

Aditivní výroba s využitím biokompatibilních polymerních materiálů

Bc. Renata Pučalíková

Diplomová práce 2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Renata Pučalíková**
Osobní číslo: **T18252**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Materiálové inženýrství**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Aditivní výroba s využitím biokompatibilních polymerních materiálů**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte rešerši na téma možnosti využití aditivní výroby (3D tisku) pro tvorbu podpůrných struktur z biokompatibilních polymerních materiálů.
2. Seznamte se s obsluhou přístrojového vybavení pro tvorbu 3D struktur z různých materiálů (3D tiskárna) a pro hodnocení vstupních materiálů i hotových produktů (skenovací elektronový mikroskop, optický mikroskop, optický goniometr, tenziometr, viskozimetr).
3. Charakterizujte vybrané vstupní materiály z pohledu viskozity, povrchového napětí, atd.
4. S využitím 3D tiskárny se pokuste o přípravu prostorových struktur použitelných pro podpůrné konstrukce (scaffoldy).
5. Získané výsledky přehledně zpracujte a diskutujte v závěrečných kapitolách diplomové práce.

Forma zpracování diplomové práce: **Tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

1. Chua, C. K., Leong, K. F. & Lim, C. S. *Rapid Prototyping: Principles and Applications*. (WORLD SCIENTIFIC, 2003). doi:10.1142/5064.
2. Ngo, T. D., Kashani, A., Imbalzano, G., Nguyen, K. T. Q. & Hui, D. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. *Compos. Part B Eng.* 143, 172?196 (2018).
3. Hiemenz, P. C. *Principles of colloid and surface chemistry*. (M. Dekker, 1986).
4. Forgacs, G., Sun, W., *Biofabrication: Micro- and Nano-fabrication, Printing, Patterning and Assemblies*. Elsevier Science, (2013).
5. Pashley, R. M., Kafaman, M. E., *Applied Colloid and Surface Chemistry*. John Wiley and Sons, (2004).

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Petr Smolka, Ph.D.**
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **3. února 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Ve Zlíně dne 17. února 2020

Příjmení a jméno: Obor:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/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 mě požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/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.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ 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, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odporuje-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce pojednává o potenciálu technologie 3D tisku v tkáňovém inženýrství a zdravotním průmyslu. Teoretická část této práce seznamuje čtenáře s používanými technologiemi aditivní výroby a možnostmi jejich využití v biomedicině. Pozornost je věnována zejména technologii bio-tisku, používaným materiálům a konkrétním aplikacím. Experimentální část se zaměřuje na samotný proces tisku, výběr vhodného materiálu a jeho následnou charakterizaci. Práce se zaměřuje na materiály přírodního původu, jako jsou bílkoviny (kolagen, želatina) a polysacharidy (alginát sodný). Přírodní materiály se vyznačují dobrou bio-kompatibilitou, často nicméně disponují horšími mechanickými vlastnostmi. Část práce se věnuje procesu síťování daných materiálů, který může mechanické vlastnosti vylepšit.

Klíčová slova: aditivní výroba, bio-tisk, kolagen, želatina, alginát sodný

ABSTRACT

The diploma thesis deals with the technologies of 3D printing having the potential of practical application in tissue engineering and healthcare. Theoretical part of this work gives a brief overview of the additive manufacturing technologies and their applications in biomedicine. The focus here is on bio-printing, namely materials that are being used and application. Experimental part focuses on printing process, selection of suitable materials and their characterization. Natural polymers such as peptides (collagen, gelatine) and polysaccharides (sodium alginate) were studied. Natural materials are biocompatible but may have insufficient mechanical properties. Part of the work is devoted to the process of crosslinking the materials, thus improving its mechanical properties.

Keywords: Additive Manufacturing, Bio-printing, Collagen, Gelatine, Sodium Alginate

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce Ing. Petru Smolkovi, PhD. za odborné vedení a rady. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Lence Musilové, PhD. a Ing. Lence Vítkové za pomoc s realizací praktické části a odborné vedení.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	13
1 ADITIVNÍ VÝROBA	14
1.1 HISTORIE	14
1.2 PRINCIP	15
1.3 VÝHODY A NEVÝHODY	15
1.4 PŘEHLED TECHNIK	16
2 VYBRANÉ TECHNIKY ADITIVNÍ VÝROBY PRO MEDICÍNSKÉ APLIKACE	18
2.1 METODY ZALOŽENÉ NA VYTLAČOVÁNÍ	18
2.1.1 Fused deposition modeling FDM.....	18
2.1.2 Extrusion based printing EBB.....	21
2.2 METODY ASISTOVANÉ LASEROVOU TECHNOLOGIÍ.....	23
2.2.1 Stereolithografie SLA	23
2.2.2 Selective laser sintering SLS.....	25
2.2.3 Laser assisted bioprinting LAB.....	27
2.3 METODY ZALOŽENÉ NA TRYSKÁNÍ MATERIÁLU.....	30
2.3.1 Droplet based bioprinting DBB	30
3 BIO-TISK (BIO-PRINTING)	36
3.1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	36
3.2 CHARAKTERISTIKA BIO-TISKU.....	38
3.2.1 Principy bio-tisku	39
3.2.2 Proces bio-tisku	41
3.3 SOUČASNOST, VÝZVY A BUDOUCNOST BIO-TISKU	42
3.4 METODY BIO-TISKU.....	44

3.4.1	Srovnání metod	44
4	APLIKACE 3D TISKU VE ZDRAVOTNICTVÍ.....	46
4.1	MEDICÍNSKÉ APLIKACE KLASICKÉHO TISKU	46
4.2	APLIKACE BIO-TISKU.....	48
4.2.1	Regenerativní medicína.....	48
4.2.2	Biomedicínské (farmakologické) aplikace.....	51
5	MATERIÁLY PRO BIO-TISK	52
5.1	MATERIÁLY PRO BIO-TISK.....	52
5.1.1	Charakteristika a funkčnost materiálu vhodného pro bio-tisk	52
5.1.2	Bio-inkousty.....	53
5.1.3	Polymerní materiály a hydro-gely pro bio-tisk	54
5.1.4	Metody síťování hydro-gelu.....	60
II	PRAKTICKÁ ČÁST	63
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	64
6.1	CÍLE PRÁCE	64
6.2	ALGINÁTOVÉ HYDRO-GELY	64
6.2.1	Příprava vzorků	65
6.3	HYDRO-GELY KOLAGENU A ŽELATINY	66
6.3.1	Příprava vzorků	66
6.3.2	Proces 3D tisku	68
7	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	71
7.1	ALGINÁTOVÉ HYDRO-GELY	71
7.2	BIO-TISK.....	75
7.2.1	Charakterizace síťovacího činidla.....	76
7.2.2	Časy gelace.....	80
7.2.3	Bio-tisk hydro-gelu	84

7.2.4	SEM snímky.....	99
7.2.5	Swelling testy	113
ZÁVĚR	116

ÚVOD

Aditivní výroba představuje relativně jednoduchý způsob výroby vrstvením materiálu na sebe. Jedna z technologií aditivní výroby je 3D tisk. Jeho vznik je datován do roku 1984. Jednoduchost a finanční dostupnost umožňují jeho použití ve většině průmyslových odvětví, od designu k potravinářskému průmyslu, až po výrobní průmysl. Zdravotní průmysl je jedním z odvětví, jež technologii 3D tisku začíná nově využívat. V současné době se především zaměřuje na tisk kloubních a kostních náhrad, chirurgických nástrojů, výukových modelů a тренаžerů pro doktory (studenty). Avšak výše zmíněné aplikace jsou pouze počátkem cesty. Potenciál 3D tisku spočívá v přípravě umělých tkání a orgánů. Tkáňové inženýrství patří mezi obory věnující se této problematice. Někdo by si mohl položit otázku, z jakého důvodu je důležité tisknout orgány? Odpověď je jednoduchá, seznam čekatelů na transplantačních listinách je dlouhý. Naopak seznam dárců je příliš krátký. Budoucností medicíny je léčba pacienta na míru, s využitím jeho vlastních buněk. Rozsah použití tiskových metod se vztahuje u člověka na jedenáct orgánových soustav, dále na testování lékařských postupů a účinnosti léčiv. V budoucnu by mohlo dojít k zastavení provádění pokusů na zvířatech. V mnohých aspektech jsou vnímány jako nehumánní. Komerčně dostupné technologie bio-tisku tvoří výborný základ pro další rozvoj a uplatnění výše zmíněných vizí. Nicméně pokud se zamyslíme nad komplexností a složitostí lidské soustavy, je zřejmé, že uplynou dlouhá desetiletí, než budeme schopni vize bio-tisku naplnit. Současné technologie jsou neustále podrobovány dalšímu vývoji s cílem dosáhnout co nejvyšší kvality a přesnosti tisku. ¹⁻⁵

Smyslem této práce je seznámit s hlavními technologiemi 3D tisku, které nachází uplatnění ve zdravotním průmyslu a biomedicině. Další kapitoly jsou věnovány bio-tisku, konkrétním aplikacím a používaným materiálům. Experimentální část diplomové práce se věnuje výběru vhodného materiálu k tisku. Přírodní polymerní materiály nabízí mnoho výhod, jako jsou biologická rozložitelnost a biokompatibilita. V rámci práce se zaměřujeme na přírodní protein (kolagen, želatina) a polysacharid (alginát sodný). Přírodní polymery disponují výhodami, ale i nevýhodami. Jejich slabina je především nižší mechanická pevnost ve stavu hydro-gelu, která je zapříčiněna vysokým obsahem vody v jejich struktuře. Nezbytností je správné síťování hydro-gelu a výběr vhodného činidla. Hlavním cílem je připravit vhodný systém materiál a síťovací činidlo, jež budou vykazovat vhodné vlastnosti

pro přípravu scaffoldu. To jsou především viskozita systému, mechanické vlastnosti (schopnost držet tvar a strukturu), porozita systému a odolnost vůči difúzi rozpouštědla.¹⁻⁵

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ADITIVNÍ VÝROBA

Aditivní výroba, představuje část průmyslové revoluce Industry 4,0. Pod samotným názvem aditivní výroba (AM, additive manufacturing) si lze představit soubor výrobních technologií, založených na principu skládání vrstev materiálu na sebe. Tímto způsobem vzniká kompaktní objekt. Ve veřejném mínění je AM známá, díky technologii 3D tisku.¹⁻⁴ V současné době technologie RP proniká do všech odvětví, přesahuje větší možnosti než jen tvorby prototypu pro výrobu. Oblast použití zahrnuje automobilový průmysl, strojírenství, obranný průmysl, design a zdravotní průmysl. Mezi nejčastěji používané materiálu k tisku se řadí kovy, keramika, kompozitní materiály a polymery.³ Průmyslové odvětví aditivní výroby zažilo tak rychlou expanzi, že bylo nutné standardizovat používanou terminologii, aby nedocházelo ke dvojznačnému výkladu. Dle přesné definice ISO/ASTM 52900-15 je aditivní výroba oficiálně uznávaná definice pro všechny procesy, které jsou v protikladu k subtraktivním procesům. Pod pojmem subtraktivní technologie si můžeme představit procesy zpracování materiálu postupným ubíráním, jako je třeba obrábění.³⁻⁶

1.1 Historie

Počátky 3D tisku sahají do 90 let minulého století. Myšlenka je založená na skládání materiálu ve vrstvách na sebe, s cílem vytvořit výsledný objekt. Autorem konceptu této technologie je Charles Hull. Jednalo se konkrétně o stereolitografii (SLA), pracující s fotopolymery vytvrditelným za pomoci UV záření. Objev materiálu schopného fotopolymerizace a vytvoření tuhé vrstvy se datuje do roku 1984. Dva roky poté si SLA nechal Charles Hull patentovat.⁷⁻⁹ Ve stejném období byla vyvinuta a následně patentována metoda selektivního laserového slinování prášků (SLS, selective laser sintering). Princip byl navržen Carlem Deckardem. Další technika 3D tisku známá jako modelování depozicí taveniny (FDM, fused deposition modeling) přišla v roce 1989, díky vynálezci Scottu Crumpovi. Cca od roku 2000 došlo k výraznějšímu rozšíření 3D tisku mimo průmyslovou sféru mezi tzv. „hobby uživatele“, zejména díky nižším pořizovacím nákladům a tím i dostupnosti 3D tiskáren a tiskových materiálů. Zároveň se jedná o období počátku vývoje dalších 3D tiskáren a nových technik. Dalším významným milníkem je příchod projektu s názvem RepRap, tj. idea 3D tiskárny, která je složena z co možná největšího množství dílů vyrobených pomocí 3D tisku – „rodičovská“ tiskárna vyrábějící díly pro další tiskárny.

Uživatel si pouze zakupuje licenci.^{2,9,10} 3D tisk od počátku svého vzniku zásadně ovlivňuje mnoho oblastí v technických vědách, ale v současnosti se našly přístupy, jak rozšířit aplikaci 3D tisku jako takového i do zdravotnictví. Jedná se především o tisk biokompatibilních materiálů a bio 3D tisk. V roce 2003 byla navržena technika buněčného bio-tisku, která vycházela z tradiční dvoudimenzionální inkoustové techniky. První komerčně dostupná bio-tiskárna na trhu byla Organovo Novogen MMX Bioprinter™. Tato tiskárna funguje na principu extruze materiálu.^{7,8,11}

1.2 Princip

Jako již bylo zmíněno, výroba probíhá po tenkých vrstvách (15 až 500 μm), které jsou tvarovány v rovině (x, y). Třetí rozměr (z) vzniká skládáním materiálu na sebe, proces výroby se odehrává zdola nahoru. Je nutno podotknout, že z-souřadnice není tvořena souvislou vrstvou, výběr vhodného typu materiálu, zajišťuje správnou adhezi vrstev. Aditivní výroba lze rozdělit do několika kroků, které následují po sobě. První z nich je vytvoření modelu pomocí software CAD (computer aided design). Následuje vytvoření algoritmu tisku za pomoci sliceru. Výsledkem je soubor ve formátu g-kódu, který se pošle do tiskárny. Princip bude důkladněji popsán v kapitole věnující se bio-tisku.^{1,2,12}

1.3 Výhody a nevýhody

Technologie aditivní výroby umožňuje vytvářet složité geometrie bez potřeby rozsáhlých a složitých výrobních systémů. Mezi přednostní výhody se řadí přesnost a reprodukovatelnost. Eliminace množství vzniklého odpadu při výrobě, v některých případech může dojít ke snížení odpadu až o 75 %. Za pomoci technologie AM je možné vytvořit odlehčenou, a přesto velmi stabilní konstrukci splňující požadovanou funkčnost. Samotný proces výroby je jednoduchý, nenáročný na obsluhu. Aditivní výroba má převážně uplatnění v malosériových procesech, kde dochází k výrazné úspoře finančních nákladů spojené s nákupem drahých nástrojů a forem. Tato technologie má rozsáhlou oblast použití od výroby prototypu pro výrobu, až k přípravě zdravotních potřeb.^{2,4,13}

Nevýhody aditivní výroby spočívají v rychlosti výroby produktu v porovnání s konvenčními metodami, na základě toho je jeho uplatnění převážně v tvorbě prototypů a malosériových výrobcích. Další problém 3D tisku je snížená adheze mezi vrstvami ve směru osy z, jež není spojitý. To zhoršuje mechanické vlastnosti výrobku, přítomností

reziduálních napětí. Přesnost výrobku je dána nastavenými parametry, jako je tloušťka vrstvy a kvalitou 3D tiskárny. ^{2,5}

1.4 Přehled technik

V průběhu několika let zažilo toto odvětví rychlou expanzi ve vývoji, je známo mnoho desítek komerčních systémů AM. Ty jsou rozděleny do sedmi kategorií dle procesu výroby a normy upravující terminologii ISO/ASTM 52900-15. ^{2,3,14}

- Tryskání pojiva (binder jetting):
 - 3D printing,
 - Ink-jetting,
 - S-print,
 - M-print.
- Řízená energetická depozice (direct energy deposition):
 - Direct metal deposition,
 - Laser deposition,
 - Laser consolidation,
 - Electron beam direct,
 - Melting.
- Vytlačování materiálu (material extrusion):
 - Fused deposition modeling,
 - Fused filament fabrication,
 - Robocasting.
- Tryskání materiálu (material jetting):
 - Polyjet,
 - Ink-jetting,
 - Termojet.
- Slinování prášků (powder bed fusion):

- Selective laser sintering,
 - Selective laser melting,
 - Electron beam melting.
- Listová laminace (sheet lamination):
 - Laminated object,
 - Ultrasonic consolidation,
 - Manufacture.
- Objemová foto-polymerizace (vat photopolymerization):
 - Stereolithography,
 - Digital light processing.²⁻⁴

2 VYBRANÉ TECHNIKY ADITIVNÍ VÝROBY PRO MEDICÍNSKÉ APLIKACE

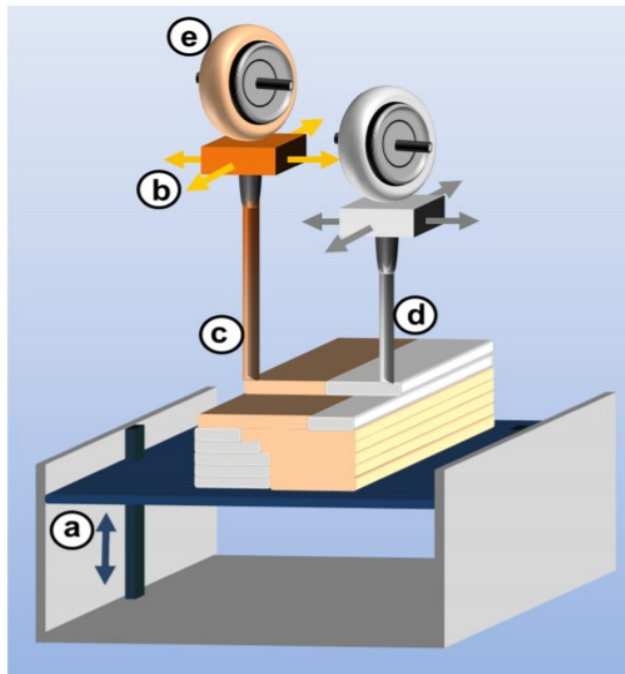
2.1 Metody založené na vytlačování

Materiálová extruze je známa pod názvem ME-AM (material extrusion additive manufacturing). Funguje na principu modelování 3D objektu z roztavené nebo změkčené vrstvy materiálu v režimu kontinuálního tisku. Mezi nejznámější techniku se řadí FDM (fused deposition modeling), která zpracovává především termoplasty a jejich kompozity. Scott Crump vymyslel v roce 1989 právě metodu FDM, jež dala vzniknout společnosti Stratasys Inc.¹⁵ Ve srovnání s jinými AM technologiemi je konstrukce zařízení pro vytlačování materiálu nenáročná a levná. Tyto technologie jsou vhodné pro kombinaci více druhů materiálu, za pomoci většího počtu vytlačovacích jednotek. Mezi další zástupce této skupiny patří extrusion based bioprinting (EBB), známá i jako mikroextruze. Tato technologie se neomezuje pouze na termoplastické materiály, ale zahrnuje i zpracování dalších typů materiálů jako jsou hydro-gely a pasty.^{2,4,16}

2.1.1 Fused deposition modeling FDM

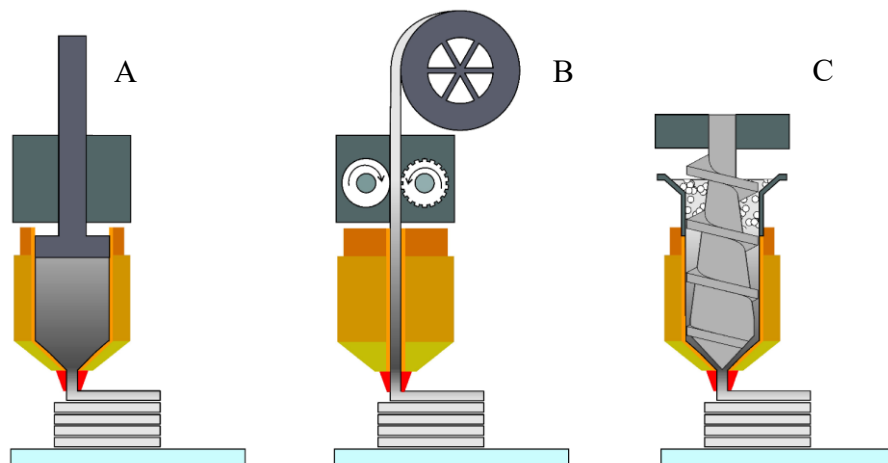
Jedná se o první nejrozšířenější aditivní technologii, jež zná každý z nás. Důvod tak rychlého rozšíření je nízká cena tiskáren. Princip FDM technologie spočívá v protažení materiálu přes vyhřívanou trysku. Zde dochází k zahřívání nad teplotou tání. Změkнутý materiál (viskoelastická tavenina) je potom tvárný a nanáší se po vrstvách na platformu. Jednotlivé vrstvy se skládají na sebe, okamžitě začínají tuhnout. Průměr vytlačeného vlákna odpovídá tloušťce trysky, zpravidla 0,4 mm. V případě tisku komplikovaných tvarů a převisů je nutné současně tisknout i podpěry (nosnou strukturu). Které se posléze odstraní vylámaním, popřípadě rozpuštěním.^{17,18} Pro úspěšný proces tisku je nutné správně nastavit parametry tisku jako je typ vlákna, teplota, rychlost, rastrovací úhel, orientace, CAD model a rovnováhu reologie polymerní taveniny. Na základě těchto parametrů je zpracovatelské okno termoplastů úzké. Zpracovávají se především termoplastické materiály s polymerními přísadami, jako jsou plniva, pigmenty, atd. Hlavní nevýhodou FDM technologie tvoří neschopnost udržet rovnoměrnou disperzi částic plniva ve vytlačovaném vlákne, možnost zpracovávat pouze určité druhy termoplastů.^{16,19}

FDM technologie umožňuje tvorbu složitých objektů s obtížnými tvary, vysokou mechanickou pevností, tepelnou odolností. ²⁰



Obr. 1. FDM tiskárna navržená Scottem Crumpem, skládající se z vertikálně posuvné platformy (a), temperované tiskové hlavy (b), tištěným objektem (c), druhou tiskovou hlavou zajišťující tisk podpěr z jiného materiálu (d), plnicí zónou materiálem. ¹⁶

Konstrukce tiskárny se skládá z rámu a držáků, extrudéru nebo jejich soustavy, vláknů, tiskové desky (platformy), systému řadičů a posuvných lišt, motoru zajišťující pohon, topných těles zajišťující ohřev. ¹⁷ Rozlišení tisku v komerčně dostupných tiskárnách se pohybuje okolo 100 μm . ²⁰ U FDM technologie se můžeme setkat se třemi typy vytlačování materiálu, a to jsou za pomoci pístu, šneku a struny. Na následujícím obrázku jsou jednotlivé typy technologií znázorněny. ⁴



Obr. 2. FDM typy technologie zpracování za pomoci pístu (a), filamentu (b) a šneku (c).⁴

2.1.1.1 Vytlačování materiálu za pomoci pístu

Za pomoci této technologie se zpracovávají profily (tyče) z kovového nebo keramického prášku, kde jako systém pojiv fungují termoplastické materiály s vysokým stupněm plnění. Tisk materiálu je možný v okamžiku plastikace polymerního pojiva. Měkký materiál se hromadí v zásobníku, posléze se nanáší po vrstvách na platformu za pomoci mechanicky pohonného systému (píst). Následuje proces slinování vytištěného objektu, s cílem získat lepší mechanické vlastnosti. Jako prášky se většinou používají nerezové oceli, karbidy, slitiny hliníku, mědi, nástrojové oceli, magnetické kovy.^{4,21}

2.1.1.2 Vytlačování materiálu za pomoci filamentu (vlákna)

Vytlačování vláken a následné modelování je komerčně známe jako technologie FDM. V současné době lze takový název použít i pro jiné technologie aditivní výroby, jež vytlačují materiál. Z tohoto důvodu byla zavedena alternativní terminologie, jako je výroba taveného vlákna (FFF, fused filament fabrication). Jedná se o jednu z nejrozšířenějších technologií vytlačování. Popularita roste s nízkou cenou tiskáren a jednoduchostí tisku. Princip technologie spočívá ve vytlačování vlákna přes trysku, které je následně i taveno nad teplotou tání. Změknuté vlákno se nanáší na platformu umístěné v komoře. Vyhřívání komory je temperováno pod teplotou tání materiálu, aby došlo k ztuhnutí vytisknuté vrstvy. Zároveň teplota musí být vyšší než v místnosti pro podporu přilnavosti jednotlivých tištěných vrstev. Tato technologie umožňuje tisk materiálu i bez vyhřívání komory a platformy.^{4,21}

Vlákno je v průběhu tisku taženo přes hnací systémy k trysce, kde je namáháno na tah, střih a třením. Vlákno musí vykazovat požadované mechanické vlastnosti, aby nedošlo k poškození kontinuálního vlákna v průběhu tisku. Musí být zároveň flexibilní pro možnost navíjení do cívek. Používané polymerní materiály: ABS, PLA, ASA, PA, PC a další.⁴

2.1.1.3 Vytlačování materiálu za pomoci šneku

Existují materiály, jež není možné zpracovávat výše uvedenými technologiemi. Nabízí se, technologie vytlačování za pomoci šneku, se schopností vyvinut vyšší smykové síly. Samotný materiál se zpracovává ve formě pelet. Rotační šnek usnadňuje pohyb materiálu v komoře, jeho tavení a zajišťuje homogenní tok. Zpracovávané materiály jsou ABS, PEKK, PEI, PPS.^{4,21}

2.1.2 Extrusion based printing EBB

Metoda pracuje v kontinuálním mechanismu, jinými slovy tiskne materiál spojitě v jednotlivých vrstvách. Díky zajištění neustálého toku materiálu, se nabízí potenciál pro použití v lidském měřítku. Extruzní tisk se používá pro zpracování termoplastických polymerů a kompozitních polymerů. Tiskárna se skládá ze zásobníku obsahující bio-inkoust, trysky zajišťující vytlačování materiálu a substrátu.^{7,22-26} Z hlediska viskozity tisknutelného bio-materiálu, má široký rozsah použití 30 až 6×10^7 mPas. Díky tomu je možno tisknout i vysoce viskózní bio-inkousty. Viskozita systému je hlavní klíčový parametru pro tisk. Bio-inkoust musí být v kapalně fázi, aby byl tisknutelný a omezil se nežádoucí jevy (ucpání trysky). V průběhu zpracování je možné viskozitu upravit, za pomoci změny teploty nebo smykového namáhání. Mezi velké výhody této metody, patří možnost tisku s vysokou hustotou buněk, která odpovídá přírodním tkáním. Rychlost zpracování v průběhu tisku je přijatelná, zároveň je zajištěna homogenní distribuce buněk.^{7,22-24,27}

Na druhou stranu 3D bio-tisk pomocí extruze nese i určité nevýhody. Jako je rozlišení (okolo 100 μm). Rozlišení by mohlo být vylepšeno zmenšením průměru trysky. Čímž dojde ke snížení životaschopnosti buněk. Použitím bio-inkoustu s vyšší viskozitou, dochází k nárůstu smykového namáhání v průběhu tisku. Vznikající vysoká smyková síla by mohla poškodit buňky. Dalším důležitým parametrem tisku je tlak v průběhu vytlačování. Použitím příliš vysokých hodnot tlaku, dochází ke zkreslování výsledků (porušení buněčných membrán). Životaschopnost buněk po tisku, závisí na použité viskozitě

bio-inkoust, koncentraci buněk a velikosti průměru trysky. Přibližně je v rozsahu 40 až 95 %. V případě použití vysokého tlaku a smykového namáhání, v průběhu tisku je platná nižší hranice.^{7,22-24}

Tato metoda se dělí dle typu dávkování do trysky na pneumatickou (využití vzduchové síly nebo čerpadla), další metody jsou založeny na použití mechanické síly pístovou a šnekovou (šroubovou).^{23,28}

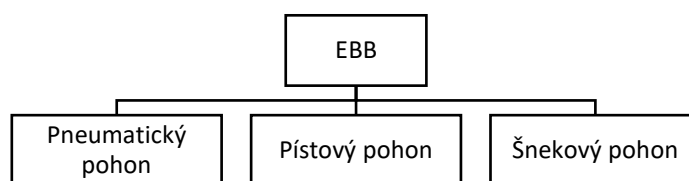
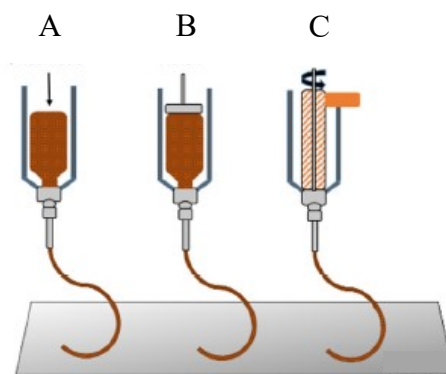


Diagram 1. Schéma metod provedení pro extruzní metodu bio-tisku (EBB).^{23,28}

U pneumatického dávkování materiálu hnací sílu tvoří tlak vzduchu. Metoda dávkování může být provedena s nebo bez konfigurace ventilu. V případě konfigurace pomocí ventilu, lze dosáhnout vyššího rozlišení. Vzduch zajišťující pohon samotného tisku je nutno sterilizovat pro minimalizaci kontaminaci vzorku. Mechanické dávkování materiálu svou povahou provedení, nabízí možnost tisku více viskózních systémů. Šnekové a pístové dávkování využívá vyšší smykové a normálové síly. Kvůli zvýšenému namáhání, dochází k poškození buněk. Na obrázku uvedeném níže můžeme graficky vidět jednotlivé metody dávkování.^{22,28,29}



Obr. 3. EBB s pohonem pneumatickým (a), pístovým (b), šnekovým (c).²³

2.2 Metody asistované laserovou technologií

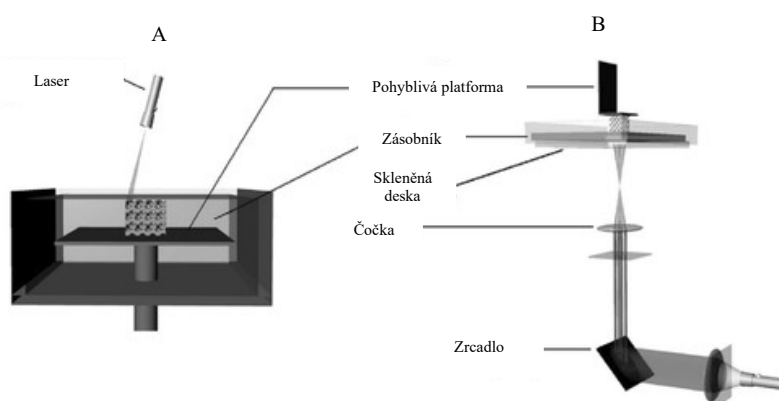
Mezi metody asistované laserovou technologií, se řadí slinování prášků – selektivní laserové slinování (selective laser sintering SLS). Dále technologie aditivní výroby využívající jevu foto-polymerizace – Stereolitografie (SLA). Technologie zastupující bio-tisk laser assisted bioprinting (LAB).^{2,22}

2.2.1 Stereolithografie SLA

Stereolitografie je metoda aditivní výroby využívající jevu foto-polymerizace. Na základě některých publikací se řadí mezi techniky bio-tisku. SLA technologie byla jedna z prvních 3D technologií tisku materiálu.^{11,30} Pracuje s foto citlivými polymerními roztoky, většinou na bázi kapalných pryskyřic. Které vlivem působení světla, jsou schopny zahájit polymerační reakce (síťování). Pro zajištění síťovací reakce pryskyřic s vysokou přesností, je zapotřebí několik složek v kapalně směsi. Jako jsou oligomer/monomer, ředidlo, foto-iniciátor, činidlo. Kapalná směs se umísťuje do zásobníku, polohově naprogramovaný laser, pracující dle algoritmu tisku, skenuje povrch pryskyřice. Tím dochází k zahájení polymeračních reakcí. Hlavním projevem je přechod z kapalného na pevné skupenství. Proces se opakuje vrstvu za vrstvou. Kvalita tisku závisí na parametrech tisku (intenzita a expozice laserového paprsku, doba vytvrzování, rychlost skenování, rozlišení tisku).^{19,22,30}

SLA technika může pracovat ve dvou pohybech platformy, a to shora dolů (top-down) nebo zdola nahoru (bottom-up). Technologické provedení jsou znázorněna na následujícím obrázku. Konstrukce tiskárny je tvořena pohyblivou platformou, nádržku s kapalnou pryskyřicí, zdrojem laserového paprsku. Bottom-up funguje na principu vytvoření tenké vrstvy vytvrzené pryskyřice. Stavební platforma se posune dolu o tloušťku odpovídající jedné vrstvě. Top-down vyznačující odlišnou konstrukcí a umístěním laserového paprsku na dno nádrže, vyžaduje se přítomnost soustavy čoček a zrcadel usměrňující laserový paprsek. Vytvrzená vrstva pryskyřice je následně vyzvednuta. U obou technik se zmíněný princip opakuje vrstvu po vrstvě. Existuje několik výhod řadící technologii provedení top-down do popředí. Jedna z nich je bezpečnost práce, eliminací rizika zasažení operátora laserovým paprskem. Proces vytvrzování probíhá v uzavřeném

prostředí (nádržce s kapalnou směsí). Nedochází tak k inhibici kyslíku během fotopolymerizace. Prskyřice se doplňují automaticky do zásobníku.³⁰



Obr. 4. Schéma znázorňující SLA techniku bottom-up (a), top-down (b).³⁰

UV záření patří mezi nejčastější zdroje laserového paprsku. Pro bio-tisk se jedná o velkou nevýhodu. Zdroj UV světla je škodlivý pro buňky, dochází k trvalému poškození a ztrátě životaschopnosti. Oblast viditelného světla není pro buňky škodlivá, nabízí se jako možnost náhrady UV záření. Technologie se vyznačují vysokou kvalitou tisku a rychlostí. Mnozí vědci hledají kombinace materiálů, jež jsou schopny vytvrdit za pomoci viditelného světla. Wang a kolektiv vyvinuly směs PEGDA, GelMA a erosinu Y. Jedná se o hydro-gel se schopností vytvrzení za pomoci viditelného světla s minimálním poškozením buněk.^{22,31} Mezi nejčastěji používané porézní lešení patří prskyřice poly-(D,L-laktidová) a poly-(D,L-laktid-co-co-kaprolaktom).²² Další omezení SLA je nedostatek biokompatibilních a biologicky rozložitelných polymerů. Fotocitlivé činidla většinou vykazují toxické účinky pro buňky, s neschopností úplného odstranění nosné struktury.³²

Hlavní výhody SLA je přesnost a rozlišovací schopnost. Komerčně dostupné 3D tiskárny pracují s rozlišením 50 až 200 μm . V případě SLA je to i pod 20 μm . Vysoká rozlišovací schopnost technologie je zprostředkována pomocí prostorového a časového řízení fotonů, cíleného zaměřování paprsku. V případě použití dvou fotonových laseru se posouvá rozlišení tisku na nano-rozměr. Old World Laboratory sestrojili tiskárnu pracující s rozlišením až 100 nm. Absence tiskové hlavy omezuje riziko ucpání. I tato technologie má svá omezení, jako je například korkové schodiště. Příčinou je schopnost tiskárny vyrábět pouze rovné vrstvy a ostré hrany. V současné době se toto omezení řeší možnostmi rotujícího skenování laserovým paprskem. Proces tisku je výrazně zpomalován nízkou rychlostí polymeračních reakcí, diskontinuální povahou procesu. Vyžadující,

aby kapalná pryskyřice byla doplňována do zásobníku po malých objemech. Díky tomu se proces tisku ještě více zpomaluje. Samotný vytisknutý povrch není dostatečně pevný a musí být vytvrzen v UV komoře. Ještě předtím je nutno zbavit objekt zbytku pryskyřice. Další nevýhodou je nutnost stavby podpěr u komplikovaných modelů, jež se po procesu vytvrzení musí vylámat. Z toho plyne, časová náročnost technologie tisku. Zároveň je technologie finančně nákladná.^{2,17,19,30}

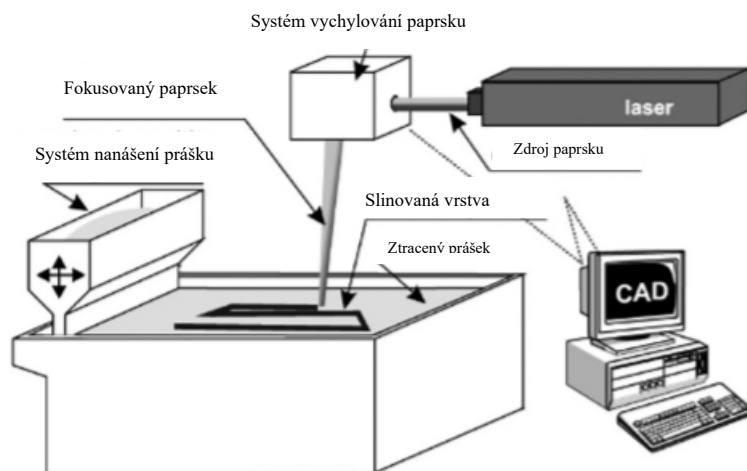
2.2.2 Selective laser sintering SLS

Základy metody selektivního laserového slinování, dále už jen SLS, byly položeny v roce 1989 Deckardem. SLS technika tisku využívá laserového paprsku pro slinování materiálu ve formě prášků. Metoda pracuje na principu nanášení práškového materiálu po vrstvách, přičemž během nánosu každé vrstvy dochází k procesu slinování. Proces tisku je znázorněn na obrázku číslo 5. Tloušťka jednotlivých vrstev je 100 až 200 μm .² Mezi nejčastěji používané lasery patří CO_2 s velikostí laserového bodu paprsku 0,1 až 0,4 mm. Intenzita penetrace laserového paprsku má výrazný vliv na kvalitu tisku (přesnost). Vazebný mechanismus tvorby vrstev, lze rozdělit do tří kategorií. První z nich je solid-slinování (solid state sintering), jedná se o tepelný proces odehrávající se mezi polovinou teploty tání a teplotou tání daného materiálu. Materiály obtížně slinovatelné, se zpracovávají za pomoci spékání kapalně fáze (liquid phase assisted sintering). Kapalnou fází nebo maticí tvoří polymerní materiály, jež se postupně rozkládají (časem vymizí). Poslední třetí kategorie je plné tání (full melting). Využívá se pro kovové a keramické prášky. V jednom kroku dochází k plnému roztavení prášku za pomoci laseru. Tato technologie bývá označována jako selective laser melting SLM.³³

Mezi zpracovávané materiály se řadí kovy, keramiky, polymery. Struktura zrn práškového materiálu je klíčový parametr pro výsledné vlastnosti výrobku. Jako ideální velikost částic se považuje 10 až 150 μm . Přičemž distribuce velikosti částic a procesní nastavené parametry (tloušťka vrstvy, teplota, hustota energie laseru), výrazně ovlivňují přítomnost reziduálních napětí. Dalším negativním projevem může být i porozita, která je způsobena špatným slinutím částic. Vlivem toho dochází ke zhoršování mechanických vlastností. V mnohých aplikacích to může být vnímáno jako negativum, nicméně v případě aplikace bio-tisku, může být i pozitivum. Tvorba porézních struktur je klíčová pro oblast použití v tkáňovém inženýrství. Cílená tvorba porézních struktur lze dosáhnout nastavením rychlosti laserového skenování. Čím pomalejší laserové

skenování, tím se prodlužuje doba interakce mezi práškem a laserovým paprskem. Zvyšuje se intenzita slinování. Naopak pokud proces laserového skenování urychlíme, sníží se tak doba slinování, což vede k větší porozitě. Tloušťka vrstvy ovlivňuje intenzitu slinování. Platí pravidlo, že pokud bude materiál nanášen v menších tloušťkách, bude docházet k intenzivnějším slinování práškového materiálu. Eliminují se vznikající porézní struktury.^{2,33,34}

Aplikace techniky SLS ve zdravotním průmyslu spočívá v torbě zdravotních nástrojů, implantátů pro pacienta. Zpracovávané polymerní termoplastické materiály vykazují amorfní a semi-krytalický charakter. Vlastnost určující použití daného polymerního materiálu jsou teplota skelného přechodu a teplota tání. Z přírodních polymerních materiálů se používá celulóza, ze syntetických PCL. Dále se zpracovávají keramické materiály ve formě prášku, kaše a kalu. Kde může docházet k jevu aglomerace. Jedná se o tvorbu shluků částic, jež mají negativní výsledek na proces slinování. Patří jsem zejména bioaktivní keramiky jako jsou hydroxyapatit a křemičitan vápenatý. Pro tisk je často využívána i samotná kombinace keramického prášku s polymerním pojivem. Keramický prášek má dominantní zastoupení. Použité polymerní pojivo funguje jako obětní část, která se posléze roztaví. Výsledkem je porézní struktura, složená pouze ze slinovaného keramického prášku. Mezi materiály vykazující vysokou pevnost v tlaku a odolnost vůči únavě patří kovy. Kovové prášku jsou výborným zdrojem pro tvorbu biokompatibilních náhrad. Ve zdravotním průmyslu se nejčastěji zpracovávají kovové prášky jako je titan, tantal a jejich slitiny. Nicméně zde existuje riziko uvolňování kovových iontů, jež mohou v těle vyvolávat nežádoucí účinky. Z tohoto důvodu se kovové implantáty potahují bioaktivní keramikou. I v tomto případě je tvorba porézních struktur žádoucí, z důvodu odlehčení hmotnosti a snížení finančních nákladů.³³



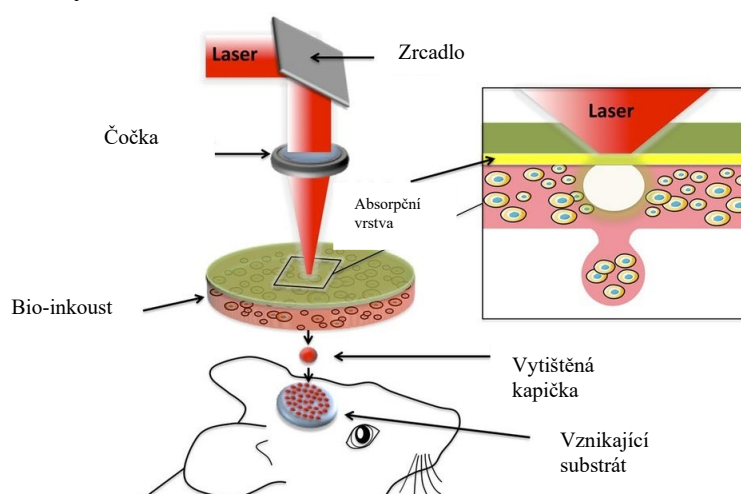
Obr. 5. Schéma konstrukce tiskárny SLS. ³⁴

2.2.3 Laser assisted bioprinting LAB

Laserově asistovaný bio-tisk byl původně vyvinut pro modelování kovů (Ag, BaTiO₃) s vysokým rozlišením jako technologie SLS. Aplikace spočívala zejména v procesu výroby počítačových čipů, kondenzátorů, rezistorů a obvodových prvků pro vodiče. ^{7,23,35} V současném provedení technologie LAB využívá především bio-tisk. Metoda pracuje v bezkontaktním režimu a bez tryskovém tisku. Čímž se výhradně liší od jiných metod. Absence tiskové hlavy rozšiřuje potenciál eliminací negativních dopadů. Zejména se jedná o možnost ucpání tiskové hlavy, nehomogenní tok materiálu a mechanickému namáhání buněk. Rozsah použitých viskozit bio-inkoustů je 1 až 300 mPas. ^{7,36} Výhody LAB spočívají v přesném tisku a vysoké rozlišovací schopnosti. Tisk jedné buňky na produkovanou kapičku, řadí metodu do popředí. Používané bio-inkousty mohou díky tomu obsahovat vyšší hustotu buněk. Vysoká reprodukovatelnost vzniklých 3D struktur je klíčový parametr umožňující aplikaci v biomedicíně inženýrství, jež metoda LAB umožňuje. ^{7,23,35} Povaha metody a způsob provedení, zapříčiňují nedostatky u tvorby složitých konstruktů. Metoda je vhodná pro modelování v oblasti buněčných mikro-prostředí, jehož aplikace spočívá v testování léčiv. Nevýhody jsou nižší životaschopnost buněk ve srovnání s jinými metodami. Příprava páska materiálu na tisk je časově náročná, avšak samotný výrobní proces (tisk) je rychlý. V současné době nejsou provedena důkladné studie o vedlejších účincích laserového paprsku na buňky. ^{7,23,35}

Konstrukce tiskárny (obr. č. 6) se skládá ze zdroje laserového paprsku, vrstev zajišťujících přenos energie laserových paprsků, obsahují bio-inkoust a substrát zajišťující sběr

vznikajících kapiček bio-inkoustu. Laserový zdroj generuje záření je vysoce monochromatické a koherentní. Laser umožňuje pracovat v režimu pulzním nebo kontinuálním. Princip spočívá, v dopadu laserového paprsku na vrstvu kovového materiálu (zlato, titan). Jež je potažena tiskovým materiálem umístěným na dně. Kovová vrstva má za úkol absorbovat energii dopadajícího záření a následně ji přenášet do vrstvy materiálu obsahující bio-inkoust. Odpařením bio-inkoustu vlivem energetického stimulu dojde k vytvoření bublinky. Vzniklá bublinka nebo kapička bio-inkoustu, klesá na spodní sběrnou vrstvu (substrát), kde dojde k procesu síťování. Tento krok se pravidelně opakuje za vzniku 3D struktury.^{7,23,35,37}



Obr. 6. Schéma konstrukce tiskárny technologií LAB.³⁸

Dle provedení tisku má tato metoda několik variací, zahrnující laserem indukovaný dopředný přenos LIFT, dále modifikovaný AFA-LIFT s absorbujícím filmem, biologické laserové zpracování BioLP, maticové pulzní laserové odpařování MAPLE DW, laserem přímá navádění (navádění s optickými vlákny nebo bez nich) LG DW.²³

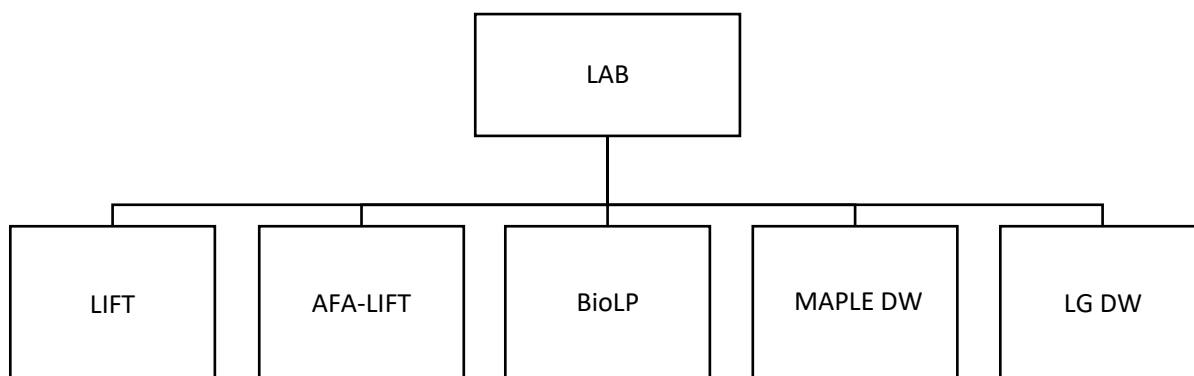


Diagram 2. Schéma metod pro laserově asistovaný bio-tisk.²³

2.2.3.1 *LIFT (laser induced forward transfer)*

Metoda laserem indukovaného dopředného přenosu, dále už jen LIFT. Využívá laserové pulzy k odstranění malého množství materiálu (2 až 1000 pl), naneseného v tenké vrstvě. Vlivem působení laserového pulzu dochází k vypuzování materiálu, bez změny fáze. Přenosová vzdálenost je okolo 100 μm .^{36,39,40} Svou technikou provedení má velkou míru buněčné smrti vlivem tepelného poškození. Životaschopnost buněk je pod 85 %. Tepelné poškození se dá ovlivnit použitým laserem a zejména dobou (nano až femto-sekundy) vystavení vysoko energetickému záření. Pomocí této techniky se vytváří především senzory, bio-senzory, kondenzátory a rezistory. Bylo prokázáno, že za pomoci této techniky je možno tisknout i molekuly DNA bez poškození s využitím laseru o vlnové délce 248 nm.^{23,39,41,42}

2.2.3.2 *AFA-LIFT (absorbing film assisted laser induced forward transfer)*

Absorpčním filmem asistovaná metoda indukovaného dopředného přenosu, AFA-LIFT, vznikla modifikací techniky LIFT. Vylepšení spočívá v omezení míry tepelného poškození materiálu. Dle některých studií může dojít k zvýšení teploty vzorku až o několik stovek stupňů celsia. Z toho plyne že míra poškození biologického materiálu je vysoká. Vylepšením o absorpční film dochází k eliminaci již zmíněného negativního jevu.⁴⁰ Laserová tisková páska (vrstva) z průhledného materiálu je potažena absorpčním filmem kovu o tloušťce 50 až 100 nm. Absorpční vrstva zajišťuje usnadnění přenosu laserového paprsku, funguje jako takzvaná obětní vrstva. Je nutno podotknout, že vrstva kovového materiálu může způsobovat zvýšenou cytotoxicitu. Vlivem přítomnosti kovových nanočástic.^{23,40}

2.2.3.3 *BioLP (biological laser printing)*

Další modifikací laserově asistovaného tisku získáme biologické laserové zpracování BioLP. Jedná se o techniku dopředného přenosu za pomoci laserových pulzů. Terč se skládá ze tří vrstev materiálu: UV transparentní vrstvou, tenkým povlakem zajišťující absorpci světla a biologickým materiálem, který se bude tisknout. Transparentní (průhledná) vrstva má za úkol zaostření laserového paprsku společně s absorpčním povlakem. Jedná se o obětní vrstvy materiálu, které podléhají poškození energetickému záření. Paprsek laserového záření je zaostřen kamerou, díky tomu jsme schopni přesně monitorovat proces přenosu v reálném čase. Stejně jako AFA-LIFT snižuje expozici laserového záření na bio-inkoust pomocí obětní vrstvy materiálu, zajišťující přenos a snížení míry poškození buněk.^{23,43-45}

2.2.3.4 *MAPLE DW (matrix assisted pulsed laser evaporation direct write)*

Tyto dvě techniky MAPLE a MAPLE DW jsou úspěšné techniky pro zrealizování tisku od biokompatibilních materiálů jako je PEG až po živé mikroorganismy. Je svou technikou provedení podobný AFA-LIFT. Na rozdíl od této metody pracuje v oblasti nízké energetického laserového záření. V porovnání s výše zmíněnými technikami využívá oblast vlnových délek záření UV. Interakce mezi laserovým paprskem a bio-materiálem umožňuje směrové vypouštění materiálu, skrze prostory rezervoáru (podpůrný materiál) na substrát. Přenos menšího množství materiálu a přesnější depozice je hlavním vylepšením technologie. Obětní vrstva materiálu není vyrobena z kovu, ale bio-polymerního materiálu. ^{23,46-48}

2.2.3.5 *LG DW (laser-guided direct write)*

LG DW funguje na principu, vznikajícího laserového paprsku rozptylem světla na mikročásticích a umožňuje tak vznášení kapiček. Pomocí této metody je možno tisknout kapalnou a aerosolovou suspenzi, které vykazují větší index lomu částic než okolní tekutina. Za pomoci této metody lze poměrně snadno tisknout více druhů materiálu, s přesností ukládání materiálu $\pm 5 \mu\text{m}$. Technika využívá nízkenergetické záření, slabě zaostřený paprsek v oblasti vlnových délek okolo 800 nm. Technika LG DW může být modifikována s pomocí naváděním optických vláken. Laserový paprsek je spojen s dutým optickým vláknem pro zvýšení pracovní vzdálenosti laseru z 300 μm na několik mm až cm. ^{23,49,50}

2.3 Metody založené na tryskání materiálu

Tyto technologie byly vyvinuty v 90 letech minulého století, fungují na principu tryskání tekutého nebo polotekutého materiálu (pojiva). V rámci této kapitoly se budeme věnovat technologii droplet based bioprinting (bio-tisku na bázi kapiček). ³⁵

2.3.1 Droplet based bioprinting DBB

Kapičkový bio-tisk vypuzuje kapiček malého objemu bio-inkoustu z trysky na substrát. Jedná se o bezkontaktní metodu, kde jednotlivé vrstvy vznikajícího materiálu nejsou tvořeny souvisle. Tiskárna se skládá ze zásobníku obsahující bio-inkoust, trysky zajišťující vytlačování materiálu a substrátu. Můžeme jej rozdělit do dalších kategorií mezi něž se řadí inkoustový tisk (inkjet bioprinting), elektro-hydrodynamický bio-tisk

(electrohydrodynamic jetting based bioprinting), akustický bio-tisk (acoustic bioprinting), mikro-ventilový nebo pneumatický bio-tisk (microvalve bioprinting).²³

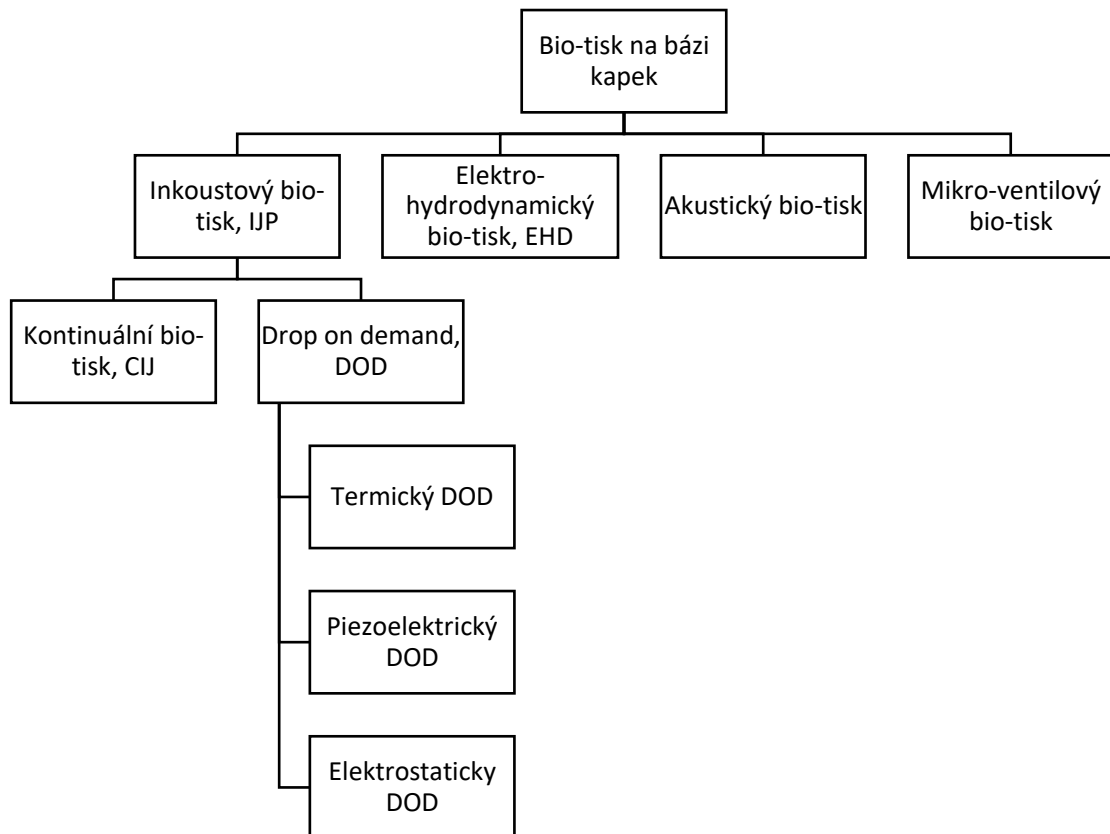


Diagram 3. Schéma metod pro Bio-tisk na bázi kapek (DBB).²³

2.3.1.1 Inkjet printing IJP

Inkoustový bio-tisk stojí na počátku vzniku buněčného tisku, patent pochází z roku 2003. Vyvinula se z 2D inkoustové tiskárny.^{8,9,51} IJP nezajišťuje nepřetržitý tok materiálu v jedné vrstvě, ale v takzvaných malých kapičkách. Tvorba malých kapiček bio-inkoustu spočívá v neustále se opakující deformaci tiskové hlavy. I tato metoda si nese určitá omezení, jako je škála použitých viskozit. V případě této tiskárny je nutno používat pouze nízko viskózní systémy. Omezení je především zapříčiněno pracovním režimem tiskárny. Elektromechanický systém zajišťující deformaci tiskové hlavy, není schopen vytlačit materiál nad 15 mPas. Mohlo by dojít k ucpaní tiskové hlavy a v krajních případech trvalému poškození. Bezpečnostní hranice rozsahu viskozit je pod 10 mPas. Díky tomu je možno tisknout pouze bio-inkousty s nízkou hustotou buněk. Ve srovnání s jinými tiskovými metodami je zde nízká přesnost umístění kapiček a korekce jejich velikosti.^{7,22,35} Mezi velké výhody

jsou nízké pořizovací náklady. Technika inkoustového bio-tisku umožňuje rychlou výrobu s opakovatelným tvarem, rozlišení tisku pod 50 μm . Samotná životaschopnost buněk je větší než 80 %. Vhodná je pro tisk konstruktů kostní, chrupavčité, kožní, srdeční a nervové tkáně.^{22,23,35} Inkoustový bio-tisk lze klasifikovat do dvou kategorií, a to continuous inkjet jetting (CIJ, kontinuální inkoustový bio-tisk) a drop on demand (DOD, kapka na vyžádání).^{8,22,23}

Continuous inkjet jetting CIJ

Technika CIJ neboli kontinuální bio-tisk se řadí mezi metody zajišťující spojitý tok materiálu. Funguje na principu vypuzování proudu bio-inkoustových kapiček. Vznikající nestabilitou Rayleigh-Plateau při natlakování trysky. Kapičky jsou řízeny pomocí magnetického nebo elektrického pole. Díky povaze procesu a neschopnosti zajistit stabilní tok s přesnou kontrolou rozměru, je preferovaná metoda drop on demand DOD.^{23,52}

Drop on demand DOD

Drop on demand, DOD, pracuje na principu vysílání kapičky bio-inkoustu pouze na vyžádání nebo spuštění daného mechanismu. V překladu se tato technika nazývá kapička na vyžádání. Kontrola rozměru a umístění kapiček jsou přesnější než u CIJ. Kvalita tisku závisí na tvaru kapky, rychlosti vypuzování a znalosti tlakového proudu. Dle typu deformace tiskové hlavy se dále dělí na termický (tepelný), piezoelektrický a elektrostatický.^{23,52-54}

Termický DOD (tepelný)

Tepelný inkoustový bio-tisk funguje na principu ohřívání bio-inkoustu, následně se vytvoří bublinky par. Bublinky páry se rozpínají a překonávají sílu povrchového napětí bio-inkoustu na špičce trysky. Díky tomuto jevu dojde k vypuzování jednotlivých kapiček. Teplota v průběhu ohřevů může dosahovat 200 až 300 °C. Samotné vystavení materiálu vysokým teplotám je okolo mikrosekund. V tiskové hlavě se zvýší teplota o 10 °C. Bylo prokázáno že zvýšená teplota způsobuje minimální poškození z hlediska životaschopnosti buněk.^{8,23}

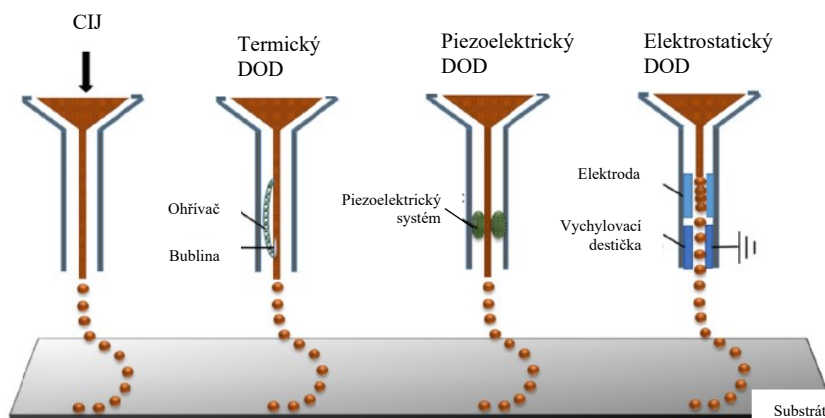
Piezoelektrický DOD

Piezoelektrická DOD obsadila dominantní postavení na trhu. Tato technika využívá změnu napětí pro vytvoření pružné deformace v piezoelektrickém materiálu (smršťování a expanze). Ten generuje tlakový pulz v tekutině, následně se z tiskové hlavy vypudí kapička bio-inkoustu. Tvar kapky lze upravit velikostí aplikovaného napětí na piezoelektrický materiál. Dle velikosti deformace, tiskové hlavy se dá jednoduše ovlivnit parametr velikosti

vznikajících kapiček bio-inkoustu. Regulace velikosti kapiček a jejich rychlosti vypuzování lze vylepšit akustickým zářením v kombinaci s ultrazvukovým polem. Nelineární hysterezní chování vedou k nepřesnostem, nestabilitám a obtížnostem s výkonem. Současné modely hystereze pro eliminaci těchto vad jsou jednoduché pro zachycení hysterezní dynamiky.^{8,55-57}

Elektrostatický DOD

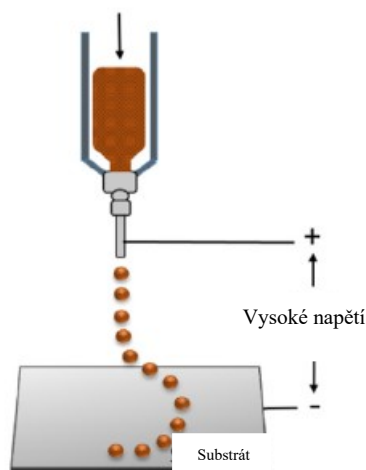
Jako alternativa k těmto technikám je elektrostatický DOD, pracující za pomoci elektrického pole. V porovnání s tepelnou a mechanickou (piezoelektrickou) deformací tiskové hlavy se zde eliminují nedostatky, jako jsou omezení velikosti a hustoty tryskového pole. Pracuje se zde s vysokým napětím, které je přiloženo na vychylující destičku. Destička následně mění objem komory, dle velikosti napětí mezi vychylující destičkou a nabíjecí elektrodou. Díky tomuto mechanismu se z trysky vytlačují kapičky bio-inkoustu. Zařízení umožňuje generovat sprej kapiček, kontinuální proud a diskrétní monodisperzní kapičky materiálu. Tisk je ovlivněn fyzikálními vlastnostmi kapaliny (povrchové napětí, viskozita, elektrická vodivost).^{23,58}



Obr. 7. Schéma znázorňující technologie CIJ, DOD (termický, piezoelektrický, elektrostatický).²³

2.3.1.2 Elektrohydrodynamic jetting based bioprinting EHD

Elektro-hydrodynamický tryskový tisk, dále už jen EHD, využívá elektrické pole k vytváření toku tekutiny pro vzorkování materiálu na substrát s vysokým rozlišením. Funguje na principu aplikace rozdílného elektrického potenciálu mezi kladně nabitou elektrodou (tryskou) a uzemněnou elektrodou (substrátem). Použité aplikované napětí je v rozsahu od 0,5 do 20 kV. V okamžiku, kdy aplikovaná síla elektrického pole překoná viskoelastickou sílu bio-inkoust a povrchové napětí, dojde k vypuzování kapiček. Během tisku jsou na bio-inkoust aplikovány elektrostatické, hydrodynamické a kapilární síly, které umožňují kontrolu nad tryskajícími kapičkami materiálu. Velikost vypuzovacích kapiček je v rozsahu několika mikrometrů až nanometrů. Díky tomu má vysoký rozsah rozlišení, maximální dosažené rozlišení je okolo 100 nm. Elektro-hydrodynamická tisková hlava (tryska) je schopna zpracovávat koncentrovanější suspenze. Bezprostředně po tisku není životaschopnost buněk ohrožena, nicméně dlouhodobé hledisko ukázalo, že tato metoda může životaschopnost buněk ovlivňovat kvůli přiloženým vysokým napětím. Další nevýhoda tohoto tisku je nepřesné umístění kapiček v prostoru při tryskání.^{8,23,59-62}



Obr. 8. Schéma znázorňující technologii EHD.²³

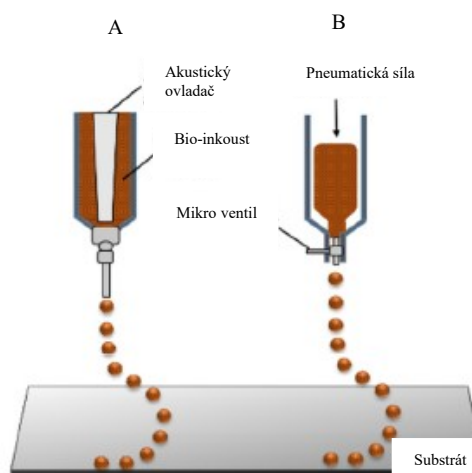
2.3.1.3 Acoustic jet printing

Jedná se o nový způsob akustického bio-tisku, který vyšel ze techniky DOD. Akustický bio-tisk umožňuje řízené ukládání pikolitrových množství tištěného materiálu s velmi přesným umístěním. Samotný bio-inkoust je umístěn v nádržce v jejichž středu je umístěn akustický ovladač. Na špičce trysky je pomocí povrchového napětí udržován bio-inkoust. V okamžiku aktivace akustického ovladače, osahující piezoelektrické médium,

se začnou generovat kruhové akustické vlny. Povrchové vlny jsou soustředěny do jediného bodu (tiskové hlavy). Následně, dojde k překonání povrchového napětí a vytlačení bio-inkoustu. Životaschopnost buněk je větší než 90 %. Velká výhodou této metody je eliminace stresových faktorů pro buňky jako jsou vysoká napětí, tlak a teplo. Rozlišovací schopnosti okolo 40 μm a vysoké rychlosti tisku (10 000 kapiček za sekundu). Velikost vznikajících kapiček je parametr ovlivňující se použitou frekvencí a nezávisí na geometrii tiskové hlavy. Platí pravidlo čím vyšší frekvence, tím menší kapičky. Průměr vznikajících kapiček je ovlivněn viskozitou bio-inkoustu. V případě použití vysokých akustických sil dochází ke snížení životaschopnosti buněk, není tedy možné zpracovávat viskóznější roztoky.^{23,63,64}

2.3.1.4 *Microvalve bioprinting*

Mikro-ventilový nebo také pneumatický bio-tisk pracuje na principu elektro-mechanických mikro ventilů. Kapičky jsou produkovány otevíráním a zavíráním ventilu (0, 1 ms) za konstantního pneumatického tlaku. Kapičky jsou vypuzovány pouze na základě napěťového impulsu. V okamžiku, kdy pneumatický tlak překoná viskoelastickou sílu bio-inkoustu a povrchové napětí na špičce trysky dojde k vypuštění kapičky. Nabízí řízené ukládání vrstev materiálu o tloušťce 1 až 2 μm , přesné polohování buněk. Díky tomu je možnost zpracovávat různé kapalné materiály s viskozitou až 200 Pas. Životaschopnost buněk je vyšší jak 80 %, buňky jsou méně náchylné k poškození díky nízkým hodnotám pneumatického tlaku. Maximální množství buněk je 10⁶ na 1 ml, kvůli problémům se sedimentací buněk, roste možnost ucpání tiskové hlavy. Objem kapiček lze upravit velikostí tlaku a dobou otevření ventilu. Kontrola velikosti kapiček a životaschopnost buněk je nízká.^{8,65}



Obr. 9. Schéma znázorňující pneumatický (b) a akustický bio-tisk (a).²³

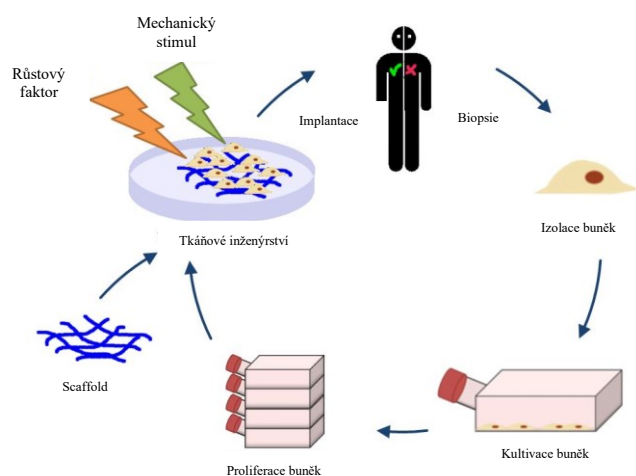
3 BIO-TISK (BIO-PRINTING)

Smysl bio-tisku spočívá v tvorbě podpůrného materiálu scaffoldů (lešení) pro buňky, které jsou tištěny zároveň s nosným materiálem. Scaffoldy mají významné uplatnění v oboru tkáňového inženýrství. Společným cílem je snaha vytvořit nové tkáně, orgány, popřípadě i regenerace již poškozených orgánů. Za pomoci biologických a inženýrských principů. Pro vytvoření nové tkáně je nutné poskytnout fyzickou oporu, která bude zajišťovat výslednou interakci s buňkami, tomuto lešení se říká „scaffold“. Bio-tisk se řadí mezi metody umožňující vytvořit řízené struktury.^{22,63,66-68} Hlavní důvod, proč se zabývat bio-tiskem je, že možnost transplantace orgánu od jiného dárce nese svá omezení a rizika. Transplantace orgánů zahrnuje hrozby, jako jsou možnosti odmítnutí imunitního systému příjemce orgánů od dárce. Dále je zde malé potenciální riziko nákazy od dárce, nebo v následujících dnech po transplantaci. V neposlední řadě ne vždy je možné potřebnému příjemci orgán transplantovat. Buď není prokázána shoda mezi dárce a příjemcem, nebo poptávka po dárcech orgánu převyšuje možnosti nabídky. Tkáňové inženýrství je jedna z možných cest, jak eliminovat již zmíněná rizika.^{22,35}

3.1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství využívá poznatků z oboru biologie, fyziky, bio-materiálů, medicíny. Slouží především k vývoji biologických náhrad, jejichž cílem je plně nahradit nebo obnovit funkce tkáně nebo orgánu.^{22,35,69} Základním principem, jak popsat tkáňové inženýrství je následující cyklus uvedený na obrázku číslo 10. Můžeme začít osobou, která poslouží jako zdroj buněk. U této osoby provedeme biopsii a získáme tak vzorek požadované tkáně. Následuje izolace získaných buněk. Tyto buňky pak dále podstupují proces kultivace a proliferace. Cílem v průběhu kultivace je vytvořit vhodné prostředí pro buňky ve zkumavce, jako jsou v následujícím organismu, kde budou umístěny. Během kultivace je buňkám zajištěn optimální přísun kyslíku, živin a stálé prostředí (vnitřní homeostáza). Proliferace buněk spočívá v množení a vytváření skupin buněk s vysokou mitotickou (buněčným dělením) aktivitou. Jako další možnost se pak nabízí vzít připravený scaffold a buněčnou kulturu, kterou se osadí. Následně se buňkami osazený scaffold vloží do bioreaktoru. Kde za pomoci mechanických a růstových stimulů se vytvoří požadovaná tkáň. V případě bio 3D tisku se nabízí možnost tisknout bio-materiál společně s buňkami. Po vyčištění scaffoldu dochází následně k procesu kultivace v bioreaktorech za specifických

podmínek. Jako poslední krok, který celý cyklus uzavře je implantace nově vzniklé tkáně pacientovi. ^{11,22,70-73}



Obr. 10. Základní princip tkáňového inženýrství. ⁷²

V tkáňovém inženýrství se používají tři postupy (strategie) k nahrazení poškozených nebo nefunkčních tkání. První z nich je použití odebraných buněk, dále následuje využití biokompatibilních bio-materiálů a jako poslední z nich je kombinace dvou předchozích. Poslední strategie je v dnešní době hlavním předmětem výzkumu. Bio-materiál s buňkami slouží jako již dříve zmíněný scaffold. Kombinace buněk a bio-materiálu do scaffoldu se řídí procesem shora dolů nebo zdola nahoru. V případě shora dolů se buňky osazují řídce, je obtížné u této metody zajistit homogenní distribuci buněk. Které následně nejsou schopny vytvořit vhodnou extracelulární matici (ECM). Naopak je tomu u zdola nahoru, kde jednotky buněk a bio-materiálu jsou kombinovány za vzniku makro tkání. Pomocí přístupu zdola nahoru je možno vytvořit správné prostředí ECM. Metoda bio-tisku je založená právě na přístupu zdola nahoru. ³⁵

Scaffold zajišťuje výsledný tvar materiálu a oporu pro buňky, dále obsahuje růstové faktory pro kontrolu a zvýšení růstu buněk. Makro a mikro-architektura výsledného scaffoldu výrazně ovlivňuje biologické procesy, jako jsou migrace a adheze buněk, jejich další množení a udržení si diferencované funkce. Na základě toho je patrné, že scaffold musí vykazovat správné vlastnosti. Samotné vlastnosti scaffoldu se silně odvíjejí od aplikace. Obecně je lze rozdělit na fyzikální, transportní (zajištění dopravy) a biologické vlastnosti. Mezi fyzikální vlastnosti se řadí mechanismus tvorby gelu, mechanické vlastnosti scaffoldu a jeho degradace. ^{22,63,66-68,74} Geometrie scaffoldu, zejména z hlediska pórovitosti a propojenosti pórů, umožňuje růst buněk a jejich migraci, transport živin a odpadních látek. Zároveň v případě dosažení příliš velké velikosti pórů může dojít k vyplavení buněk a tím

se zhoršují mechanické vlastnosti. Metoda 3D tisku umožňuje řízenou tvorbu struktury, díky tomu lze dosáhnout větší hloubky penetrace buněk. Mezi sledované mechanické vlastnosti patří tuhost a pevnost scaffoldu. Tuhost ECM umožňuje reakci na vnější zatížení za pomoci změny průtoku tekutin a signalizací mezi buňkami. Tuhost je závislá na pórovitosti a propustnosti scaffoldu. Zvyšující tuhost systému snižuje pórovitost a propustnost. Adheze buněk na scaffold je silně ovlivněna topografií (strukturou). Jedná se o vazbu buňky na ECM, povrch substrátu či na jinou buňku. Zajištění správné adheze je podstatné, dochází k přenosu a generování signálů mezi buňkami což usnadňuje komunikaci.^{66,75} Scaffold musí splňovat důležitá kritéria, jako jsou biokompatibilita pro zajištění buněčné adheze, diferenciací a proliferací. Biologická rozložitelnost neboli vlastní degradace scaffoldu, které musí být v souladu s tvorbou nové tkáně.⁷⁶ Jedna z cest, jak se inspirovat při návrhu vhodné struktury scaffoldu a fyzikálních vlastností lešení je bio-mimetický přístup. Na základě správné struktury scaffoldu může dojít k zajištění maximální interakci mezi buňkami, podpůrným materiálem a vytvořením vhodné ECM. Scaffold slouží jako umělá ECM tvořící vhodné prostředí pro přilnutí, migraci a proliferaci (množení) buněk, dále dodává stimuly buňkám k produkci vlastní ECM, pokud by k tomuto jevu nedošlo tento systém by se začal rozkládat.^{8,22,35,66,69}

Je nutno podotknout, že současné techniky v oblasti tvorby tkáňového inženýrství nejsou schopné těchto struktur dosáhnout na úrovni nano architektury. Samotné tkáňové inženýrství je pouze na začátku své cesty ve snaze vytvořit 3D strukturu. Jež by byla podobná nativní formě struktury a schopnosti tvořit celky dle dané hierarchie. Cílem je potom vytvořit umělý orgán, který bude plnit stejnou funkci.^{8,22,35,66,68,69}

3.2 Charakteristika bio-tisku

Bio 3D tisk je aditivní metoda tisku, díky níž je možno kontrolovanou výrobu. Automatizovaný proces je řízený počítačem za pomoci dat z digitálního modelu. Umožňuje prostorovou kontrolu umístění buněk, proteinů, DNA, růstových faktorů a léčiv, případně dalších bioaktivních látek.^{8,63,77,78} Rozdíl mezi klasickým 3D tiskem a bio-tiskem, je přítomnost živého systému v tištěném materiálu, jež vyžaduje zvýšená opatření. Především se jedná o teplotu, mechanické napětí a namáhání v průběhu tisku (vysoký tlak, smykové napětí), pH, biokompatibilita okolního prostředí. Bio-inkousty zahrnují kombinaci živých buněk, polymerních materiálů, chemických faktorů (růstové faktory), biomolekul. U klasického 3D tisku tomu tak není. U těchto metod jsou stále jisté podobnosti a přístupy.

^{23,24,63} Mezi vhodné substráty pro tisk patří pevné rovinné povrchy, jako jsou Petriho misky, skleněné podložní sklíčko, kultivační destičky. ⁶³

Na rozdíl od jiných metod, zaměřených na tvorbu scaffoldu jako je litografie, elektrospinning atd., se bio 3D tisk vyznačuje vysokou flexibilitou z hlediska rozlišení tisku od 10 až 1 000 μm . Tyto tradiční metody přípravy struktur pro tkáňové inženýrství jsou výrazně omezeny kontrolou procesu přípravy, reprodukovatelnosti a přesnosti struktur. Existuje riziko zůstatku použitých rozpouštědel během procesu zpracování, které jsou ve většině případů toxické pro buňky. Umělá tkáň je nerealistická z hlediska mikroprostředí pro buňky. Potenciál bio 3D tisku spočívá v tvorbě složitějších a sofistikovanějších struktur. ^{9,11,22,23,35}

3.2.1 Principy bio-tisku

Hod Lipson zdůrazňuje deset základních principů 3D tisku. Díky nim byla snaha opustit klasickou představu o tisku. Tyto principy výrazně snižují klíčové překážky v průběhu tisku. Formování živých tkání za pomoci Lipsonových principů posunuli bio-tisk. ⁶³

1. Princip: fyzikální replikace živého konstruktů ze souboru digitálního modelu.
 - Bio-tiskárna přijímá počáteční údaje o výrobním procesu z digitálního modelu. Samotný digitální model slouží jako úložiště informací a řídí výrobní činnost. ⁶³
2. Princip: přizpůsobení produktu s vysokou rozmanitostí funkcí.
 - Uživatelé tiskárny mohou rozhodovat o specifických vlastnostech tisku, s cílem možnosti tisku složitějších konstruktů. ⁶³
3. Princip: strukturálně heterogenní produkt zahrnující více rozměrů.
 - Umožňuje tvorbu konstrukcí se strukturálními vlastnostmi lišící se ve více jak dvou rozměrech. Aplikace tohoto principu je snaha napodobit přírodní tkáně a architekturu. ⁶³
4. Princip: přesné prostorové vzory.
 - Jedná se o schopnost tisku přesných prostorových vzorů ve dvou a více dimenzích. ⁶³

5. Princip: minimální manipulace s živým systémem.
 - Jedná se o zajištění minimálního mechanického a environmentálního stresu pro živé biologické systémy, který by mohl ohrozit buňky a molekuly na životě a zahájit řízenou smrt. Ovlivňuje parametr životaschopnosti buněk.⁶³
6. Princip: vodivé mikroprostředí pro buňky před a po tisku.
 - Buňkám musí být poskytnuto vhodné prostředí, aby se udržely na substrátu a nedocházelo k jejich vyplavení. Nesmí dojít v průběhu tisku ke změně životaschopnosti a funkce buněk. V případě nutnosti tisku, v něhož průběhu dochází ke změnám funkce buněk, měla by platit snaha o minimální dopad.⁶³
7. Princip: konstrukce musí být stabilní pro následné operace.
 - Tištěný konstrukt musí vykazovat chemickou, mechanickou a biologickou stabilitu, aby byl použit v navazujících aplikacích.⁶³
8. Princip: bio-tiskárny s minimální asistencí obsluhy.
 - Stroje by měly být snadno ovladatelné, vstup operátora do výroby by měl být eliminován, jelikož dochází k zvýšené pravděpodobnosti chyb. Tiskárna musí být odolná, aby bylo možné ji instalovat i v prostředí nemocnic, z důvodu ekonomických s cílem snížit náklady na výrobu.⁶³
9. Princip: buněčný konstrukt, umělá tkáň a orgán na požádání.
 - Digitální technologie umožňující specifikaci vlastností konstruktů na vyžádání zákazníka. Jedná se o tisk na míru omezující skladování výrobku.⁶³
10. Princip: opakovatelná a zajištěná kvalita tištěné struktury.
 - Proces bio-tisku musí dosahovat maximální přesnosti v průběhu tisku a minimálních odchylek od digitálního modelu. Z hlediska struktury je nutné zajistit reprodukovatelnost.⁶³

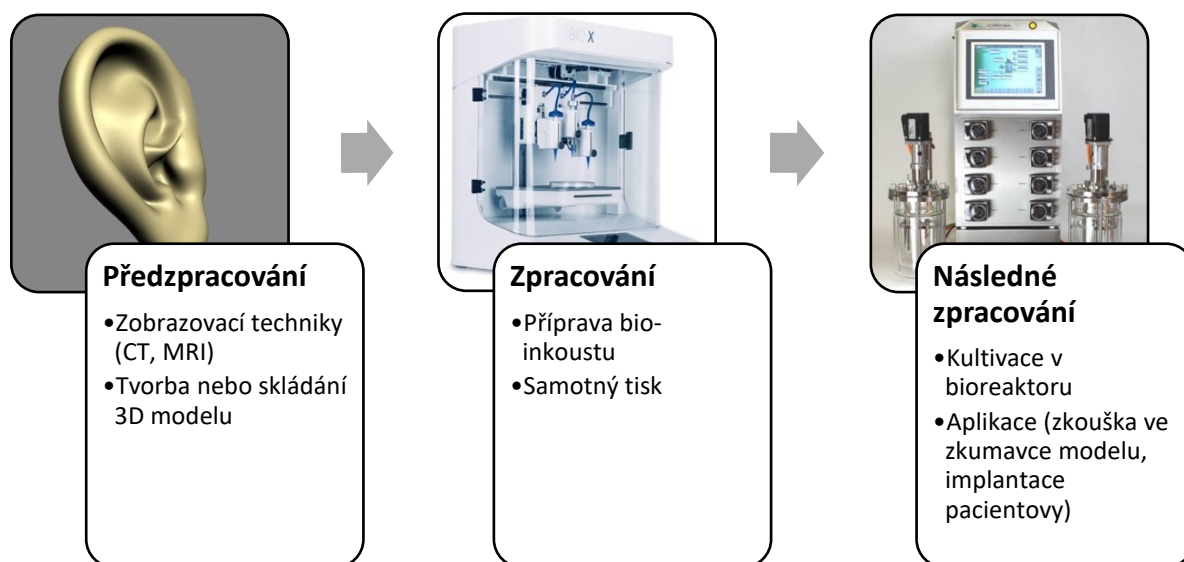
Některé současné technologie bio-tisku jsou schopny splnit výše vyjmenované principy tisku, dále je zde snaha neustále vylepšovat metody tisku. Je otázka času a budoucnosti kdy dojde k sestrojení tiskárny schopny splnit všech deset principů.⁶³

3.2.2 Proces bio-tisku

Obecně se výrobní činnost dělí na tři kroky předzpracování (pre-bioprinting), zpracování (bioprinting), následné zpracování (post-bioprinting). V rámci kroku předzpracování je zde zahrnuto modelování, výběr bio-inkoustu a metody tisku. Následuje druhý krok samotný tisk, ten může probíhat současně se zabudováváním buněk do vznikající konstrukce nebo bez nich. Poslední krok, zahrnuje vývoj bio-mimetických struktur, biologických a mechanických (pružnost a pevnost struktury) funkcí potřebných pro živou tkáň. V rámci posledního kroku je zahrnuta i kultivace buněk.⁸ Z hlediska konstrukce bio 3D tiskárny se jedná o mechanickou platformu pracující ve třech osách (x, y, z), která řídí pohyb extrudéru dle nastaveného algoritmu. Algoritmus tisku je vytvořen návrhářem a zpravidla je uložen ve formátu souboru g-kód. K tomu abychom vytvořili soubor g-kódu předchází několik kroků. První z nich je získat model, možnosti jsou různé od vytvoření modelu ve vhodném softwaru CAD až po získání dat z tomografie (CT), magnetické rezonance (MRI), ultrazvuku a laserového skenování. Tyto metody získávající data za pomoci měřicí techniky se především uplatní u složitějších tvarů. Získané data musí být převedena na STL soubor. Ten se následně zpracovává v softwaru zvaný slicer, cílem je rozdělit model do jednotlivých vrstev a vytvořit algoritmus tisku. Jedná se o poslední krok, při kterém se STL soubor převede na g-kód, který se následně nahraje do tiskárny. G-kód obsahuje příkazy určující rychlost tisku, procento výplně, požadavky na podpurnou strukturu

a spoustu dalších. Samotný tisk modelu probíhá po jednotlivých vrstvách dle algoritmu.

9,11,22,79



Obr. 11. Proces bio-tisku zahrnující předzpracování, zpracování a následné zpracování. ^{23,80-82}

3.3 Současnost, výzvy a budoucnost bio-tisku

Budoucnost této technologie spočívá v dostupnosti pro klinickou léčbu pacienta. Současné technologie v bio-tisku jsou pouze na počátku vývoje. Předchozí přístupy v klasickém tkáňovém inženýrství, jako je formování a tvorba porézních struktur, nevykazují schopnost integraci živých a neživých bio-materiálů do hybridních struktur. Díky tomu dochází k postupu a překonání předchozích nevýhod, znemožňující tvorbu umělých živých tkání. Značné úsilí je věnováno vývoji a zlepšování principů tisku, prokázání jejich proveditelnosti z hlediska životaschopnosti buněčného systému. Nicméně pro úspěšné klinické testování je třeba prokázat platnost procesu *in vitro* (ve zkumavce) a *in vivo* (v živém organismu) studií. Studie *in vivo* zahrnuje prokázání funkčnosti daného scaffoldu po implantaci. Prokázání platnosti *in vivo* studie, patří právě funkcionalizace těchto struktur, mezi sledované parametry se řadí hustota buněk, heterogenita, vaskularizace, inervace, mechanické vlastnosti. Dle vyjádření mnoha odborníků, nejprve je nutné provést důkladnou charakterizaci základních procesních mechanismů s cílem snížit náklady. ^{63,67,83}

Tvorba digitálních modelů orgánů je klíčová pro zrealizování samotného tisku, jelikož data řídí samotný bio-tisk. Výzvou budoucnosti bude tvorba vhodného softwaru se schopností řídit architekturu a nástroje pro návrh tkáňových a orgánových systému. Nové datové informace musí obsahovat všechny potřebné informace o živých systémech. Zejména informace o umístění buněk, bio-materiálu, biologických molekul v daném návrhu modelu. Je očekávatelné, že takové modely budou komplikované. Všechny následné výrobní operace musí být taktéž součástí digitálního modelu. Platforma pro softwarový design přinese přínos a aplikaci bio-tisku ve výzkumu a průmyslu. ^{10,63}

Dostupnost bio-tisku je ovlivněna i cenou vstupních surovin pro zpracování, a to jsou právě bio-inkousty, skládající se z bio-materiálů a dalších biologických složek. Současné používané bio-materiály jsou mnohdy omezené a drahé. Samotné buňky musí vykazovat schopnost zapouzdření v nosném bio-materiálu a tvorba ECM. Z toho plyne, že škála použitelných materiálů se opět zužuje. Nejpoužívanější bio-materiály jsou kyselina polymléčná, kyselina glykolová (PLGA), kyselina ethylen poly-glykol-diacrylátová (PEGDA), alginát vápenatý a další. Bio-inkousty podstupující vývoj musí prokázat schopnost interakce s buňkami. Dále je potřebné znát jejich reologické, mechanické a biologické charakterizace. V případě mechanických vlastností je klíčovým parametrem elastický modul. Pokud není dostatečně vysoký dojde k selhání struktury vlivem vlastní deformace. Na základě zjištěných vlastností se určí jejich specifická aplikace, pro jaký typ tkáně nebo orgánové soustavy jsou vhodné. ^{22,63,83}

Samotný tisk materiálu mnohdy vykazuje nedostatek přímého plnění buněk a rovnoměrnou distribuci. Složitější systémy mohou obsahovat miliony buněk, které budou muset být umístěny do tištěného materiálu, aby bylo zajištěna následná fyziologická funkce. Současné technologie jsou omezeny parametrem maximální hustotou buněk pod 10 miliónů/ml v bio-inkoustu, protože by došlo k velkému nárůstu viskozity a neschopnosti zajištění tisku. Pro vytvoření orgánu, jako je srdce a játra, bude třeba 50 až 100 miliónů/ml. Což vede k prodloužení doby tisku a potenciálu nárůstu rizika usazení buněk v komoře tiskové hlavy. Rovnoměrná distribuce buněk v tištěném systému je obtížná, ne-li zcela nemožná. Přednostní uplatnění zaznamenají technologie schopny tisknout jednu nebo dvě buňky na kapičku. ^{63,83}

3.4 Metody bio-tisku

Mezi hlavní metody bio-tisku se řadí EBB (extrusion based bioprinting), DBB (droplet based bioprinting) a LAB (laser based bioprinting) a SLA (stereolithography). Každá z těchto technik má charakteristické vlastnosti a omezení, zejména se liší rozlišovacími schopnostmi, přesností, výrobního času. Kompletní přehled technik a jejich dalších metod, lze nalézt v příloze číslo 1. ^{8,22,24,84,85}

3.4.1 Srovnání metod

V této kapitole jsou srovnány nejčastěji používané techniky bio-tisku. Výběr vhodné techniky pro 3D bio-tisk závisí na mnoha faktorech, jako jsou velikost tkáně, citlivost umístění buněk, bio-materiálu a biomolekul. V neposlední řadě na požadovaném rozlišení tisku. Pro daný typ tkáně a aplikaci je nutné vybrat správnou metodu tisku. Hlavním současným problémem vytištěných tkání je jejich funkčnost, většina z nich je schopna vykázat pouze jednu z požadovaných funkcí. U nativních tkání tomu tak není, ty vykazují více dimenzí funkčnosti. Techniky jsou vzájemně srovnány v následující tabulce. ^{11,83}

Tab. 1. Srovnání technik bio-tisku EBB, DBB, SLA a LAB. ^{22,83}

Metoda tisku	EBB	DBB	SLA	LAB
Výhody	<ul style="list-style-type: none"> ○ Jednoduchá metoda ○ Schopnost tisknout širokou škálu bio-materiálů ○ Schopnost tisknout vysoké hustoty buněk 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Tisk materiálu s nízkou viskozitou ○ Vysoká rychlost výroby ○ Nízká cena ○ Vysoké rozlišení 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Technika tisku bez využití trysek ○ Doba tisku je nezávislá na složitosti struktury ○ Vysoká přesnost ○ Vysoká životaschopnost buněk 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Vysoké rozlišení ○ Tisk materiálu v pevné, kapalně fázi
Nevýhody	<ul style="list-style-type: none"> ○ Platí pouze pro viskózní kapaliny 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Neschopnost zajistit nepřetržitý tok ○ Špatná tvorba vertikálních struktur ○ Nízká schopnost tisknout vysokou hustotu buňkami 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Toxicita UV světla pro buňky ○ Poškození buněk během procesu vytvrzování 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Vysoká cena ○ Poškození buněk vlivem působení laseru (doba působení <i>ns</i> a <i>fs</i>)
Rychlost	○ Pomalá	○ Rychlá	○ Rychlá	○ Střední
Cena	○ Přijatelná	○ Nízká	○ Nízká	○ Vysoká

Metoda tisku	EBB	DBB	SLA	LAB
Možnost vertikálního tisku	<input type="radio"/> Dobrá	<input type="radio"/> Slabá	<input type="radio"/> Dobrá	<input type="radio"/> Střední
Životaschopnost buněk	<input type="radio"/> $(89 \pm 3) \%$	<input type="radio"/> 80-95 %	<input type="radio"/> > 90 %	<input type="radio"/> <85 %
Hustota buněk	<input type="radio"/> Vysoká	<input type="radio"/> Nízká	<input type="radio"/> Střední	<input type="radio"/> Střední
Rozlišení	<input type="radio"/> 100 μm	<input type="radio"/> 50 μm	<input type="radio"/> 100 μm	<input type="radio"/> 10 μm
Viskozita	<input type="radio"/> 30 až 6×10^7 mPa.s	<input type="radio"/> <10 mPa.s	<input type="radio"/> Bez limitu	<input type="radio"/> 1 až 300 mPa.s

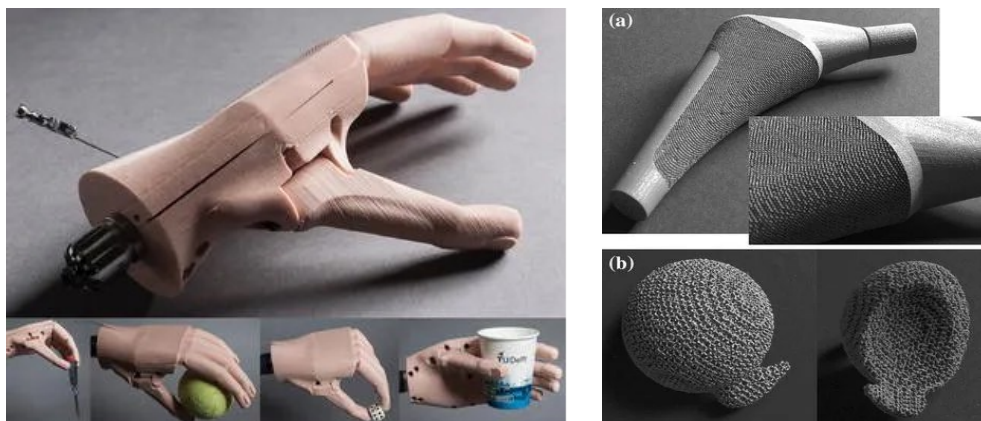
4 APLIKACE 3D TISKU VE ZDRAVOTNICTVÍ

Z hlediska pohledu aplikace ve zdravotním průmyslu se u 3D klasického tisku, tak i bio-tisku skrývá obrovský potenciál. V současné době se používá v biomedicínských aplikacích (lékařské přístroje, chirurgické nástroje), protézy, inertních (přízpusobených) implantátů, anatomický modelů pro chirurgické plánování zákroků, případně výcviku. Současné výzvy a perspektivy bio-tisku jsou v tvorbě umělých tkání a orgánů, regenerativní medicíny. Rozsah použití bio-tisku v lidském těle se vztahuje na 11 orgánových systémů (soustav). Bio-tisku může dále v budoucnu sloužit jako alternativní náhrada spojená s testováním lékařských postupů či jiných klinických testech (testování účinnosti léčiva, toxicita) na zvířatech.^{8,23,86} Zlepšením rozlišením a kvality tisku dochází k vývoji nových složitějších 3D konstrukcí. Velkým pokrokem patří samotná fabrikace komplexních konstrukcí s cílem přesněji napodobit nativní orgány. Ve většině odborných publikací a článků se mluví o budoucí aplikaci tisku, jako je tvorba umělých živých orgánů. Nicméně je třeba znovu zdůraznit, že žádná z uvedených technik v této práci neumožňuje prozatím produkci komplikovaných syntetických tkání. Současná aplikace 3D tisku spočívá v tvorbě modelů orgánů umožňující školení zdravotního personálu a pochopení případné vývojové vady nebo nemoci pacienta. Testování léčiv a nemocí v oblasti patofyziologie jsou nová odvětví, kde dochází k zavádění těchto technologií. Dle odhadu uplynou dlouhá desetiletí, než budeme schopni transplantovat složitější orgány jakou jsou plíce a játra, které byly vytvořeny 3D tiskem pacientovi na míru.^{35,63}

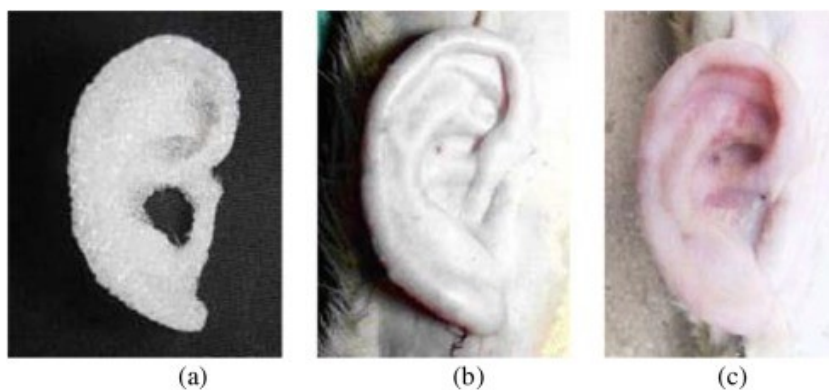
4.1 Medicínské aplikace klasického tisku

Jednou z aplikací klasického tisku ve zdravotním průmyslu zahrnující metody jako je FDM, SLS je příprava lékařských nástrojů, implantátů.^{14,87} V roce 2008 byla vytištěna první protéza FDM technologií. Ukázkový příklad protézy ve tvaru ruky je vidět na obrázku číslo 12.^{14,20} Pomocí metod pracujících na slinování prášku keramik, kovů a polymeru lze snadno připravit implantáty porézního charakteru. Které posléze mohou sloužit jako náhrada kostní tkáně. Na následujícím obrázku číslo 12., lze vidět příklad vytvořené náhrady za pomoci technologie SLM, jež je odvozena od technologie SLS.⁸⁷ Za pomoci FDM tisku

bylo sestrojeno lidské ucho (obr. č. 13.), tento scaffold se skládal z porézního polyurethanu, jež vykazoval dobrou flexibilitu, biokompatibilitu s elastickým modulem.^{9,88}



Obr. 12. Protéza připravená pomocí technologie FDM (levá strana), kloubní náhrada připravená pomocí SLM (pravá strana).¹⁴

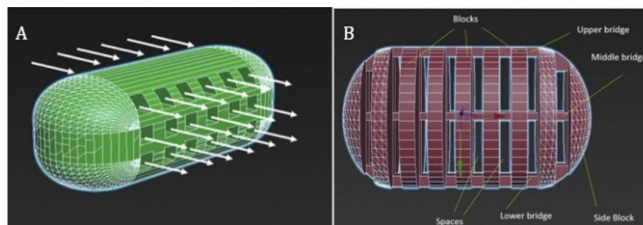


Obr. 13. Scaffold ucha připravený za pomoci FDM, kde (a) scaffold po tisku, (b) scaffold po osazení buňkami a transplantaci, (c) 12 měsíců po transplantaci.

88

V roce 2014 bylo za pomoci FDM technologie připravena tableta s řízeným uvolňováním léčiv. Za pomoci různých polymerních matric je FDM technologie schopna připravit tabletu s okamžitým a dlouhodobým modifikovaným uvolňováním léčivé látky. V současné době je nutno jednotlivé tablety potahovat speciálními povlaky pro řízení uvolňování léčiva. V případě FDM technologie tento krok odpadá, proces uvolňování léčiva lze snadno ovlivnit výběrem vhodného materiálu, parametry nastavené tiskem (zejména

se jedná o procento výplně). Na následujícím obrázku lze vidět srovnání klasické tablety a vyrobené technologií FDM. ²⁰



Obr. 14. Tableta připravená klasickými metodami (a), FDM technologií (b). ²⁰

4.2 Aplikace bio-tisku

Obecně lze aplikaci bio-tisku rozdělit na dvě oblasti, první z nich je tkáňová regenerace a regenerativní medicína. Druhé odvětví jsou biomedicínské aplikace, jsem je zahrnuto produkce a testování léčiv. ^{22,85}

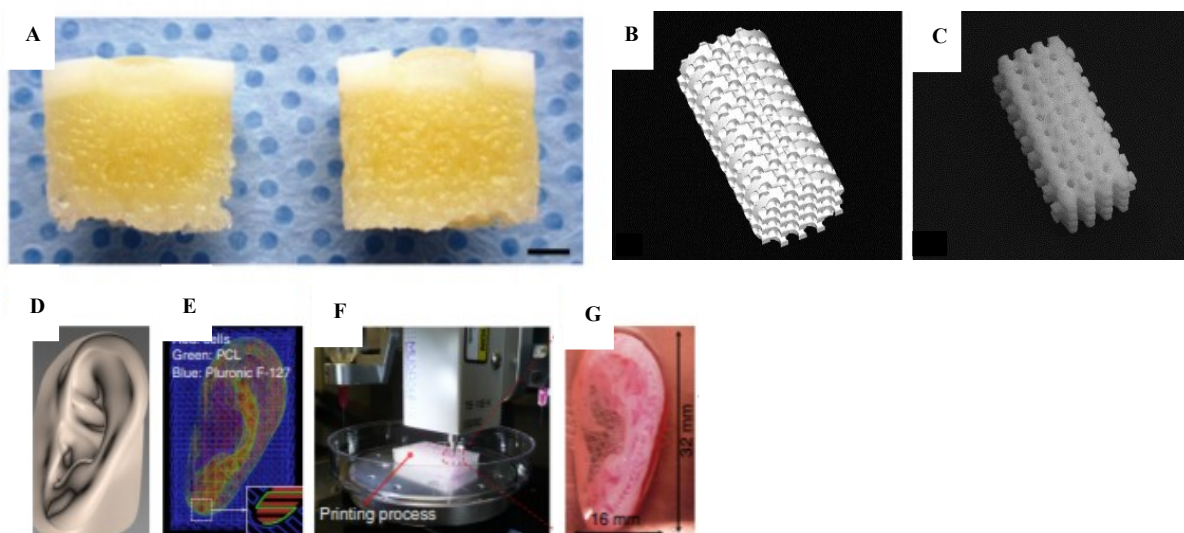
4.2.1 Regenerativní medicína

Mezi nejrozšířenější odvětví bio 3D tisku patří regenerativní medicína s cílem vyvinout vhodné scaffoldy pro dané soustavy. Jedním z hlavních problémů pro vývoj současných tkání je zajištění správné vaskularizace systému, od integrace tepen, cév až vlásečnic. Mezi nejúspěšnější tištěné tkáně patří především ty, co nevyžadují vaskularizaci, jako je chrupavčitá tkáň. ^{22,23,86,89-92} V rámci této práce se zaměříme na některé významné soustavy jako jsou kostní, svalová, kardiovaskulární a nervová.

4.2.1.1 Kostní a chrupavčitá tkáň

Kostní tkáňové inženýrství patří v současné době k hlavním výzkumným cílům. Z důvodu schopnosti bio-tiskových metod replikovat anatomickou strukturu. Kost se vyznačuje významnou vlastností samo-regenerace, to však platí jen do jisté míry poškození. Proto jsou hojně využívány kostní scaffoldy k regeneraci. Chrupavka je tkáň s nízkým počtem buněk, na základě toho je její schopnost regenerace dost omezená. Nicméně nízký počet buněk je hlavní výhodou pro bio-tisk, takováto tkáň je snadno tisknutelná i z důvodu menší míry vaskularizace. ²³ První implantáty k rekonstrukci skeletu a regeneraci kosti připravené pomocí bio-tisku byly připraveny z materiálu na bázi PCL. Jejich schválení proběhlo v roce 2003. Návrh designu a tištěnou konstrukci můžeme vidět na obrázku číslo 15. ^{86,89} V roce 2011 se vědci pokusili o laserový tisk kmenových buněk diferenciovaných chondrocytů za pomoci technologie LIFT. Tento jeden z prvních tisků

prokázal úspěšnost, z hlediska schopnosti buněk životaschopnosti, zachování funkčnosti a diferenciaci buněk.^{86,93} Pro vylepšení vlastností používaných hydro-gelu dochází ke kombinaci materiálu jako jsou hydroxyapatit, želatina, alginát.⁹⁰ Mezi další úspěšné pokusy se řadí inkoustový bio-tisk lidských chondrocytů v hydro-gelu PEGDMA. Z hlediska mechanických a biochemických vlastností se vytištěná konstrukce podobala nativní chrupavce. Po implantaci vytištěného konstruktů do defektu kloubní chrupavky byla pozorována integrace s nativní tkání. Vytištěná konstrukce chrupavky na obrázku číslo 15.^{8,86,94}



Obr. 15. Připravené scaffoldy za pomoci technologie bio-tisku (a) chrupavčitá tkáň⁹⁴; (b) model kostní tkáně, (c) vytištěná kostní tkáň⁸⁹; (d, e) model ucha, (f) proces tisku ucha, (g) vytištěné ucho.⁹⁵

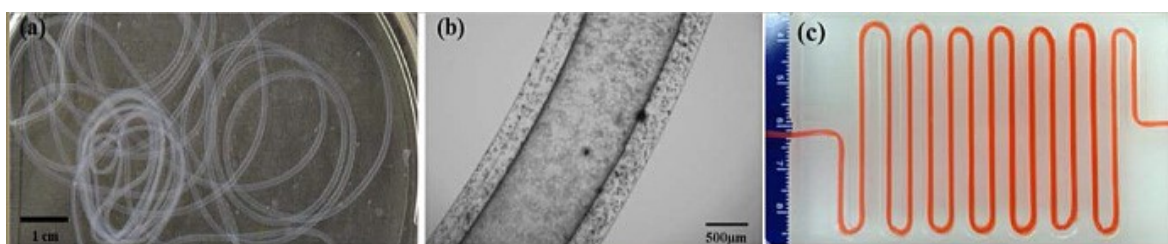
4.2.1.2 Svalová tkáň

Existují tři typy svalové tkáně a to kosterní, srdeční a hladké svalstvo. Kosterní svalstvo se upíná ke kostem a na základě interakce s nervovým systémem a dalšími nám umožňuje pohyb. Jedná se o jediný typ svalstva v našem těle, jež jsme schopni ovládat vlastní vůlí. Srdeční svalstvo (myokard) se nachází v srdci a umožňuje neustálou pulzaci srdce. Konečně hladké svalstvo tvoří stěny vnitřních orgánů. Heterogenita kosterní svalové tkáně je všeobecně výzvou pro bio-tisk, zejména přenos mechanických stimulů. Za pomoci metody inkoustového tisku byly vytištěny kmenové svalové buňky myši. Cílem studie je vytvořit prostorově definované vzorce a řízenou diferenciaci kmenových buněk. Jedná

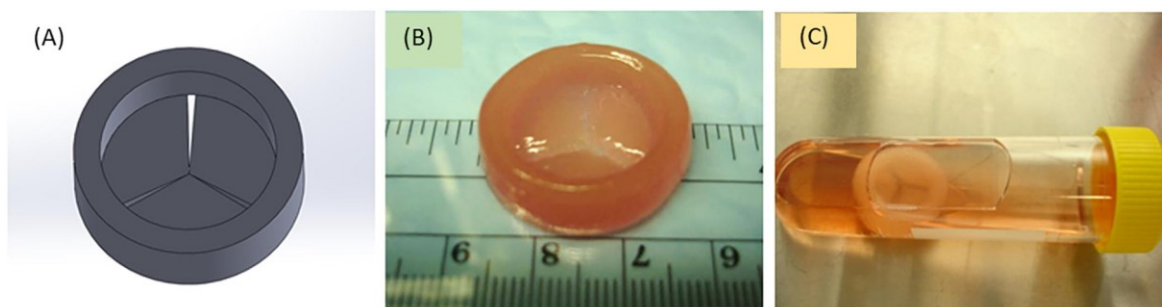
se o jednu z prvních zpráv o bio-tisku svalových buněk v roce 2013. Pro tvorbu svalové tkáně se jako podpůrný materiál využívá hydro-gel z želatiny, kyselina hyaluronová, fibrinogenu.^{23,96}

4.2.1.3 Kardiovaskulární tkáň

Kardiovaskulární systém se skládá ze srdce, tepen, cév a vlásečnic zajišťující krevní oběh. Schopnost vytvářet vaskulární prvky v bio-tištěných konstruktech jsou omezeny. Jedna ze slibných technik umožňující vznik cév v tištěné tkáni jsou magnetické nanočástice, které by byly součástí bio-inkoustu. Samotná poloha vznikajících cév by mohla být řízena magnetickým polem. Bylo prokázáno, že funkcionalizovaná částice oxidu železa mohou být začleněny do buněk za pomoci endocytózy. Tato nová inovativní technologie byla nazvána jako tkáňové inženýrství poháněné magnetickými silami, v současné době je na počátku svého výzkumu.^{23,35,90,97} Systém připravený ze síťovaného alginátu byl vytištěn pomocí technologie bio-tisku (obr. 16.), takto připravená trubice o průměru milimetrů a délce jeden metr, vykazovalo podobné prodyšné vlastnosti jako cévy. Úspěchem pokusu bylo vypěstování hladkého svalstva (koronární tepny), nicméně vědci nebyli schopni zmenšit průměr tištěné trubice. Mimo cévy, tepny a vlásečnice je další oblastí bio-tisku příprava srdečních chlopní (obr. 17.).^{23,90,98}



Obr. 16. Připravené cévy bio-tiskem, kde (a) cévní potrubí o délce 1 m a průměru 1 mm, (b) zvětšený snímek cévního potrubí, (c) buněčné médium.⁹⁸



Obr. 17. Bio-tisk srdeční chlopně, kde (a) model chlopně, (b) vytištěný konstrukt, (c) osazení buněčnou kulturou po dobu 7 dní v tubě.²³

4.2.1.4 Kožní tkáň

U pacientů trpících na popáleniny a kožní rány chronického typu je často problém s pasivními obvazy, které poškozenou oblast pouze překryjí a chrání ji před vnějším prostředím. Vytvořením umělé kožní tkáně, jakožto aktivní ochrany poškozené oblasti, bude podpořena adheze, proliferace, migrace buněk a urychlení procesu regenerace. Pro výrobu ideálních konstruktů kožních tkání je nutné zajistit vaskularizaci a pigmentaci systému. Mezi nejčastěji používané a slibné materiálu pro tuto oblast patří kolagen, elastin, fibrin v kombinaci s lidskými buňkami. Kompozitní hydro-gel na bázi kolagen-elastin nazvaný MatriDerm® vykazuje slibné výsledky pro léčbu popálenin. Jedná se o acelulární náhradu pokožky umožňující regeneraci tkání a obnovující její biomechanické funkce.^{90,99,100}

4.2.1.5 Nervová tkáň

Nervový systém se skládá z mozku, míchy, nervové sítě zajišťuje komunikaci mezi jednotlivými orgány, jejich řízení a regulaci.²³ Nervové buňky a neurony se řadí mezi tkáně s omezeno skoro žádnou schopností regenerace. Bio-tisk takové tkáně je obrovský potenciál k léčbě nemocí napadající nervový systém. Samotný tisk funguje na principu tisku nové tkáně, jako takové nebo inervace již vytištěného konstruktů. Následně je nutná implantace do systému, aby došlo k začlenění do nervového systému a propojení sítě nervových vláken. Vzhledem k složitosti nervové soustavy existuje málo studií zabývajících se touto problematikou.^{23,35,90}

4.2.2 Biomedicínské (farmakologické) aplikace

Výzkum a objev nových léčiv patří mezi časově a finančně nákladné odvětví. Dle statistik jen jedna 10 000 vyzkoumaných chemických entit dosáhne schválení klinického testování. Schopnost předvídat účinnost a toxicitu kandidátu na léčiva je jedna z aplikací bio-tisku. Jelikož 3D konstrukce mohou napodobit nativní tkáně, umožňují tak vědcům získat fyziologickou odpověď a odezvu léčiv. Aplikace je potom testování interakcí mezi příslušnými tkáněmi a léčivy. Bio-tisk umožňuje výrobu jednoduchých tkání s danou funkcí.^{35,86,101} Společnost Organovo představila v roce 2014 tištěnou tkáň jater, nazvanou exVive3D™. Tato tkáň nabízí pouze možnost pro testování toxicity léků, komerčně dostupná tkáň nebyla prozatím vynalezena.^{22,89}

5 MATERIÁLY PRO BIO-TISK

5.1 Materiály pro bio-tisk

První technologie 3D tisku byly navrženy pro nebiologické aplikace, hlavní zpracovávané materiály byly kovy, keramiky a termoplastické polymery. Obecně se pracovalo za vysokých teplot s využitím organických rozpouštědel a síťovacích činidel. Vysoké teploty a síťovací činidla nejsou biokompatibilní s buňkami. Hlavní výzva bio-tisku byla najít biokompatibilní materiály vhodné pro tisk. Současné používané materiály jsou založeny na přírodních polymerech nebo jsou od nich odvozeny.⁸⁴

5.1.1 Charakteristika a funkčnost materiálu vhodného pro bio-tisk

Výběr vhodného materiálu pro bio-tisk závisí na několika faktorech. Mezi něž se řadí biokompatibilita materiálu, degradační kinetika a vznikající vedlejší produkty, strukturální a mechanické vlastnosti, heterogenita, bio-mimetika materiálu, hustota buněk, tisknutelnost materiálu, síťování, vaskularizace, inervace, tepelná stabilita.⁸³⁻⁸⁵

Biokompatibilita materiálu je schopnost nevyvolat v systému nežádoucí a negativní reakce (toxické účinky, imunogenní odpovědi). Naopak by měl materiál podpořit biologické funkce. Degradační kinetika je míra určující tvorbu vlastní ECM a vznikající vedlejší produkty rozkladu nesmí být toxické. Samotná degradace scaffoldu musí probíhat stejně rychle, jako vznikající nativní ECM.^{83,84,90,106,107} Strukturální (porozita) a mechanické vlastnosti konstrukce závisí na aplikaci. Tištěná konstrukce musí být dostatečně tuhá, aby si udržela svoji strukturu, ale zároveň porézní. Pro zajištění správné vaskularizace, migrace buněk a jejich přilnutí je důležité vytvořit porézní strukturou o dané velikosti pórů. Mechanické vlastnosti konstrukce se mohou lišit v závislosti na teplotě a čase. Dalšími parametry jsou použité koncentrace materiálu pro přípravu hydro-gelu. Je důležité si uvědomit, že stejný scaffold nebude podporovat růst všech typů buněk.^{83,84,90,106,107} Bio-mimetický přístup umožňuje získání funkční přesnosti v tištěných tkáních a orgánech. Zejména se jedná o uspořádání buněk, složení ECM, požadavky na okolní prostředí. Pochopení těchto vlastností je důležité pro zajištění proliferace, diferenciace a migrace buněk. Každý orgán v našem těle obsahuje jiný počet buněk složených z více typů o různé hustotě. Pro představu játra obsahují $1,3 \times 10^8$ buněk na gram. Je třeba zajistit replikaci požadovaných hustot buněk pro danou tkáň. Z toho je jasně patrné, že tento parametr

je omezen způsobem a metodou bio-tisku, jelikož dochází k výraznému nárůstu viskozity systému a souvisí s tisknutelností.^{83,84,106,107}

Tisknutelnost materiálu je charakterizující vlastnost materiálu určující chování v průběhu tisku. Tuto vlastnost lze popsat gelačními metodami a reologickým chováním materiálu. Do jisté míry závisí na interakci mezi substrátem a bio-inkoustem. Vlastnosti jsou určeny hydrofilní nebo hydrofobní povahou roztoku. Samotná adheze mezi materiály a buňkami je ovlivněna povrchovým napětím nosného materiálu. Během tisku konstrukce je důležité zajistit správné povrchové napětí s cílem udržet velké kontaktní úhly smáčení se substrátem. Tisknutelnost je důležitý parametr pro výběr vhodné metody tisku, jedná se především o viskozitu systému a metodu síťování materiálu. Současné technologie bio-tisku jsou z negativních průchozích jevu při tisku, omezeny pouze na kapalné nebo polotekuté materiály. Je tedy nutné správně řídit kinetiku síťování těchto roztoků. V úvahu připadají polymerní roztoky, které jsou schopny foto nebo chemicky síťovací materiály.^{83,84,90,106,107}

Vaskularizace, tvorba cévní sítě, se řadí mezi důležité faktory zabraňující tkáňové smrti. Souvisí i transportem živin a kyslíku. Většina vzniklých vaskularizačních sítí byla vytvořena z termoplastických materiálů, které jsou rozpustné ve vodě (cukr, vinylalkohol). Významným faktorem podporující vaskularizaci je heterogenita systému. Heterogenita systému je parametr související se zajištěním správné prostorové orientace biologických struktur. Inervace systému zajišťují funkčnost systému a schopnosti vytvoření a propojení nervů.^{83,84,106-108} Tepelná stabilita je parametr určující možnost tisku daného materiálu, nesmí dojít k porušení materiálu při zvýšené teplotě v průběhu tisku.^{90,108}

5.1.2 Bio-inkousty

Bio-inkousty jsou materiály složené z mnoha komponent určeny k bio-tisku. Obvykle je tvořen buněčným materiálem, aditivy (růstové faktory, biologické signální molekuly), v neposlední řadě podpůrným lešením. Vlastnosti bio-inkoustu a jeho složení se odvíjí od požadované aplikace a metody tisku.^{7,22} Nastavené parametry v průběhu tisku, jako jsou rychlost a teplota ovlivňují přežití buněk umístěné v bio-inkoustu. V případě použití příliš vysokých teplot pro snížení viskozity systému a zajištění lepší tisknutelnosti, by mohlo dojít k úmrtí buněk. Stejně je tomu i v případě příliš vysokého mechanického namáhání v průběhu tisku. Po vytisknutí by měl bio-inkoust podstoupit rychlou gelaci,

tak aby došlo k minimálnímu ovlivnění životaschopnosti buněk a nedošlo k zhroucení a ztráty tvaru.^{22,109}

5.1.3 Polymerní materiály a hydro-gely pro bio-tisk

Polymerní materiály jsou velké makromolekuly složené z mnoha opakujících se jednotek monomerů vázané kovalentními vazbami. Počet opakujících se jednotek v řetězci je dán polymeračním stupněm nebo délkou řetězce. Hydro-gely jsou základní složky pro bio-inkousty určené k bio-tisku. Jedná se o vysoce molekulární materiály, které jsou v přímém kontaktu s buňkami a udržují jejich životaschopnost, podporují růst a proliferaci. Hydro-gely jsou považovány za ideální materiál pro bio-tisk, díky jejich fyzikálním a mechanickým vlastnostem, vysokému obsahu vody (až 99 %) a biologické rozložitelnosti. Hydro-gely jsou schopny nabobtnat, aby zachytili mnohonásobek své původní hmotnosti, tvoří hydrofilní síť. Fyzikální a biochemické vlastnosti silně závisí na jejich složení, metodách použitých pro jejich polymeraci a hustotě vytvořené sítě. Tyto sítě jsou tvořeny fyzikálními (vratnými), chemickými (vratné, nevratné) a biochemickými (nevratné) vazbami. Obecně mají tyto hydro-gely špatné mechanické vlastnosti, které se však dají vylepšit jejich vzájemnou kombinací, síťováním, přidávkem nanočástic, zvyšování koncentrace polymeru. Omezenost mechanické pevnosti je způsobena vysokým obsahem vody ve struktuře, za mechanicky náročných podmínek dochází ke konstrukčnímu selhání hydro-gelu. Existují dva typy polymerního hydro-gelu přírodní a syntetické, v bio-tisku se většinou používají ve vzájemné kombinaci.^{90,110-113}

5.1.3.1 Syntetické polymerní materiály

Syntetické materiály nabízí mnoho výhod, na rozdíl od přírodních polymerních materiálů, které se vyznačují tvorbou vhodného prostředí (ECM). U těchto synteticky připravených lze řídit a přizpůsobit fyzikální vlastnosti (molekulová hmotnost, distribuce monomeru, struktura řetězce, geometrie a větvení) tak, aby vyhovovali konkrétní aplikaci. Obvykle zlepšují biokompatibilitu, biologickou rozložitelnost, mechanické, chemické, tepelné vlastnosti v jejich vzájemné kombinaci za tvorby kompozitu. Patří jsem zejména polyethylen glykol PEG, díky jeho rozpustnosti ve vodě. Z hlediska zastoupení v bio-inkoustech tvoří pouze 3 % materiálu, jelikož není schopen vytvářet chemickou a fyzikální síť pro tvorbu hydro-gelu. Další zástupce syntetických polymerních materiálů je kopolymer laktidu a glykolidu v kruhu PLGA, poly-ethyleoxid PEO, poly-ε-kaprolaktan PCL,

polyvinylalkohol PVA, kyselina polyléčná PLA, methakrylovaný hyaluronan HEMA, polyurethan PU. ^{74,84,90,110,114}

5.1.3.2 Přírodní polymerní materiály

Jedná se o biologicky odvozené materiály, vyskytují se v přírodě a jsou za pomoci fyzikálních nebo chemických metod extrahovatelné. Přírodní polymerní materiály mají významnou vlastnost většina z nich je rozpustná ve vodě. Zejména alginát, želatina, fibrogen, kyselina hyaluronová, kolagen. Tyto materiály mohou být rozpuštěny v kultivačních médiích a fosfátových pufrách, které jsou příznivé pro buňky za vzniku roztoku / hydro-gelu. Mají složení podobné nativním tkáním zejména biologické a fyziologické vlastnosti. ^{90,110,113} Mezi přírodní polymerní materiály pro bio-tisk se řadí proteiny, polysacharidy, glykoproteiny, proteoglykany. Proteiny, taktéž i bio-polymery, mají vysokou molekulovou hmotností. Jsou součástí živého organismu, tvořené aminokyselinami. V našem těle se specializují jako stavební prvky (kolagen, elastin), transportní, obranné, skladovací, zajišťující pohyb. ¹¹⁵ Glykoproteiny obsahují v řetězci navázané sacharidy, kdežto proteoglykany mají v řetězci zabudované glykosoaminoglykany, jejich jádrem v řetězci zůstává protein. Polysacharidy často nepřesně označovány jako cukry, jsou taktéž biopolymerní molekuly. Vyznačující se vysokým počtem monomerních jednotek v řetězci. Vybraní zástupci těchto skupin jsou uvedeny v následujícím diagramu. Přírodních polymerních materiálů existuje celá řada, pouze některé z nich jsou schopny splnit důležité parametry pro bio-tisk. ^{90,110,113}

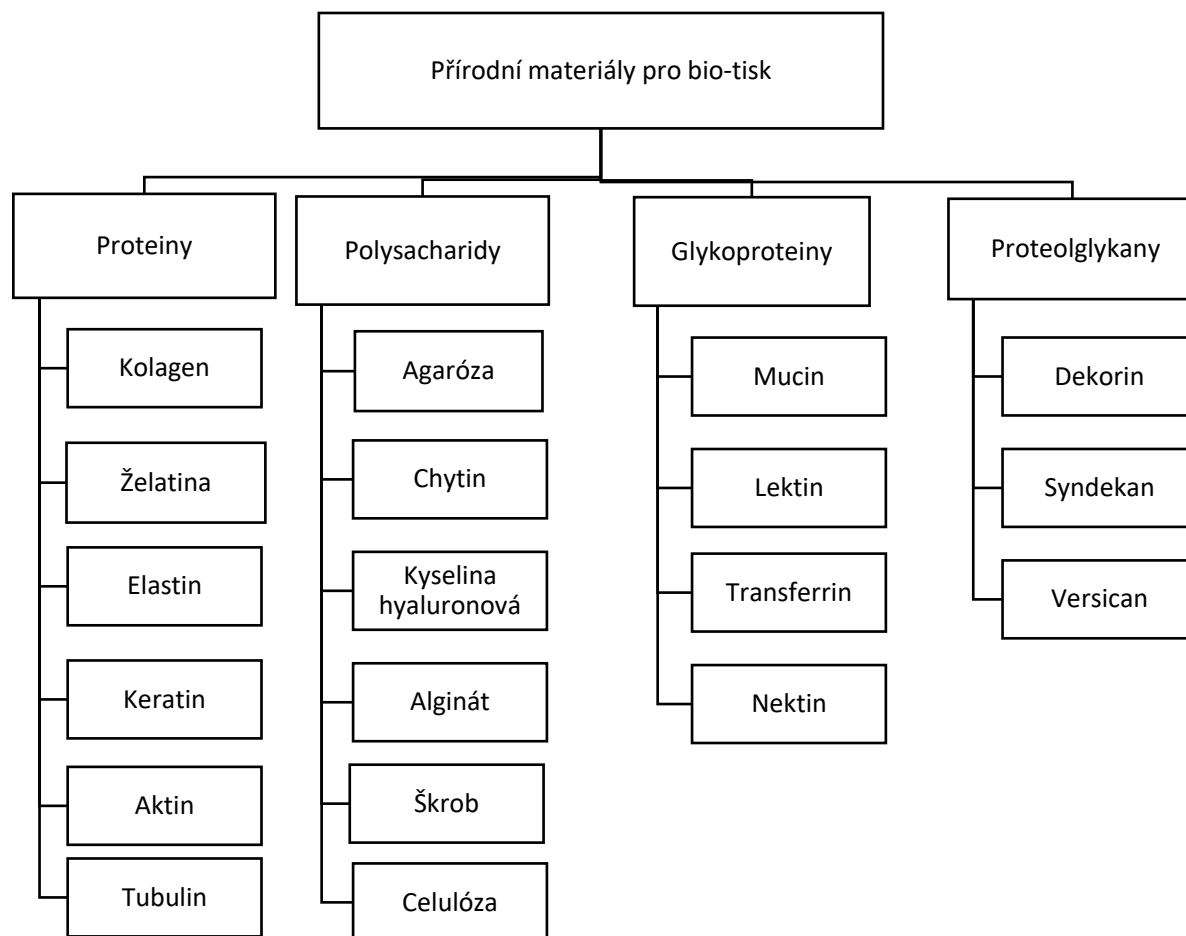
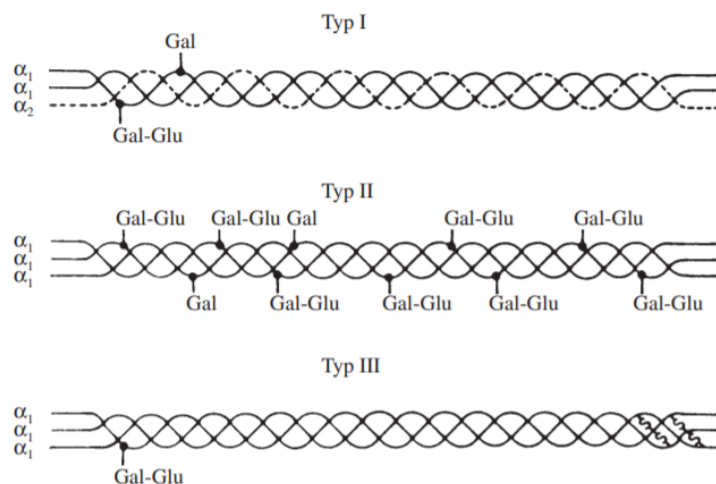


Diagram 4. Přírodní materiály vhodné pro bio-tisk. ^{90,110}

Kolagen

Kolagen je hlavní strukturální složka všech obratlovců, řadí se mezi glykoproteiny. Obsahuje malé množství galaktózy a glukózy. Jedná se o složku kůží, šlach, chrupavek, kostí a pojivových tkání. Kolagen představuje 25 až 30 % bílkovin v těle. Molekula kolagenu nebo kolagenový monomer (tropokolagen) o délce 300 nm, průměru 1,5 nm, s molekulovou hmotností až 300 kDa. Struktura řetězce je tvořena šroubovicovou spirálou složenou ze tří polypeptidových řetězců.^{74,116-118} Obecná aminokyselinová sekvence řetězce kolagenu je Gly-X-Y, kde jednotlivá písmena znamenají glycin, prolin a hydroxyprolin. Jsou zde dále přítomny i další aminokyseliny jako jsou kyselina glutamová, alanin, arginin, kyselina aspariková, lysin, serin, leucin, valin, fenylalanin, threonin, izoleucin, histidin, hydroxylysin, methionin, tyroxin a cystein. Bylo prokázáno, že tepelná stabilita kolagenu souvisí s obsahem aminokyseliny pyrrolidinu. Zatímco hydroxyprolin souvisí se stabilitou

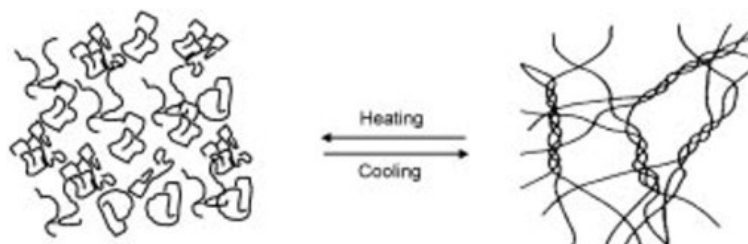
molekuly, díky schopnosti tvorby vodíkových můstků. Spirála je stabilizována za pomoci inter a intra-molekulových vodíkových můstků a kovalentních vazeb. Úplná otočka spirály obsahuje 30 aminokyselinových zbytků.^{74,117,118}



Obr. 18. Schéma kolagenu typu I až III.¹¹⁷

Intenzita síťování kolagenu závisí na typu a jeho původu. Existuje několik typů kolagenu I až V. Kolagen typu I pochází z pojivových tkání, kůží a kostí. Typ II je hlavní složka chrupavky, III má původ ve vaskulárních tkání a střevě.¹¹⁶ Kolagen vykazuje amfoterní chování, to znamená že část postranních skupin je schopna disociace jak v alkalickém, tak v kyselém prostředí. Náboj molekuly se potom mění dle pH prostředí. Izoelektrický bod nativního kolagenu je při neutrálním pH. Kolagen je nerozpustný ve vodě, ale rozpustný v zředěné kyselině nebo solném roztoku, jeho rozpustnost se snižuje s procesem stárnutí (vyskytující se u většiny savců). Tento jev je zapříčiněn zvyšujícím počtem inter a intra-molekulárních vazeb.^{117,118} Kolagen je schopen denaturace (ztráta nativní konformace) vlivem tepelného účinku dojde ke ztrátě nativních vlastností. Produktem je pak želatina. Kritický parametr denaturační teplota, jejichž hodnota je určena obsahem aminoskupin pyrrolidinu. Nad touto teplotou je ztracena veškerá trojitá spirálovitá struktura kvůli porušení vodíkových vazeb, které zajišťují její stabilizaci. Výsledkem je že molekuly kolagenu a vzniklé želatiny existují v roztoku jako helixy a náhodné cívky. Tento proces můžeme vidět na následujícím obrázku, jedná se o vratný děj. Proces probíhá ve dvou fázích první je zborcení spirálovité struktury kolagenu a vytvoření statického klubka, kde jednotlivé řetězce jsou spojeny. Ve druhé fázi dochází k rozpojování těchto makromolekul na tři frakce obsahující řetězce α , β , γ . Řetězce α mají molekulovou hmotnost v rozsahu 90 až 110 kDa jedná se o jeden polypeptidový řetězec. Molekulová hmotnost β

řetězců je výrazně vyšší 180 až 220 kDa díky doposud spojení dvou polypeptidových řetězců, pro γ řetězce, jež nejsou změněny a zůstávají ve stavu statického klubka je molární hmotnost 270 až 300 kDa. Pokud tento roztok ponecháme stát při nižší teplotě dojde k částečné renaturaci, neboli opětovnému vrácení do původního stavu.^{117,118}



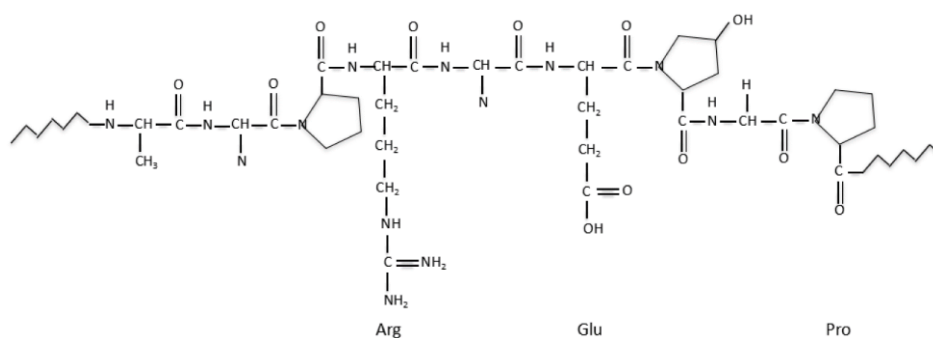
Obr. 19. Denaturace kolagenu (pravá strana) na želatinu (levá strana).¹¹⁸

V posledních letech byl kolagen hojně využíván pro tvorbu scaffoldu v tkáňovém inženýrství. Jedná se o nativní biomolekulu. Zlepšuje adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk na porézním scaffoldu. Velikost vznikajících pórů je v rozsahu 50 až 150 μm . Tisk kolagenových hydro-gelů je závislý na rozpustnosti, teplotě a samotnému pH roztoku. Pro dosažení rozpustnosti kolagenu je nutné pH zvýšit nad hodnotu 7, taktéž je nutné zvýšit i teplotu. Scaffoldy takto připravené se vyznačují dobrou průchodností kanálu umožňující transport živin a kyslíku. Materiálové složení a struktura je schopna gradientu s přínosem vzniku vícero funkcí, a v neposlední řadě je to přímé začlenění buněk. Jejich použití v bioinkoustech je omezeno z důvodu nízké viskozity čistého kolagenu a rychlosti degradace. Změna viskozity a snížení rychlosti degradace lze dosáhnout smícháním s dalšími biopolymery jako je alginát, chytosin, atd.¹¹³ Vlastnosti kolagenu (viskozita systému) lze vylepšit pomocí chemicky síťovacích činidel.⁷⁴

Želatina

Želatina je materiál, který se hojně využívá od potravinářského průmyslu až po obalový průmysl, kosmetický, farmaceutický, medicínský. Díky své široké oblasti použití je jedním s všestranných biopolymerů. Rostoucí zájem o použití želatiny v tkáňovém inženýrství je zapříčiněn mnoha kladnými vlastnostmi jako je biokompatibilita, biologická rozložitelnost, snadnost manipulace a nízké náklady. Za pomoci hydrolytické degradace se od kolagenu (typu I) lze odvodit želatina. Želatina je přírodní protein rozpustný ve vodě, zatímco kolagen, od kterého je odvozena je nerozpustný ve vodě. Hydrolytická degradace

spočívá v rozbití trojité šroubovice polypeptidu kolagenu, ziskem je jedno vláknová molekula želatiny lineárního charakteru. Tímto procesem dojde k výraznému snížení molekulové hmotnosti (100 kDa), způsobené narušením kovalentních vazeb struktury kolagenu. Vlastnosti želatiny silně závisí na vlastnostech kolagenu, od kterého jsou odvozeny.^{71,86,88,116,118,119} Typická vlastnost želatiny je přechod sol-gel, zahřátím dochází k tání gelu (30 až 34 °C) přechod na sol a opětovným chlazením (28 °C) přechodu na gel.¹¹⁷ V chemické struktuře současně obsahuje alkalické a kyselé funkční skupiny aminokyselin, na základě toho je schopna vykazovat amfoterní chování. Postranní řetězce obsahují hydrofilní a hydrofobní aminokyseliny a nabitě skupiny. Hydrofobní a hydrofilní části mají tendenci migrovat směrem k povrchu, dohází tak ke snižování povrchového napětí ve vodných systémech, díky tomu se vytváří nabitý film. Želatina se tudíž řadí mezi povrchově aktivní látky s izoelektrickým bodem 4,8 až 5,5. Aminokyseliny ve struktuře želatiny jsou karboxylové kyseliny s primární aminogrupinou ($-NH_2$). Nejdůležitější jsou RGD (kyselina arginin-glycin-aspartová), GXY (glycin, prolin, hydroxyprolin) a MMP (metaloproteináza) jež podporují připojení buněk. Proto je želatina při bio-tisku využívána, jedná se asi o 10 % z používaných materiálů. Právě přítomnost těchto složek vytváří pro buňky vhodné ECM prostředí. Je nutno podotknout že aminokyselinové sekvence trpí rychlejší degradací. Želatina je považována za velmi čistou formu kolagenu.^{90,109,111,113,119-121}



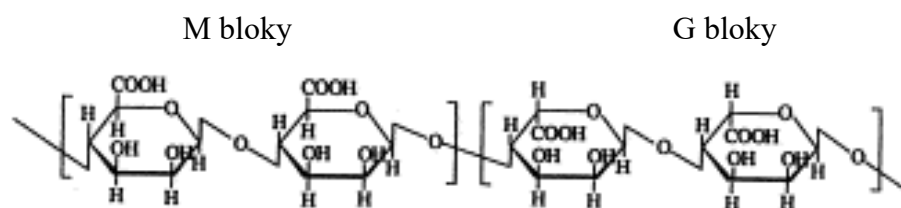
Obr. 20. Schéma vzorce želatiny.¹¹³

Želatina obsahuje mnoho sekvencí aminokyselin celkem jich je 19.^{116,119} Kvalita želatiny pro danou aplikaci vychází z reologických vlastností, fyzikálně chemických (složení, rozpustnost, molární hmotnost, průhlednost, barva, zápach, chuť). Nicméně hlavní parametry definující želatinu jsou pevnost gelu a tepelná stabilita (teplota tání a gelovatění). Standardizovaný test pro charakterizaci pevnosti a tuhost gelu je Bloomův test, probíhá za přesně definovaných podmínek.^{90,118,121} Existují i určité nevýhody hydro-gelu na bázi želatiny. Mezi něž se řadí nízká mechanická pevnost a strukturální nestabilita

za fyziologických podmínek pro buňky jako je teplota 37 °C. Dochází tak k rychlému rozpadu želatinového konstruktu při kultivaci, je to dáno tím, že vytvořené fyzikální síť želatiny se nad teplotou tání 28 °C rozpadají. To vede k úplnému zhroucení struktury. Proto je potřebné u želatinových hydro-gelu použít i jiné síťovací mechanismy, jako jsou chemické nebo biochemické.¹¹³

Alginát sodný

Alginát se řadí mezi lineární polysacharidy (biopolymer), jež se získávají z mořských hnědých řas. Kvalita alginátu závisí na zdroji mořských řas. Alginát se používá komerčně v potravinářství, kosmetickém průmyslu, farmakologické, průmyslu a biomedicíně. Alginát se vyznačuje dobrou biologickou rozložitelností a biokompatibilitou, avšak se vyznačují zhoršenými mechanickými vlastnostmi. Síťování je jedna z cest, jak je vylepšit. Alginát sodný má významné vlastnosti jako je rozpustnost ve vodě, reologické vlastnosti (želatinace, stabilizace disperzí). Vlastnosti se odvíjejí od struktury alginátu. Jeho struktura je tvořena střídavými bloky kyseliny α -l-guluronové (G-blok) a β -d-mannurové (M blok) vázané mezi sebou vazbou 1–4, společně tvoří řetězec. Schéma struktury alginátu lze vidět na následujícím obrázku číslo Vlastnosti alginátu jsou závislé množství obsahující G a M bloků. Pokud jsou vedle sebe dva G-bloky, vzniká tak díra pro navázání dvojmocných kationtů (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+}). Které se následně podílejí na zprostředkování síťovacích reakcí. Molekulární hmotnost alginátu se pohybuje okolo 80 až 290 kDa.¹²²⁻¹²⁶



Obr. 21. Schéma struktury alginátu sodného, tvořeného M a G bloky.¹²⁵

5.1.4 Metody síťování hydro-gelu

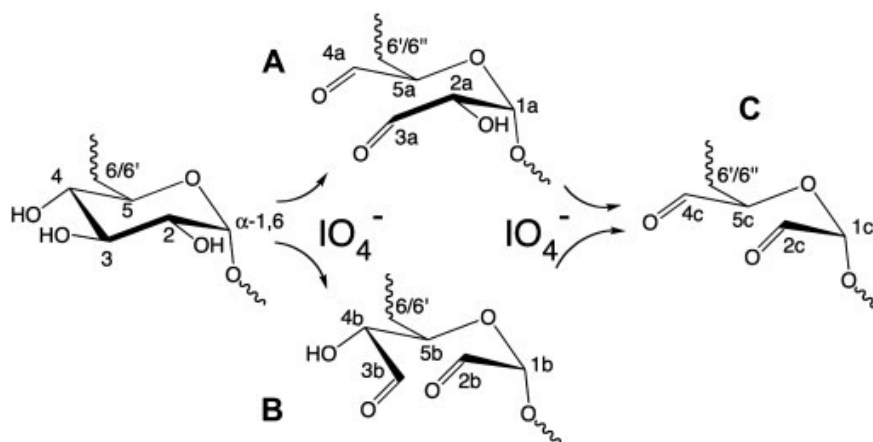
Hydro-gely jako takové nevykazují vhodné mechanické a reologické vlastnosti pro bio-tisk, jedna z možných cest, jak vylepšit jejich vlastnosti je síťování.^{127,128} Vytvořením hustější 3D sítě za pomoci přídavku aditiv (síťovacích činidel) do hydro-gelu je založeno na principech fyzikálních a chemických, jež mohou a nemusí být vratného charakteru. Síťovací reakce jsou založeny na tvorbě pevných formací hydro-gelu, vylepšující

mechanické vlastnosti (pevnost v tahu, tuhost), zajištěním interakcí funkčních skupin (vodíkové, iontové vazby) nebo kovalentních vazeb v polymerních řetězcích. Dále vylepšuje odolnost hydro-gelu vůči enzymatické degradaci a vyšším teplotám. Zesíťovaný hydro-gelu rozšiřuje oblast použití na *in vitro* a *in vivo* aplikace, jelikož zabraňuje rychlému rozpuštění hydro-gelu (polymerní sítě) a dochází tak procesu bobtnání.^{128,129}

Chemicky síťovací gely mohou být připraveny radikálovou polymerizací monomeru o nízké molekulové hmotnosti v přítomnosti síťovacího činidla. Nejčastěji studovaný hydrogelový systém je pHEMA (poly (2-hydroxyethylmethakrylát)) síťovací za pomoci ethylen glykol dimethakrylátu. Dalším systémem umožňující síťovací reakce je zprostředkován za pomoci funkčních skupin jako jsou -NH_2 , -OH , -COOH . Síťování může být zprostředkováno za pomoci aldehydů, adičních reakcí (typu Michael, Schiffova báze), kondenzačními reakcemi. Dále může být použito síťování za pomoci vysoko energetického záření, jako je gama nebo svazek elektronového paprsku. Tato technologie síťování může být nebezpečná pro buňky, jež jsou součástí bio-inkoustů. V neposlední řadě jsou zde zahrnuty i enzymatické reakce. V posledních letech se do popředí dostává technologie tvoření 3D sítě za pomoci fyzikálních vazeb. Pomocí tohoto přístupu je možnost vyloučit síťovací činidla ze systému, jež jsou mnohdy toxická pro buněčné složky. Využívá se zde iontových reakcí s uplatněním vícemocných iontů v případě alginátu se nejvíce používají Ca^{2+} kationty. Dalším zástupcem je proces krystalizace, síťování za vzniku vodíkových vazeb a proteinových reakcí.^{128,129}

5.1.4.1 Síťovací činidlo pro kolagen, želatinu

Síťovací činidla jsou používána u chemicky síťovacích hydro-gelu, existuje jich celá řada. Každý z nich má použití pro daný typ hydro-gelu a použité metody. V případě téhle práce se zaměříme na hydro-gely na bázi proteinů jako jsou kolagen a želatina. Pro tyto hydro-gely může být použit jako síťovací činidlo dextran, nebo spíše jeho oxidovaná forma. Dextran se řadí mezi polysacharidy, jež se vyznačuje přítomností α -1,6 vazeb jež umožňují větvení této molekuly. Sloučenina dextranu lze jednoduše oxidovat přítomností jodistanu IO_4^- ve vodném prostředí za pomoci dialýzy. Jodistan napadá α -1,6 vazby mezi uhlíky C_3 a C_4 nebo C_3 a C_2 . Během reakce dochází k narušení jednoduché vazby mezi uhlíky. Reakce je ukončena etylenglykolu, jež naváže volné zbytky jodistanu. Pro terminaci reakce mohou být využity i jiné sloučeniny. Míra oxidace dextranu je závislá na čase probíhající reakce s jodistanem.^{129,130}



Obr. 22. Schéma oxidace dextransu v pozici α -1,6: (a) C3–C4; (b) C3–C2; (c) dvojitá oxidace.¹³⁰

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Cíle práce

Hlavním cílem diplomové práce je příprava materiálu použitelného pro tvorbu tzv. scaffoldu metodou 3D tisku. Na takový materiál jsou kladeny různé požadavky, např. biokompatibilita (nízká toxicita), biologická rozložitelnost, vhodné reologické vlastnosti (tisknutelnost, síťovatelnost), mechanické a strukturální vlastnosti (pevnost, porozita). Testovanými materiály byly alginát, kolagen a želatina. Připravené materiálové systémy by měly být, zpracovatelné metodou mikro-extruze s využitím pneumatického pohonu, což je jedna ze základních metod bio-3D tisku.

6.2 Alginátové hydro-gely

Kapitola je věnována přípravě hydro-gelu z alginátu, jež by mohl sloužit jako bio-inkoust k bio-tisku. Pozornost je věnována především způsobům síťování alginátu pomocí různých síťovacích činidel, jako jsou chlorid vápenatý a uhličitán vápenatý. Již z teoretické části je patrné, že se jedná o způsob fyzikálního síťování (iontový) s využitím dvojmocných kationtů Ca^{2+} . Hlavní nevýhoda této metody síťování, jež snižuje potenciál tohoto systému k bio-tisku, je vratnost procesu síťování. Daná struktura hydro-gelu je nestabilní a způsobuje zborcení struktury. Další nevýhoda alginátu spočívá v použitých síťovacích činidlech, které jsou pro buňky pravděpodobně toxické a jejich kinetika síťování je příliš vysoká, síťování je prakticky okamžité. Vlivem příliš velké rychlosti gelování a nárustu viskozity dochází k zadržování bublinek vzduchu v hydro-gelech. Přítomné bublinky vzduchu jsou v případě tisku zdrojem nehomogenního toku materiálu. Samotný tisk, již zesíťovaného materiálu je mnohdy nemožný, kvůli vysoké viskozitě systému. V případě přípravy méně viskózního systému, se objevuje jiný problém, a to neschopnost držet tvar, strukturu. Existuje možnost dodatečného síťování po vytisknutí, avšak není realizovatelná pro více vrstvé objekty (dochází k zborcení struktury již při samotném tisku). V úvahu přichází možnost využití speciální tiskové nádoby, směšovač, jež by zajistil smíchání čistého alginátu a síťovacího činidla v průběhu tisku. Nicméně není zajištěno důkladné promíchání a homogenita systému, finanční náklady směšovačů jsou vysoké a jedná se o produkt určený k jednorázovému použití. Z těchto důvodů nebyly nakonec připravené alginátové gely použity při 3D tisku. Alginátové gely byly charakterizovány z hlediska reologického

chování za pomoci rotačního viskozimetru. Reologické křivky se nachází v kapitole věnované výsledkům.

6.2.1 Příprava vzorků

6.2.1.1 Použité chemikálie a jejich popis

Pro přípravu alginátového gelu byly použity následující chemikálie: alginát sodný (Manihi, s.r.o.), síťovací činidla CaCl_2 a CaCO_3 (Sigma-Aldrich), kyselina sírová (Sigma-Aldrich).

6.2.1.2 Přístroje a pomůcky

V rámci přípravy vzorků bylo použito standardní laboratorní sklo, laboratorní váhy s přesností $\pm 0,001$ g, mikro-pipety, mixér.

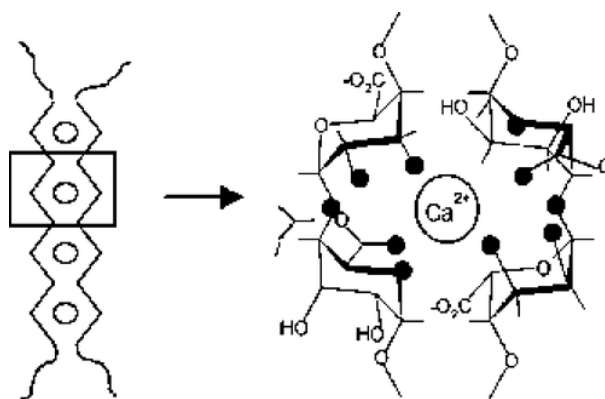
6.2.1.3 Popis přípravy vzorků, průvodních jevů a reakcí

Příprava zesíťovaného alginátového hydro-gelu probíhala ve dvou krocích. První z nich obsahuje přípravu samotného alginátového gelu. Druhý krok spočívá v provedení síťovacích reakcí. Alginát sodný byl navážen s přesností $\pm 0,001$ g na laboratorních váhách. Následně byl rozpuštěn ve vodném prostředí (deionizovaná voda). V případě potřeby osazení alginátového gelu buněčnou kulturou je vhodné pro rozpuštění použít fyziologický roztok. Samotný alginátový gel se rozpouští pomalu, jedna z cest, jak proces urychlit je zvýšená teplota. V rámci této práce nebyla využita, pro důkladnou homogenizaci byl využit mixér. V druhém kroku bylo přidáno síťovací činidlo CaCl_2 nebo CaCO_3 o molaritě 0,1 M nebo 0,01 M. Síťovací činidla byla připravena ve vodném prostředí (deionizovaná voda). Pro usnadnění rozpuštění uhličitanu vápenatého, byl roztok mírně okyselen kyselinou sírovou. Do alginátového gelu bylo přidáno dané objemové množství síťovacího činidla, a následně byly vzorky důkladně promíchány. Samotná síťovací reakce je příliš rychlá a probíhá prakticky okamžitě. V rámci experimentální činnosti byly použity různé objemové množství síťovacích činidel a jejich kombinací. Jako nejperspektivnější byly vyhodnoceny následující kombinace (přídavek síťovacího činidla je uveden v objemových procentech):

- 0,01 M CaCO_3 33 vol%
- 0,01 M CaCl_2 50 vol%
- 0,1 M CaCl_2 9 vol%

- 0,1 M CaCO₃ 9 vol%
- 0,1 M CaCO₃ 5 vol%

Uhličitan vápenatý, jako síťovací činidlo, vykazoval vyšší efektivitu než chlorid vápenatý. Na základě toho byl používán v menších objemových množstvích než chlorid vápenatý. Proces síťovací reakce probíhá následujícím mechanismem. Řetězec alginátu sodného je tvořen glukuronovou kyselinou obsahující sodné ionty, ty jsou během síťovací reakce vyměněny a nahrazeny vápenatými dvojmocnými ionty. Následkem toho vzniká charakteristická struktura popsána modelem „egg-box“. Vápenaté ionty se přednostně váží na bloky kyseliny α -1-guluronové (G-bloky). Bloky se mezi sebou následně spojují za vzniku gelové sítě. Na obrázku uvedeném níže, lze vidět schéma modelu.^{123,124}



Obr. 23. Egg-box model alginátu s vápenatými ionty¹²³

6.3 Hydro-gely kolagenu a želatiny

Jako materiál pro přípravu 3D-tištěných scaffoldu sloužily králičí kolagen, hovězí kolagen a farmaceutická želatina, jež byly síťovány za pomoci oxidované formy dextranu a amoniaku. Příprava oxidované formy dextranu byla popsána v teoretické části. V rámci této kapitoly bude důkladně popsána příprava vzorků. Dále se budeme věnovat procesu a parametrům tisku.^{129,130}

6.3.1 Příprava vzorků

6.3.1.1 Použité chemikálie a jejich popis

Mezi použité chemikálie se řadí kolagen, farmaceutická želatina, 25 % amoniak, síťovací činidlo dextran v oxidované formě, PBS roztok. Používaný druh kolagenu byl typu I. Kolagen byl získán od výrobce Tanex Vladislav a.s., především je určen

pro průmyslové (technické) zpracování. Farmaceutická želatiny (PharmaGrade) byla získána od firmy Noventis s. r. o. s čistotou 98 % a více. Dextran získán od společnosti Sigma-Aldrich o molární hmotnosti 40 kDa. Použité síťovací činidlo dex-ox (oxidovaná forma dextranu) bylo připraveno za pomoci reakcí, jež jsou popsány v teoretické části této práce. Oxidace dextranu probíhala po dobu 4 hodin a byla zakončena přidavkem ethylenglykolu. PBS, fosfátem pufovaný fyziologický roztok, byl získán od výrobce Sigma-Aldrich spol. s r. o. Jedná se o solný roztok na vodní bázi, jež obsahuje fosforečnan sodný a chlorid sodný, jejichž koncentrace v roztoku odpovídá koncentraci iontů v lidském těle. V rámci práce byl využíván jako roztok pro rozpouštění daných chemikálií, jež zajišťuje vhodné prostředí pro buňky. Především se jedná o sterilní roztok se stálou hodnotou pH= 7,4.

131

6.3.1.2 Přístroje a pomůcky

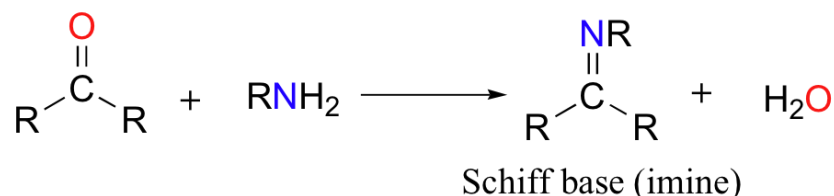
V rámci přípravy vzorků bylo použito standardní laboratorní sklo, laboratorní váhy s přesností $\pm 0,001$ g, stopky, mikro-pipety, sušárny pro temperaci a rozpouštění vzorků, injekční stříkačky, titrační aparatura.

6.3.1.3 Příprava vzorků

V prvních kroku bylo nutné připravit roztoky kolagenu, želatiny a síťovacích činidel. Fyziologický roztok pufr byl používán pro rozpouštění všech zmíněných roztoku pro zajištění stabilního a sterilního prostředí s daným pH= 7,4. Kolagen a farmaceutická želatina se používal v koncentraci 15 % (hmotnostních). Za standardních laboratorních podmínek je zcela nemožné rozpustit tyto komponenty v PBS roztoku. Z tohoto důvodu byla využita zvýšená teplota pro usnadnění rozpouštění. Roztoky želatiny a kolagenu byly ponechány přes noc v sušárně při teplotě 50 °C. Síťovací činidlo dex-ox o koncentraci 2 % (hmotnostních) v PBS roztoku, bylo rozpuštěno při teplotě 30 °C v sušárně, po dobu jedné až dvou hodiny. Připravené roztoky byly dlouhodobě skladovány v lednici, včetně amoniaku a PBS pufru. Vzhledem k povaze kolagenu a jeho dlouhodobé nestabilitě, kde začíná rychle docházet k rozkladu, se pro experimenty používal kolagen o stáří několika málo dní. Kolagen byl z tohoto důvodu připravován v menším objemu vždy pro dílčí experiment.

Poté, co jsou připraveny a rozpuštěny dílčí komponenty, je potřeba před samotným zpracováním provést temperaci na 30 °C. Mírným zahřátím roztoku na zvýšenou teplotu

se usnadní manipulace s roztoky kolagenu a želatiny, které i bez zesíťování vykazují zvýšenou viskozitu. Tímto krokem se usnadní nabírání potřebného objemu do pipety. Pro usnadnění síťovací reakce se temperuje i síťovací činidlo. Roztoky byly temperovány po dobu jedné hodiny, pokud byly vytaženy z lednice. Připravovaný systém se skládá ze složek 15 % kolagen / želatina, 2 % dex-ox a 25 % amoniak. V rámci experimentu byly zafixovány poměry 1; 2; 3 díly kolagen / želatina, 1 díl síťovacího činidla, a nakonec následoval přídavek amoniaku uvedený v množství μl na 1 ml kolagenu / želatiny. Amoniak funguje jako katalyzátor a mírně zvyšuje pH, jelikož v kyselém prostředí probíhá rozkladná reakce. Nevýhoda amoniaku spočívá ve zvyšování toxicity systému, snaha byla používat menší množství (30, 50, 70, 90 μl na 1 ml kolagenu / želatiny). Po přidavku amoniaku a důkladném zamíchání všech složek, začne bezprostředně probíhat síťovací reakce dle následujících rovnic na obrázku, během experimentu byl měřen čas. Mechanismus reakcí probíhá chemickou tvorbou sítě, reakce je známá jako Schiffova báze, podmínkou je přítomnost alifatického či aromatického aminu ($-\text{NH}_2$) a karbonylové sloučeniny ($\text{R}-\text{CO}-\text{R}$), probíhající reakce je nukleofilní adice. Vznikajícím produktem je imin, sloučenina je stabilní díky kovalentním vazbám. Tato reakce je znázorněna na následujícím obrázku. Zdrojem aminoskupiny je kolagen / želatina a karbonylové sloučeniny (aldehydu) je oxidovaná forma dextranu.^{132,133}



Obr. 24. Schiffova báze, průběh reakce.¹³³

6.3.2 Proces 3D tisku

Tisk probíhal na 3D tiskárně BIO XTM od společnosti CELLINK. Před samotným tiskem připraveného materiálu je důležité nastavit tiskárnu dle požadovaných parametrů, jež budou podrobně rozebrány níže. Následně se připravený materiál nabere do injekční stříkačky a přemístí se do tiskové hlavy. Umístěním tiskové hlavy do tiskárny je možno zahájit kalibraci tiskárny a posléze samotný tisk.

6.3.2.1 Tiskárna BIO X™

Tiskárna pracuje v režimu extruzním (vytlačovacím) a DOD (drop on demand). Vyznačuje se mnoha výhodami, mezi něž se řadí možnost tisku materiálu ze tří tiskových hlav současně, tlakový rozsah až 700 kPa, přesností tisku 1 μm , teplotním rozsahem použití 4 až 250 $^{\circ}\text{C}$ pro tiskové hlavy a podložku 4 až 60 $^{\circ}\text{C}$. Na následujícím obrázku je vidět tiskárna, jejíž konstrukce je tvořena komorou (1), třemi pozicemi pro tiskové hlavy (2), podložkou s možností ohřevu/chlazení (3), dotykovou obrazovkou (4), pohonným systémem obsahující kompresor (5), mezi další komponenty patří např. teplotní a tlaková čidla.¹³⁴



Obr. 25. Bio-tiskárna BIO X™ (levá strana) a tiskové hlavy (pravá strana).¹³⁴

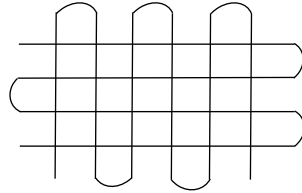
Takzvané inteligentní tiskové hlavy jsou měnitelné dle výběru, patří jsem tiskové hlavy jako je extruzní pneumatická, elektromagnetická DOD, pneumatická s kontrolovanou teplotou, extruzní s pístovým pohonem, termoplastická, foto-sít'ovací a hlava s HD kamerou. Tisková hlava se vybírá dle vlastností zpracovávaného bio-inkoustu a požadavků, jež budou kladeny na scaffold.¹³⁴

6.3.2.2 Parametry tisku

Během tisku lze nastavit mnoho parametrů jež mají významný vliv na vlastnosti vytištěného scaffoldu, patří jsem výběr tiskové hlavy a průměr trysky, tiskové podložky (mikroskopické sklíčko, Petriho miska), tvaru, jež bude tištěn (obdélník, válec, model orgánu), typ mřížky, hustota plnění materiálu (doporučený rozsah 5 až 25 %), rychlost tisku, tlak při tisku s možností zapnutí externí pumpy, výška tištěné vrstvy a základny.

Pro tisk byla využita pneumatická tisková hlava o objemu 3 ml o průměru použité trysky 0,41 mm. Tištěným tvarem byl obdélník o rozměru 10×10×3 mm s typem mřížky rectilinear (obrázek číslo 26). Hustota plnění mřížky byla 15 až 20 %. Byla zvolena rychlost

tisku 3 mm/s, tlak byl v průběhu tisku proměnný s možností zapnutí externí pumpy. Výška jednotlivých vrstev činila 0,6 až 0,8 mm se základnou 66 % (materiálu).



Obr. 26. Mřížka typu rectilinear.

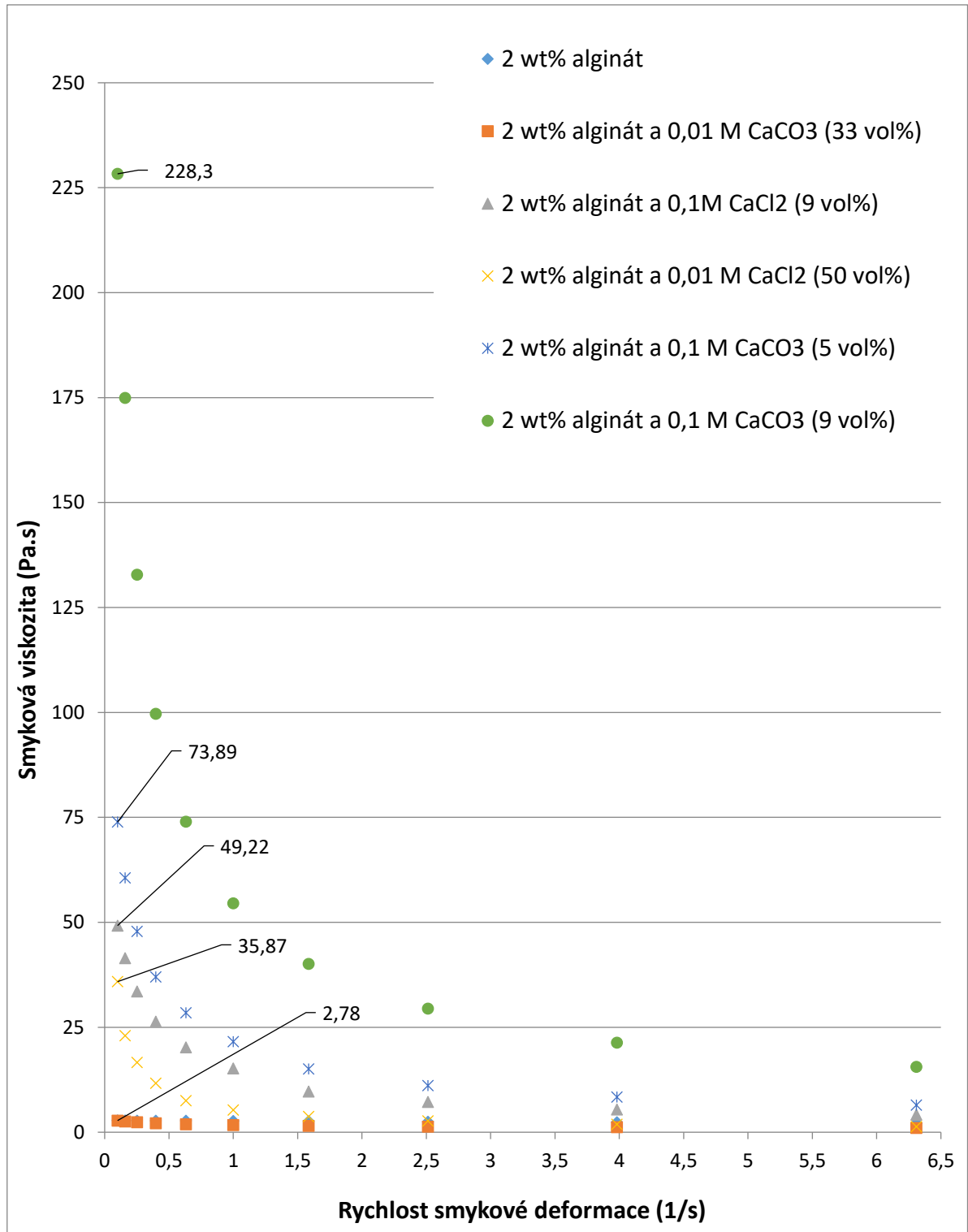
7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Alginátové hydro-gely

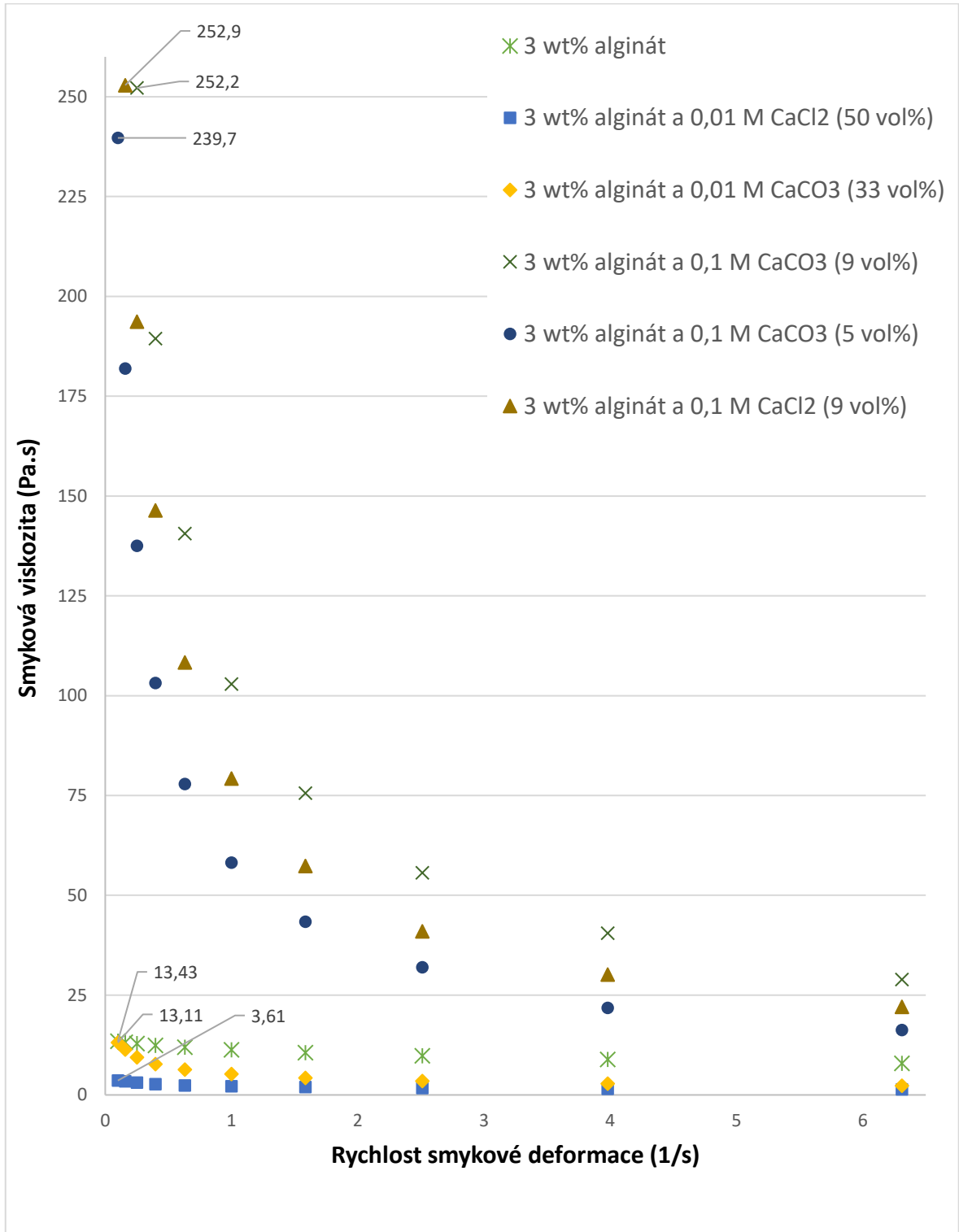
Připravené hydro-gely alginátu byly charakterizovány z hlediska reologických vlastností na rotačním viskozimetru, geometrie válec-válec při teplotě 25 °C. Vzorky byly připraveny jeden den před testováním. Zesíťované vzorky alginátu o koncentraci 2 a 3 % (hmotnostních, wt.) pomocí 0,1 a 0,01 M síťovacích činidel CaCl_2 a CaCO_3 , budou následně srovnány z hlediska reologického chování (smyková viskozita v závislosti na rychlosti smykové deformace). Pro větší přehlednost jsou kompletní grafy umístěny samostatně v Příloze 2. a 3.

Na následujících grafech číslo 1. a 2. jsou znázorněny počáteční trendy při měření závislosti smykové viskozity na rychlosti smykové deformace. Princip popsání vzorků bude vysvětlen na následujícím příkladu: 2 wt% alginát a 0,01 M CaCO_3 (33 vol%). Zkratka *wt* znamená údaj v hmotnostních procentech, *vol* v objemových procentech. Popisek znamená, že připravený hydro-gel alginátu o hmotnostním zastoupení 2 %, byl smíchán se síťovacím činidlem o dané molaritě, v uvedeném objemovém množství. Stejným principem jsou popsány i následující vzorky.

Graf 1. Závislost smykové viskozity na rychlosti smykové deformace pro hydro-gel 2 wt% alginátu síťovaného pomocí 0,1 a 0,01 M CaCl₂, CaCO₃.



Graf 2. Závislost smykové viskozity na rychlosti smykové deformace pro hydro-gel 3 wt% alginátu síťovaného pomocí 0,1 a 0,01 M CaCl₂, CaCO₃.



Z grafické závislosti číslo 1. a 2., znázorňující smykovou viskozitu η na rychlosti smykové deformace $\dot{\gamma}$, je patrné pseudoplastické chování hydro-gelu. Pseudoplasticita materiálu se vyznačuje poklesem smykové viskozity s rostoucí hodnotou smykové deformace.

Graf číslo 1., potvrzuje že nejtuzší systém (zesíťovaného hydro-gelu) je kombinace 2 wt% alginátu společně s 0,1 M CaCO_3 (9 vol%), počáteční viskozita dosahuje hodnot $\eta = 228$ Pa.s. Dále následuje stejná kombinace, s použitím menšího množství síťovacího činidla (5 vol%) s viskozitou okolo $\eta = 74$ Pa.s. Kombinace 2 wt% alginátu s 0,1 M CaCl_2 (9 vol%) dosahovala počáteční smykové viskozity $\eta = 49$ Pa.s, pro stejné síťovací činidlo o nižší molaritě 0,01 M a větším množstvím zastoupení ve vzorku (50 vol%), se počáteční hodnota smykové viskozity pohybovala okolo $\eta = 36$ Pa.s. Nejnižší smykovou viskozitu systému vykazovala kombinace 2 wt% alginátu s 0,01 M CaCO_3 (33 vol%) a samotný 2 wt% alginát, jež není zesíťovaný. Počáteční hodnota smykové viskozity pro obě kombinace se pohybuje okolo $\eta = 3$ Pa.s. Pro tyto kombinace se smyková viskozity v závislosti na rychlosti smykové deformace výrazně nemění, tak jako u jiných kombinací.

Graf číslo 2., kde je zobrazena závislost reologického chování pro 3 wt% alginátového hydro-gelu. Systémy s nejvyšší hodnotou smykové viskozity $\eta = 252$ Pa.s, činila kombinace s 0,1 M CaCO_3 a CaCl_2 (9 vol%). Smyková viskozita, klesá nepatrně pro stejný systém 0,1 M CaCO_3 s menším množstvím síťovacího (5 vol%) činidla, dosahuje hodnot $\eta = 240$ Pa.s. Můžeme si povšimnout stejného trendu i u grafické závislosti číslo 1. Nezesíťovaný alginátový hydro-gel a síťovaný 0,01 M CaCO_3 (33 vol%) s podobnou počáteční hodnotou $\eta = 13$ Pa.s. Poslední kombinace 0,01 M CaCl_2 (50 vol%) výrazně snížila smykovou viskozitu systému vůči nezesíťovanému alginátu na $\eta = 3$ Pa.s.

Z následujících dat získané z grafických závislostí je patrné, že molarita síťovacího činidla má výrazný vliv na viskozitu systému a tvorbu sítě. Čím vyšší molarita v tomto případě 0,1 M. Tím rychleji a snadněji se vytváří síť. S tím roste i hodnota smykové viskozity. Dále vyplývá, že pokud použijeme síťovací činidlo o vyšší molaritě, klesá spotřeba neboli použité množství síťovacího činidla. Jak již bylo zmíněno, síťovací činidla CaCl_2 a CaCO_3 jsou pro buňky a jejich kultury toxická. S rostoucí hodnotou molarity, roste i množství přítomných vápenatých kationtů a zbytkových aniontů, jež zprostředkovávají síťovací reakci. Zvyšuje se tak toxicita systému (Cl^- a CO_3^{2-}), dále se urychluje kinetika síťovací reakce. Roste potenciál příliš rychlého nárůstu viskozity systému a větší množství

bublin vzduchu v hydro-gelu, které způsobují v případě tisku nehomogenity, vytištěné konstrukty jsou obtížně reprodukovatelné. Naopak pokud použijeme síťovací činidlo o nižší molaritě 0,01 M, výrazně roste jeho spotřeba. V porovnání hodnot smykových viskozit s vyšší molaritou, dochází ke snižování viskozity. Z toho plyne, že takové systému nejsou schopny udržet tvar ani strukturu. Zároveň je třeba podotknout, že pokud by bylo použito příliš velké množství síťovacího činidla, dojde k naředění systému a snížení viskozity. Následující trend je patrný v grafické závislosti číslo 2. Alginát 3 wt% v kombinaci s 0,01 M CaCl_2 (50 vol%) a CaCO_3 (33 vol%), vykazuje nižší viskozitu než nezesíťovaná alginátový hydro-gel. Z grafické závislosti číslo 2, pro kombinace 3 wt% alginátu, je trend rozdílných molárních síťovacích činidel jasně patrný. Pro použité 0,1 M síťovací činidlo v kombinaci s alginátem vykazuje pseudoplastické chování. Kdežto u 0,01 M síťovacího činidla, není toto chování natolik výrazné.

Pokud porovnáme daná síťovací činidla CaCl_2 a CaCO_3 mezi sebou, z grafických závislostí 1. a 2., vyplývá následující. Uhličitan vápenatý vykazuje větší účinnost než chlorid vápenatý. Další aspekt ovlivňující hodnoty smykové viskozity systému je procentuální zastoupení samotného alginátu, pro 3 wt% alginát činila počáteční hodnota viskozity 13 Pa.s, zatímco u 2 wt% to bylo méně než 3 Pa.s.

7.2 Bio-tisk

Kapitola bio-tisku se věnuje charakterizaci připravených hydro-gelů na bázi proteinu (kolagen, želatina) a síťovacího činidla. Používané síťovací činidlo dex-ox, jež je oxidovaná forma dextranu, bylo charakterizováno titrací hydroxylamin hydrochloridem. Metoda stanovuje počet aldehydových (oxidovaných) skupin v řetězci dex-ox. Na jejichž základě jsme schopni vyhodnotit míru oxidace dextranu. Jako další charakteristika byla využita spektrální analýza FT-IR. Připravené hydro-gely byly vyhodnoceny z hlediska gelačního mechanismu, jedná se o měření času gelace (vizuální metoda). Následoval samotný tisk materiálu, jako nejlépe vhodný materiál se ukázal kolagen. Vytištěné scaffoldy byly nasnímány pomocí optické kamery. Jako další charakteristika hydro-gelu slouží stanovení porozity systému, swelling testy (test bobtnání). Pro tyto dvě metody je nutné vytištěné scaffoldy lyofilizovat.

7.2.1 Charakterizace síťovacího činidla

7.2.1.1 Titrace pomocí hydroxylamin hydrochloridu

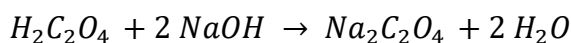
Oxidační stupeň dex-ox lze určit titrací hydroxylamin hydrochloridem. Metoda spočívá rozpuštěním dex-ox nebo dextransu o dané navážce v roztoku 0,25 M hydroxylamin hydrochloridu a následnou titrací 0,25 M hydroxidem sodným NaOH. Příprava 0,25 M HONH₂·HCl (hydroxylamin hydrochlorid) roztoku vyžaduje rozpuštění stejnojmenné komponenty ve vodném prostředí, následuje přidavek methylové oranži a nastavení hodnoty pH roztoku na 4,00. Titrace hydroxidem sodným, roztoku obsahujícího rozpuštění dextransu/dex-ox v 0,25 M HONH₂·HCl, probíhá do hodnoty pH= 4,00. Zjištěné hodnoty spotřeby hydroxidu sodného a jeho koncentrace slouží ke stanovení množství aldehydových skupin na 100 glukózových jednotek, dle následujícího vzorce: ¹³⁵

$$ALS = c_{NaOH} \cdot V_{NaOH} \cdot \left(\frac{M_w}{m_{dex}}\right) \cdot \left(\frac{100}{S}\right) \cdot 10^{-3} \quad (1)$$

Kde ALS je počet aldehydových skupin, c_{NaOH} je skutečná koncentrace NaOH (mol/dm³), V_{NaOH} je spotřebovaný objem při titraci (ml, cm³), M_w je molekulární hmotnost dextransu (44 000 g/mol), m_{dex} je navážka dextransu / dex-ox (g), S je počet glukózových podjednotek v dextransu (222,2). ¹³⁵

Stanovení skutečné koncentrace NaOH:

Skutečná hodnota koncentrace NaOH se stanoví za pomoci titrace 0,1 M kyseliny šťavelové H₂C₂O₄ (10 ml) s indikátorem fenolftalein, do trvalého růžového zbarvení. Probíhající reakce v průběhu titrace:



Dle rovnice víme, že jeden mol kyseliny šťavelové reaguje s dvěma moly hydroxidu sodného. Na základě toho provedeme výpočet, dle rovnice: ¹³⁶

$$n_{NaOH} = 2 \cdot n_{H_2C_2O_4} \quad (2)$$

$$c_{NaOH} \cdot V_{NaOH} = 2 c_{H_2C_2O_4} \cdot V_{H_2C_2O_4} \quad (3)$$

Tab. 2. Naměřené hodnoty spotřeby 0,25 M hydroxidu sodného při titraci 0,1 M kyseliny šťavelové (10 ml).

Číslo měření	Objem NaOH (ml)
1	8,47
2	8,47
3	8,68
4	8,24
5	8,37
Průměr	8,45

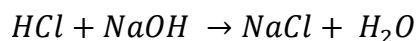
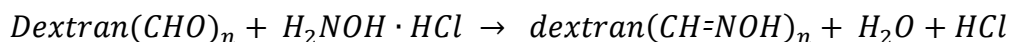
Výpočet skutečné koncentrace NaOH dle rovnice číslo 3:

$$c_{NaOH} = \frac{2 c_{H_2C_2O_4} \cdot V_{H_2C_2O_4}}{V_{NaOH}} = \frac{2 \cdot 0,1 M \cdot 10 ml}{8,45 ml} = 0,2368 M$$

Stanovená skutečná koncentrace NaOH odpovídá 0,2368 mol/dm³.

Stanovení počtu aldehydových skupin:

Navážka dextranu / dex-ox 0,1 g byla rozpuštěna v 25 ml 0,25 M HONH₂·HCl hydroxylamin hydrochloridu po dobu dvou hodin. Připravený roztok dex-ox byl rozdělen na dva díly, navážka je potom 0,05 g v objemu 12,5 ml. Rostok dextranu byl titrován v celém objemu. Následně probíhala titrace hydroxidem sodným o koncentraci 0,2368 M do hodnoty pH= 4,00. Rovnice probíhající reakcí uvedená níže, popisuje reakci hydroxylaminu hydrochloridu v methylenové oranži. Ten začne reagovat s aldehydovými skupinami při pH= 4,00 za produkci polyoxim dextranu.^{135,137}



Tab. 3. Naměřené hodnoty spotřeby 0,25 M NaOH při titraci metodou hydroxylamin hydrochlorid.

	Objem NaOH (ml)	pH (-)
Dex-ox-I	0,00	1,99
	0,84	4,00
Dex-ox-II	0,00	2,01
	0,82	4,00
Dextran-I	0,00	3,82

	Objem NaOH (ml)	pH (-)
	0,10	4,00
Dextran-II	0,00	3,82
	0,08	4,00

Průměrná hodnota spotřeby NaOH pro oxidovaný dextran je 0,83 ml a pro čistý dextran 0,09 ml. Odečtením spotřeby NaOH čistého dextranu od oxidovaného dextranu se zjistí skutečná spotřeba. Do výpočtu je tedy zahrnut i slepý pokus. Spotřeba pro čistý dextran je uvedena na 0,1 g vzorku, pro oxidovaný dextran na 0,05 g vzorku. Pokud zahrneme i slepý pokus, musí se vzít poloviční hodnota spotřeby NaOH při titraci dextranu. Počet aldehydových skupin je vypočten dle vzorce číslo 1.

Počet aldehydových skupin na 100 jednotek:

$$\begin{aligned}
 ALS_{Dex-ox-I} &= c_{NaOH} \cdot V_{NaOH} \cdot \left(\frac{M_W}{m_{dex}} \right) \cdot \left(\frac{100}{S} \right) \cdot 10^{-3} \\
 &= 0,2368 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot 0,83 \text{ ml} \cdot \left(\frac{40\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}}{0,05 \text{ g}} \right) \cdot \left(\frac{100}{222,2} \right) \cdot 10^{-3} \\
 &= 70,76 \text{ na } 100 \text{ jednotek}
 \end{aligned}$$

Počet aldehydových skupin na 100 jednotek, včetně slepého pokusu:

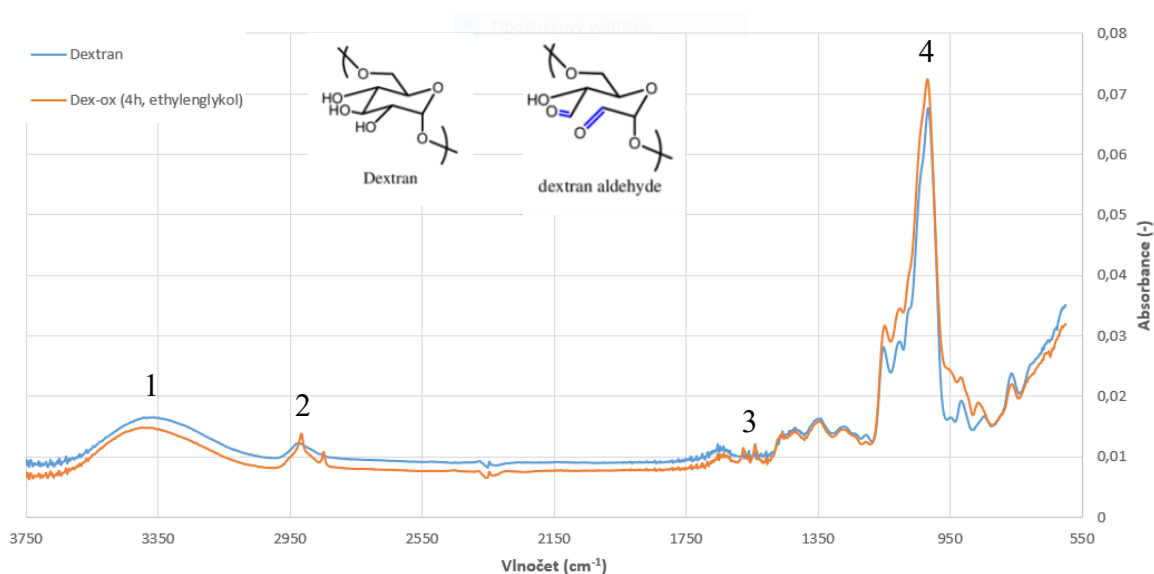
$$\begin{aligned}
 ALS_{Dex-ox-II} &= c_{NaOH} \cdot V_{NaOH} \cdot \left(\frac{M_W}{m_{dex}} \right) \cdot \left(\frac{100}{S} \right) \cdot 10^{-3} \\
 &= 0,2368 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \left(0,83 - \frac{0,09}{2} \right) \text{ ml} \cdot \left(\frac{40\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}}{0,05 \text{ g}} \right) \cdot \left(\frac{100}{222,2} \right) \\
 &\cdot 10^{-3} = 66,93 \text{ na } 100 \text{ jednotek}
 \end{aligned}$$

Oxidovaná forma dextranu (dex-ox), obsahuje 70,8 aldehydových (oxidovaných) skupin na 100 jednotek, jež jsou schopny se účastnit síťovacích reakcí. Pokud budeme chtít zhodnotit míru oxidace dextranu, zahrneme do výpočtu slepý pokus, kde počet aldehydových skupin je 66,93 na 100 jednotek v řetězci dextranu. Můžeme tvrdit, že stupeň oxidace dextranu je 66,93 %.

7.2.1.2 FT-IR

Za pomoci infračervené spektroskopie, byla změřena spektra pro čistý dextran a jeho oxidovanou formu (dex-ox). Použit byl přístroj Nicolet iS5, vybavený germaniovým ATR krystalem. Spektra dextranu a dex-ox jsou znázorněna v Grafu 3.

Graf 3. Grafická závislost absorpance na vlnočtu pro dextran a jeho oxidovanou formu.¹³⁸



Na základě naměřeného IR spektra, můžeme konstatovat následující. Oblast odpovídající hodnotám vlnočtu okolo 3600 až 3000 cm^{-1} , odpovídající označení 1., je valenční vibrace —OH skupin, oblast 2, odpovídá valenčním deformacím —CH skupin. V případě dextranu tato oblast není příliš výrazná, maxima dosahuje při vlnové délce 2923 cm^{-1} . Naopak u oxidované formy, jsou zde viditelné dva ostré pásy 2915 a 2848 cm^{-1} , jež jsou typické pro aldehydy. V oblasti vlnočtů 1720 až 1740 cm^{-1} by měla být valenční deformace C=O typická pro aldehydy. V oblasti není prokázána přítomnost této skupiny, dle některých studií je pravděpodobným důvodem formace na hemiacetal nebo nízký stupeň oxidace.¹³⁵ Pro oxidovanou formu dextranu, se v oblasti 3, 1596 a 1575 cm^{-1} objevují dva píky. Pravděpodobně se jedná o deformační vibrace —CH_2 skupiny. Oblast 4, odpovídající vlnočtu 1018 cm^{-1} je vibrace C—O skupiny pro ether.¹³⁹

Dle změny plochy pod křivkou, pro vybrané oblasti, můžeme prokázat modifikaci dextranu na oxidovanou formu. V oblasti 2996 až 2832 cm^{-1} dochází k nárůstu plochy pod křivkou pro oxidovanou formu dextranu. Objevují se zde dva píky, které jsou typické

pro aldehydy. U vlnočtů v rozsahu 1598 až 1523 cm^{-1} se pro dextran objevuje šum, v případě oxidované formy jsou zde viditelné dva píky. Pro oblasti 1187 až 1130 cm^{-1} a 931 až 883 cm^{-1} dochází u dex-ox poklesu plochy pod křivkou. Uvedené hodnoty jsou v následující tabulce.

Tab. 4. Vyhodnocení plochy pod křivkou pro vybrané oblasti.

Oblast vlnočtů (cm^{-1})	Plocha pod křivkou	
	Dextran	Dex-ox
2996–2832	0,1746	0,2842
1598–1523	-	0,0738
1187–1130	0,2062	0,1782
931–883	0,0963	0,0668

7.2.2 Časy gelace

Pro připravené vzorky hydro-gelu byly měřeny časy tuhnutí a gelace. Za pomoci vizuální metody, probíhajících změn viskozity systému v závislosti na čase. Vlivem síťovacích reakcí začíná docházet k nárůstu viskozity systému a tvorbě zesíťovaného hydro-gelu. Tento systém, jež v čase zvyšuje svoji viskozitu a tuhne je připravený pro tisk. V prvních sekundách až minutách je typickým projevem takzvané tahání vlákna. Následuje přechod kapalného systému na viskóznější formu, schopnost držet tvar a v poslední fázi se jedná o vytvoření tuhého hydro-gelu. Byly měřeny čtyři časy u kolagenu a želatiny o daném poměru (1; 1,5; 2; 2,5; 3) vůči síťovacímu činidlu dex-ox (ethylenglykol, 4h). Množství přidaného amoniaku (30, 50, 70, 90 μl) je uvedeno na 1 ml kolagenu / želatiny. Nutno zdůraznit, že měření časů síťování gelu pomocí vizuální metody je zatíženo mnohými chybami, zejména lidským faktorem. Uvedené časy v tabulkách je třeba vnímat pouze orientačně, sloužící především odhad vhodného systému k tisku.

Tab. 5. Časy gelace pro systém želatina a dex-ox (ethylenglykol, 4h).

Poměr želatina: síťovací činidlo	Množství přidaného amoniaku (25 vol%) na 1 ml želatiny			
	30 μ l	50 μ l	70 μ l	90 μ l
	Čas (minuty) tažení vlákna / přechod na viskóznější formu / držení tvaru / ztuhnutí			
1:1	0,33	0,25	0,25	0,25
	0,67	0,67	0,67	0,67
	0,83	0,83	0,83	0,85
	1,33	1,33	1,33	1,50
1,5:1	0,25	0,20	0,33	0,33
	0,50	0,50	0,67	0,67
	0,75	0,75	1,16	1,16
	1,16	1,33	1,50	1,50
2:1	0,25	0,25	0,25	0,25
	0,42	0,50	0,50	0,50
	0,75	0,75	0,83	0,75
	1,25	1,33	1,33	1,33
2,5:1	0,27	0,30	0,33	0,33
	0,50	0,42	0,58	0,58
	0,75	0,67	1,00	1,00
	1,42	1,33	1,67	1,67
3:1	0,25	0,33	0,50	0,50
	0,50	0,75	0,67	0,75
	0,83	1,33	1,00	1,00
	1,25	1,67	1,50	1,50

Želatina jako materiál schopen samo-gelace, vykazuje čas ztuhnutí okolo pár minut. Již v teoretické části bylo zmíněno, že pro převod na méně viskózní formu je nutné želatinu temperovat nad 28 °C. Pro tento experiment je klíčové, aby byla želatina správně temperována, z důvodu vysoké viskozity nezesíťovaného hydro-gelu. Přídavkem síťovacího činidla a amoniaku lze tento čas tuhnutí želatiny výrazně urychlit, jak lze vidět v tabulce číslo 5. Tvorba zesíťovaného hydro-gelu, byla příliš rychlá. Ve vzorku bylo přítomno velké množství bublinek, jež by v případě tisku narušovaly homogenitu toku materiálu. Porovnáním získaných dat za pomoci vizuálního hodnocení tvorby gelu, zohledněním množství chyb, na něž jsou tyto metody náchylné, je patrné následující. Vliv množství přídavku amoniaku není prokazatelný, uvedené časy nabývají obdobných hodnot. Stejný

závěr je i pro vliv poměru mezi želatinou a síťovacím činidlem. Mezi nejrychlejší systémy se řadí poměr 1,5:1 s přidavkem amoniaku 30 µl na 1 ml želatiny.

Tab. 6. Časy gelace pro systém kolagen (hovězi) a dex-ox (ethylenglykol, 4h).

Poměr kolagen: síťovací činidlo	Množství přidaného amoniaku (25 obj %) na 1 ml kolagenu			
	30 µl	50 µl	70 µl	90 µl
	Čas (minuty) tažení vlákna / přechod na viskóznější formu / držení tvaru / ztuhnutí			
1:1	0,83	0,83	0,58	0,58
	1,83	1,83	1,66	1,50
	2,00	2,00	2,00	2,00
	5,00	5,00	4,50	4,00
1,5:1	0,58	0,50	0,50	0,50
	1,17	1,10	1,10	1,00
	1,42	1,42	1,50	1,50
	2,25	2,20	2,00	2,00
2:1	0,67	0,67	0,67	0,83
	1,83	1,67	1,50	2,00
	2,00	2,00	2,00	2,67
	3,00	3,00	3,00	3,50
2,5:1	0,67	0,67	0,67	0,58
	2,00	1,83	1,83	1,67
	3,00	2,50	2,50	2,30
	5,00	4,50	4,33	4,50
3:1	0,83	0,67	0,67	1,00
	1,67	2,00	2,00	2,00
	2,00	2,50	3,50	3,00
	3,00	4,50	7,00	3,50

V případě síťování kolagenu (hovězi) má přídavek amoniaku významnou roli. Poměry 1:1; 1,5:1 se vyznačující nepatrným urychlením síťovací reakce s rostoucím množstvím amoniaku. Avšak u jiných poměrů jako jsou 2:1; 3:1 se rychlost zpomaluje s rostoucím přidavkem amoniaku. U poměru 3:1 je vidět i trend opětovného zrychlení síťovací reakce. Pokud dané hodnoty budeme vnímat orientačně s ohledem na chyby vznikající lidským faktorem, můžeme konstatovat že funkce amoniaku opět neprokazatelná.

Mezi nejrychlejší systémy tvorby gelu se řadí poměr 1,5:1. Vzhledem k podobnosti daných dat, množství přidaného amoniaku nehraje roli. Za nim ho následuje poměr 2:1. Naopak nejpomalejší systém je v poměru 3:1 s přidavkem 70 μ l na 1ml kolagenu. Větší množství amoniaku výrazně zpomalilo síťovací reakce. Poměry 1:1 a 2,5:1 vykazují obdobné chování.

Tab. 7. Časy gelace pro systém kolagen (králík) a dex-ox (ethylenglykol, 4h).

Poměr kolagen: síťovací činidlo	Množství přidaného amoniaku (25 obj %) na 1 ml kolagenu			
	30 μ l	50 μ l	70 μ l	90 μ l
	Čas (minuty) tažení vlákna / přechod na viskóznější formu / držení tvaru / ztuhnutí			
1:1	0,83	0,75	0,67	0,63
	1,83	1,50	1,33	1,25
	2,33	1,83	1,75	1,75
	3,50	3,00	2,67	2,50
1,5:1	0,83	0,67	0,67	0,67
	1,83	1,25	1,00	0,87
	2,50	1,33	1,25	1,00
	4,00	3,00	2,50	2,50
2:1	0,75	0,58	0,50	0,50
	1,33	1,25	1,00	1,17
	1,83	1,67	1,67	1,67
	3,50	3,33	3,00	3,00
2,5:1	0,58	0,50	0,42	0,50
	1,33	1,00	0,83	1,00
	1,67	1,25	1,33	1,50
	3,50	2,50	2,50	3,00
3:1	0,67	0,67	0,58	0,67
	1,50	1,17	1,00	1,50
	2,00	1,67	1,50	2,50
	4,00	2,50	2,00	3,00

Mezi naměřenými daty pro kolagen typu králík může být vliv poměru a přidavku amoniaku opět zpochybnitelný, vzhledem k metodě provedení. V případě poměrů 1:1; 1,5:1; 2:1; 3:1 funkce amoniaku spočívá v mírném zrychlování síťovací reakce s rostoucím množstvím přidavku amoniaku. Naopak u poměru 2,5:1 je znatelné zpomalení u přidavku

90 μ l na 1 ml kolagenu. Jednotlivé poměry se mezi sebou s ohledem na množství přidaného amoniaku výrazně neliší.

Pokud srovnáme všechny připravené systémy želatina, kolagen typu hovězí a králík, můžeme konstatovat, že želatina se řadí mezi nejrychleji síťovací systémy. Zároveň je nejméně vhodná k bio-tisku, jelikož síťuje příliš rychle. Pravděpodobně příprava takového systému na tisk je obtížnější, zároveň obsahuje příliš velké množství bublinek, které mohou být v případě tisku zdrojem nehomogenního toku a distribuce buněk. Pokud porovnáme kolagen, dle jednotlivého typu původu králík a hovězí, není mezi daty zásadní rozdíl.

7.2.3 Bio-tisk hydro-gelu

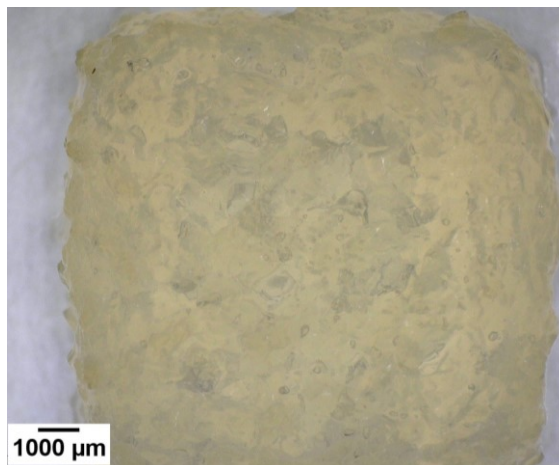
Připravené želatinové gely nejsou příliš vhodné k tisku, jedná se především o množství bublinek vzduchu. V průběhu tisku by narušovali homogenitu. Samotný bio-tisk se zaměřuje pouze na kolagen hovězího a králičího typu. Příprava bio-inkoustu pro tisk spočívala v smíchání kolagenu a síťovacího činidla v daném poměru s přídavkem amoniaku (30 μ l na 1 ml kolagenu). Výsledná směs byla v injekční stříkačce umístěna do tiskové hlavy 3D tiskárny.

7.2.3.1 Zjišťování vhodných parametrů tisku

Pro úspěšný tisk je potřeba mít připravený bio-inkoust s vhodnou kinetikou síťování a požadovanými vlastnostmi (zejména mechanické a reologické). Nicméně pro přípravu vhodné struktury scaffoldu to nemusí být dostatečné. Svou roli hraje i samotný proces tisku a nastavení jeho parametrů. Cílem práce je najít nejlepší kombinaci nastavení parametru tisku. Experimenty byly prováděny na kolagenu hovězího typu pro poměry 1:1 se síťovacím činidlem dex-ox, přídavkem amoniaku 30 μ l na 1 ml kolagenu. Mezi stálé a neproměnné parametry tisku patří pneumatická hlava s objemem 3 ml, model 10 \times 10 \times 3 mm, mřížky typu rectilinear (dle obr. 26), jehla o vnitřním průměru 0,41 mm, rychlost tisku 3 mm/s. Hustota plnění, výška jedné vrstvy, tlak a čas jsou sledované parametry tisku.

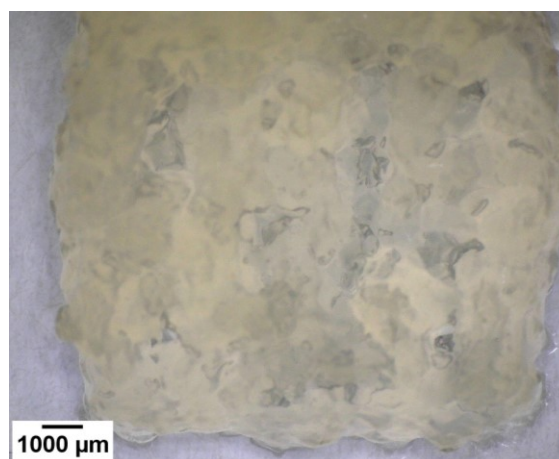
Jako nastavené parametry pro první výtisk byly použity při tlaku 200 kPa, v čase probíhající síťovací reakce 5 minuta, s hustotou plnění 20 % a výškou vrstvy 0,6 mm. Vytištěný scaffold lze vidět na obrázku číslo 27. Během tisku tryska zasahovala do již vytištěné konstrukce a narušovala tvar mřížky. Díky tomu zde nejsou vidět mezery

v mřížce, další příčinou může být příliš vysoká hodnota tlaku a nízká pevnost hydro-gelu, jež měl tendenci se roztékat.



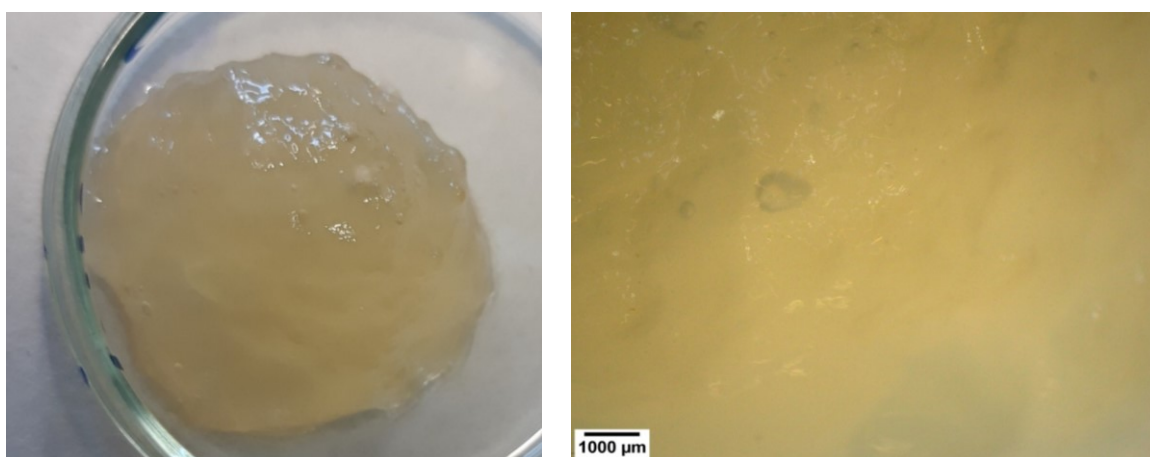
Obr. 27. Vytištěný scaffold pro kolagen typu hovězí s dex-ox v poměru 1:1, parametry tisku: 20 % hustota plnění, tlak 200 kPa v čase 5 min probíhající síťovací reakce, výška vrstvy 0,6 mm.

Snížením hustoty plnění na 15 % se ovlivní množství vytékajícího materiálu a zvýšením výšky vrstvy na 0,8 mm. Lze eliminovat zasahování tiskové jehly do již vytištěné konstrukce. Vzorek byl tištěn v 5 minutě síťující reakce při tlaku 200 kPa. Dle obrázku lze vidět přítomnost mezer, jež by měly být charakteristické pro daný typ mřížky. Lze usoudit na nízkou pevnost gelu a menší tendenci držet tvar, použitý tlak je také příliš vysoký.

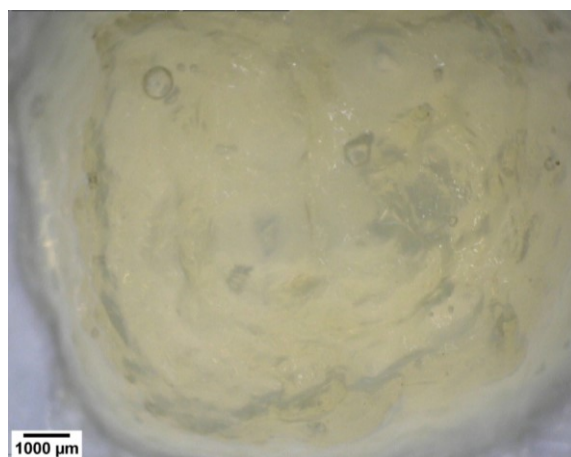


Obr. 28. Vytištěný scaffold pro kolagen typu hovězí s dex-ox v poměru 1:1, parametry tisku: 15 % hustota plnění, tlak 200 kPa v čase 5 min probíhající síťovací reakce, výška vrstvy 0,8 mm.

Pokud zafixujeme hustotu plnění 15 % a výšku vrstvy 0,8 mm, můžeme sledovat vliv parametru jako je tlak v čase probíhající síťovací reakce. Dle mnohých experimentů je lepší tisknout až po 15 minutě probíhající síťovací reakce, gely se vyznačují vyšší pevností. Tlak při tisku je klíčový parametr, ovlivňující vlastnosti připraveného scaffoldu. Příliš vysoký tlak má vliv na pevnost gelu. Vytištěný konstrukt nedrží tvar a dochází k úplnému zborcení struktury, viz obrázek číslo 29. Snížením tlaku na hodnotu odpovídající 120 kPa v 15 minutě probíhající síťovací reakce lze získat následující vytištěnou konstrukci, jež je vidět na obrázku číslo 30. Snížením tlaku se zamezí roztečení gelu, ale naopak se zde objevuje jiný problém, spočívající ve snížené adhezi kolagenu k substrátu (Petriho miska), na němž je tisknut. Z obrázku je patrné, že okraje jsou zaoblené, jednotlivé vrstvy jsou vůči sobě posunuté, jelikož kolagen neměl tendenci ulpívat na substrátu ale táhnout se za tryskou. Prodloužením časového úseku síťovacích reakcí, dle reologie je gel výrazně pevnější a drží tvar.



Obr. 29. Vytištěný scaffold pro kolagen typu hovězí s dex-ox v poměru 1:1, parametry tisku: 15 % hustota plnění, tlak 230 kPa v čase 15 min probíhající síťovací reakce, výška vrstvy 0,8 mm.



Obr. 30. Vytisknutý scaffold pro kolagen typu hovězí s dex-ox v poměru 1:1, parametry tisku: 15 % hustota plnění, tlak 120 kPa v čase 15 min probíhající síťovací reakce, výška vrstvy 0,8 mm.

7.2.3.2 Hovězí kolagen

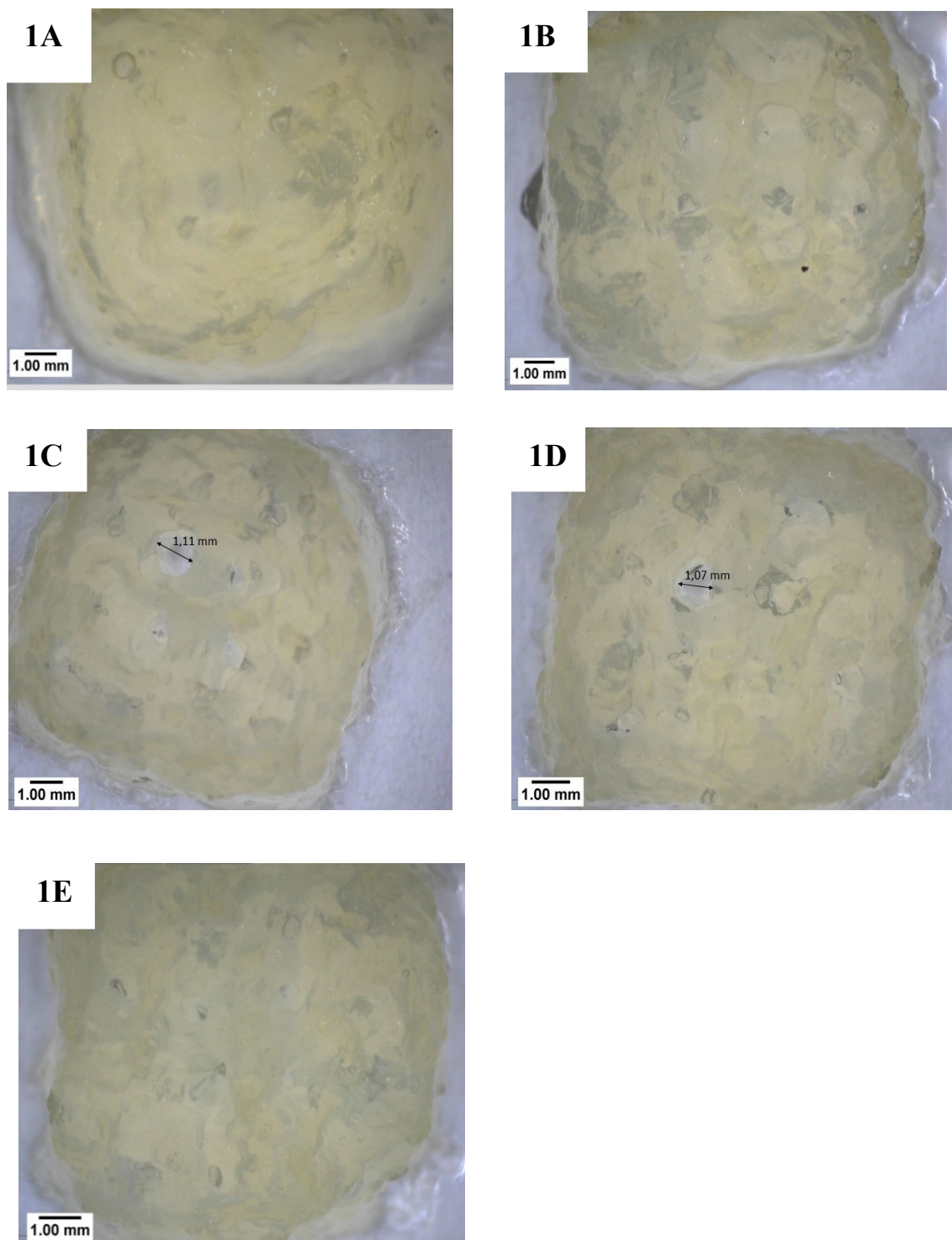
V následující části budou porovnány jednotlivé poměry kolagenu vůči síťovacímu činidlu, dle parametrů tisku, jež byly experimentálně zjištěny. Nastavené parametry tisku: pneumatická hlava s objemem 3 ml, model mřížky 10×10×3 mm, vrstva mřížky rectilinear, jehla 0,41 mm, rychlost tisku 3 mm/s, hustota plnění 15 %, výška jedné vrstvy 0,8 mm se základnou 66 %. Přídavek amoniaku (25 %) činil 30 μl na 1 ml kolagenu. Proměnný parametr je tlak a čas probíhající síťovací reakce.

a) Poměr 1:1

Tab. 8. Nastavený tlak při tisku hovězí kolagen v čase pro poměr 1:1.

Čas (min)	Tlak (kPa)	Označení
15	120	1A
20	120	1B
25	120	1C
30	130	1D
35	130	1E

Vytisknuté scaffoldy jsou znázorněny na obrázku číslo 31. Dle výsledků je patrné následující. Charakteristické díry pro tisk jsou viditelné pouze v případě obrázku 1C a 1D. u všech ostatních došlo k jejich splnutí vlivem roztečení materiálu, špatného držení tvaru, popřípadě vlivem tisku. Během tisku docházelo k opakovanému zasahování tiskové jehly do struktury.

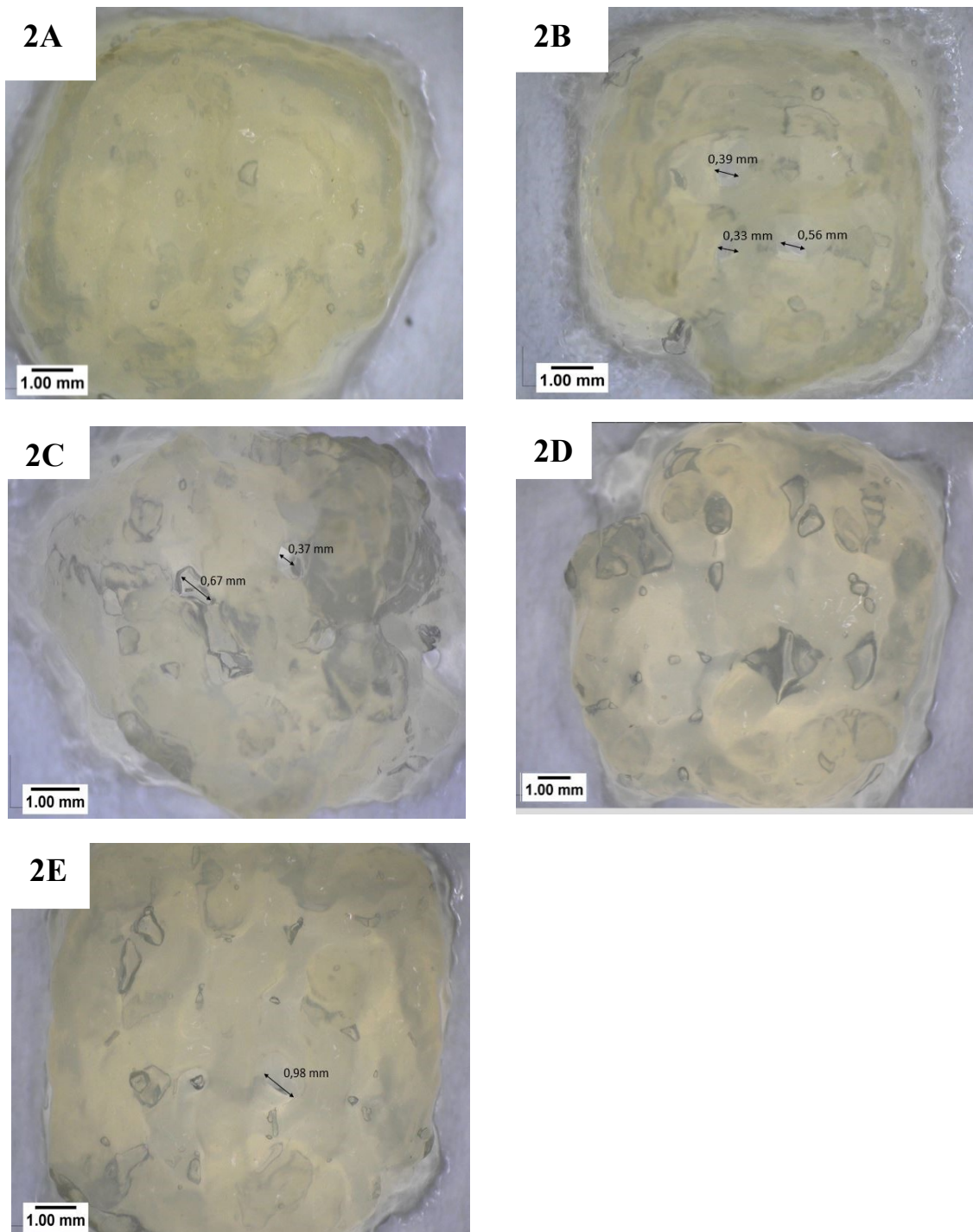


Obr. 31. Vytištěný scaffold pro hovězí kolagen s dex-ox v poměru 1:1, parametry tisku pro: (1A) 120 kPa, 15 min.; (1B) 120 kPa, 20 min.; (1C) 120 kPa, 25 min.; (1D) 130 kPa, 30 min.; (1E) 130 kPa, 35 min.

*b) Poměr 2:1**Tab. 9. Nastavený tlak při tisku hovězího kolagenu v čase pro poměr 2:1.*

Čas (min)	Tlak (kPa)	Označení
15	110	2A
20	110	2B
25	160	2C
30	160	2D
35	160	2E

Objevují se zde stejné problémy jako u poměru 1:1, mezi něž se řadí zasahování tiskové jehly do již vytištěné konstrukce. Na obrázky 2C lze vidět i projevy nízké adheze kolagenu k tiskové podložce, které se prokazují nepravidelnými okraji. Charakteristické díry pro mřížku lze vidět na obrázku 2B, 2C, 2E. Vytlačovací metoda se vyznačuje problémy, jako je např. možnost ucpání tiskové jehly. Pokud se důkladně podíváme na použité hodnoty tlaku, zjistíme, že v případě tisku nad 25 minutou, dochází k výraznému nárůstu tlaku. Tento negativní důsledek je způsoben opakovaným používáním tiskových jehel, jejich mírnému zanesení a rostoucím rizikem ucpání. Potřebný tlak pro vytlačení materiálu se musí zvýšit.



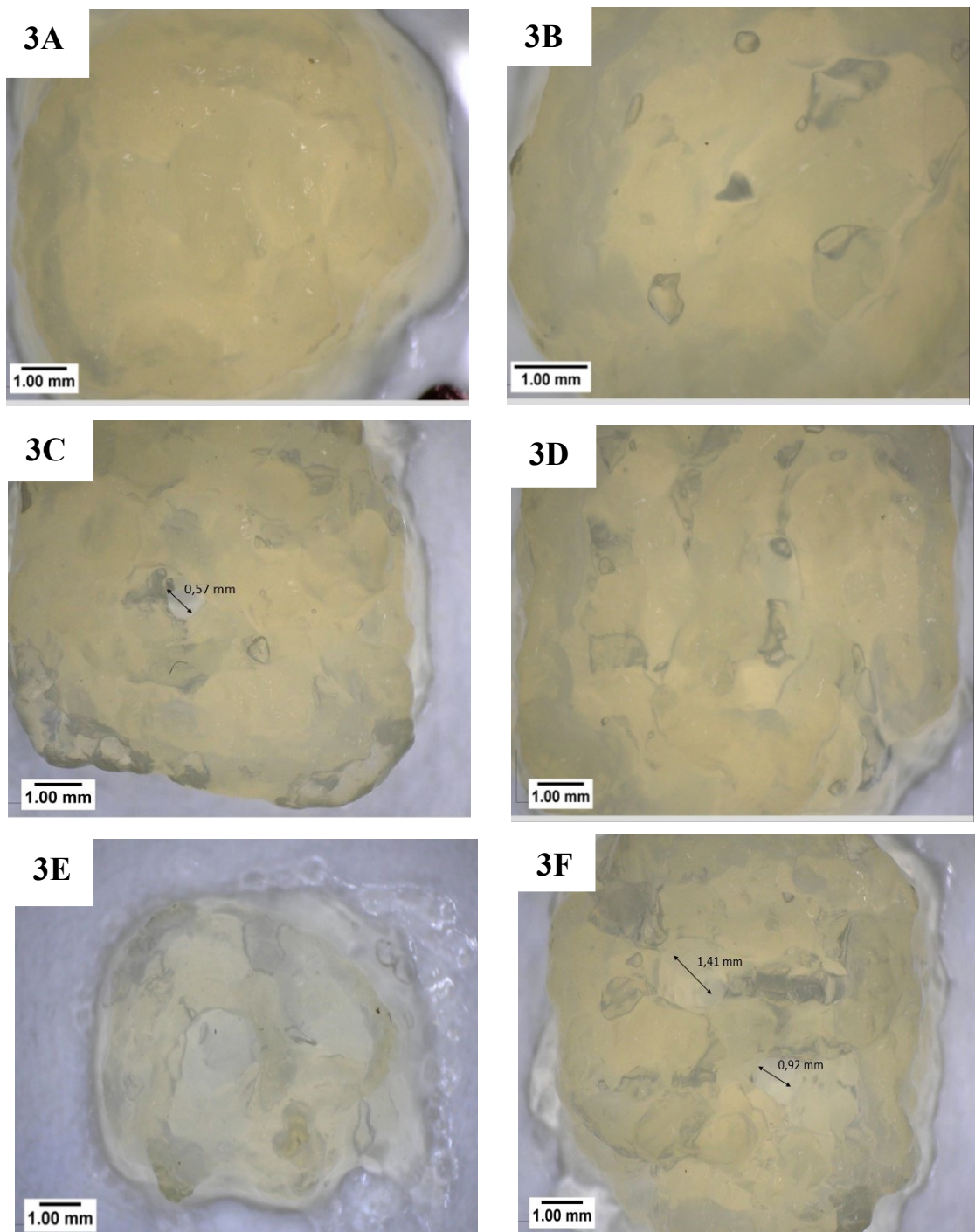
Obr. 32. Vytištěný scaffold pro hovězí kolagen s dex-ox v poměru 2:1, parametry tisku pro: (2A) 110 kPa, 15 min.; (2B) 110 kPa, 20 min.; (2C) 160 kPa, 25 min.; (2D) 160 kPa, 30 min.; (2E) 160 kPa, 35 min.

c) *Poměr 3:1*

Tab. 10. Nastavený tlak při tisku hověziho kolagenu) v čase pro poměr 3:1.

Čas (min)	Tlak (kPa)	Označení
15	100	3A
20	100	3B
25	100	3C
30	110	3D
35	110	3E
40	110	3F

Jako u předchozích poměrů 1:1, 2:1 se zde objevují stejné problémy spojené s nízkou adhezí kolagenu, strukturou, zasahování tiskové jehly, do již vytištěné konstrukce. Charakteristické díry lze vidět u materiálu 3C a 3F. Poměr 3:1, se chová mírně odlišně než ostatní. V 15 minutě tisku lze vidět, že materiál má tendenci se roztékat, není dostatečně zesíťovaný.



Obr. 33. Vytištěný scaffold pro hovězí kolagen s dex-ox v poměru 3:1, parametry tisku pro: (3A) 100 kPa, 15 min.; (3B) 100 kPa, 20 min.; (3C) 100 kPa, 25 min.; (3D) 110 kPa, 30 min.; (3E) 110 kPa, 35 min.; (3F) 110 kPa, 40 min.

Dle výsledků získaných z optické mikroskopie, jsou u všech poměrů přítomny problémy s nerovnými okraji, nehomogenní strukturou, které jsou zapříčiněny nízkou adhezí kolagenu k substrátu. Při prodloužení časového úseku na 15 až 40 min, se častěji objevují mezery, jež by měly být pro mřížku charakteristické. Pokud jednotlivé poměry srovnáme mezi sebou z hlediska použitých hodnot tlaku, nejvyšších hodnot (110–160 kPa) nabývá poměr 2:1. Hodnota tlaku se výrazně liší od poměru 1:1 (120–130 kPa) a 3:1 (100–110 kPa), příčina může být následující. Vzhledem k tomu, že tiskové jehly byly používány opakovaně, mohlo dojít k mírnému zanesení (ucpání) a zmenšení průměru jehly. Je jasné, že tlak potřebný pro vytlačení materiálu vzroste.

7.2.3.3 Kolagen typu králík

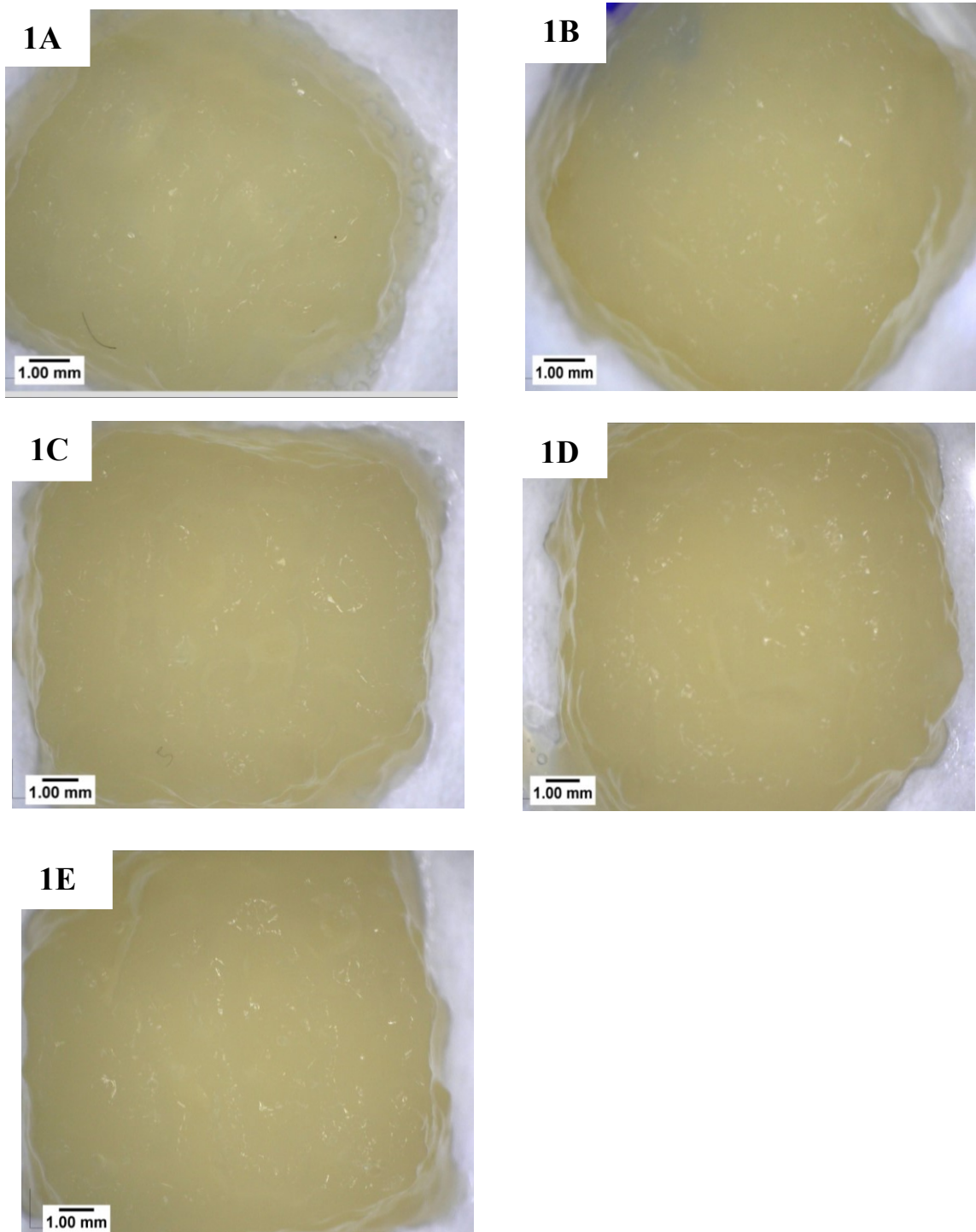
Nastavené parametry tisku jsou stejné jako u hovězího kolagenu. Dle mnohých experimentů, kolagen typu králík síťuje pomaleji a tisk je vhodné začínat, až po 40 minutě. Pokud bychom začali tisknout dříve, došlo by k vytečení veškerého materiálu, případně by nedržel tvar.

a) Poměr 1:1

Tab. 11. Nastavený tlak při tisku kolagenu (králík) v čase pro poměr 1:1.

Čas (min)	Tlak (kPa)	Označení
40	70	1A
45	80	1B
50	90	1C
55	90	1D
60	100	1E

Tisk králičího kolagenu v poměru 1:1, vykazuje následující problém. Samotný bio-inkoust je málo zesíťovaný, jelikož má mírnou tendenci se roztékat. Nejsou zde přítomné mezery pro mřížku. Připravené vzorky si drží tvar a nejsou zde výrazné problémy s nízkou adhezí.



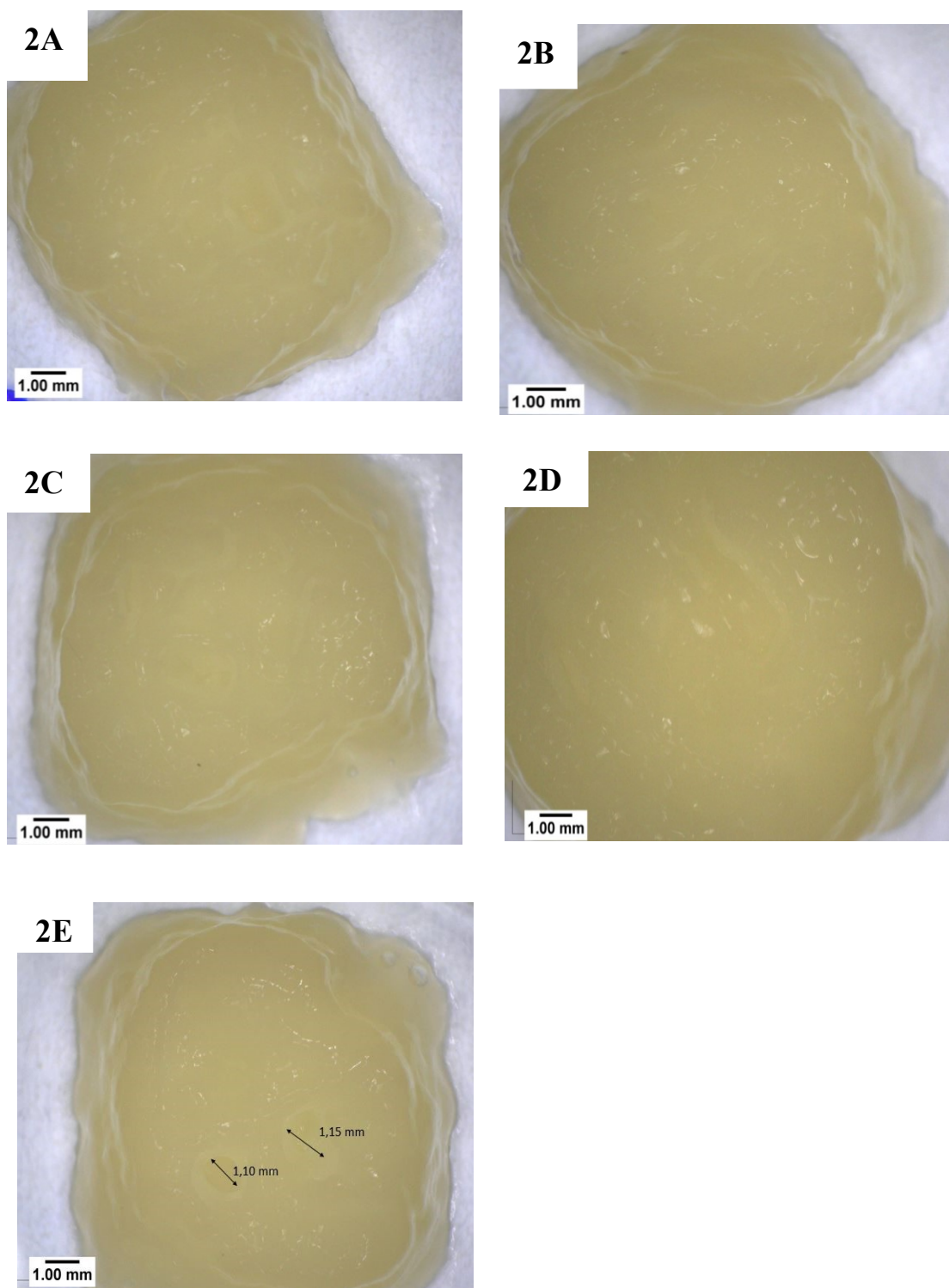
Obr. 34. Vytištěný scaffold pro kolagen typu králik s dex-ox v poměru 1:1, parametry tisku pro: (1A) 70 kPa, 40 min.; (1B) 80 kPa, 45 min.; (1C) 90 kPa, 50 min.; (1D) 90 kPa, 55 min.; (1E) 100 kPa, 60 min.

b) Poměr 2:1

Tab. 12. Nastavený tlak při tisku kolagenu (králik) v čase pro poměr 2:1.

Čas (min)	Tlak (kPa)	Označení
40	70	2A
45	70	2B
50	70	2C
55	80	2D
60	80	2E

Tisk kolagenu králíka v poměru 2:1 se vyznačuje přítomností charakteristických děr pro mřížku, můžeme je vidět na obrázku 2E. Objevuje se zde problém s nízkou adhezí kolagenu, jež je viditelný na obrázku 2C a 2B, kde okraje jsou spíše zaoblené.



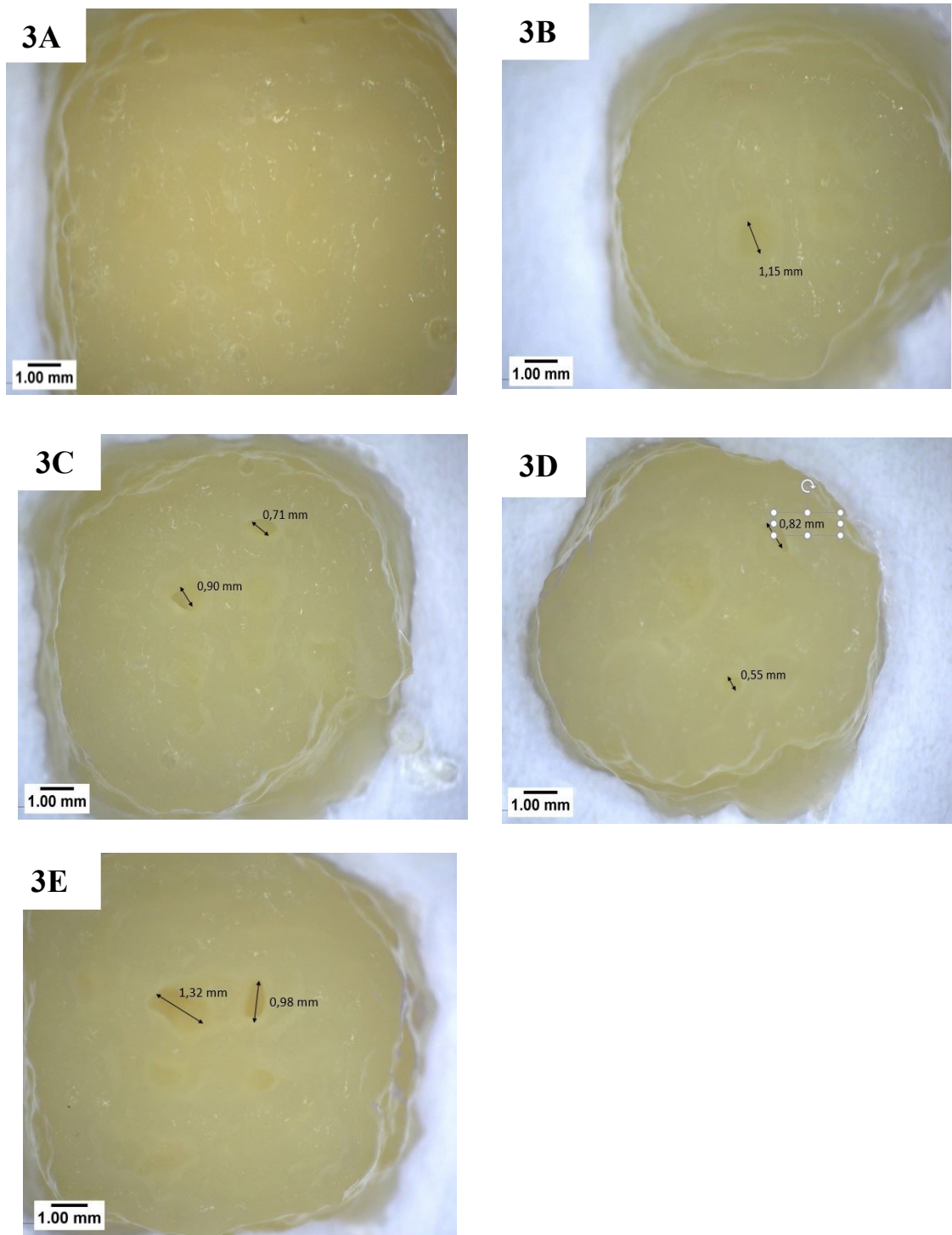
Obr. 35. Vytištěný scaffold pro kolagen typu králík s dex-ox v poměru 2:1, parametry tisku pro: (2A) 70 kPa, 40 min.; (2B) 70 kPa, 45 min.; (2C) 70 kPa, 50 min.; (2D) 80 kPa, 55 min.; (2E) 80 kPa, 60 min.

c) *Poměr 3:1*

Tab. 13. Nastavený tlak při tisku kolagenu (králík) v čase pro poměr 3:1.

Čas (min)	Tlak (kPa)	Označení
20	70	3A
25	80	3B
30	90	3C
35	110	3D
40	120	3E

Kolagen typu králík v poměru 3:1, síťuje výrazně rychleji než poměr 1:1 a 2:1. Samotný tisk byl možný od 20 minuty, nicméně z obrázku 3A je patrně, že kolagen nemá dostatečné vlastnosti (tendence se roztékat). V případě vyšších časů nad 20 minutu, se objevují charakteristické díry pro mřížku a kolagen lépe drží tvar. Nežádoucí účinek je nízká adheze kolagenu viditelná na obrázku 3B, 3C, 3D.



Obr. 36. Vytištěný scaffold pro kolagen typu králík s dex-ox v poměru 3:1, parametry tisku pro: (3A) 70 kPa, 20 min.; (3B) 80 kPa, 25 min.; (3C) 90 kPa, 30 min.; (3D) 110 kPa, 35 min.; (3E) 120 kPa, 40 min.

U většiny vzorků je problém s charakterem okrajů a celkovým tvarem výtisku. Kolagen typu králík bylo možné tisknut až po 40 minutě. Mezery se objevují pouze u poměru 2:1 v 60 minutě probíhající síťovací reakce, 3:1 od 25 minuty. V případě poměru 1:1 nejsou přítomny. Nejvyšší hodnoty tlaku byly použity pro poměr 3:1 (70–120 kPa), za ním následuje poměr 1:1 (70–100 kPa), 2:1 (70–80 kPa). Poměr 3:1, síťuje výrazně rychleji než ostatní, tisk probíhal ve 20 až 40 minutě. Ze všech výsledků pro králíčí kolagen, je tento poměr výrazně úspěšnější než ostatní. Je zcela pravděpodobné, že prodloužením síťovací reakce (po 40 min), by vytištěný scaffold mohl vykazovat lepší strukturu.

7.2.3.4 *Srovnání hovězího a králíčího kolagenu*

Pokud srovnáme výsledky mezi králíčím a hovězím kolagenem. Jsou již na první pohled patrné jasné výsledky. Hovězí kolagen vykazuje pevnější gely s menší tendencí se roztékat a drží tvar, v kratším čase probíhající síťovací reakce 15 až 40 min. Pro králíčí kolagen čas síťovacích reakcí probíhá 40 až 60 minut, příprava vzorku je tak časově náročnější. Zároveň hovězí kolagen má větší tendenci se táhnout za jehlou a neulpívá na povrchu, vykazuje nižší adhezi. U Králíčího kolagenu nejsou tyto problémy tolik výrazné. Poměr 3:1 u králíčího kolagenu je mírně bližší hovězímu, jelikož je zde rychlejší čas probíhajících síťovacích reakcí (20 až 40 min).

7.2.4 SEM snímky

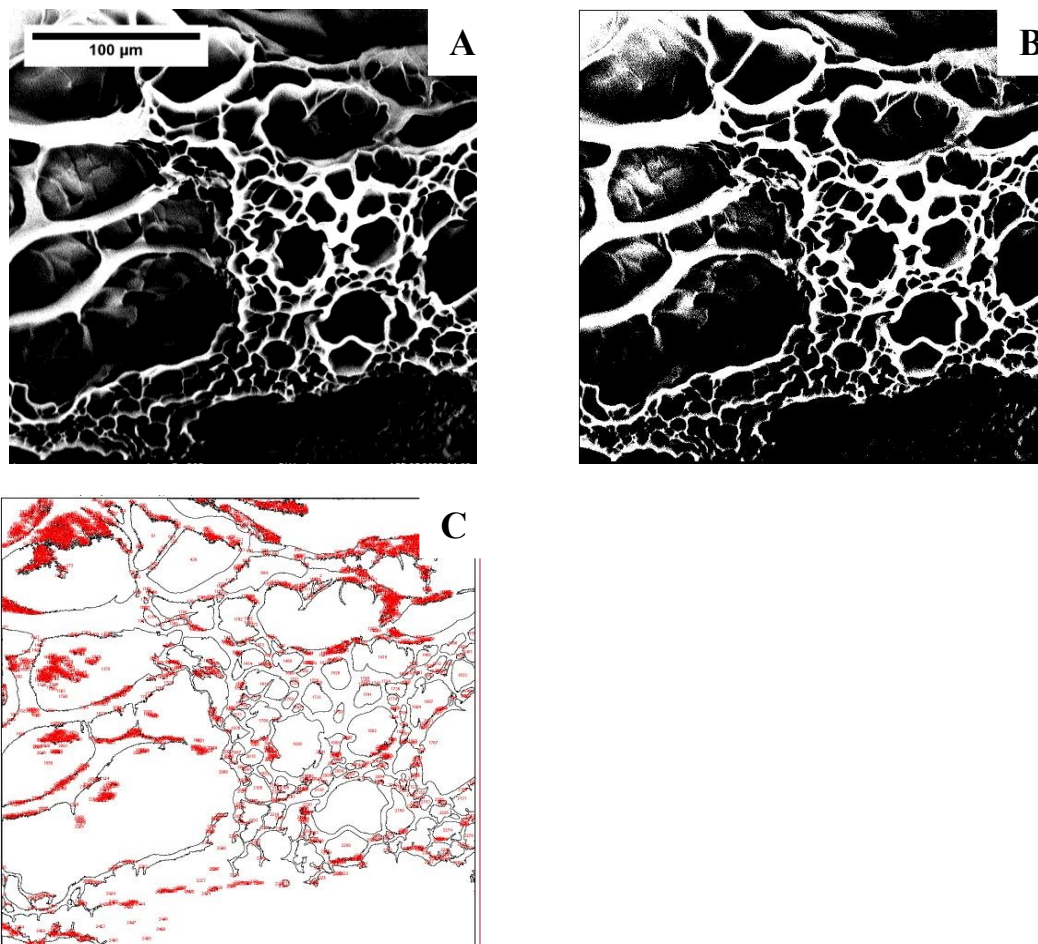
SEM snímky byly pořízeny na elektronovém mikroskopu Phenom Pro. Vzorky byly lyofilizovány a následně pokoveny paládiem. Byly provedeny řezy ve směru osy z (kolmá k rovině tisku) a x (ve směru roviny tisku). Pořízené snímky byly podrobeny analýze v softwaru Image J. Dle zjištěné plochy pórů S_p a celkové plochy S lze vypočítat odhadovou porozitu P (%) materiálu (vztah č. 4). S ohledem na typ vzorků a způsob analýzy je třeba brát uváděné porozity skutečně jako hrubé odhady, sloužící spíše ke vzájemnému srovnání vzorků než jako absolutní čísla.

$$P = \frac{S_p}{S} \cdot 100 \quad (4)$$

7.2.4.1 Kolagen typu hovězí

a) Poměr 1:1

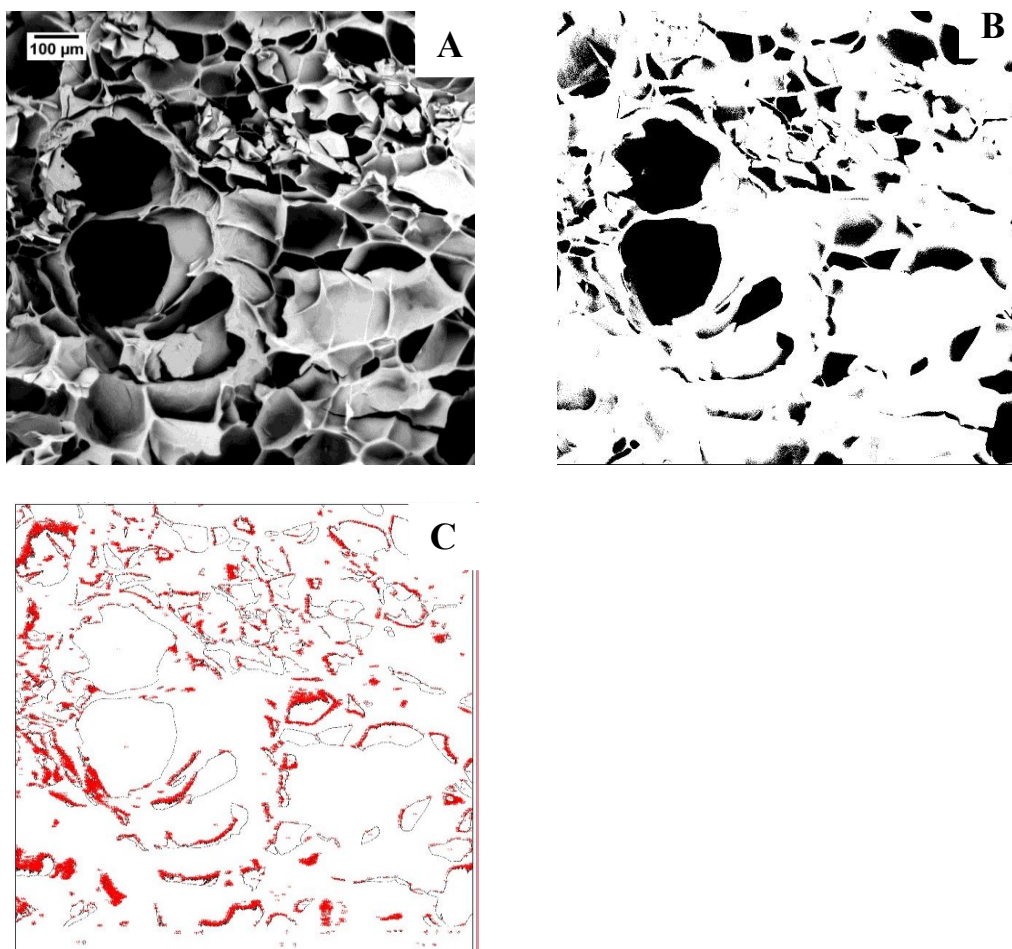
- Řez ve směru osy z



Obr. 37. Hovězí kolagen v poměru 1:1, řez v ose z. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A.

Odhadovaná velikost póru kolagenu v poměru 1:1 pro řez v ose z, se pohybuje v rozsahu jednotek až desítek μm. Největší póry nabývají hodnot okolo 80 μm, nejmenší póry 4 až 20 μm. Výsledky analýzy v Image J, jsou mírně zkreslené, jelikož zanedbávají nejmenší póry, které následně při řešení splývají. Vypočtená plocha pórů činí 30 026 μm², celková analyzovaná plocha 73 931 μm². Porozita se spočítá dle vztahu 4., její hodnota je cca 41 %.

- Řez ve směru osy x

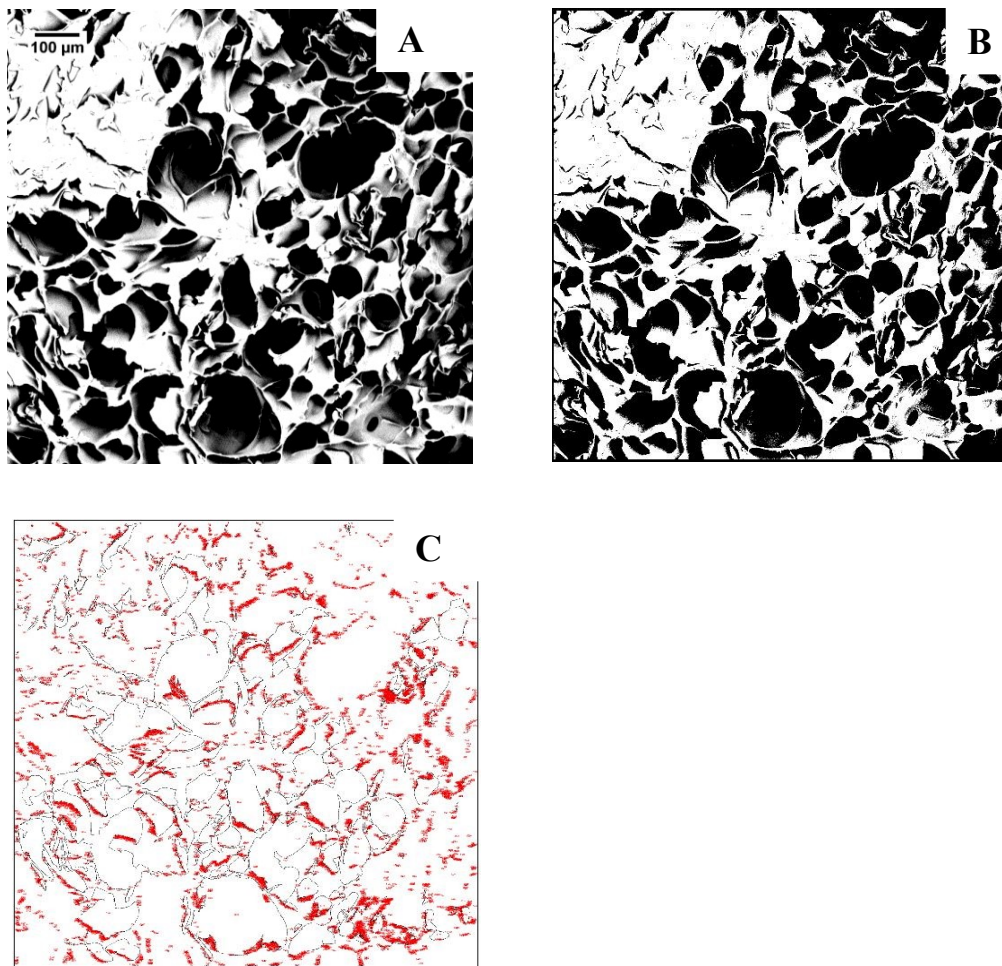


Obr. 38. Hovězí kolagen v poměru 1:1, řez v ose x. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A.

Řez v ose x hovězího kolagenu v poměru 1:1. Největší póry nabývají hodnot okolo 200 až 260 µm, nejmenší póry 30 µm. Vyskytují se zde póry v rozsahu 50 až 90 µm. Dle výsledků zjištěných z analýzy, vypočtená plocha pórů činí 230 626 µm², celková analyzovaná plocha 1 089 935 µm². Porozita se spočítá dle vztahu 4., její hodnota je 21 %. Skutečná hodnota porozity je vyšší, během analýzy došlo částečné ztrátě pórů.

b) Poměr 2:1

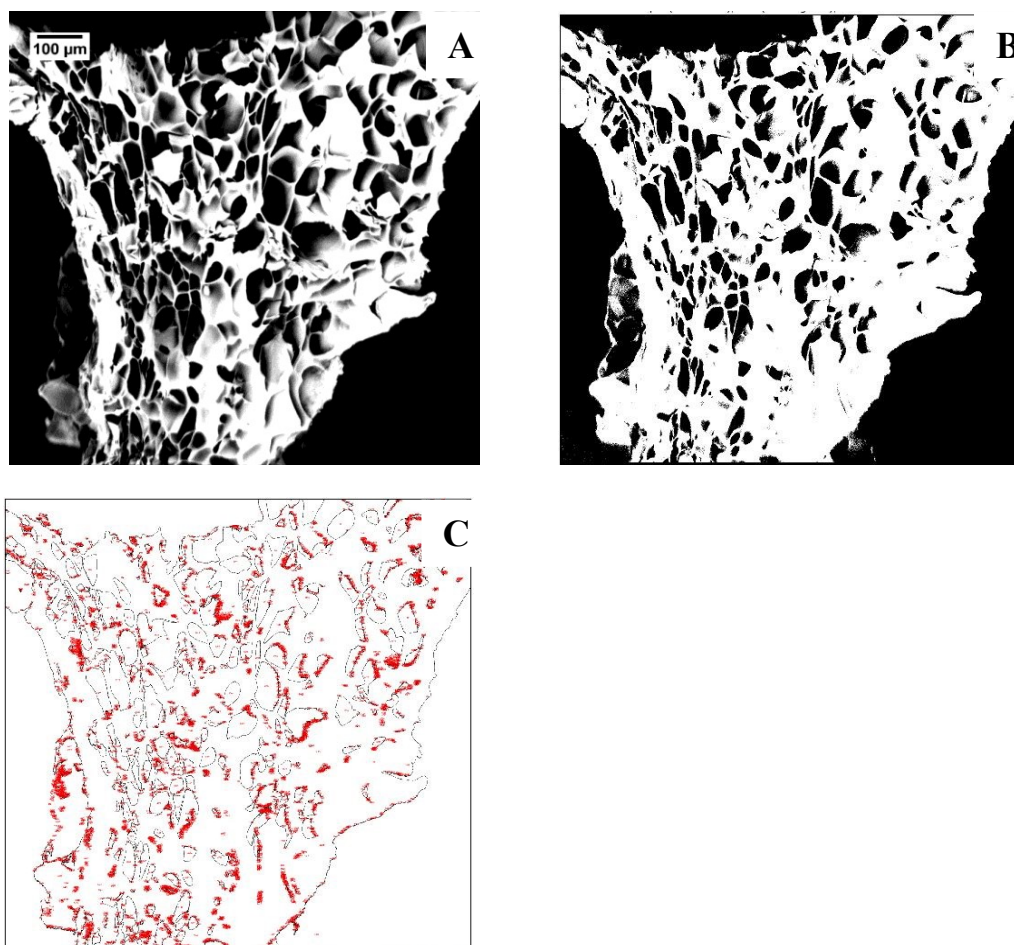
- Řez ve směru osy z



Obr. 39. Hovězí kolagen v poměru 2:1, řez v ose z. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A.

Velikost póru hovězího kolagenu v poměru 2:1 pro řez v ose z, se pohybuje v rozsahu desítky μm . Největší póry nabývají hodnot okolo $200 \mu\text{m}$, nejmenší póry 80 až $60 \mu\text{m}$. Vypočtená plocha pórů, dle analýzy činí $659\,051 \mu\text{m}^2$, celková analyzovaná plocha $1\,123\,599 \mu\text{m}^2$. Porozita se spočítá dle vztahu 4., její hodnota je 59% .

- Řez ve směru osy x

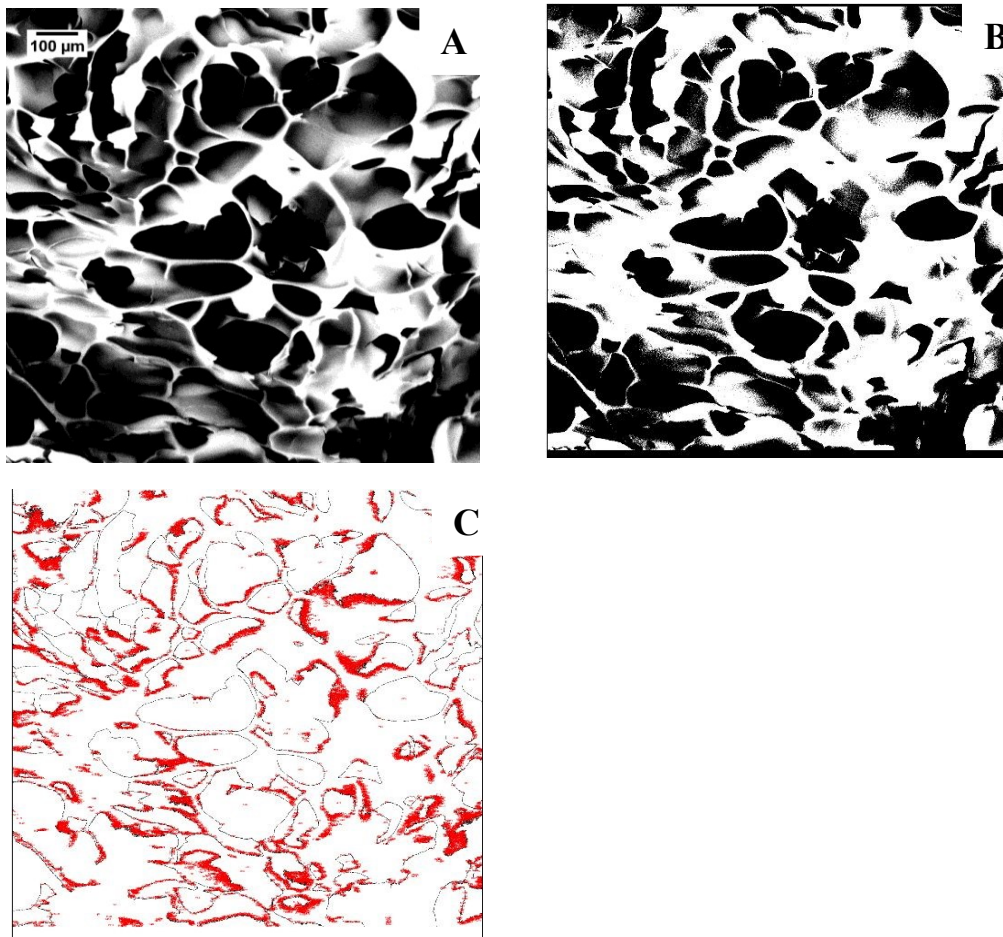


Obr. 40. Hovězí kolagen v poměru 2:1, řez v ose x. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A.

Odhadovaná velikost póru kolagenu v poměru 2:1 pro řez v ose x, se pohybuje v rozsahu desítky μm . Největší póry nabývají hodnot okolo $130 \mu\text{m}$, nejmenší póry okolo $20 \mu\text{m}$. Během analýzy dochází k mírnému zkreslení výsledků, přítomností černých okrajových ploch. Z plochy pórů jsou tyto hodnoty vypuštěny, a od celkové plochy jsou odečteny. Vypočtená plocha pórů, dle analýzy činí $153\,382 \mu\text{m}^2$, celková analyzovaná plocha $671\,241 \mu\text{m}^2$. Hodnota porozity (dle vztahu 4.) je 23 %.

c) Poměr 3:1

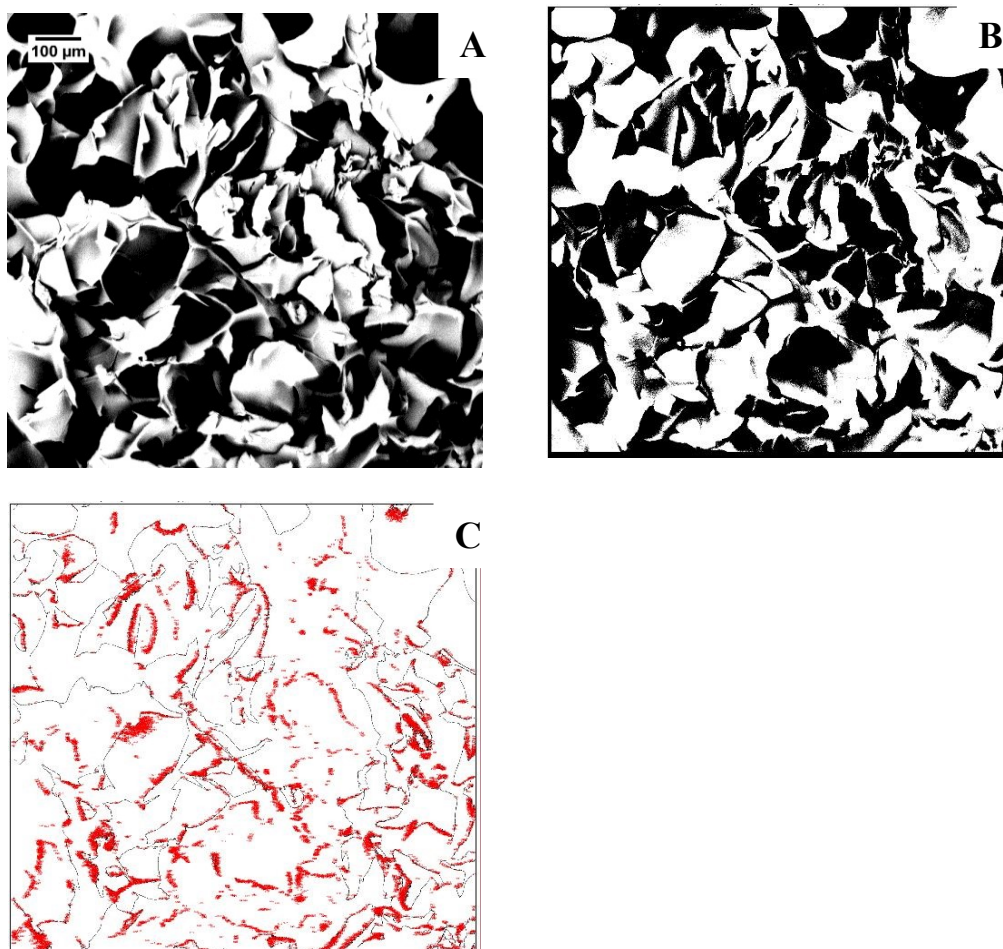
- Řez ve směru osy z



Obr. 41. Hovězí kolagen v poměru 3:1, řez v ose z. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A.

Odhadovaná velikost póru hovězího kolagenu v poměru 3:1 pro řez v ose z se pohybuje okolo hodnot okolo 200 až 280 µm pro největší póry. Nejmenší póry okolo 60 až 80 µm. Střední póry jsou velikost okolo 100 µm. Vypočtená plocha póru 696 560 µm², celková analyzovaná plocha 1 265 625 µm². Hodnota porozity (dle vztahu 4.) je 55 %.

- Řez ve směru osy x



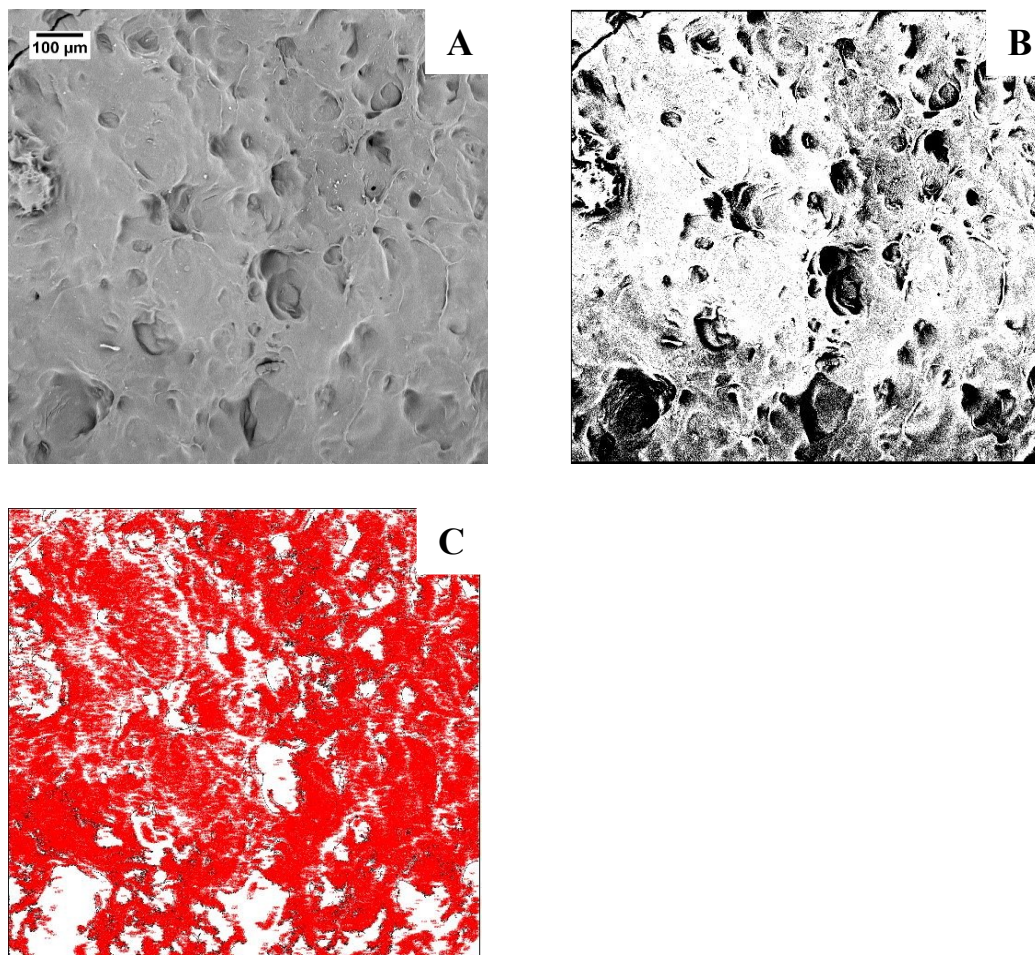
Obr. 42. Hovězí kolagen v poměru 3:1, řez v ose x. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A.

U hovězího kolagenu v poměru 3:1 pro řez v ose x nabývají největší póry hodnot okolo 180 až 260 μm , nejmenší póry jsou okolo 60 μm . Vypočtená plocha póru 512 518 μm^2 , celková analyzovaná plocha 1 069 147 μm^2 . Hodnota porozity (dle vztahu 4.) je 48 %.

7.2.4.2 Kolagen typu králík

a) Poměr 1:1

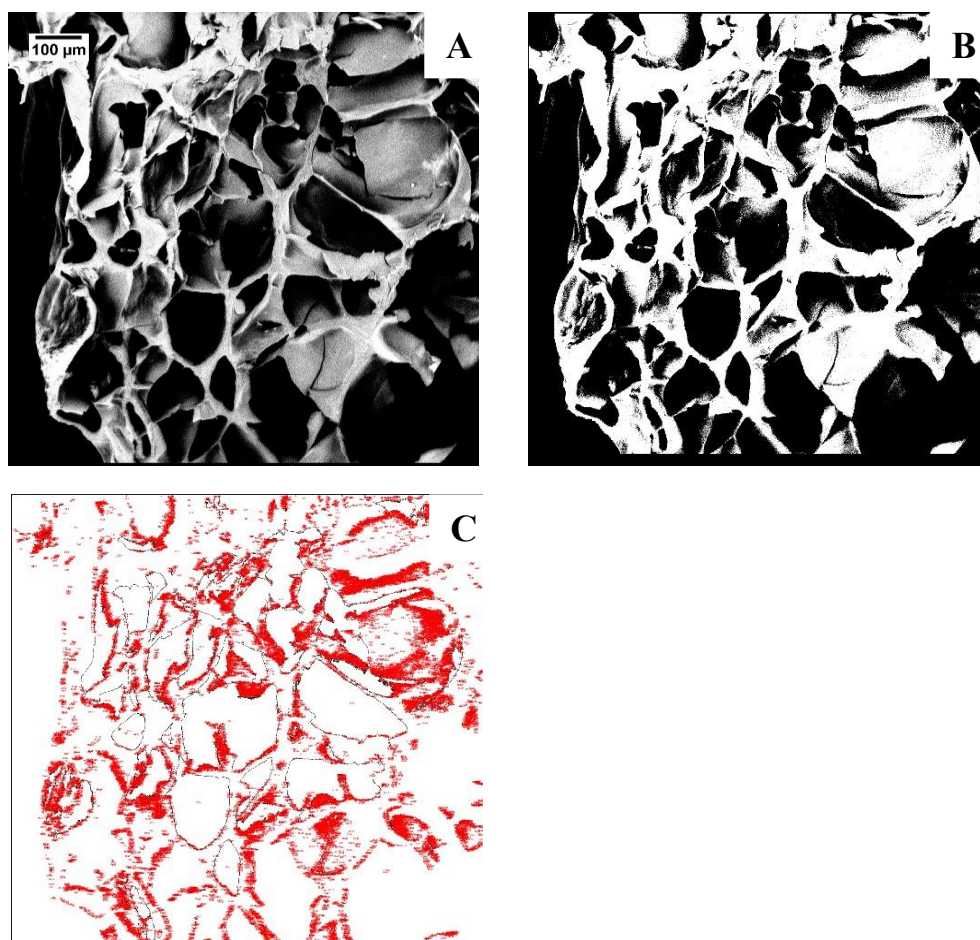
a) Řez ve směru osy z



Obr. 43. Kolagen typu králík v poměru 1:1, řez v ose z. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A.

Řez osou z, kolagenem typu králík v poměru 1:1, vykazuje velikosti pórů okolo 15 až 50 μm, největší póry nabývají hodnot okolo 150 μm. Výsledky poskytnuté analýzou v ImageJ, jsou zkreslené šumem. Na základě toho byla provedena korekce dat, z výpočtu byly vyloučeny póry menší než 10 μm. Vypočtená plocha póru 292 732 μm², celková analyzovaná plocha 1 050 621 μm². Hodnota porozity (dle vztahu 4.) je 28 %.

b) Řez ve směru osy x

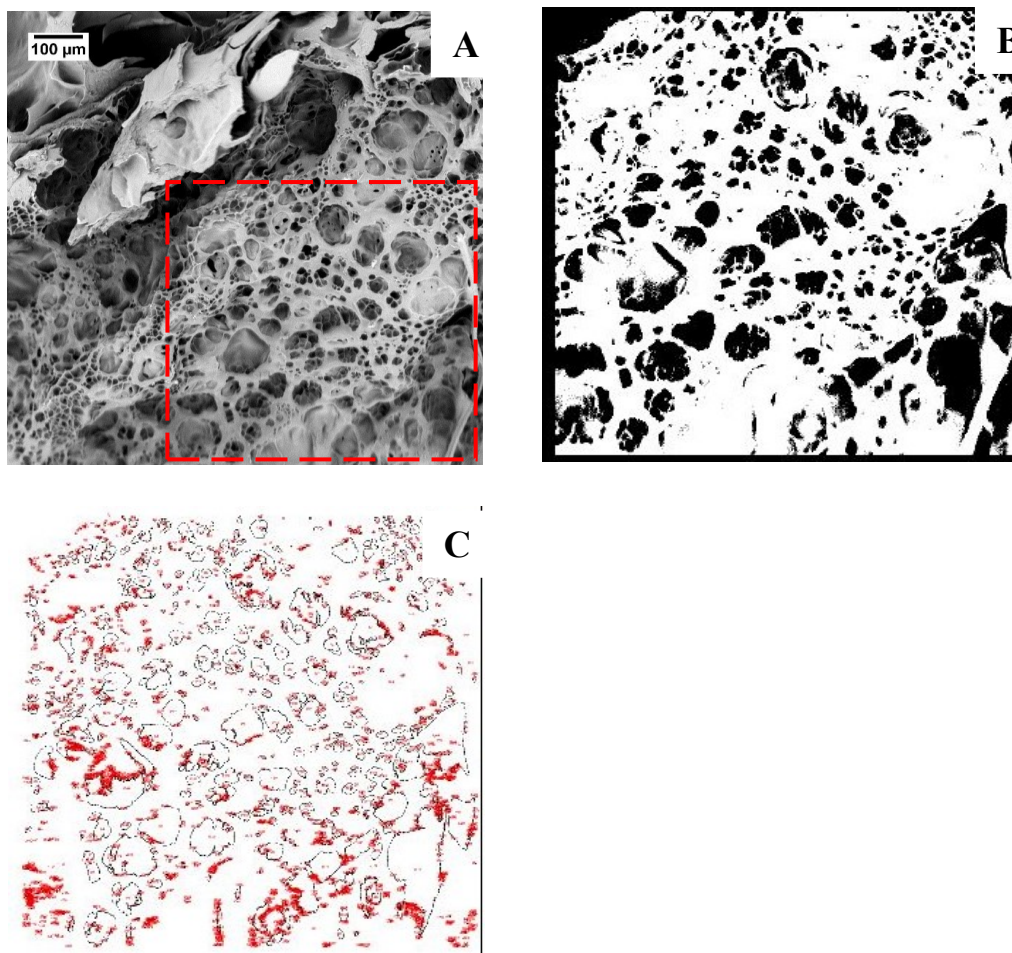


Obr. 44. Kolagen typu králík v poměru 1:1, řez v ose x. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A.

Kolagenem typu králík v poměru 1:1 řez osou x, má dle snímku nejmenší velikost pórů okolo 60 µm, střední velikost mezi 90 až 130 µm, největší 200 µm. Výsledky poskytnuté analýzou v ImageJ, jsou zkreslené přítomností okrajové plochy. Jejím vyloučením, získáme následující data. Vypočtená plocha póru 222 527 µm², celková analyzovaná plocha 607 813 µm². Hodnota porozity (dle vztahu 4.) je 36 %.

b) Poměr 2:1

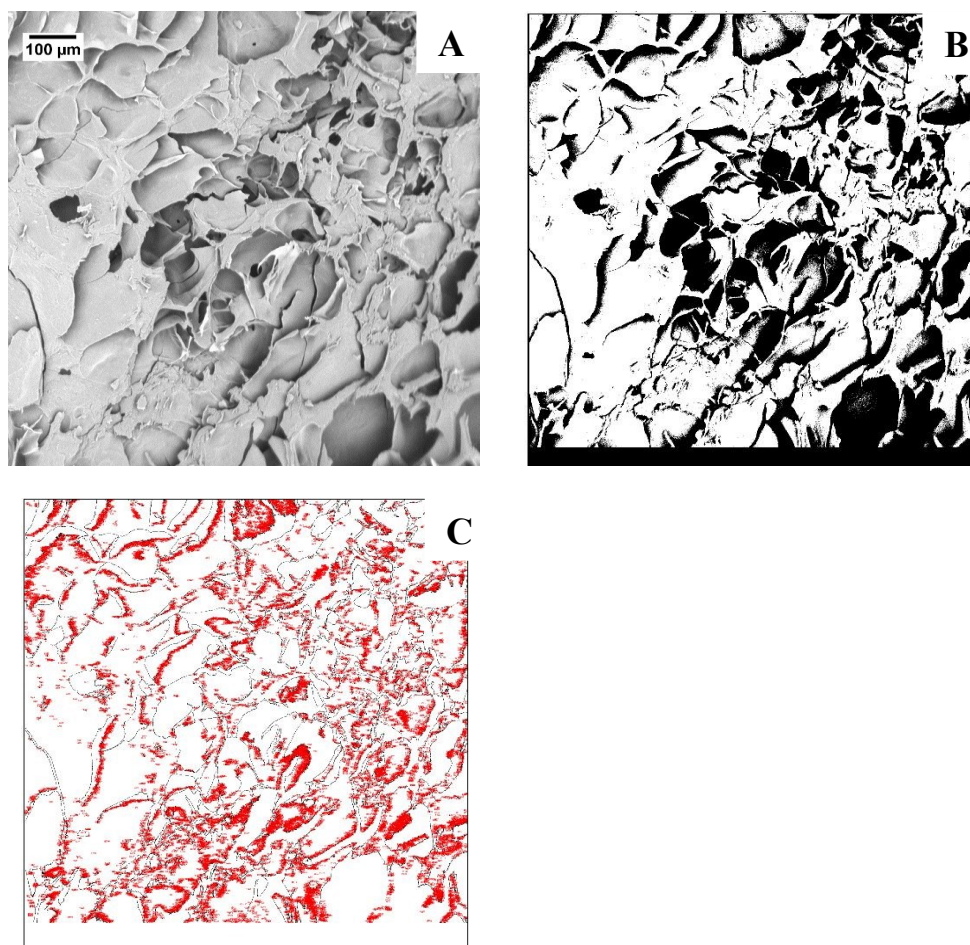
a) Řez ve směru osy z



Obr. 45. Kolagen typu králík v poměru 2:1, řez v ose z. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A.

Kolagenem typu králík v poměru 2:1 (řez osou z), byl pro snadnější analýzu ořezán, dle vyznačené červené čáry (snímek A). Velikost pórů se pohybuje okolo 20 μm pro nejmenší póry, střední velikost 30 až 50 μm , největší póry jsou okolo 80 až 100 μm . Vypočtená plocha pórů je 86 161 μm^2 , celková analyzovaná plocha 389 998 μm^2 . Hodnota porozity (dle vztahu 4.) je 22 %.

b) Řez ve směru osy x

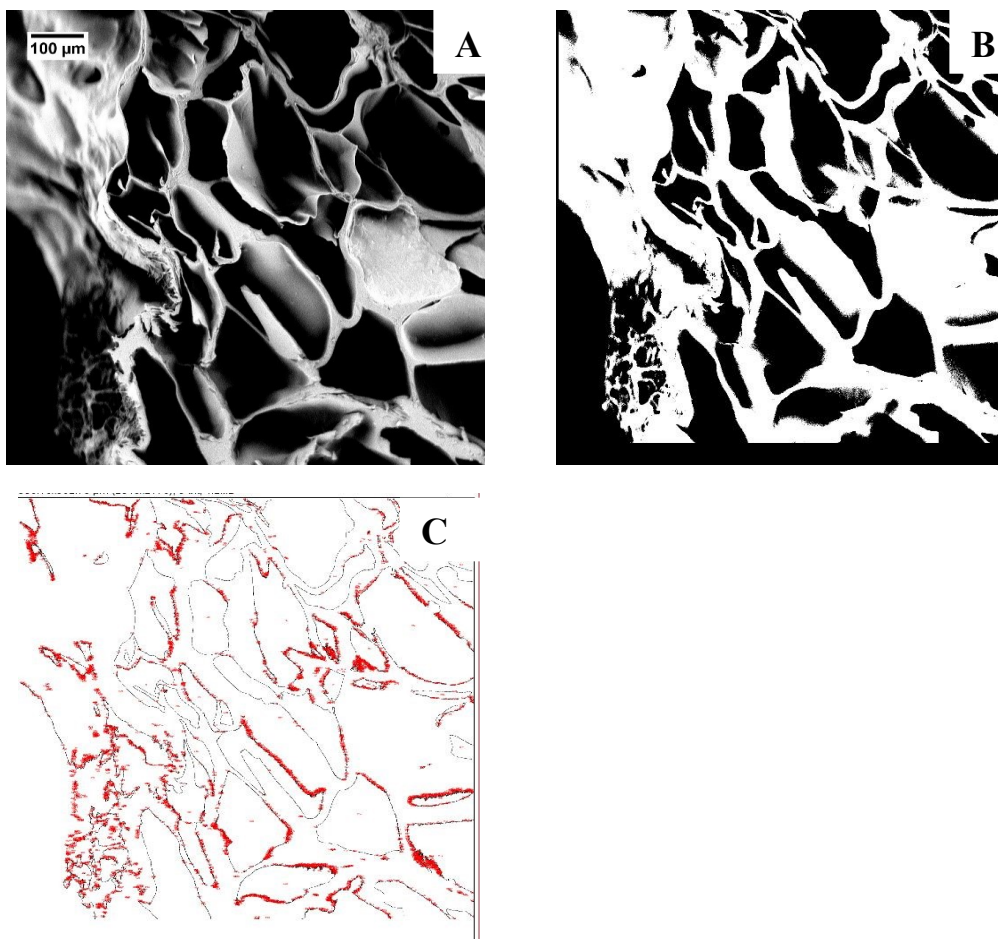


Obr. 46. Kolagen typu králík v poměru 2:1, řez v ose x. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A.

Řez osou x pro kolagen typu králík v poměru 2:1, jehož odhadovaná velikost pórů činí 160 až 190 μm pro největší póry, 70 až 100 μm u menších pórů. Vypočtená plocha pórů 127 092 μm², celková analyzovaná 1 028 187 plocha μm². Hodnota porozity (dle vztahu 4.) je 12 %. Hodnota porozity je příliš nízká, pokud se podíváme na snímek B a A. Zjistíme, že jsou zde přítomny póry, jež jsou obrazovou analýzou v ImageJ počítány jako stěny. Výsledky jsou tak výrazně zkresleny.

c) Poměr 3:1

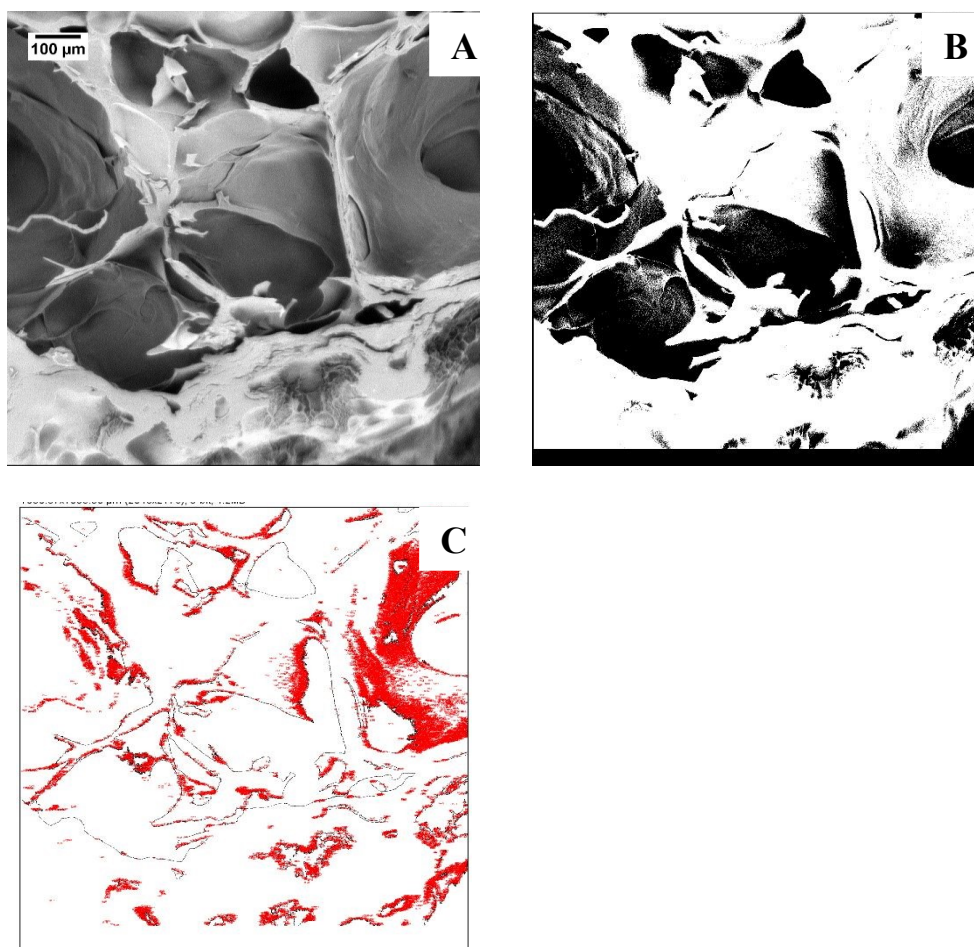
a) Řez ve směru osy z



Obr. 47. Kolagen typu králík v poměru 3:1, řez v ose z. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A.

Poměr 3:1 pro kolagen, řez osou z. Největší velikost přítomných pórů je v rozsahu okolo 300 μm, dále 200 μm. Střední velikost pórů je 100 až 170 μm. Nejmenší přítomné póry jsou okolo 70 μm. Ze snímku je patrná přítomnost okrajových ploch, jež zkresluje výsledky analýzy. Na základě toho byly příslušné hodnoty vyloučeny a odečteny od celkové plochy. Vypočtená plocha póru 241 451 μm², celková analyzovaná 624 258 plocha μm². Hodnota porozity (dle vztahu 4.) je 39 %.

b) Řez ve směru osy x



Obr. 48. Kolagen typu králík v poměru 3:1, řez v ose x. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A.

Králičí kolagen v poměru 3:1 (řez osou x) má jedny z největších pórů ve srovnání s ostatními vzorky, velikost přítomných pórů je cca 330 µm, dále jsou zde přítomny póry o velikosti 170 až 200 µm. Dle obrazové analýzy v ImageJ, se zde objevil šum. Na základě toho byly z dat vyloučeny póry pod 20 µm. Vypočtená plocha pórů 421 242 µm², celková analyzovaná 1 052 676 plocha µm². Hodnota porozity (dle vztahu 4.) je 40 %.

7.2.4.3 Srovnání hovězího a králičího kolagenu

V následující tabulce jsou uvedeny hodnoty porozity pro hovězí a králičí kolagen v daném poměr (1:1, 2:1, 3:1) v řezu osy x a z.

Tab. 14. Vypočtené hodnoty porozity pro kolagen typu hovězí v řezu osy x a z.

Kolagen typu hovězí		
Poměr kolagenu vůči síťovacímu činidlu	Vypočtená hodnota porozity (%)	
	Řez v ose z	Řez v ose x
1:1	41	21
2:1	59	23
3:1	55	48
Kolagen typu králík		
Poměr kolagenu vůči síťovacímu činidlu	Vypočtená hodnota porozity (%)	
	Řez v ose z	Řez v ose x
1:1	28	36
2:1	22	12
3:1	39	40

Hodnota porozity pro hovězí kolagen nabývá pro řez v ose z vyšších hodnot, než v ose x. V případě poměru 1:1 a 2:1 je výrazný rozdíl mezi hodnotou porozity v ose z a x. U poměru 3:1 není výrazný rozdíl mezi řezem v ose z a x. Poměr 2:1 se vyznačuje nejvyšší porozitou 59 % (řez v ose z), za ním ho následuje poměr 3:1 s 55 % (řez v ose z). Nejnižší porozitou se vyznačuje poměr 1:1, v obou řezech.

V případě králičího kolagenu, jsou zde přítomny rozdílné výsledky než u kolagenu hovězího. Porozita nabývala vyšších hodnot v řezu osy z, pro králíka jsou výsledky rozdílné, dle poměru. Nejvyšší hodnotu porozity má poměr 3:1 v řezu osy x a z, kde jsou uvedené hodnoty podobné. Zároveň v tomto poměru existují póry o nejvyšší velikosti. Nejnižší porozita je u poměru 2:1 (řez osou x), kde dosahuje 12 %.

Pokud bychom chtěli srovnat kolagen typu králík a hovězí, dosahuje nejvyšší hodnoty 59 % hovězí v poměru 2:1 (řez osou z). Nejnižší porozita 12 % je přítomna u králíka v poměru 2:1 (řez osou x). Je těžké vzájemně mezi sebou srovnávat použité poměry kolagenu vůči síťovacímu činidlu a druhy kolagenu. Obrazová analýza byla prováděna pouze na dílčí části vzorku, již z toho je patrné, že výsledky mohou být v celém objemu

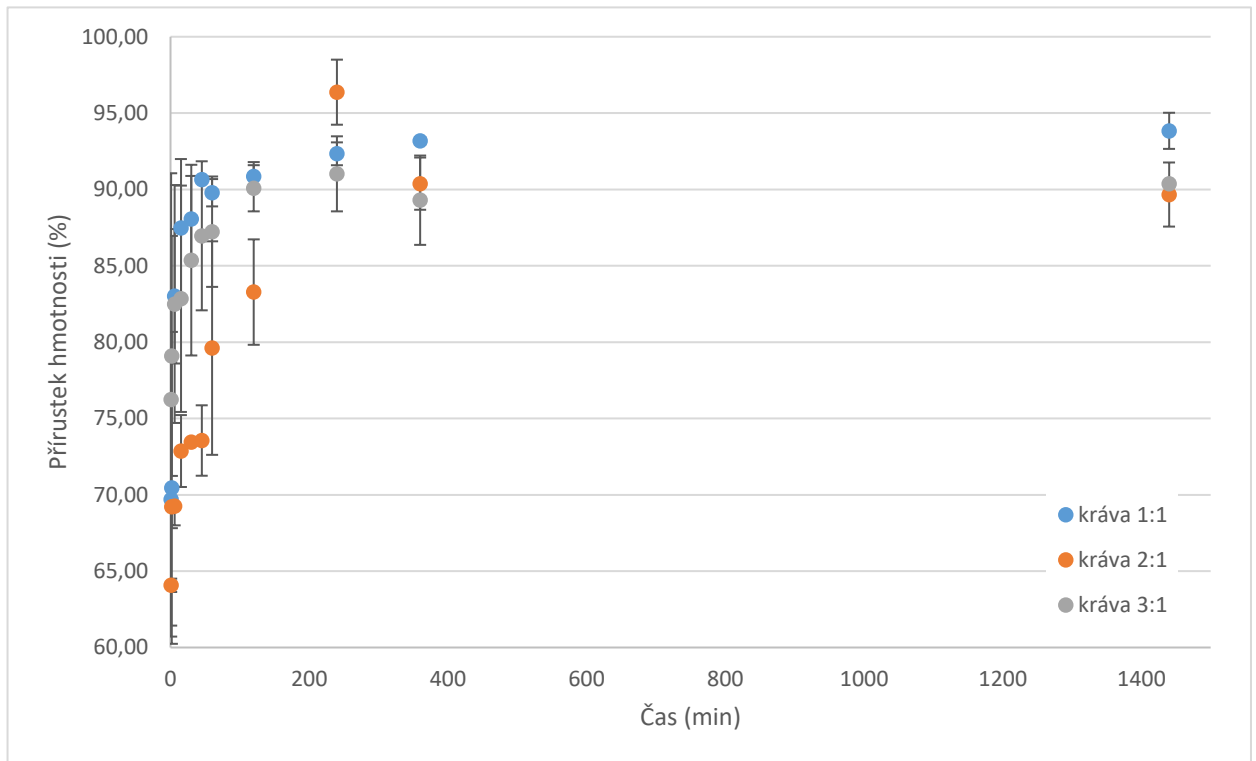
vzorku rozdílné. V průběhu přípravy vzorku (řez), mohlo dojít vlivem manipulace se vzorkem k jeho poškození. Dále docházelo v průběhu analýzy ke zkreslování výsledků (šum, splývání malých pórů), jež museli být posléze korigovány. Hodnoty porozity je nutné vnímat pouze orientačně.

7.2.5 Swelling testy

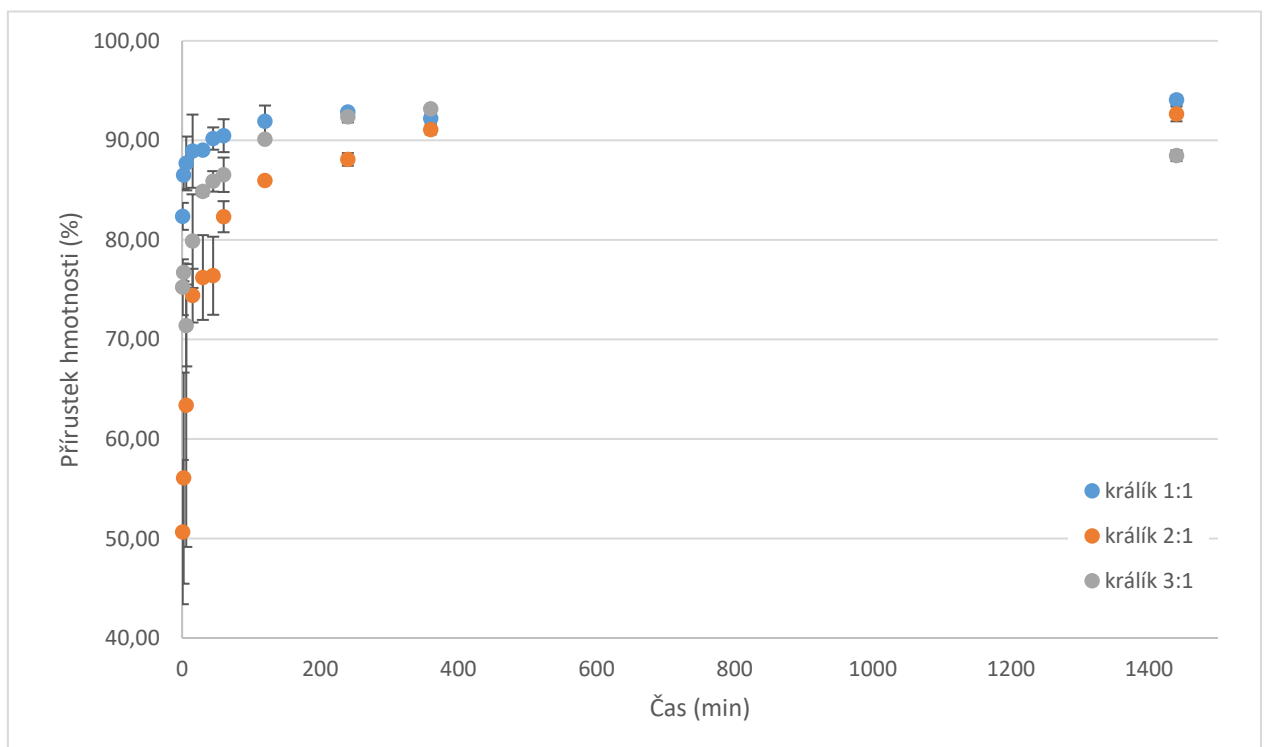
Swelling testy (testy bobtnání) poskytují informace o zásadních vlastnostech hydrogelů z pohledu absorpce kapaliny. Jsou prováděny pro simulaci prostředí v průběhu kultivace buněk. V průběhu bobtnání dochází k difúzi rozpouštědla mezi polymerní řetězce, které se od sebe postupně oddalují. Proces bobtnání může být ovlivněn pH, teplotou a rozpouštědlem, iontovou silou.¹⁴⁰ Bobtnání bylo prováděno při teplotě 37 °C v PBS (pH= 7,36) roztoku po dobu 24 hodin. Vzorky hydro-gelu byly před testem lyofilizovány. Vzorky byly v průběhu měření umístěny v drátěných košíčkách, aby se omezila manipulace se vzorkem. Tento postup eliminuje riziko rozbití vzorku v průběhu měření, je však nutné košíčky před každým vážením řádně vysušit. Výsledky testu bobtnání mohou být zkresleny vlhkostí, jež je obsažena v košíčkách. Vážení vzorku probíhalo v daném časovém intervalu (1, 2, 6, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 1440 min). Měření bylo provedeno dvakrát, uvedené hodnoty v grafických závislostí jsou průměrovány, chybové úsečky představují směrodatné odchylky průměru. Přírůstek hmotnosti M (%) byl vypočten dle následujícího vztahu, kde m_i je hmotnost mokrého vzorku (g) odečtená v daném časovém intervalu, m_s je hmotnost suchého vzorku (g).

$$M = \frac{m_i}{m_i + m_s} \cdot 100 \quad (5)$$

Graf 4. Závislost zobrazující přírůstek hmotnosti hovězího kolagenu v daném časovém intervalu.



Graf 5. Závislost zobrazující přírůstek hmotnosti králičího kolagenu v daném časovém intervalu.



Povaha a způsob provedení metody je zatížen chybou vznikající lidským faktorem. Přesnost měření silně závisí na důkladnosti vysušení mokrých košíčků. Z grafických závislostí pro kolagen typu králík a hovězí je patrné, že v počátku měření dochází ke značným odchylkám od předpokládaného trendu. Příliš rychlá difúze rozpouštědla mezi řetězce, způsobuje rychlý nárůst hmotnosti, následkem toho nestíhají řetězce kolagenu relaxovat. V okamžiku, kdy dojde k relaxaci řetězců, dochází k poklesu hmotnostního přírůstku. Tento trend je nejvíce znatelný u hovězího kolagenu v poměru 2:1.¹⁴¹ V počátcích měření dochází k strmému nárůstu hmotnosti, který se při odečtu v 6 a 24 hodině vyrovná. Hovězí kolagen v poměru 1:1 vykazuje přírůstek hmotnosti (24 hod) 94 %, pro poměr 2:1 a 3:1 je okolo 90 %. Můžeme konstatovat, že poměr 1:1, vykazuje vyšší míru bobtnání. Králičí kolagen v poměru 1:1 má 94 % přírůstek hmotnosti (24 hod), poměr 2:1 dosahující obdobné hodnoty 93 %, poměr 3:1 89 %. Poměr 1:1 se vyznačoval, na rozdíl od poměru 2:1 a 3:1, schopností držet tvar a strukturu i po 24 hodinách. U vyššího zastoupení kolagenu v systému, docházelo k zborcení a rozpadu struktury. Z grafických závislostí je patrné, že chování králičího a hovězího kolagenu v průběhu bobtnání nevykazuje výrazné rozdíly. Pokud vynecháme odlehlé hodnoty a zvážíme chybovost při měření, trend přírůstku hmotnosti v daných poměrech je obdobný.

ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byly připraveny hydro-gely pomocí fyzikálního a chemického síťování. Hydro-gely mají obrovský průmyslový potenciál a jsou mimo jiné velmi často používány jako materiály pro přípravu bio-inkoustů. Fyzikální síťování bylo využito u alginátu sodného, iontový mechanismus spočíval v tvorbě tzv. „egg-box“ za pomoci dvojmocných kationtů vápníku. Takto připravená zesíťovaná struktura je schopna vratné reakce, již z toho je patrné, že potenciál použití materiálu k 3D tisku je nízký, s ohledem na mechanickou nestabilitu systému. Alginát sodný byl připraven v koncentraci 2 a 3 wt%, v kombinaci s 0,1 a 0,01 M CaCl_2 a CaCO_3 v příslušných objemových podílech. Bylo prokázáno, že síťovací činidlo o vyšší molaritě 0,1 M poskytuje zesíťované systémy s vyšší viskozitou a schopností držet tvar. Lepší vlastnosti z hlediska viskozity systému byly dosaženy u větší koncentrace alginátu, konkrétně 3 wt%.

Kolagen (hovězí a králičí) a želatina byly síťovány za pomoci oxidované formy dextranu. Metoda síťování je chemického charakteru, popsána Schiffovou bází. Vznikající vazba je kovalentní, hydro-gely se proto vyznačují vyšší pevností a mechanickou stabilitou. Charakteristika síťovacího činidla, tj. míra jeho reaktivity, je dána množstvím oxidovaných vazeb. Titrací byla určena míra oxidace dextranu, konkrétně je to 66,93 na 100 jednotek v řetězci. Přítomnost oxidované formy dextranu byla prokázána také díky FT-IR analýze. Kolagen (hovězí, králik) a želatina v kombinaci se síťovacím činidlem o daném poměru (1; 1,5; 2; 2,5; 3) s přidavkem amoniaku byly podrobeny charakteristice měření časů gelace s cílem zjistit čas potřebný pro přípravu vzorků k tisku. Želatina se řadí mezi materiály s nejrychlejší tvorbou sítě, vysvětlení spočívá v její schopnosti samo-gelace. Reakce je takřka okamžitá, objevují se zde problémy spočívající v příliš rychlém nárůstu viskozity systému, který následně zadržuje bublinky vzduchu v hydro-gelu. Ty jsou pak zdrojem nehomogenity toku materiálu při tisku. Tisk materiálu jako je želatina by byl příliš obtížný. Na rozdíl od želatiny má kolagen velmi dobré tokové vlastnosti. Hovězí a králičí kolagen byl nakonec využit jako materiál k experimentům s 3D tiskem. Kolagen byl míchán se síťovacím činidlem v poměrech 1:1, 2:1, 3:1 s přidavkem amoniaku 30 μl . V rámci práce byl porovnán vliv poměru kolagenu a síťovacího činidla a vliv původu kolagenu. V obou případech kolagenu se zde při tisku objevují stejné problémy, spočívající v nerovných okrajích výtisku a nízkou adhezí materiálu k tiskové podložce. Na snímcích z optického mikroskopu je parametrem pro hodnocení kvality tisku přítomnost charakteristických mezer

pro mřížku. Kolagen hovězího původu vykazuje větší počet mezer u všech poměrů, naopak u králíčího kolagenu tomu tak není. U poměru 1:1 a 2:1 nejsou mezery přítomny, vyskytují se až u poměru 3:1. Rozdílné vlastnosti mezi hovězím a králíčím kolagenem jsou znatelné. Kinetika síťování králíčího kolagenu je výrazně pomalejší než u hovězího.

Vytištěné scaffoldy byly následně lyofilizovány (vysušeny mrazem), nasnímány pomocí SEM a v řezu x a z byla vyhodnocena porozita. Materiál vykazující nejvyšší porozitu (59 % osa z) ze všech byl hovězí kolagen pro poměr 2:1. Další je kolagen typu hovězí v poměru 3:1, kde porozita činí 55 % osa z a 48 % osa x. Králíčí kolagen vykazuje v poměru 1:1 a 2:1 nižší hodnoty porozity, ale v poměru 3:1 nabývá obdobných hodnot (39 % osa z, 40 % osa x). Oba materiály (králíčí i hovězí kolagen) vykazují obdobné vlastnosti z pohledu bobtnání v prostředí PBS, u materiálů s poměry 2:1 a 3:1 docházelo ke zborcení struktury gelu. Z pohledu přípravy bio inkoustů jsou v podstatě využitelné oba materiály na kolagenové bázi, s tím, že hovězí kolagen je lépe tisknutelný a v lyofilizované formě vykazuje větší míru porozity.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Prakash K. S., Nancharaih T., *Additive Manufacturing Techniques in Manufacturing – An Overview*, Materials Today: Proceedings, 2018, 5 (2, Part 1), 3873–3882.
2. Janovec M., *Užitné vlastnosti výrobku připravených pomocí technologie 3D tisku*, Zlín, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2019.
3. Narayan R., *Rapid Prototyping of Biomaterials – Techniques in Additive Manufacturing (2nd Edition) – 1.2 Definition.*, Elsevier, 2020.
4. Gonzalez–Gutierrez J., Cano S., Schuschnigg S., *Additive Manufacturing of Metallic and Ceramic Components by the Material Extrusion of Highly–Filled Polymers: A Review and Future Perspectives.*, Materials, 2018, 11 (5).
5. Guzzi E. A., Tibbitt M. W., *Additive Manufacturing of Precision Biomaterials*, Advanced Materials, 2019, 24.
6. DebRoy T., Wei H. L., Zuback J. S., *Additive manufacturing of metallic components – Process, structure and properties*, Progress in Materials Science, 2018, 92, 112–224.
7. Bishop E. S., Mostafa S., Pakvasa M., *3–D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends*, Genes & Diseases, 2017, 4 (4), 185–195.
8. Cui H., *3D Bioprinting for Organ Regeneration*, Advanced Healthcare Materials, 2017, 6 (1).
9. Singh M., Jonnalagadda S., *Advances in bioprinting using additive manufacturing*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 143.
10. Melchels F. P. W., Domingos M. A. N., *Additive manufacturing of tissues and organs*, Progress in Polymer Science, 2012, 37 (8), 1079–1104.
11. Jessop Z. M., Al–Sabah A., Gardiner M. D., *3D bioprinting for reconstructive surgery: Principles, applications and challenges*, Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 2017, 70 (9), 1155–1170.
12. González–Henríquez C. M., Sarabia–Vallejos M. A., *Polymers for additive manufacturing and 4D–printing: Materials, methodologies, and biomedical applications*, Progress in Polymer Science, 2019, 94, 57–116.
13. Busachi A., Erkoyuncu J., Colegrove P., *A review of Additive Manufacturing technology and Cost Estimation techniques for the defence sector*, CIRP Journal of Manufacturing Science and Technology, 2017, 19, 117–128.
14. Zadpoor A. A., Malda J., *Additive Manufacturing of Biomaterials, Tissues, and Organs*, 2017, 45 (1), 1–11.
15. Spoerk M., Gonzalez–Gutierrez J., *Material extrusion–based additive manufacturing of polypropylene: A review on how to improve dimensional inaccuracy and warpage*, Applied polymer science, 2019, 1–16.
16. Ligon C. S., Liska R., *Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing*, ACS Publications, 2017, 117, 10212–10290.

17. Wágnerová L., *Materiály na bázi polymerů využitelné pro bio 3D-tisk*, Zlín, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2018.
18. Singh S., Ramakrishna S., Singh R., *Material issues in additive manufacturing: A review*, Journal of Manufacturing Processes, 2017, 25, 185–200.
19. Jabran S., Wei Q., Lei M., *A review on 3D printed matrix polymer composites: its potential and future challenges*, The International Journal of Advanced Manufacturing Technology, 2020, 106 (5–6), 1695–1721.
20. Awad A., Trenfield S. J., Gaisford S., Basit A. W., *3D printed medicines: A new branch of digital healthcare*, International Journal of Pharmaceutics, 2018, 548 (1), 586–596.
21. Valkenaers H., Vogeler F., *A novel approach to additive manufacturing: screw extrusion 3D-printing*, Department of Mechanical Engineering, Faculty of Engineering Technology – Campus De Nayer, KU Leuven, Belgium, 2013.
22. Derakhshanfar S., Mbeleck R., Xu K., Zhang X., Zhong W., *3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances*, Bioactive Materials, 2018, 3 (2), 144–156.
23. Vijayavenkataraman S., Yan W. C., Lu W. F., *3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2018, 132, 296–332.
24. Tomasina C., Bodet T., *Bioprinting Vasculature: Materials, Cells and Emergent Techniques*, Materials, 2019, 12 (17).
25. Ambrosio L., *Extrusion-Based Printing*, Biomedical Composites (2nd Edition), Elsevier, ISBN 978-0-08-100752-5.
26. Ozbolat I. T., Hospodiuk M., *Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting*, Biomaterials, 2016, 76, 321–343.
27. Peng W., Datta P., Ayan B., Ozbolat V., *3D bioprinting for drug discovery and development in pharmaceuticals*, Acta Biomaterialia, 2017, 57, 26–46.
28. Gu Z., Fu J., Lin H., *Development of 3D Bioprinting: From Printing Methods to Biomedical Applications*, Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2019.
29. Hacıoglu A., Yilmazer H., *3D printing for tissue engineering applications*, Politeknik Dergisi, 2018, 1 (21), 221–227.
30. Manapat J. Z., Chen Q., Ye P., Advincula R. C., *3D Printing of Polymer Nanocomposites via Stereolithography*, Macromolekular Materials and Engineering, 2017, 302 (9).
31. Wang Z., Abdulla R., Parker B., *A simple and high-resolution stereolithography-based 3D bioprinting system using visible light crosslinkable bioinks*, Biofabrication, 2015, 7 (4).
32. Saygili E., Dogan-Gurbuz A., Yesil-Celiktas O., Draz M. S., *3D bioprinting: A powerful tool to leverage tissue engineering and microbial systems*, Bioprinting, 2020, 18.
33. Seyed F. S. S., Mehrali M., Yarmand H., *A review on powder-based additive manufacturing for tissue engineering: selective laser sintering and inkjet 3D printing*, Science and Technology of Advanced Materials, 2015, 16 (3).

34. Néel T. A. L., Pascal M., *A review on additive manufacturing of sand molds by binder jetting and selective laser sintering*, Rapid Prototyping Journal, 2018, 24 (8), 1325–1336.
35. Mandrycky C., Wang Z., Kim K., *3D bioprinting for engineering complex tissues*, Biotechnology Advances, 2016, 34 (4), 422–434.
36. Duocastella M., Colina M., Fernández–Pradas J. M., Serra P., Morenza J. L., *Study of the laser–induced forward transfer of liquids for laser bioprinting*, Applied Surface Science, 2007, 253 (19), 7855–7859.
37. Catros S., Guillotin B., Bačáková M., *Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser–Assisted Bioprinting*, Applied Surface Science, 2011, 257 (12), 5142–5147.
38. Keriquel V., Oliveira H., Rémy M., *In situ printing of mesenchymal stromal cells, by laser–assisted bioprinting, for in vivo bone regeneration applications*, Scientific Reports, 2017, 7.
39. Fernández–Pradas J. M., Colina M., Serra P., Domínguez J., *Laser–induced forward transfer of biomolecules*, Thin Solid Films, 2004, 27 (30), 453–454.
40. Smausz T., Hopp B., Kecskeméti G., Bor Z., *Study on metal microparticle content of the material transferred with Absorbing Film Assisted Laser Induced Forward Transfer when using silver absorbing layer*, Applied Surface Science, 2006, 252 (13), 4738–4742.
41. Karaiskou A., Zergioti I., Fotakis C., Kapsetaki M., Kafetzopoulos D., *Microfabrication of biomaterials by the sub–ps laser–induced forward transfer process*, Applied Surface Science, 2003, 208 (209), 245–249.
42. Kandyla M., *Laser microprinting of conducting polymers*, cit. (24. 2. 2020), dostupné z: <http://www.mkandyla.gr/Kandyla/LIFT.html>. Published 2020. Accessed.
43. Barron J. A., Rosen R., Jones–Meehan J., *Biological laser printing of genetically modified Escherichia coli for biosensor applications*, Biosensors and Bioelectronics, 2004, 20 (2), 246–252.
44. Fitzgerald L. A., Wu P. K., Gurnon J. R., Biffinger J. C., *Isolation of the phycodnavirus PBCV–1 by biological laser printing*, Journal of Virological Methods, 2010, 167 (2), 223–225.
45. Montgomery M. T., Fulmer P. A., Gaston J. D., Pirlo R. K., *Heterotrophic bacterial production measured on soil microaggregates sampled using a Biological Laser Printer*, Soil Biology and Biochemistry, 2019, 131, 176–181.
46. Barron J. A., Ringeisen B. R., Kim H., Spargo B. J., *Application of laser printing to mammalian cells*, Thin Solid Films, 2004, 453 (454), 383–387.
47. Ringeisen B. R., Chrisey D. B., Piqué A., *Generation of mesoscopic patterns of viable Escherichia coli by ambient laser transfer*, Biomaterials, 2002, 23 (1), 161–166.
48. Wu P. K., Ringeisen B. R., Callahan J., *The deposition, structure, pattern deposition, and activity of biomaterial thin–films by matrix–assisted pulsed–laser evaporation (MAPLE) and MAPLE direct write*, Thin Solid Films, 2001, 198 (399), 607–614.

49. Odde D. J., Renn M. J., *Laser-guided direct writing for applications in biotechnology*, Trends in Biotechnology, 1999, 17 (10), 385–389.
50. Vinson B. T., Sklare S. C., Chrisey D. B., *Laser-based cell printing techniques for additive biomanufacturing*, Current Opinion in Biomedical Engineering, 2017, 2, 14–21.
51. Xu T., Jin J., Gregory C., Hickman J. J., Boland T., *Inkjet printing of viable mammalian cells*, Biomaterials, 2005, 26 (1), 93–99.
52. Saunders R. E., Gough J. E., Derby B., *Delivery of human fibroblast cells by piezoelectric drop-on-demand inkjet printing*, Biomaterials, 2008, 29 (2), 193–203.
53. Link N., Semiat R., *Ink drop motion in wide-format printers: I. Drop flow from Drop-On-Demand (DOD) printing heads*, Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2009, 48 (1), 68–83.
54. Li J., Wu C., Chu P. K., Gelinsky M., *3D printing of hydrogels: Rational design strategies and emerging biomedical applications*, Materials Science and Engineering: R: Reports, 2020, 140.
55. Zhou J., Pei Z., *Experimental study of the piezoelectric drop-on-demand drop formation in a coaxial airflow*, Chemical Engineering and Processing – Process Intensification, 2020, 147.
56. Chen H. Y., Liang J. W., *Piezoelectric-actuated drop-on-demand droplet generator control using adaptive wavelet neural network controller*, Journal of Process Control, 2014, 24 (5), 578–585.
57. Brünahl J., Grishin A. M., *Piezoelectric shear mode drop-on-demand inkjet actuator*, Sensors and Actuators A: Physical, 2002, 101 (3), 371–382.
58. Lee S., Byun D., Jung D., *Pole-type ground electrode in nozzle for electrostatic field induced drop-on-demand inkjet head*, Sensors and Actuators A: Physical, 2008, 141 (2), 506–514.
59. Li X., Go M., Lim S., Jeong Y. J., *Electrohydrodynamic (EHD) jet printing of carbon-black composites for solution-processed organic field-effect transistors*, Organic Electronics, 2019, 73, 279–285.
60. Barton K., Mishra S., Alleyne A., Ferreira P., Rogers J., *Control of high-resolution electrohydrodynamic jet printing*, Control Engineering Practice, 2011, 19 (11), 1266–1273.
61. Jung E. M., Lee S. W., Kim S. H., *Printed ion-gel transistor using electrohydrodynamic (EHD) jet printing process*, Organic Electronics, 2018, 52, 123–129.
62. Li K., Wang D., Zhao K., Song K., Liang J., *Electrohydrodynamic jet 3D printing of PCL/PVP composite scaffold for cell culture*, Talanta, 2020, 211.
63. Zhang L. G. F., John P. L., Kam W., *3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Elsevier, 2015, ISBN 978-0-12-800547-7.
64. Demirci U., *Single cell epitaxy by acoustic picolitre droplets*, Lab on a Chip, 2007, 7 (9), 1139–1145.

65. Wei L., Wai Y. Y., *Microvalve-based bioprinting – process, bio-inks and applications*, Biomaterials Science, 2017, 5 (4), 632–647.
66. Narayan R., *Rapid Prototyping of Biomaterials – Techniques in Additive Manufacturing (2nd Edition) – 5.1.1 Tissue Engineering*. Elsevier, 2020, ISBN 978-0-08-102663-2.
67. Mironov V., Boland T., Trusk T., Forgacs G., *Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering*, Trends in Biotechnology, 2003, 21 (4), 157–161.
68. Moroni L., Wijn J. R., Blitterswijk C. A., *3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: Influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties*, Biomaterials, 2006, 27 (7), 974–985.
69. Horáková J., *Úvod do tkáňového inženýrství*, cit. (2. 2. 2020), dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/5343/mod_resource/content/1/MTI%201-2.pdf.
70. Kachan K., *Kultivace vrstvy buněk v mikrofluidním systému*, Vysoké učení technické v Brně, Ústav biomedicínského inženýrství, Brno, 2017.
71. Wikipedia, *Proliferace*, cit. (4. 2. 2020), dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Proliferace>. Accessed.
72. Wikipedia, *Principle of tissue engineering*, cit. (3. 4. 2020), dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Tissue_engineering_english.jpg. Accessed.
73. Conci C., Bennati L., Bregoli C., *Tissue engineering and regenerative medicine strategies for the female breast*. J Tissue Eng Regen Med, 2020, 14 (2), 369–387.
74. Drury J. L., Mooney D. J., *Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications*, Biomaterials, 2003, 24 (24), 4337–4351.
75. Ermis M., Antmen E., Hasirci V., *Micro and Nanofabrication methods to control cell-substrate interactions and cell behavior: A review from the tissue engineering perspective*, Bioactive Materials, 2018, 3 (3), 355–369.
76. Bedir T., Ulag S., Ustundag C. B., Gunduz O., *3D bioprinting applications in neural tissue engineering for spinal cord injury repair*, Materials Science and Engineering: C, 2020, 110.
77. Cellink, *What is 3D bioprinting*, cit. (25. 3. 2020), dostupné z: <https://cellink.com/what-is-3d-bioprinting-simply-explained/>.
78. Boland T., Tao X., Damon B. J., *Drop-on-demand printing of cells and materials for designer tissue constructs*, Materials Science and Engineering: C, 2007, 27 (3), 372–376.
79. Roth E. A., Xu T., Das M., Gregory C., *Inkjet printing for high-throughput cell patterning*, Biomaterials, 2004, 25 (17), 3707–3715.
80. Select science, *Cellink bio x by Cellink*, cit. (1. 3. 2020), dostupné z: <https://www.selectscience.net/products/cellink-bio-x/?prodID=209722>.
81. Cgtrader., *Human Ear Free low-poly 3D model*, cit. (5. 3. 2020), dostupné z: <https://www.cgtrader.com/free-3d-models/character/anatomy/human-ear-6>.
82. Environmental expert, *bbi – Model xCUBIO*, cit. (6. 3. 2020), dostupné z: <https://www.environmental-expert.com/products/bbi-model-xcubio-twin-bioreactor-and-fermentor-with-two-cultivation-vessels-624305>.

83. Leberfinger A. N., Dinda S., Wu Y., *Bioprinting functional tissues*, Acta Biomaterialia, 2019, 95, 32–49.
84. Murphy S. V., Atala A., *3D bioprinting of tissues and organs*, Nature Biotechnology, 2014, 32 (8), 773–785.
85. Hong N., Yang G. H., *3D bioprinting and its in vivo applications*. Journal of Biomedical Materials, 2018, 106 (1), 444–459.
86. Ozbolat I. T., Peng W., Ozbolat V., *Application areas of 3D bioprinting*, Drug Discovery Today, 2016, 21 (8), 1257–1271.
87. Murr L. E., *Metallurgy principles applied to powder bed fusion 3D printing/additive manufacturing of personalized and optimized metal and alloy biomedical implants: an overview*, Journal of Materials Research and Technology, 2020, 9 (1), 1087–1103.
88. Wen Z., Renji Z., Yongyan N., Jie R., Tianrui Z., *Fused deposition modelling of an auricle framework for microtia reconstruction based on CT images*, Rapid Prototyping Journal, 2008, 5 (14).
89. Williams J. M., Adewunmi A., Schek R. M., *Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering*, Biomaterials, 2005, 26 (23), 4817–4827.
90. Aljohani W., Ullah M. W., Zhang X., Yang G., *Bioprinting and its applications in tissue engineering and regenerative medicine*, International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107, 261–275.
91. Ozbolat I. T., *Bioprinting scale-up tissue and organ constructs for transplantation*, Trends in Biotechnology, 2015, 33 (7), 395–400.
92. Pati F., Song T. H., Rijal G., Jang J., Kim S. W., *Ornamenting 3D printed scaffolds with cell-laid extracellular matrix for bone tissue regeneration*, Biomaterials, 2015, 37, 230–241.
93. Martin G., Andrea D., Lothar K., Sabrina S., Claudia U., *Laser Printing of Stem Cells for Biofabrication of Scaffold-Free Autologous Grafts*, Tissue Engineering, 2011, 17 (1), 79–87.
94. Cui X., Breitenkamp K., Finn M., Lotz M., *Direct Human Cartilage Repair Using Three-Dimensional Bioprinting Technology*. Tissue Engineering, 2012, 18 (11–12), 1304–1312.
95. Hyun-wook K., Jin L. S., Kap K. I., Carlos K., *A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity*, Nature Biotechnology, 2016, 34 (3), 312–319.
96. Xiaofeng C., Yongjun Q., *Accelerated myotube formation using bioprinting technology for biosensor applications*, Biotechnology Letters, 2013, 35 (3), 315–321.
97. Mironov V., Kasyanov V., Markwald R. R., *Nanotechnology in vascular tissue engineering: from nanoscaffolding towards rapid vessel biofabrication*, Trends in Biotechnology, 2008, 26 (6), 338–344.
98. Farzaneh D., Zhang Y., *In vitro evaluation of carbon-nanotube-reinforced bioprintable vascular conduits*, Nanotechnology, 2014, 25 (14).

99. Abbott R. D., Kaplan D. L., *Strategies for improving the physiological relevance of human engineered tissues*, Trends in Biotechnology, 2015, 33 (7), 401–407.
100. MedSkin, *MatriDerm*, cit. (5. 3. 2020), dostupné z: <http://www.medskin-suwelack.com/en/matriderm.html>.
101. Peng W., Unutmaz D., Ozbolat I. T., *Bioprinting towards Physiologically Relevant Tissue Models for Pharmaceuticals*, Trends in Biotechnology, 2016, 34 (9), 722–732.
102. Tyler B., Gullotti D., Mangraviti A., Utsuki T., Brem H., *Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2016, 107, 163–175.
103. Zeeshan S., Khurshid Z., Verma V., Rashid H. *Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications*, Materials, 2015, 8 (9), 5744–5794.
104. Tan L., Yu X., Wan P., Yang K., *Biodegradable Materials for Bone Repairs: A Review*, Journal of Materials Science & Technology, 2013, 29 (6), 503–513.
105. Brožek J., *Kyselina polymléčná – materiál pro biodegradovatelné oděvní a technické textilie*, Chemické listy, 2015, 109, 291–297.
106. Courtney J. M., *Mechanical properties of biomaterials: Advances in Biomaterials*, Journal of Biomedical Engineering, 1981, 3 (3), 260–261, ISSN 1751–1616.
107. Datta P., Ayan B., Ozbolat I. T., *Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication*, Acta Biomaterialia, 2017, 51, 1–20.
108. Zhang H. B., Xing T. L., Yin R. X., *Three-dimensional bioprinting is not only about cell-laden structures*, Chinese Journal of Traumatology, 2016, 19 (4), 187–192.
109. Das S., Pati F., Choi Y. J., *Bioprintable, cell-laden silk fibroin–gelatin hydrogel supporting multilineage differentiation of stem cells for fabrication of three-dimensional tissue constructs*, Acta Biomaterialia, 2015, 11, 233–246.
110. Wang X., *Advanced Polymers for Three-Dimensional (3D) Organ Bioprinting*, Micromachines, 2019, 10 (12).
111. Yue K., Trujillo-de S. G., Alvarez M. M., Tamayol A., *Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels*, Biomaterials, 2015, 73, 254–271.
112. Boere K., Visser J., Seyednejad H., *Covalent attachment of a three-dimensionally printed thermoplast to a gelatin hydrogel for mechanically enhanced cartilage constructs*, Acta Biomaterialia, 2014, 10 (6), 2602–2611.
113. Liu F., Chen Q., Liu C., *Natural Polymers for Organ 3D Bioprinting*, Polymers, 2018, 10 (11).
114. Daniele M. A., Adams A. A., Naciri J., North S. H., *Interpenetrating networks based on gelatin methacrylamide and PEG formed using concurrent thiol click chemistries for hydrogel tissue engineering scaffolds*, Biomaterials, 2014, 35 (6), 1845–1856.
115. Wikipedie, *Bilkoviny*, cit. (5. 4. 2020), dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/B%C3%ADlkovina>.
116. Alfaro A. B., Weber I. C., *Fish Gelatin: Characteristics, Functional Properties, Applications and Future Potentials*, Food Engineering Reviews, 2015, (7), 33–44.

117. Peterková P. O., *Kolagen – vlastnosti, modifikace a aplikace*, Chemické listy, 2000, 371–379.
118. Haug I. J., Draget K. I., *Handbook of Hydrocolloids (Second Edition): 6 – Gelatin*, Woodhead Publishing, 2009, 142–163.
119. Hrdlová L., *Želatina – vlastnosti, metody charakterizace a její použití v potravinářském a farmaceutickém průmyslu*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně; Fakulta technologická, Zlín, 2008.
120. Klotz B. J., Gawlitta D., Rosenberg A. J., Malda J., *Gelatin–Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication–Based Tissue Repair*, Trends in Biotechnology, 2016, 34 (5), 394–407.
121. Gómez–Guillén M. C., Giménez B., López–Caballero M. E., Montero M. P., *Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review*, Food Hydrocolloids, 2011, 25 (8), 1813–1827.
122. Bajpai S. K., Sharma S., *Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions*, Reactive and Functional Polymers, 2004, 59 (2), 129–140.
123. Liangbin L., Vreeker R., Appelqvist I., *Reexamining the Egg–Box Model in Calcium–Alginate Gels with X–ray Diffraction*, Biomacromolecules, 2007, 8 (2), 464–468.
124. George M., Abraham T. E., *Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan a review*, Journal of Controlled Release, 2006, 114 (1), 1–14.
125. Gombotz W. R., Wee S., *Protein release from alginate matrices*, Advanced Drug Delivery Reviews, 1998, 31 (3), 267–285.
126. Varaprasad K., Jayaramudu T., Kanikireddy V., Toro C., Sadiku E. R., *Alginate–based composite materials for wound dressing application: A mini review*, Carbohydrate Polymers, 2020, 236.
127. Reddy N., Reddy R., Jiang Q., *Crosslinking biopolymers for biomedical applications*, Trends in Biotechnology, 2015, 33 (6), 362–369.
128. Nezhad–Mokhtari P., Ghorbani M., Roshangar L., Soleimani R. J., *Chemical gelling of hydrogels–based biological macromolecules for tissue engineering: Photo– and enzymatic–crosslinking methods*, International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 139, 760–772.
129. Hennink W. E., *Novel crosslinking methods to design hydrogels*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2012, 64, 223–236.
130. Maia J., Carvalho R. A., Coelho J. F., *Insight on the periodate oxidation of dextran and its structural vicissitudes*, Polymer, 2011, 52 (2), 258–265.
131. Merck, *Phosphate Buffered Saline*, cit. (7. 5. 2020), dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/806552?lang=en®ion=CZ&fbclid=IwAR2ujeS8ZxAvHobYmifA-wyHSHcNTaqLJ4eKOZiv8O-fiaMzBf4RnXTQZx0>.
132. Wikipedia, *Schiffovy báze*, cit. (4. 5. 2020), dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Schiffovy_b%C3%A1ze.

-
133. Quora, *What is schiff's base?*, cit. (4. 5. 2020), dostupné z: <https://www.quora.com/What-is-schiffs-base>.
134. Cellink, *BIO X*, cit. (4. 5. 2020), dostupné z: <https://cellink.com/wp-content/uploads/2019/06/Cellink-BioX-brochure-16P-LR-2.pdf>.
135. Lisman A., Butruk B., Wasiak I., Ciach T., *Dextran /Albumin hydrogel sealant for Dacron (R) vascular prosthesis*, Journal of Biomaterials Applications, 2014, 28 (9), 1386–1396.
136. Hrdlička J., *Titrace a odměrné nádoby*, cit. (4. 5. 2020), dostupné z: <https://dspace5.zcu.cz/bitstream/11025/29388/1/Titrace.pdf>.
137. Zhao H., *Determination of Degree of Substitution of Formyl Groups in Polyaldehyde Dextran by the Hydroxylamine Hydrochloride Method*, Pharmaceutical Research, 1991, 8, 400–402.
138. Cabral J., Roxburgh M., Shi Z., *Synthesis, physiochemical characterization, and biocompatibility of a chitosan/dextran-based hydrogel for postsurgical adhesion prevention*, Journal of materials science Materials in medicine, 2014, 25.
139. Reusch W., *Infrared Spectroscopy*, cit. (4. 5. 2020), dostupné z: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm>.
140. Kankala R. K., Wang S. B., Chen A. Z., Zhang Y. S., *Handbook of Nanomaterials for Cancer Theranostics, Chapter 2 – Self-Assembled Nanogels: From Particles to Scaffolds and Membranes*, Elsevier, 2018, 33–62.
141. Collins N. M., Birkinshaw C., *Investigation of the Swelling Behavior of Crosslinked Hyaluronic Acid Films and Hydrogels Produced Using Homogeneous Reactions*, Journal of Applied Polymer Science, 2008, 109, 923–931.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AM	Aditivní výroba (additive manufacturing)
CAD	Computer aided design
SLA	Stereolitografie
SLS	Selektivní laserové slinování (selective laser sintering)
UV	Ultrafialové záření
FDM	Modelování depozicí tavenin (fused deposition modeling)
ME-AM	Materiál extrusion additive manufacturing
EBB	Bio-tisk založený na vytlačování (extrusion based bioprinting)
USA	Spojené státy americké
FFF	Fused filament fabrication
SLM	Selektivní laserové tavení (selective laser melting)
LAB	Laserem asistovaný bio-tisk (laser assisted bioprinting)
LIFT	Laser induced forward transfer
AFA-LIFT	Absorbing film assisted laser induced forward transfer
MAPLE DW	Matrix assisted pulse laser evaporation direct write
MAPLE	Matrix assisted pulse laser evaporation
LG DW	Laser guide direct write
BioLP	Biologické laserové zpracování (biological laser printing)
EHD	Elektro-hydrodynamický tryskový tisk (electrohydrodynamic jetting based bioprinting)
DBB	Kapčkový bio-tisk (droplet based bioprinting)
DOD	Kapčka na vyžádání (drop on demand)
CIJ	Kontinuální bio-tisk (continuous inkjet jetting)
IJP	Inkoustový bio-tisk (inkjet bioprinting)
ECM	Extracelulární matrice

Ag	Stříbro
BaTiO ₃	Bárium titanát
PEGDA	Polyethylen glykol diakrylát
PEGDMA	Polyethylen glykol dimethakrylát
GelMA	Hydro-gel želatiny a methyacrylátu
CO ₂	Oxid uhličitý
PCL	poly-ε-kaprolaktan
PEG	Polyethylenglykol
ABS	Akrylonitril-butadien-styren
PLA	Kyselina polyléčná
PVA	Polyvinylalkohol
PA	Polyamid
PC	Polykarbonát
PEEK	Polyetheretherketon
PEI	Polyetherimid
PPS	Polyfenyl sulfid
PPF	Polypropylen fumarát
ASA	Akrylonitril-styren-akrylát
PPS	Polyfenylsulson
PU	Polyurethan
PLGA	Kopolymer laktidu a glykolidu
-NH ₂	Amino skupina
-OH	Hydroxylová skupina
-COOH	Karboxylová skupina
CaCl ₂	Chlorid vápenatý
CaCO ₃	Uhličitán vápenatý

HONH₂·HCl Hydroxylamin hydrochlorid

η Smyková viskozita (Pa.s)

$\dot{\gamma}$ Rychlost smykové deformace (s⁻¹)

p Porozita (%)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 FDM tiskárna navržená Scottem Crumpem, skládající se z vertikálně posuvné platformy (a), temperované tiskové hlavy (b), tištěným objektem (c), druhou tiskovou hlavou zajišťující tisk podpěr z jiného materiálu (d), plnicí zónou materiálem. 16	19
Obr. 2 FDM typy technologie zpracování za pomoci pístu (a), filamentu (b) a šneku (c). 4	20
Obr. 3 EBB s pohonem pneumatickým (a), pístovým (b), šnekovým (c). 23	22
Obr. 4 Schéma znázorňující SLA techniku bottom-up (a), top-down (b). 30	24
Obr. 5 Schéma konstrukce tiskárny SLS 34	27
Obr. 6 Schéma konstrukce tiskárny technologií LAB. 38	28
Obr. 7 Schéma znázorňující technologie CIJ, DOD (termický, piezoelektrický, elektrostatický). 23	33
Obr. 8 Schéma znázorňující technologii EHD. 23	34
Obr. 9 Schéma znázorňující pneumatický (b) a akustický bio-tisk (a). 23	35
Obr. 10 Základní princip tkáňového inženýrství. 72	37
Obr. 11 Proces bio-tisku zahrnující předzpracování, zpracování a následné zpracování. 23,80-82	42
Obr. 12 Protéza připravená pomocí technologie FDM (levá strana), kloubní náhrada připravená pomocí SLM (pravá strana). 14	47
Obr. 13 Scaffold ucha připravený za pomoci FDM, kde (a) scaffold po tisku, (b) scaffold po osazení buňkami a transplantaci, (c) 12 měsíců po transplantaci. 88	47
Obr. 14 Tableta připravená klasickými metodami (a), FDM technologií (b). 20	48
Obr. 15 Připravené scaffoldy za pomoci technologie bio-tisku (a) chrupavčitá tkáň 94; (b) model kostní tkáně, (c) vytištěná kostní tkáň 89; (d, e) model ucha, (f) proces tisku ucha, (g) vytištěné ucho. 95	49
Obr. 16 Připravené cévy bio-tiskem, kde (a) cévní potrubí o délce 1 m a průměru 1 mm, (b) zvětšený snímek cévního potrubí, (c) buněčné médium. 98	50

Obr. 17 Bio-tisk srdeční chlopně, kde (a) model chlopně, (b) vytištěný konstrukt, (c) osazení buněčnou kulturou po dobu 7 dní v tubě. ²³	50
Obr. 18 Schéma kolagenu typu I až III. ¹¹⁷	57
Obr. 19 Denaturace kolagenu (pravá strana) na želatinu (levá strana). ¹¹⁸	58
Obr. 20 Schéma vzorce želatiny. ¹¹³	59
Obr. 21 Schéma struktury alginátu sodného, tvořeného M a G bloky. ¹²⁵	60
Obr. 22 Schéma oxidace dextranu v pozici α -1,6: (a) C3–C4; (b) C3–C2; (c) dvojitá oxidace. ¹³⁰ 62	
Obr. 23 Egg-box model alginátu s vápenatými ionty ¹²³	66
Obr. 24 Schiffova báze, průběh reakce. ¹³³	68
Obr. 25 Bio-tiskárna BIO X™ (levá strana) a tiskové hlavy (pravá strana). ¹³⁴	69
Obr. 26 Mřížka typu rectilinear.	70
Obr. 27 Vytištěný scaffold pro kolagen typu hovězí s dex-ox v poměru 1:1, parametry tisku: 20 % hustota plnění, tlak 200 kPa v čase 5 min probíhající síťovací reakce, výška vrstvy 0,6 mm.	85
Obr. 28 Vytištěný scaffold pro kolagen typu hovězí s dex-ox v poměru 1:1, parametry tisku: 15 % hustota plnění, tlak 200 kPa v čase 5 min probíhající síťovací reakce, výška vrstvy 0,8 mm.	85
Obr. 29 Vytištěný scaffold pro kolagen typu hovězí s dex-ox v poměru 1:1, parametry tisku: 15 % hustota plnění, tlak 230 kPa v čase 15 min probíhající síťovací reakce, výška vrstvy 0,8 mm.	86
Obr. 30 Vytištěný scaffold pro kolagen typu hovězí s dex-ox v poměru 1:1, parametry tisku: 15 % hustota plnění, tlak 120 kPa v čase 15 min probíhající síťovací reakce, výška vrstvy 0,8 mm.	87
Obr. 31 Vytištěný scaffold pro hovězí kolagen s dex-ox v poměru 1:1, parametry tisku pro: (1A) 120 kPa, 15 min.; (1B) 120 kPa, 20 min.; (1C) 120 kPa, 25 min.; (1D) 130 kPa, 30 min.; (1E) 130 kPa, 35 min.	88

- Obr. 32 Vytisknutý scaffold pro hovězí kolagen s dex-ox v poměru 2:1, parametry tisku pro: (2A) 110 kPa, 15 min.; (2B) 110 kPa, 20 min.; (2C) 160 kPa, 25 min.; (2D) 160 kPa, 30 min.; (2E) 160 kPa, 35 min. 90
- Obr. 33 Vytisknutý scaffold pro hovězí kolagen s dex-ox v poměru 3:1, parametry tisku pro: (3A) 100 kPa, 15 min.; (3B) 100 kPa, 20 min.; (3C) 100 kPa, 25 min.; (3D) 110 kPa, 30 min.; (3E) 110 kPa, 35 min.; (3F) 110 kPa, 40 min. 92
- Obr. 34 Vytisknutý scaffold pro kolagen typu králík s dex-ox v poměru 1:1, parametry tisku pro: (1A) 70 kPa, 40 min.; (1B) 80 kPa, 45 min.; (1C) 90 kPa, 50 min.; (1D) 90 kPa, 55 min.; (1E) 100 kPa, 60 94
- Obr. 35 Vytisknutý scaffold pro kolagen typu králík s dex-ox v poměru 2:1, parametry tisku pro: (2A) 70 kPa, 40 min.; (2B) 70 kPa, 45 min.; (2C) 70 kPa, 50 min.; (2D) 80 kPa, 55 min.; (2E) 80 kPa, 60 96
- Obr. 36 Vytisknutý scaffold pro kolagen typu králík s dex-ox v poměru 3:1, parametry tisku pro: (3A) 70 kPa, 20 min.; (3B) 80 kPa, 25 min.; (3C) 90 kPa, 30 min.; (3D) 110 kPa, 35 min.; (3E) 120 kPa, 40 98
- Obr. 37 Hovězí kolagen v poměru 1:1, řez v ose z. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A. 100
- Obr. 38 Hovězí kolagen v poměru 1:1, řez v ose x. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A. 101
- Obr. 39 Hovězí kolagen v poměru 2:1, řez v ose z. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A. 102
- Obr. 40 Hovězí kolagen v poměru 2:1, řez v ose x. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A. 103
- Obr. 41 Hovězí kolagen v poměru 3:1, řez v ose z. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A. 104

- Obr. 42 Hovězí kolagen v poměru 3:1, řez v ose x. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A. 105
- Obr. 43 Kolagen typu králík v poměru 1:1, řez v ose z. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A. 106
- Obr. 44 Kolagen typu králík v poměru 1:1, řez v ose x. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A. 107
- Obr. 45 Kolagen typu králík v poměru 2:1, řez v ose z. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A. 108
- Obr. 46 Kolagen typu králík v poměru 2:1, řez v ose x. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A. 109
- Obr. 47 Kolagen typu králík v poměru 3:1, řez v ose z. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A. 110
- Obr. 48 Kolagen typu králík v poměru 3:1, řez v ose x. SEM snímek (A), analýza v ImageJ snímek (B, C). Snímek B znázorňuje oblast pórů (černá), snímek C znázorňuje mapu počítaných pórů. Snímek B a C je ve stejném měřítku jako snímek A. 111

SEZNAM DIAGRAMŮ

Diagram 1 Schéma metod provedení pro extruzní metodu bio-tisku (EBB). ^{23,28}	22
Diagram 2 Schéma metod pro laserově asistovaný bio-tisk. ²³	28
Diagram 3 Schéma metod pro Bio-tisk na bázi kapek (DBB). ²³	31
Diagram 4 Přírodní materiály vhodné pro bio-tisk. ^{90,110}	56

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Srovnání technik bio-tisku EBB, DBB, SLA a LAB. ^{22,83}	44
Tab. 2 Naměřené hodnoty spotřeby 0,25 M hydroxidu sodného při titraci 0,1 M kyseliny šťavelové (10 ml).....	77
Tab. 3 Naměřené hodnoty spotřeby 0,25 M NaOH při titraci metodou hydroxylamin hydrochlorid.....	77
Tab. 4 Vyhodnocení plochy pod křivkou pro vybrané oblasti.	80
Tab. 5 Časy gelace pro systém želatina a dex-ox (ethylenglykol, 4h).....	81
Tab. 6 Časy gelace pro systém kolagen (hovězí) a dex-ox (ethylenglykol, 4h).....	82
Tab. 7 Časy gelace pro systém kolagen (králík) a dex-ox (ethylenglykol, 4h).	83
Tab. 8 Nastavený tlak při tisku hovězí kolagen v čase pro poměr 1:1.	87
Tab. 9 Nastavený tlak při tisku hovězího kolagenu v čase pro poměr 2:1.	89
Tab. 10 Nastavený tlak při tisku hovězího kolagenu) v čase pro poměr 3:1.....	91
Tab. 11 Nastavený tlak při tisku kolagenu (králík) v čase pro poměr 1:1.....	93
Tab. 12 Nastavený tlak při tisku kolagenu (králík) v čase pro poměr 2:1.....	95
Tab. 13 Nastavený tlak při tisku kolagenu (králík) v čase pro poměr 3:1.....	97
Tab. 14 Vypočtené hodnoty porozity pro kolagen typu hovězí v řezu osy x a z.....	112

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Závislost smykové viskozity na rychlosti smyková deformace pro hydro-gel 2 wt% alginátu síťovaného pomocí 0,1 a 0,01 M CaCl ₂ , CaCO ₃	72
Graf 2 Závislost smykové viskozity na rychlosti smyková deformace pro hydro-gel 3 wt% alginátu síťovaného pomocí 0,1 a 0,01 M CaCl ₂ , CaCO ₃	73
Graf 3 Grafická závislost absorbance na vlnočku pro dextran a jeho oxidovanou formu. ¹³⁸	79
Graf 4 Závislost zobrazující přírůstek hmotnosti hovězího kolagenu v daném časovém intervalu.	114
Graf 5 Závislost zobrazující přírůstek hmotnosti králičího kolagenu v daném časovém intervalu.	114

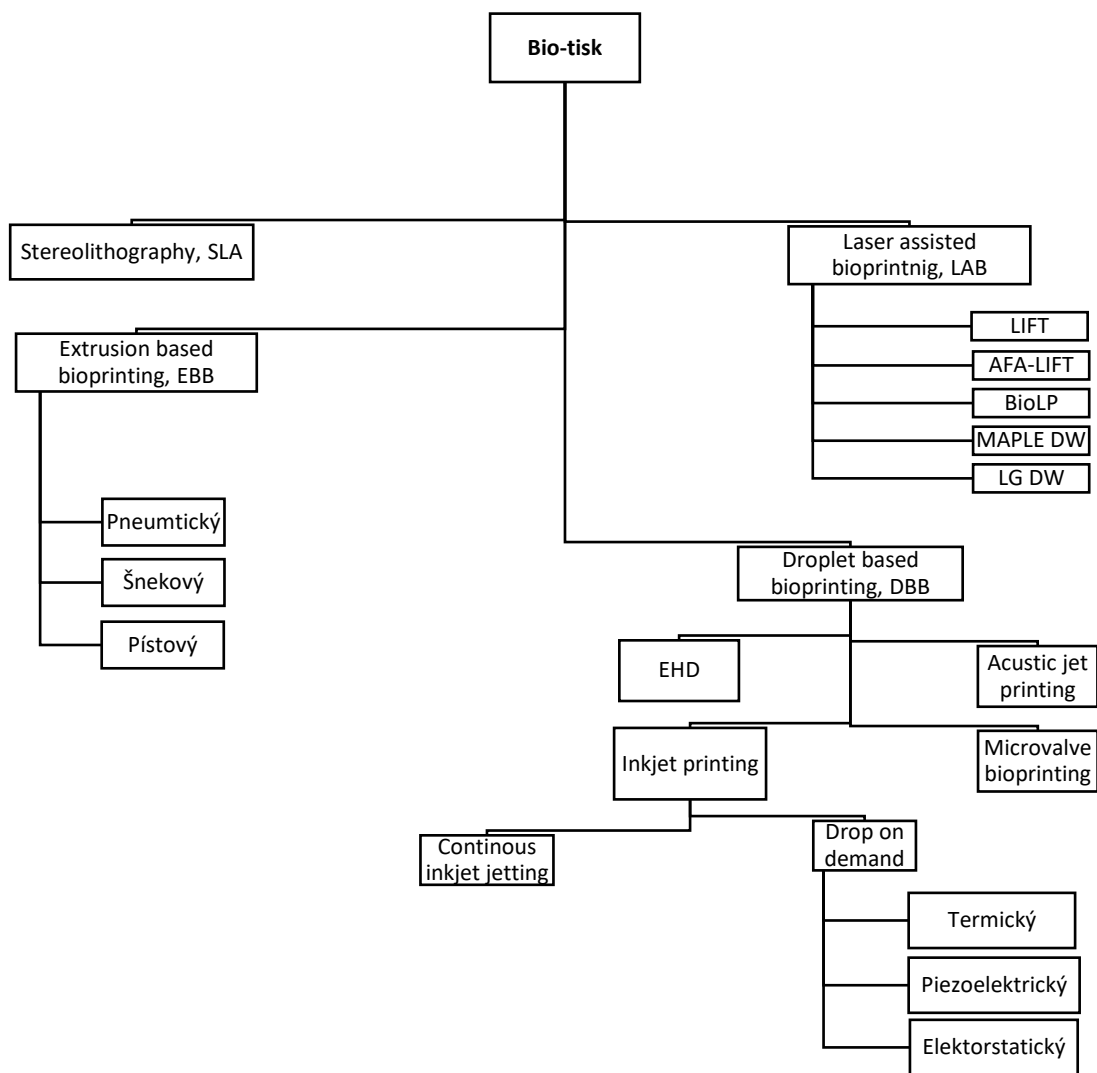
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Přehled technik bio-tisku

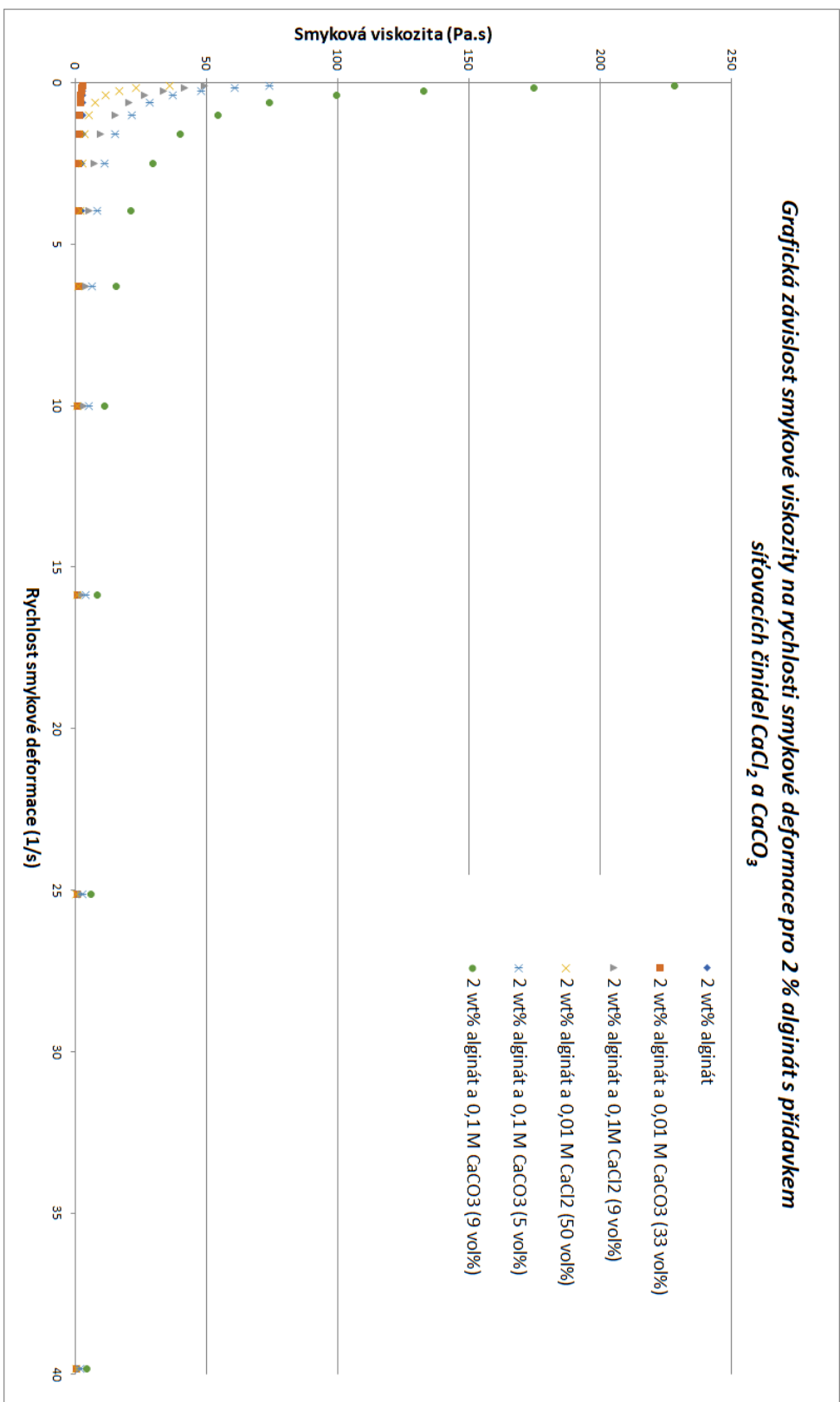
Příloha II: Reologická křivka pro 2 % alginát sodný

Příloha III: Reologická křivka pro 3 % alginát sodný

PŘÍLOHA I: PŘEHLED TECHNIKY BIO-TISKU ²³



PŘÍLOHA II: REOLOGICKÁ KŘIVKA PRO 2 % ALGINÁT SODNÝ



PŘÍLOHA III: REOLOGICKÁ KŘIVKA PRO 3 % ALGINÁT SODNÝ

