technologies,” *Trans. Aerosp. Res.*, vol. 2018, no. 3, pp. 69–86, 2018, doi: 10.2478/tar-2018-0023.
- [3] T. Coviello, P. Matricardi, C. Marianecci, and F. Alhaique, “Polysaccharide hydrogels for modified release formulations,” *J. Control. Release*, vol. 119, no. 1, pp. 5–24, 2007, doi: 10.1016/j.jconrel.2007.01.004.
- [4] C. Lee Ventola, “Medical applications for 3D printing: Current and projected uses,” *P T*, vol. 39, no. 10, pp. 704–711, 2014.
- [5] T. D. Ngo, A. Kashani, G. Imbalzano, K. T. Q. Nguyen, and D. Hui, “Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges,” *Compos. Part B Eng.*, vol. 143, no. December 2017, pp. 172–196, 2018, doi: 10.1016/j.compositesb.2018.02.012.
- [6] “OFRII.com - 3D tisk - 3D scan - 3D model.” http://3d.ofrii.com/index.php?id=3d_technologie (accessed May 20, 2021).
- [7] J. Šafka, F. Veselka, M. Lachman, and M. Ackermann, “Rapid prototyping technology for special pressure vessels,” *Mater. Sci. Forum*, vol. 919, pp. 222–229, 2018, doi: 10.4028/www.scientific.net/MSF.919.222.
- [8] L. N. Y. Cao and D. Y. H. Pui, “Real-time measurements of the particle geometric surface area by the weighted-sum method on a university campus,” *Aerosol Air Qual. Res.*, vol. 20, no. 7, pp. 1569–1581, 2020, doi: 10.4209/aaqr.2019.12.0621.
- [9] H. Lee, C. H. J. Lim, M. J. Low, N. Tham, V. M. Murukeshan, and Y. J. Kim, “Lasers in additive manufacturing: A review,” *Int. J. Precis. Eng. Manuf. - Green Technol.*, vol. 4, no. 3, pp. 307–322, 2017, doi: 10.1007/s40684-017-0037-7.
- [10] L. G. Zhang, J. P. Fisher, and K. W. Leong, “3.2 Definition and Principles of 3D Bioprinting,” *3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Elsevier, p. 58, 2015.
- [11] A. Parak, P. Pradeep, L. C. du Toit, P. Kumar, Y. E. Choonara, and V. Pillay,

- “Functionalizing bioinks for 3D bioprinting applications,” *Drug Discov. Today*, vol. 24, no. 1, pp. 198–205, 2019, doi: 10.1016/j.drudis.2018.09.012.
- [12] F. R. . Rayleigh, “On the Instability of Jets,” *Proc. London Math. Soc.*, vol. 14, no. June 1873, pp. 4–13, 1878.
- [13] X. Li *et al.*, “Inkjet Bioprinting of Biomaterials,” *Chem. Rev.*, vol. 120, no. 19, pp. 10793–10833, 2020, doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00008.
- [14] R. Suntornnond, J. An, and C. K. Chua, “Bioprinting of Thermoresponsive Hydrogels for Next Generation Tissue Engineering: A Review,” *Macromolecular Materials and Engineering*, vol. 302, no. 1. 2017, doi: 10.1002/mame.201600266.
- [15] Y. J. Seol, H. W. Kang, S. J. Lee, A. Atala, and J. J. Yoo, “Bioprinting technology and its applications,” *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.*, vol. 46, no. 3, pp. 342–348, 2014, doi: 10.1093/ejcts/ezu148.
- [16] S. C. Ligon, R. Liska, J. Stampfl, M. Gurr, and R. Mülhaupt, “Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing,” *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 15, pp. 10212–10290, 2017, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00074.
- [17] L. Ning and X. Chen, “A brief review of extrusion-based tissue scaffold bio-printing,” *Biotechnology Journal*, vol. 12, no. 8. 2017, doi: 10.1002/biot.201600671.
- [18] S. Derakhshanfar, R. Mbeleck, K. Xu, X. Zhang, W. Zhong, and M. Xing, “3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances,” *Bioact. Mater.*, vol. 3, no. 2, pp. 144–156, 2018, doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.11.008.
- [19] A. Atala and J. J. Yoo, *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*. 2015.
- [20] I. T. Ozbolat and M. Hospodiuk, “Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting,” *Biomaterials*, vol. 76, pp. 321–343, 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.076.
- [21] Richards *et al.*, “Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectiv,” *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 5, pp. 139–148, 2018, doi: 10.1016/j.apmt.2019.100479.Hydrogel-based.
- [22] B. Lemons, A. Ratner, F. Hoffman, and J. Schoen, *Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine*, 1 st. San Diego: Academic Press, 1997.

- [23] E. M. Ahmed, "Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review," *J. Adv. Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 105–121, 2015, doi: 10.1016/j.jare.2013.07.006.
- [24] J. Xu, Y. Liu, and S. hui Hsu, "Hydrogels based on schiff base linkages for biomedical applications," *Molecules*, vol. 24, no. 16, pp. 1–21, 2019, doi: 10.3390/molecules24163005.
- [25] J. Maia, R. A. Carvalho, J. F. J. Coelho, P. N. Simões, and M. H. Gil, "Insight on the periodate oxidation of dextran and its structural vicissitudes," *Polymer (Guildf)*, vol. 52, no. 2, pp. 258–265, 2011, doi: 10.1016/j.polymer.2010.11.058.
- [26] A. Ammar and M. Sherif, "Production of dextrans and their applications in human health and nutrition– Review," *Eur. Acad. Res.*, 2016.
- [27] "Reaction with Primary Amines to form Imines - Chemistry LibreTexts." [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Organic_Chemistry\)/Aldehydes_and_Ketones/Reactivity_of_Aldehydes_and_Ketones/Reaction_with_Primary_Amines_to_form_Imines](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Aldehydes_and_Ketones/Reactivity_of_Aldehydes_and_Ketones/Reaction_with_Primary_Amines_to_form_Imines) (accessed May 20, 2021).
- [28] A. K. Yu Shrike Zhang¹, "Advances in Engineering Hydrogels," *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 3, pp. 139–148, 2019, doi: 10.1126/science.aaf3627.Advances.
- [29] N. A. Peppas, J. Z. Hilt, A. Khademhosseini, and R. Langer, "Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology," *Adv. Mater.*, vol. 18, no. 11, pp. 1345–1360, 2006, doi: 10.1002/adma.200501612.
- [30] A. Basu, K. R. Kunduru, S. Doppalapudi, A. J. Domb, and W. Khan, "Poly(lactic acid) based hydrogels," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 107, pp. 192–205, 2016, doi: 10.1016/j.addr.2016.07.004.
- [31] J. Lunt, "Large-scale production, properties and commercial applications of poly lactic acid polymers," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 59, no. 1–3, pp. 145–152, 1998, doi: 10.1016/s0141-3910(97)00148-1.
- [32] T. Casalini, F. Rossi, A. Castrovinci, and G. Perale, "A Perspective on Polylactic Acid-Based Polymers Use for Nanoparticles Synthesis and Applications," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, no. October, pp. 1–16, 2019, doi: 10.3389/fbioe.2019.00259.
- [33] Z. Bao, C. Xian, Q. Yuan, G. Liu, and J. Wu, "Natural Polymer-Based Hydrogels with Enhanced Mechanical Performances: Preparation, Structure, and Property," *Adv.*

- Healthc. Mater.*, vol. 8, no. 17, pp. 1–11, 2019, doi: 10.1002/adhm.201900670.
- [34] J. L. Drury, R. G. Dennis, and D. J. Mooney, “The tensile properties of alginate hydrogels,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 16, pp. 3187–3199, 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.10.002.
- [35] G. A. Di Lullo, S. M. Sweeney, J. Körkkö, L. Ala-Kokko, and J. D. San Antonio, “Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 6, pp. 4223–4231, 2002, doi: 10.1074/jbc.M110709200.
- [36] S. Dinescu, M. Albu Kaya, L. Chitoiu, S. Ignat, D. A. Kaya, and M. Costache, “Collagen-Based Hydrogels and Their Applications for Tissue Engineering and Regenerative Medicine,” no. January, pp. 1643–1664, 2019, doi: 10.1007/978-3-319-77830-3_54.
- [37] S. Petros, T. Tesfaye, and M. Ayele, “A Review on Gelatin Based Hydrogels for Medical Textile Applications,” *J. Eng.*, vol. 2020, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1155/2020/8866582.
- [38] P. Mokrejš, P. Mrázek, R. Gál, and J. Pavlačková, “Biotechnological preparation of gelatines from chicken feet,” *Polymers (Basel)*, vol. 11, no. 6, pp. 1–14, 2019, doi: 10.3390/POLYM11061060.
- [39] S. Kommareddy, D. B. Shenoy, and M. M. Amiji, “Gelatin Nanoparticles and Their Biofunctionalization,” *Nanotechnologies Life Sci.*, no. September, 2007, doi: 10.1002/9783527610419.ntls0011.
- [40] P. A. Janmey and M. Schliwa, “Quick guide Rheology,” *Curr. Biol.*, vol. 18, no. 15, pp. R639–R641, 2008.
- [41] “Jaký je rozdíl mezi dynamickou a kinematickou viskozitou?” <https://www.cscscientific.com/csc-scientific-blog/whats-the-difference-between-dynamic-and-kinematic-viscosity> (accessed May 10, 2021).
- [42] R. Holubová, “Základy Reologie a Reometrie Kapalin,” pp. 1–50, 2014.
- [43] “Rotační reometr - Istec CNR.” <https://www.istec.cnr.it/en/research/technological-laboratories/colloidal-property-laboratory-of-interface/rotational-rheometer/> (accessed May 10, 2021).

- [44] A. Hill, “Introducing rotational rheology and Kinexus,” *Malvern Panalytical*, vol. 2017, no. May, 2017.
- [45] P. C. Lodge, T.P., & Hiemenz, *Polymer Chemistry*, 2nd ed., vol. 6, no. 11. CRC Press, 2007.
- [46] X. Lan, A. Adesida, and Y. Boluk, “Addressing rheological issues at the micro-extrusion and layerstacking stages of collagen bioprinting,” *SSRN Electron. J.*, no. 10, pp. 1–91, 2019, doi: 10.2139/ssrn.3455072.
- [47] P. Mokrejš, R. Gál, and P. Mrázek, “Biotechnology-based production of food gelatine from poultry by-products,” CZ 307665, 2019.
- [48] L. Ouyang, R. Yao, Y. Zhao, and W. Sun, “Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells,” *Biofabrication*, vol. 8, no. 3, 2016, doi: 10.1088/1758-5090/8/3/035020.
- [49] GMIA, “Gelatin Handbook,” pp. 1–25, 2012.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABS	Akrylonitril-butadien-styren
CAD	Computer aided design
FDM	Fused deposition modeling
HP	Hewlett-Packard
PBS	Fosfátový pufr
PC-ABS	Polykarbonát/akrylonitril-butadien-styren
PEG	Polyethylenglykol
PLA	Kyselina polymléčná
SLA	Stereolitografie
SLS	Selektivní laserové sintrování
UV	Ultrafialové (záření)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Schéma fotopolymerace při SLA [6].....	12
Obr. 2: Schéma technologie FDM [8]	13
Obr. 3: Schématické znázornění možností tisku založené na vytlačování. A-pneumatické vytlačování, B-pístové, C-šroubové [18].....	16
Obr. 4: Struktura dextranu poukazující na glykosidické vazby v hlavním řetězci včetně možných menších větví řetězců [26]	20
Obr. 5: Popis tvorby iminů [27].....	20
Obr. 6: Chemická struktura želatiny[39]	22
Obr. 7: Průběh smykového napětí při použití jehly a špičky [46]	26
Obr. 8 Tiskárna Cellink BioX.....	30
Obr. 9 Reometr Kinexus [44]	31
Obr. 10: Závislost viskozity (průměr ze tří vzorků) při stejné frekvenci pro koncentraci 25 % (doba rozpouštění 2,4,18 hod.)	33
Obr. 11: Závislost viskozity (průměr ze tří vzorků) při stejné frekvenci pro koncentraci 35 % (doba rozpouštění 2,4,18 hod.)	34
Obr. 12: Výsledný výtisk mřížky na tiskárně Cellink BioX za pomoci jehly 210 kDa 35 %	35
Obr. 13: Výsledný výtisk mřížky na tiskárně Cellink BioX za pomoci jehly 210 kDa 25 %	36
Obr. 14: Výsledný výtisk mřížky na tiskárně Cellink BioX za pomoci špičky 210 kDa 25 %	36
Obr. 15: Výsledný výtisk mřížky na tiskárně Cellink BioX za pomoci špičky 210 kDa 35 %	37
Obr. 16: Názorná ukázka stanovení narůstání za hubicí 210 kDa 25 %.....	39
Obr. 17: Ukázka vyhodnocení výsledků P_r na daný tvar pórů.....	43

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Parametry měření tokových křivek.....	31
Tabulka 2: Složení reakčních směsí pro tvorbu hydrogelů.....	32
Tabulka 3: Nastavené parametry před zahájením tisku pro uvedené vytisknuté mřížky	34
Tabulka 4: Naměřené hodnoty obsahu a obvodu pórů pro mřížku jehla 210 kDa 35 % doba rozpouštění 18 hodin.....	37
Tabulka 5: Naměřené hodnoty obsahu a obvodu pórů pro mřížku jehla 210 kDa 35 % doba rozpouštění 18 hodin.....	38
Tabulka 6: Naměřené hodnoty obsahu a obvodu pórů pro mřížku jehla 210 kDa 25 % doba rozpouštění 18 hodin.....	38
Tabulka 7: Naměřené hodnoty obsahu a obvodu pórů pro mřížku špička 210 kDa 25 % doba rozpouštění 18 hodin.....	38
Tabulka 8: Naměřené hodnoty obsahu a obvodu pórů pro mřížku špička 210 kDa 35 % doba rozpouštění 18 hodin.....	38
Tabulka 9: Naměřené hodnoty obsahu a obvodu pórů pro mřížku špička 210 kDa 35 % doba rozpouštění 18 hodin.....	39
Tabulka 10: Naměřené a vypočtené hodnoty pro jehlu 210 kDa 25 % doba rozpouštění 18 hodin	40
Tabulka 11: Naměřené a vypočtené hodnoty pro jehlu 210 kDa 35 % doba rozpouštění 18 hodin	41
Tabulka 12: Naměřené a vypočtené hodnoty pro špičku 210 kDa 25 % doba rozpouštění 18 hodin	41
Tabulka 13: Naměřené a vypočtené hodnoty pro špičku 210 kDa 35 % doba rozpouštění 18 hodin	42