

Příprava polymerních materiálových soustav pro 3D tisk v biologických aplikacích

Ing. Markéta Kadlečková, Ph.D.

Teze disertační práce

Teze disertační práce

Příprava polymerních materiálových soustav pro 3D tisk v biologických aplikacích

**Preparation of polymer material systems for 3D printing
in biological applications**

Autor: **Ing. Markéta Kadlečková, Ph.D.**

Studijní program: P2808 Chemie a technologie materiálů

Studijní obor: 2808V006 Technologie makromolekulárních látek

Školitel: doc. Ing. Antonín Minařík, Ph.D.

Konzultant: prof. Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.

Oponenti: prof. RNDr. Petr Ponížil, Ph.D.
doc. Dr. Ing. Vladimír Pavlínek

Zlín, červen 2022

© Markéta Kadlečková

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis Summary**.
Publikace byla vydána v roce 2022

Klíčová slova: tkáňové inženýrství, polymery, scaffoldy, 3D tisk, aditivní výroba, electrospinning, povrchové úpravy.

Key words: tissue engineering, polymers, scaffolds, 3D printing, additive manufacturing, electrospinning, surface treatment.

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

ISBN 978-80-7678-079-8

Abstrakt

Práce se zabývá úpravou materiálových soustav na syntetické či přírodní bázi do podoby hierarchicky strukturovaných scaffoldů a tenkých vrstev. Pro tyto účely byly používány metody aditivní výroby, electrospinningu, fázové separace a leptání. Upravovanými materiály byly fotovytvrditelné pryskyřice, polykaprolakton, poly(vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlorotrifluorethylen), fibroin, polystyren a hliník. Vybrané substráty byly testovány a charakterizovány z hlediska materiálových i biologických vlastností. Výsledky testů buněčné kompatibility prokázaly zásadní vliv topografie povrchu na buněčnou proliferaci a v případě hierarchicky strukturovaných povrchů i na změnu morfologie kmenových buněk. Pro testování připravených strukturovaných povrchů s ohledem na buněčné chování v simulovaných *in vivo* podmínkách byl vyvinut nový typ průtokového bioreaktoru. Provedené experimenty poukázaly na zásadní vliv vznikajících nepravidelností v toku na buněčnou adhezi, na jehož základě byla provedena studie vlivu rozdílných typů toku na stabilitu polymerních povrchů.

Abstract

This work is focused on modification of material systems on a synthetic or natural basis in the form of hierarchically structured scaffolds and thin layers. For this purpose, the methods of additive manufacturing, electrospinning, phase separation, etching were used. The materials treated were photocurable resins, polycaprolactone, poly (vinylidene -fluoride-trifluoroethylene-chlorotrifluoroethylene), fibroin, polystyrene and aluminum. Not only the material properties, but also the cytocompatibility was evaluated. The results of showed a fundamental impact of surface topography on cell proliferation and, in the case of hierarchically structured surfaces, on the change in stem cell morphology. A new type of bioreactor was developed to test the prepared structured surfaces with respect to study of cell behavior under simulated *in vivo* conditions. The results confirmed the fundamental influence of flow irregularities on cell adhesion, on the basis of which a study of the influence of different types of flow on the stability of polymer surfaces was performed.

Obsah

1. Úvod	5
2. Současný stav řešené problematiky	6
3. Cíle práce	8
4. Teoretický rámec	9
4.1 Požadované vlastnosti scaffoldů	9
4.2 Výrobní technologie scaffoldů	10
4.3 Biomateriály pro výrobu scaffoldů.....	11
4.4 Vliv povrchu scaffoldu na chování buněk.....	12
5. Experimentální část	12
5.1 Materiály	13
6. Výsledky a diskuze	14
6.1 Příprava 3D scaffoldů pro biologické aplikace	14
6.1.1 Srovnání přesnosti standardních tiskových přístupů SLA, DLP, FDM.....	15
6.1.2 Vláknenné scaffoldy na bázi polykaprolaktonu.....	17
6.1.2.1 Příprava hierarchicky strukturovaných PCL scaffoldů pomocí 3D tisku	17
6.1.2.2 Příprava hierarchicky strukturovaných PCL vláken pomocí electrospinningu .	19
6.1.3 Poly (vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen).....	20
6.1.3.1 Příprava PiezoRT vláknenných struktur pomocí extruzního tisku	20
6.1.3.2 Příprava PiezoRT vláken pomocí electrospinningu.....	21
6.1.3.3 Zpracování PiezoRT pomocí elektrickým polem asistovaného 3D tisku	22
6.2 Návrh bioreaktoru pro simulování tokových <i>in vivo</i> podmínek.....	23
6.2.1 Vliv toků na stabilitu polymerních povrchů	25
6.3 Strukturované povrchy a jejich vliv na buňky.....	29
6.3.1 Strukturované povrchy na bázi hedvábného proteinu.....	29
6.3.1.1 Příprava fibroinových vrstev pro povrchovou úpravu	29
6.3.1 Strukturalizace fibroinových vrstev pomocí fázové separace.....	30
6.4 Strukturované povrchy na bázi polystyrenu	32
6.5 Příprava strukturovaných povrchů na bázi hliníku.....	38
7. Přínos pro vědu a praxi	42
8. Závěr	43
Reference	45
Seznam obrázků	55
Seznam symbolů a zkratk.....	56

1. Úvod

Poškození orgánů a tkání, ke kterému může dojít nejen v důsledku zranění, je jedním z kritických zdravotních rizik. Lidské tělo má přirozenou schopnost regenerace, avšak nejrůznější choroby jako je cukrovka nebo osteoartróza jsou příklady chronických onemocnění, které tělo nedokáže samo vyléčit a jedinou možností, jak alespoň utlumit příznaky je užívání léků. [1,2] Regenerativní medicína zachází za hranici pouhého zmírnění projevů nemocí a zranění a využívá své oborové interdisciplinaritu k vývoji nových léčebných postupů s potenciálem nahrazovat poškozené tkáně. [3–5] Jedním z oborů spadající pod regenerativní medicínu je tkáňové inženýrství (TE). Dle Langer a Vacantiho [6] TE využívá základní principy přírodních věd a techniky pro vývoj biologických náhrad, které obnovují, udržují či zlepšují tkáňové funkce.

Pokud se podíváme zjednodušeně na biologickou tkáň zjistíme, že se skládá z extracelulární matrix – mezibuněčné hmoty (ECM), buněk a signálních molekul. TE je založeno právě na těchto komponentech, jež jsou známy jako „triáda tkáňového inženýrství“, která se sestává ze tří základních kamenů – tkáňového nosiče (scaffoldu – jenž slouží jako lešení pro buňky a zároveň se podílí na biologických funkcích), buněk a biologických signálních molekul (řídí chování buněk a tím i fenotyp tkáně). Pro vytvoření nové tkáně je tedy scaffold jedním z důležitých aspektů, kterému je potřeba věnovat pozornost. Nejvhodnějším scaffoldem by byla ECM cílové tkáně v nativním stavu, avšak veškeré její funkce, komplexní složení a dynamickou povahu je velmi těžké napodobit. Výběr materiálů a metod pro vytváření scaffoldů je stěžejní záležitostí zejména proto, že každý materiál má odlišné vlastnosti a z nich plynoucí (ne)výhody. Například syntetické materiály mají skvělé mechanické vlastnosti a lze u nich počítat s jistou homogenitou složení a distribucí molekulových hmotností. Přírodní materiály vykazují dobrou biokompatibilitu, ale také nehomogenitu.

Díky širokému spektru dostupných materiálů existuje mnoho možností volby mezi nimi, což je velkou výhodou vzhledem k existenci zcela odlišných typů tkání. Například kůže lze zařadit mezi relativně měkké tkáně, ale také musí přestát velká smyková napětí. Naproti tomu kost je tvrdý materiál s vysokou pevností v tlaku, který musí nést hmotnost těla. Velkou výzvou tedy stále zůstává vytvoření materiálu, jenž by byl všestranně využitelný pro všechny typy tkání.

V neposlední řadě je třeba zmínit, že scaffoldy nemusí být určeny pouze pro rekonstrukce tkání, ale velmi často je lze aplikovat jako nosiče léčiv. [7]

Při vytváření scaffoldu je důležité brát v potaz topografii a povrchové vlastnosti, jež mají zásadní vliv na chování buněk. Tyto vlastnosti lze určovat

použitými materiály, postprocesními povrchovými úpravami (fyzikální, chemické) a v případě 3D tisku¹ může být povrchová topografie definována již při modelování scaffoldu v softwaru (výstupky, prohlubně).

Tato práce je zaměřena na optimalizaci materiálových charakteristik a zpracovatelských postupů vedoucích k přípravě scaffoldů. Jsou zde popsány originální 3D tiskové postupy přípravy scaffoldů a vlákněných struktur pomocí elektrostatického zvlákňování (electrospinningu). Dále jsou zde diskutovány možnosti strukturalizace vytvářených povrchů použitím fázové separace a chemického leptání. Pro účely testování vlivu nových typů materiálových soustav na chování buněk v simulovaných *in vivo* tokových podmínkách byl navržen originální průtokový bioreaktor a byla otestována stabilita vybraného polymerního materiálu za rozdílných tokových podmínek.

2. Současný stav řešené problematiky

Poslední dvě desetiletí se staly významným obdobím rozvoje TE. K tomuto vývoji přispěly zejména nové znalosti a pokroky v technických oborech jako jsou vědy o materiálech [8], buněčná a vývojová biologie [9,10], nanotechnologie [11] a rychlé prototypování (RP) také známé jako 3D tisk [12].

Biomateriály pro výrobu scaffoldů lze dělit na polymery (přírodní a syntetické), keramiky a kovy. Keramické a kovové scaffoldy se v současnosti používají zejména v oblasti kostního inženýrství [13–17] a také jako nosiče léků [18–21]. Aktuálně mezi běžné zástupce syntetických polymerů používaných v TE patří kyselina polymléčná [22–24], kyselina polyglykolová [25–27], jejich kopolymery [28,29] a polykaprolakton [30–32]. Přírodní polymery jsou pak zastoupeny kyselinou hyaluronovou, chitosanem, fibrinem, kolagenem a nejčastěji jejich kombinací. [33–37]

V nedávné době dosáhly technologie klasického [38–40] a elektrickým polem asistovaného 3D tisku (EPA 3D tisk) [41,42] velkého pokroku na poli malosériové výroby tkáňových náhrad.

3D tisk

V současnosti jsou některé 3D tiskárny schopny využít více tiskových hlav zároveň, což umožňuje kombinovaný tisk více buněčných linií, čímž dochází

¹ „3D tisk“ nebo také „3D printing“ jsou pojmy, jimiž bude v této práci označováno více metod Aditivní výroby (str. 16).

k výraznému usnadnění tisku komplexních multibuněčných tkání či orgánů. [43–45] Cui a kol. [46] použil techniku 3D bioprintingu k výrobě funkčních kostních štěpů s organizovanou cévní sítí. Nový přístup Want et al. [47] popisuje 3D tisk komplexních scaffoldů pro tvorbu regenerativních orgánů jako je například jaterní tkáň. Jinými přístupy za použití různých biomateriálů bylo umožněno vytvoření dalších tkání včetně kůže [48], srdečních chlopní [49], kostí a chrupavek [50] a vaječníků [51].

Stereolitografie

Nedávný aplikační pokrok stereolitografie (SLA) je dán rozšířením dostupnosti rozdílných typů fotosíťovatelných polymerů a také možností použití více materiálů pro jeden konečný výtisk [52–54]. V posledních letech také dochází k vývoji nových polymerů na bázi alifatických polyesterů s biodegradačními vlastnostmi. [38] Rozvoj této metody dále výrazně ovlivnilo zlepšení rozlišení tisku na úroveň jednotek mikrometrů, a to ve všech třech osách x, y, z. [55] Právě dostupnost vysokého rozlišení je velkou výhodou, jež je často využívána při přípravě scaffoldů pro TE. [56–58] Velký potenciál má SLA technologie v kostním inženýrství [59,60], dále pro přípravu vaskularizovaných scaffoldů pro léčbu periferních nervů [61] a také při tisku scaffoldů pro regeneraci chrupavky [62].

Electrospinning

V poslední době se při přípravě scaffoldů stále častěji využívá technik založených na elektrostatickém zvlákňování. Jia a kol. [63] vytvořili pomocí electrospinningu biokompatibilní scaffold pro vnitřní stěnu vaskulárních tkání tvořený kyselinou hyaluronovou a kolagenem. Některé studie se zaměřily na tvorbu chitosan/želatinových scaffoldů pro kožní tkáň. [64,65] Další výzkumy řešily tvorbu tubulárních scaffoldů pro vaskulární tkáň za použití směsi polykaprolaktonu (PCL), kopolymeru kyseliny glykolové a kyseliny mléčné (PLA) a želatiny. [66] Scaffoldy tvořené pomocí electrospinningu byly nedávno použity pro regeneraci rohovky [67], nervové [68] či kostní tkáň [69] a náhradu vazů [70].

Elektrickým polem asistovaný 3D tisk

Pomocí technologie EPA 3D tisku se již podařilo vytvořit funkční scaffold s řízenou vláknitou mikrostrukturou podobnou kolagenovému vláknu. Scaffold věrně napodobuje anizotropní a viskoelastické chování cípu srdeční chlopně

a podporuje růst buněk lidského vaskulárního hladkého svalstva, které jsou schopny produkovat ECM. [71] V jiné studii Paxton a kol. [72] zmiňuje přípravu kaprolaktonových auxetických² tubulárních scaffoldů pomocí melt electrowritingu (MEW) v kombinaci s rotujícím sběračem vláken. Tyto scaffoldy ve tvaru trubiček se při protažení projevují zvětšením průměru, což lze využít u kardiovaskulárních aplikací [73], kde by bylo zabráněno možnému kolapsu cév. Jiné využití lze nalézt u TE pro rekonstrukce jícnu. [74]

Dalším aktuálním uplatněním MEW je tvorba scaffoldu v podobě folie, na který jsou nasazeny multibuněčné sféroidy z tukové vazivové tkáně. Scaffold je utvářen z polykaprolaktonu do porézní struktury uzpůsobené velikosti sféroidů (350-380 μm), kdy se průměr jednotlivých vláken pohybuje okolo 13–15 μm . Takto připravené scaffoldy jsou dále využitelné při regeneraci tukové tkáně a velkou výhodou je jejich snadná přenositelnost. [75]

3. Cíle práce

- Navrhnout materiálové soustavy na syntetické i přírodní bázi a postupy jejich zpracování do podoby pokročilých scaffoldů.
- Z navržených materiálových soustav připravit strukturované vrstvy a 3D objekty pomocí procesu fázové separace či leptání.
- Otestovat rozdílné materiálové kombinace z hlediska možnosti jejich zpracování pomocí vybraných technologií 3D tisku a electrospinningu.
- Pomocí 3D tisku připravit bioreaktor pro simulaci *in vivo* podmínek v biologických laboratorních testech připravených strukturovaných povrchů.
- Zhodnotit vliv nově navržených materiálových soustav a z nich připravených strukturovaných povrchů na chování buněk.

² Auxetikum je materiál, jenž se při tahovém zatížení rozpíná v příčném směru.

4. Teoretický rámec

Scaffolds jsou síťovité, porézní struktury, které nahrazují funkci ECM a zastávají nespočet důležitých funkcí. [76,77] ECM je jedinečný komplex složený z proteinů a sacharidů vytvářející trojrozměrnou vláknitou síť, která poskytuje mechanickou pevnost, ale slouží také jako prostředí pro přenos informací mezi buňkou a okolím a také mezi buňkami navzájem. [78,79] Je tedy nezbytné, aby v případě nutnosti byla ECM nahrazena takovým materiálem, který je schopen zcela či alespoň částečně plnit její funkce. [77,79]

Hlavní úloha scaffoldů spočívá v zajištění nosné funkce pro uspořádání buněk uvnitř pojivové tkáně. Kromě statické úlohy může scaffold zastávat i roli dynamickou, kdy může definovat buněčné chování a následně funkce tkání. [80] Dále zabezpečuje chemické a fyziologické prostředí pro buněčnou proliferaci a diferenciaci. [81]

4.1 Požadované vlastnosti scaffoldů

Scaffolds musí splňovat veškeré nároky kladené na nahrazovanou tkáň. Svým uspořádáním pak určují její rozměry a tvar. [82] Po implantaci do živého organismu scaffold vyplňuje 3D defekty a napomáhá tvarování tkáně tak, aby odpovídala původní 3D anatomii. Dočasně musí plnit veškeré funkční požadavky (obvykle mechanické), dokud není vytvořena nová tkáň, která tyto funkce převezme. V ideálním případě zlepšuje regeneraci tkáně tím, že zajišťuje vhodné prostředí pro hromadný transport živin a odpadních látek. [83]

Jednou z klíčových vlastností scaffoldu je biokompatibilita, která určuje schopnost podpořit normální buněčnou aktivitu bez vyvolání jakýchkoli patologických změn v okolních tkáních. [84] Cílem tkáňového inženýrství je možnost nahrazení implantovaného scaffoldu vlastní ECM a buňkami v průběhu času. [85] Scaffolds bývají pouze dočasnou podporou pro buňky, které postupem času infiltrují do pórů scaffoldu a současně s jeho degradací se buňky reorganizují do funkční tkáně. [86–89] V ideálním případě by scaffold měl mít shodné mechanické vlastnosti s místem, do kterého je implantován. Je potřeba dbát na poměr mechanické pevnosti a porozity scaffoldu. Materiál může mít výbornou mechanickou pevnost, avšak na úkor vysoké porozity, kdy může docházet k nedostatečné vaskularizaci. [85] Význam velikosti a propojení pórů v scaffoldu jsou jedním z klíčových faktorů pro většinu aplikací tkáňového inženýrství. [90–92] Póry mohou být dvojího druhu propojené = otevřené a nepropojené = uzavřené. Ideálním případem je struktura s vysokou pórovitostí s propojenými (otevřenými) póry, které umožňují difuzi živin do buněk ve scaffoldu a také do ECM vytvořené těmito buňkami. Kromě živin je potřeba také odvádět odpadní

látky a degradační produkty. Buňky s povrchem scaffoldu primárně interagují prostřednictvím chemických skupin (ligandů) což znamená, že póry musí být dostatečně velké, aby umožnily buňkám migraci do struktury scaffoldu, ale zároveň dostatečně malé, aby tvořily velký specifický povrch, který zajistí minimální množství ligandů pro účinné navázání buněk na scaffold. [93,94]

4.2 Výrobní technologie scaffoldů

Metoda použitá pro výrobu scaffoldů podmiňuje jejich klíčové vlastnosti – porozitu, velikost pórů, mechanické vlastnosti a také jejich výsledný tvar. [95] Velmi důležitým faktorem je také materiál, ze kterého bude scaffold vyráběn, protože ne každá technologie je vhodná pro všechny typy materiálů. Před výrobou scaffoldu je nezbytné vyhodnotit jaké vlastnosti by měl konečný výrobek mít a z jakého materiálu bude vyráběn a dle těchto zjištění lze následně vybrat vhodnou technologii zpracování.

Aditivní výroba je obecný název pro techniky, které čtou v datech z výkresů podporovaných počítačem (computer-aided design – CAD) převedených do formátu STL (zkratka pro „Stereolitography“, další uváděné pojmy této zkratky jsou „Standard Triangle Language“ nebo „Standard Tessellation Language“). [96] Použití aditivní výroby v tkáňovém inženýrství umožňuje vytváření 3D scaffoldů v podobě složitých geometrií s velmi jemnými strukturami. Díky použití počítače při navrhování lze jednoduše korigovat výslednou makro i mikro strukturu což ovlivňuje mechanické vlastnosti scaffoldu. Díky těmto skutečnostem lze návrh upravit dle dostupných údajů z lékařských skenů tak, aby výsledný scaffold vyhovoval individuálním potřebám každého pacienta. [97] Mezi základní metody aditivní výroby patří techniky založené zejména na vytlačování a 3D tisk s použitím pryskyřic, jež je založena na vytvrzování fotosenzitivní pryskyřice pomocí UV světla.

Další metodou často využívanou pro výrobu scaffoldů je electrospinning neboli elektrostatické zvlákňování. Je to technologie, která využívá elektrostatické síly k výrobě vlákných scaffoldů z roztoků polymerů. [98] Technologie je založena na tažení proudu viskózní tekutiny (roztok nebo tavenina) ke kolektoru, který má elektrický potenciál. Výsledkem je tak chaotická síť vláken o průměru od desítek nanometrů po desítky mikronů. [99–101]

Poměrně novým přístupem pro tvorbu vlákných scaffoldů je elektrickým polem asistovaný 3D tisk (melt electrowritingu). Pro pochopení melt electrowritingu (MEW) je nutné znát chování kapalin při toku. Proud nenabitě kapaliny, tekoucí shora dolů se rozpadá na kapky (např. tekoucí voda nebo med). Tento jev, známý také jako Plateau-Rayleigh nestabilita, je závislý na rychlosti, s jakou tekutina teče a také na výšce, z které padá. Tekoucí med, který simuluje

tok polymeru, má před projevem Plateau-Rayleigh nestability výrazně nižší rychlost toku a v této chvíli lze tekutinou „psát“ právě proto, že ještě nezačala tvořit kapky. [102] Aplikací napětí mezi trysku a kolektor dochází k eliminaci Plateau-Rayleigh nestability, jež by se za normálních okolností projevila. Tok se tak stává stabilním a nepřetržitým. Pokud je však napětí příliš vysoké, elektrické nestability způsobují tok chaotickým, jak je známo z electrospinningu. [41]

4.3 Biomateriály pro výrobu scaffoldů

Jako biomateriály označujeme skupinu materiálů, která přichází do kontaktu s biologickým systémem. [103] Z literatury je známo dvojí dělení biomateriálů. Prvním je členění na přírodní a syntetické [104], druhým je pak rozdělení na keramiky, kovy a polymery [105,106].

Syntetické polymery jsou velmi často využívány v tkáňovém inženýrství. Výhodou syntetických polymerů je výroba velkého množství za kontrolovaných podmínek, díky čemuž je možné ovlivnit výsledné vlastnosti materiálu jako je pórovitost, degradace či mechanické vlastnosti a také je lze snadno funkcionalizovat. Další výhodou je vysoká míra univerzality a snadné zpracování, na druhou stranu však bývají syntetizovány za poměrně drsných polymeračních podmínek a také bývá problém s jejich bioaktivitou. Tyto nevýhody jsou však převáženy jejich strukturálními a chemickými vlastnostmi, které lze často modifikovat a je tak možné vytvářet scaffoldy, které věrně napodobují základní rysy ECM. [107,108]

Mezi přírodní biomateriály spadají především přírodní polymery na bázi proteinů či polysacharidů (kolagen, fibroin, chitosan, elastin a další). Vzhledem k jejich přírodnímu původu vykazují skvělou biologickou aktivitu včetně buněčné proliferace, adheze a taktéž jsou netoxické vůči okolní tkáni. Velkou nevýhodou je však špatná reprodukovatelnost a jejich získávání z přírodních zdrojů, které je problematické především s ohledem na homogenitu složení a výsledné fyzikálněchemické vlastnosti.

Zvláštní skupinou jsou pak smart materiály (SM) nebo také chytré materiály jsou specifické svou schopností reverzibilně modifikovat jednu či více svých funkčních nebo strukturálních vlastností v důsledku reakce na vnější podnět. Mezi tyto vnější vlivy zahrnujeme fyzikální (teplota, světlo, elektrické a magnetické pole), chemické (pH) a mechanické podněty (tah a tlak). Patří sem samo-hojící materiály, materiály s tvarovou pamětí, piezoelektrické materiály a další.

4.4 Vliv povrchu scaffoldu na chování buněk

Jednou z kritických částí v oblasti tkáňového inženýrství je nastolení fyziologického fenotypu buněk. V této oblasti mají zásadní vliv dvě proměnné, a to chemie povrchu a topografie implantátu. [109,110]

V lidské tkáni jsou buňky zabudovány do ECM, která je složena z řady proteinů (kolagen, elastin, aj.) a polysacharidů (glykosaminy, aj.). Konkrétně kolagen je protein poskytující odolnost ECM a také se stává vazebným místem pro receptory buněčné adheze. Interakce mezi povrchem nosiče a buňkami ovlivňují jejich další vývoj a funkci. [111] Aby docházelo k vývoji buněk do formy funkční tkáně je třeba, aby makroskopická geometrie, mikroskopická topografie a chemické vlastnosti povrchu kooperovaly se stimuly extracelulárních signálních látek. [112] Buněčnou adhezi můžeme považovat za dynamický proces vyznačující se několika fázemi. [113] Prvotní adheze začíná vazbami transmembránových receptorů (integrinů) buněk na extracelulární ligandy. Integriny tedy zajišťují propojení buňky s povrchem a také spojení mezi cytoskeletem a ECM. [114] Tyto komplexy však mohou vznikat pouze jsou-li pevně ukotveny k povrchu, pak jsou navázány další intracelulární proteiny a vznikají tak makromolekulární komplexy zvané fokální adheze (FA) s délkou okolo 1-5 μm . [115]

Buněčné interakce s mikro a nano strukturovanými povrchy materiálu byly studovány v řadě publikací. [109,116,117] Z dostupných studií plyne, že nanotopografie hraje rozhodující roli pro adhezi, přežití, proliferaci a diferenciaci různých typů kmenových buněk. [118–120] Topografie povrchu pak může modifikovat vlastnosti FA a to tak, že dojde k vytvoření zón, které podporují shlukování integrinů (např. vyvýšeniny) na povrchu a naopak topografické prvky, které zabraňují tvorbě komplexů integrin-ligand (drážky, zahloubení). [121]

5. Experimentální část

V rámci výsledků experimentální práce budou představeny materiálové soustavy na syntetické a přírodní bázi zpracovávané do podoby scaffoldů. Budou řešeny postupy jejich možné povrchové strukturalizace pomocí fázové separace a chemického leptání. U vybraných materiálových soustav budou diskutovány možnosti jejich zpracování pomocí extruzního 3D tisku, electrospinningu a elektrickým polem asistovaného tisku. Pro simulaci *in vivo* podmínek v laboratorním prostředí bude popsán návrh průtokového bioreaktoru. V návaznosti na tuto část bude řešen vliv vybraných materiálových soustav na

chování kultivovaných buněk a testována stabilita vybraného polymerního systému za rozdílných tokových podmínek.

5.1 Materiály a metody

V rámci této práce byly použity níže uvedené syntetické i přírodní polymery. Standardní chemikálie jako dimethylsulfoxid (DMSO), aceton, triacetin, isopropylalkohol a další byly v p.a. kvalitě zakoupeny od lokálních dodavatelů (Sigma-Aldrich, Merck). Dále byla používána ultračistá voda s odporem 18,2 MΩ.cm.

Polystyren (PS)

Pro tvorbu hierarchicky strukturovaných syntetických povrchů byl zvolen polystyren (PS) ve formě sterilizovaných Petriho misek o průměru 3,4 cm, zbavených pyrogenů DNA/RNA určených primárně pro kultivaci buněk od společnosti Techno Plastic Products AG (Švýcarsko).

Polykaprolakton (PCL)

Pro 3D tištěné scaffoldy byl zvolen jako zástupce syntetických polymerů polykaprolakton o střední molární hmotnosti 80 000 g/mol od společnosti Sigma Aldrich. Výhodou polykaprolaktonu je schopnost biodegradace a nízká teplota tání, která se pohybuje okolo 60 °C.

Poly(vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen)

Dalším polymerem použitým pro přípravu scaffoldů je syntetický piezoelektrický polymer poly (vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen) (PVDF-TrFE-CTFE) ve formě bílého prášku dodáván společností Arkema pod obchodním označením Piezotech® RT. Tento elektroaktivní terpolymer, jenž bude dále v textu označován jako „PiezoRT“, se řadí mezi relaxační feroelektrika, která vykazují elektrostrikti (jev, při kterém vlivem vnějšího elektrického pole dochází k deformaci dielektrika).

Materiály pro SLA, DLP a FDM 3D tisk

Pro 3D tisk technologiemi stereolitografie (SLA) a digital light processing (DLP) byly použity fotosenzitivní pryskyřice doporučené samotnými výrobci konkrétních tiskáren.

Pro SLA tiskárny Form2 a Form3 od společnosti Formlabs byly použity čiré pryskyřice na bázi methakrylátu s obchodním označením „Clear“ a „Dental LT Clear“ (Formlabs), obě pryskyřice byly po provedení testů cytotoxicity označeny jako necytotoxické a tedy vhodné pro použití s buňkami. Pro DLP tiskárnu Micro HD+ od společnosti EnvisionTEC byla použita necytotoxická

pryskyřice s obchodním názvem 3DeltaHear (DeltaMed). Pro 3D tisk technologií fused deposition modeling (FDM) na tiskárně Ultimaker S5 byl použit filament kyseliny polymléčné od společnosti Ultimaker.

Hedvábný protein – fibroin

Mezi použité přírodní polymery se řadí hedvábný protein získaný z kokonů bource morušového (*bombyx mori*). Příprava fibroinu spočívá v povaření kokonů *bombyx mori* v roztoku uhličitanu sodného, následným promytím, vysušením, rozpuštěním v roztoku bromidu lithného, dialýzou a lyofilizací (postup dle protokolu D. N. Rockwooda [122]). Výsledným produktem je regenerovaný hedvábný protein ve formě bílé houbovitě struktury.

Hliník

Jako zástupce kovových materiálů byla v této práci použita slitina hliníku se složením: hliník ($96,8 \pm 0,1$ %), hořčík ($2,6 \pm 0,1$ %), železo ($0,5 \pm 0,1$ %) a další. Základní metody ošetření povrchu byly pískování, broušení pomocí brusného papíru s hrubostí 180 zrn/cm² korundu o průměrné velikosti 90 μm a použití válcovaného hliníku jako výchozího hladkého povrchu.

3D tisk

Použitými přístroji pro tvorbu scaffoldů byly tiskárny Ultimaker S5 (FDM tisk), Form 2 a Form 3 od společnosti Formlabs (SLA tisk), Micro HD+ od společnosti EnvisionTEC (DLP tisk) a BIO X od Cellinku (extruzní tisk). Virtuální modely byly vytvářeny v programu Autodesk Inventor Pro 2020. Pro tisk byly modely upraveny v programech Ultimaker Cura (pro FDM tisk), PreForm (pro SLA tisk) a PerfactoryRP (DLP tisk). Pro elektrickým polem asistovaný 3D tisk (EPA 3D tisk) bylo použito tiskové zařízení od společnosti FYSCON, s.r.o.

6. Výsledky a diskuze

V rámci této části práce budou diskutovány postupy přípravy polymerních scaffoldů pomocí 3D tisku, vývoj průtokové komory pro simulování *in vivo* podmínek v laboratoři, testování stability polymerního materiálu za rozdílných tokových podmínek a metody povrchové strukturalizace vybraných materiálových soustav a jejich vliv na chování buněk.

6.1 Příprava 3D scaffoldů pro biologické aplikace

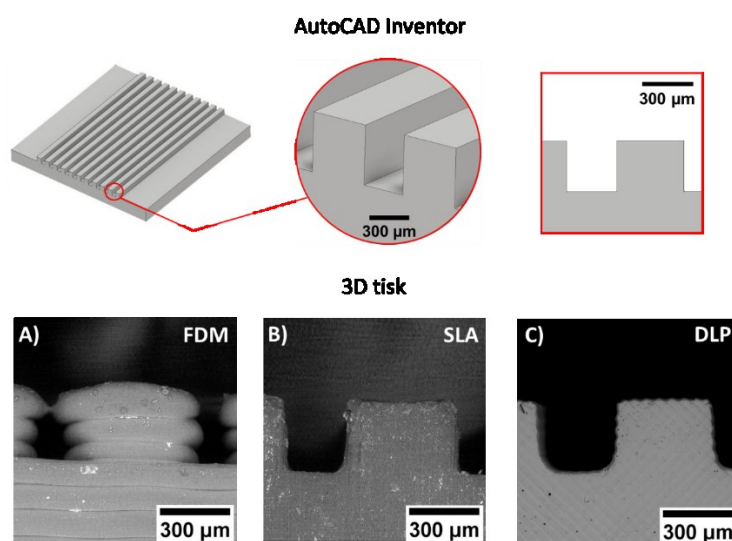
Jedním z přístupů, jak připravit scaffold pro kultivaci buněk je aditivní výroba. V závislosti na typu tištěného materiálu je nezbytné zvolit nejvhodnější techniku jeho zpracování a následně optimalizovat procesní parametry 3D tisku nebo zvláknování. V následujících podkapitolách budou diskutovány rozdílné tiskové

přístupy (SLA, DLP, FDM – fused deposition modelling, EPA 3D tisk, electrospinning) umožňující zpracovávat polymerní materiály aplikovatelné v oblasti regenerativní medicíny.

6.1.1 Srovnání přesnosti standardních tiskových přístupů SLA, DLP, FDM

Z konstrukční a fyzikální podstaty jednotlivých tiskových přístupů plyne, že nelze u všech technik dosáhnout stejné přesnosti tisku a kvality vytvářeného povrchu. S ohledem na tento fakt byla provedena studie popisující možnosti jednotlivých tiskových technik s ohledem na tvarovou a strukturní reprodukovatelnost tištěného modelu.

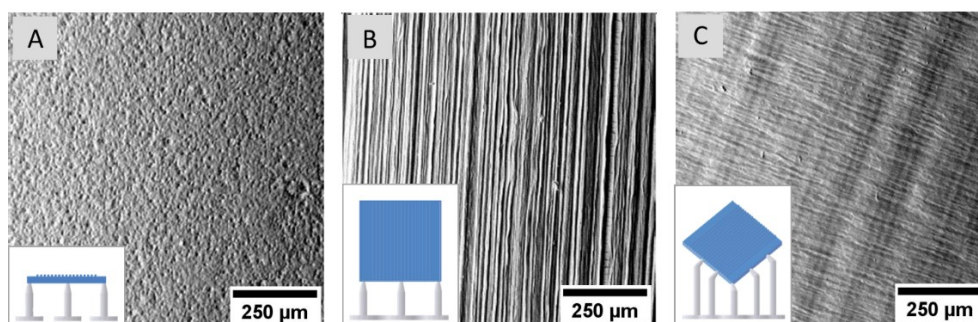
Jako modelový systém byla zvolena destička o rozměrech 12×12 mm s drážkami o výšce 300 μm , šířce 400 μm a mezerou 300 μm , Obr. 1. Pro metodu FDM 3D tisku byla použita tiskárna Ultimaker S5, materiál PLA s tryskou o průměru 400 μm . SLA tisk probíhal na tiskárně Form2 (Formlabs) a jako tiskový materiál byla zvolena pryskyřice s označením „Clear“. Průměr vytvrzovaného bodu v případě SLA byl 140 μm . Pro DLP tisk byla použita tiskárna Micro HD (EnvisionTEC) s tiskovým materiálem „3DeltaHear“ a průměrem vytvrzovaného bodu 30 μm . V případě FDM tisku byla nastavena výška tiskové vrstvy na 100 μm . U SLA a DLP byla nastavena nejnižší možná tloušťka tiskové vrstvy na úrovni 25 μm . Vezmeme-li v potaz výšku tiskových vrstev, šířku vytvrzovaných bodů a průměr trysky u FDM není ničím překvapující, že nejlepšího rozlišení dosahujeme v případě DLP tisku. Tato skutečnost je patrná z Obr. 1, kde je zobrazen boční pohled na vytvářené drážky získané pomocí elektronového mikroskopu.



Obr. 1 – porovnání návrhu modelu získaného ze softwaru AutoCAD Inventor a reálných výtisků připravených pomocí metod 3D tisku A) FDM, B) SLA, C) DLP. Obrázky A), B) a C) ze SEM.

Na výtisku vytvořeném 3D tiskárnou typu FDM (Obr. 1A), jsou zřetelně pozorovatelné jednotlivé vrstvy tisku. Po srovnání s navrhovaným modelem lze konstatovat, že nebyla dodržena požadovaná šířka výstupků a ani jejich odstup. Diametrálně odlišné výsledky vzhledem k FDM lze pozorovat v případě použití SLA a DLP tisku, Obr. 1B, C. Nejlepší reprodukovatelnost požadovaného modelu lze dosáhnout za použití DLP tiskárny. Rozměry výtisku se nejvíce blíží požadovanému modelu.

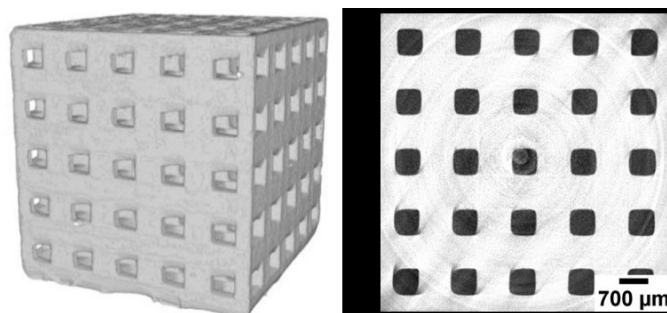
Z provedených experimentů dále vyplynulo, že v případě SLA a DLP tisku lze pomocí rozdílné orientace tiskového modelu vzhledem k tiskové podložce ovlivňovat typ povrchové struktury. Vliv této proměnné je demonstrován na výtiscích připravených pomocí SLA tiskárny Form2 od společnosti Formlabs. Na Obr. 2 jsou zobrazeny SEM snímky povrchů vzorků, jež byly při tisku odlišně orientovány vzhledem k tiskové podložce. Pro tisk v rámci tohoto experimentu byla použita pryskyřice s označením „Clear“, výška tiskové vrstvy byla nastavena na 25 μm . Obr. 2 nahoře zobrazuje snímky z elektronového mikroskopu, na kterých je dobře viditelný rozdíl strukturování povrchu v závislosti na orientaci modelu při samotném 3D tisku, Obr. 2 (dole). Strukturu povrchu při horizontálním tisku Obr. 2A lze přirovnat ke vzhledu pomerančové slupky. Jakmile však dojde k přetočení modelu do svislé polohy, je možné pozorovat povrchovou texturu orientovaných drážek Obr. 2B. Při orientaci modelu pod úhlem 45° v ose Y a 30° v ose Z Obr. 2C taktéž dochází k povrchové strukturalizaci vzorku.



Obr. 2 – SEM snímky povrchů výtisků (horní řada) získaných pomocí metody SLA 3D tisku a ukázka jejich orientace v programu PreForm (spodní řada). A) horizontální tisk, B) svislý tisk, C) tisk pod úhlem.

Klíčovým faktorem je zde úhel dopadu laseru, který vytvrzuje pryskyřici. Z výsledného porovnání plyne, že orientace tisku má nezanedbatelný vliv na kvalitu povrchu výtisku a je potřeba pečlivě zvážit úhel natočení jednotlivých modelů, respektive funkčních ploch přicházejících do styku s kultivovanými buňkami.

Mnohem složitější situace nastává v okamžiku, kdy chceme vytvořit prostorový 3D mřížkový model. Z porovnání uvedených na Obr. 2 se jeví jako nejvhodnější použití SLA a DLP technologie avšak je nutné zvolit vhodné rozměry vzhledem ke skutečnosti, že je po tisku nutné vymýt veškerou nevytvrzenou pryskyřici ze všech otvorů. Příklad vytvořené prostorové mřížky pomocí DLP tiskárny je uveden na Obr. 3. Tiskovým materiálem byla pryskyřice s označením „Clear“ a výška tiskové vrstvy byla stanovena na 50 μm . Modelem se stala kubická mřížka s otvory o rozměrech 700 \times 700 \times 700 μm . Výsledný výtisk uvedený na Obr. 3 byl zobrazen pomocí rentgenové tomografie.



Obr. 3 – rekonstrukce vytištěného scaffoldu pomocí SLA tiskárny Form2 (vlevo). Řez středem vytištěné prostorové mřížky (vpravo). Data z rentgenové tomografie.

6.1.2 Vlákenné scaffoldy na bázi polykaprolaktonu

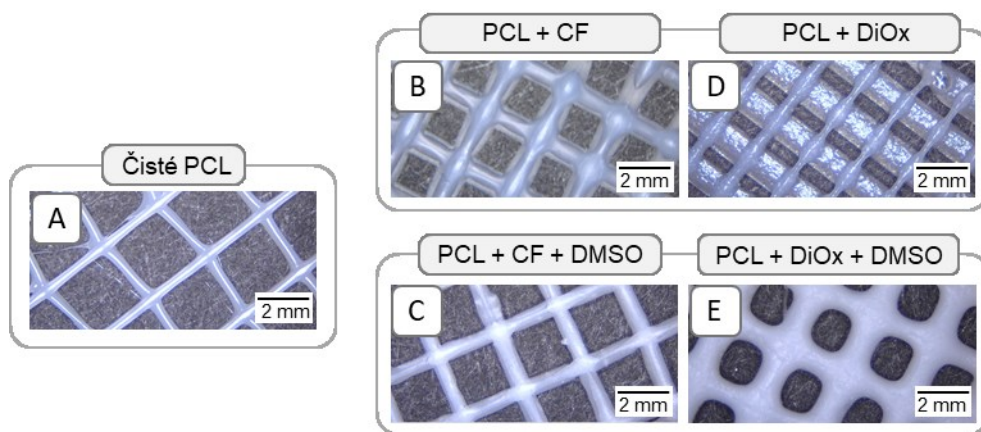
Následující část výsledků práce bude věnována originálním přístupům přípravy vlákenných scaffoldů na bázi biokompatibilního syntetického polymeru – polykaprolaktonu (PCL). Zpracování tohoto typu materiálu do podoby scaffoldů je v literatuře široce diskutováno. [30–32] Oproti literatuře zde bude prezentován originální přístup zpracování tohoto typu materiálu založený na použití roztoků tohoto polymeru. Mnoho literárních prací [24,123–125] se zabývá zpracováním taveniny tohoto termoplastického materiálu, jenž začíná téct při překročení 60 °C.

6.1.2.1 Příprava hierarchicky strukturovaných PCL scaffoldů pomocí 3D tisku

Jedním z možných způsobů přípravy scaffoldu s hladkým povrchem vláken je extruzní tisk termoplastického materiálu. Tento typ tisku je v rámci této práce používán jako srovnávací. Hladké vlákenné PCL struktury, Obr. 4A, byly tištěny pomocí termoplastické extruzní tiskové hlavy. Pro tisk PCL z taveniny byla teplota tiskové hlavy nastavena na 110 °C a teplota tiskové podložky 50 °C.

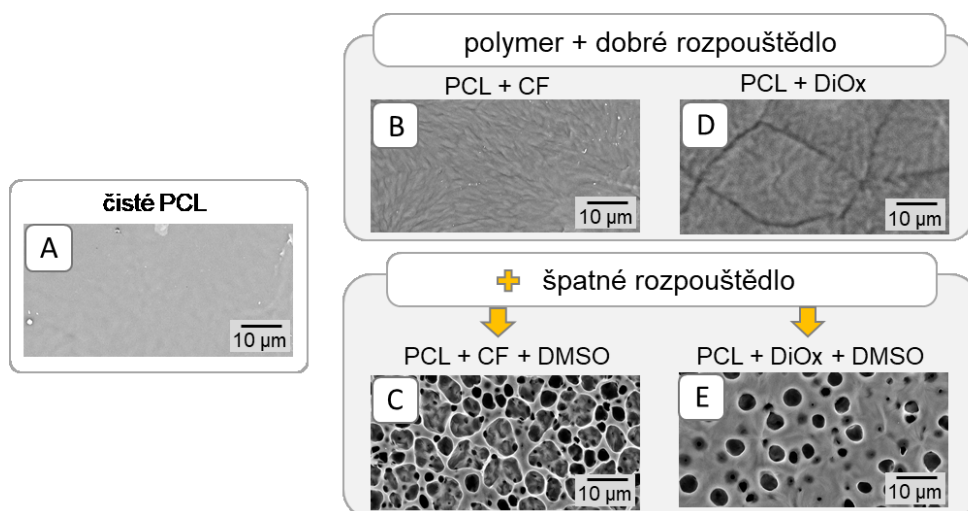
V souladu s hlavním cílem této části práce, tj. příprava hierarchicky strukturovaných vláken bylo nezbytné přejít k roztokovému způsobu tisku. Za tímto účelem byla vyhledávána nejvhodnější dobrá rozpouštědla pro PCL, která

lze zároveň mísit s další kapalinou, špatným rozpouštědlem, které se po částečném odpaření dobrého rozpouštědla fázově separuje za tvorby povrchových prohlubní. S ohledem na tyto podmínky byla zvolena dvě dobrá rozpouštědla – chloroform (CF) a 1,4-dioxan (DiOx). Jako špatné rozpouštědlo byl vybrán dimethylsulfoxid (DMSO). Výsledné povrchy tištěných mřížek ze směsi PCL a dobrého rozpouštědla jsou zobrazeny na Obr. 5B a D.



Obr. 4 – snímky reálných 3D tištěných PCL vlákněných scaffoldů pořízené pomocí digitálního mikroskopu.

Výsledné povrchy vytištěných vláken tvořících mřížky na Obr. 4 jsou v detailu zobrazeny na Obr. 5. Z obrázku je patrné, že po přidavku špatného rozpouštědla do tiskové směsi došlo vlivem fázové separace k výrazné změně a oba polymerní povrchy, jak při použití CF či DiOx jako dobrého rozpouštědla, vykazují změnu povrchového reliéfu a lze je označit jako hierarchicky strukturované.

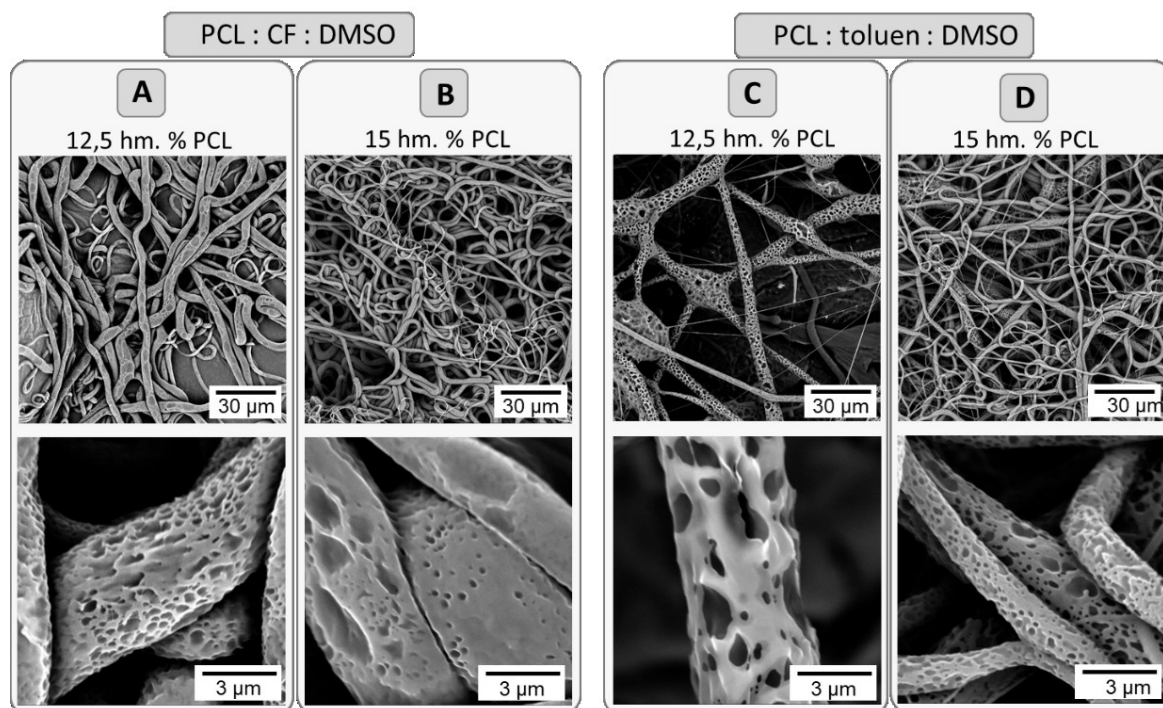


Obr. 5 – detailní pohled na povrch vlákněných PCL scaffoldů uvedených na Obr. 4. Povrchy zobrazeny pomocí SEM.

6.1.2.2 Příprava hierarchicky strukturovaných PCL vláken pomocí electrospinningu

Jedním z možných přístupů vytváření podpůrných vláknenných struktur pro buňky je elektrostatické zvlákňování (electrospinning). [126] Tato metoda umožňuje urychlení nabitého proudu polymerního roztoku ve formě vláken o průměru jednotek nanometrů až desítek mikrometrů směrem k uzemněnému kolektoru. Výsledná vlákna vykazují extrémně vysoký specifický povrch právě díky poměru plochy vlákna vzhledem k jeho objemu. [127] Jak již bylo diskutováno dříve v textu – buňky jsou vysoce citlivé na povrchovou topografii [109,116,117] a proto zde byly sledovány možnosti tvorby strukturovaných vláken.

Poznatky získané při tisku vláknenných struktur ze směsi PCL s dobrými a špatnými rozpouštědly prezentované v předešlé části výsledků byly využity pro elektrostatické zvlákňování při 15 kV. Prvními testovanými roztoky byla směs PCL + CF + DMSO s rozdílným hmotnostním podílem PCL, Obr. 6A, B. Druhou směsí byl PCL + toluen + DMSO, Obr. 6C, D. Z výsledných SEM snímků na Obr. 6 plyne, že i v případě electrospinnovaných vláken dochází vlivem fázové separace ke vzniku hierarchicky strukturovaných mikro vláken.



Obr. 6 - hierarchicky strukturovaná mikrovlákna připravená pomocí electrospinningu ze směsí obsahujících PCL s CF/toluenem a DMSO. Obrázky ze SEM.

Změna typu rozpouštědla s vyšší hustotou (chloroform, $\rho = 1,49 \text{ g/cm}^3$) za rozpouštědlo s nižší hustotou (toluen, $\rho = 0,87 \text{ g/cm}^3$) má za následek výraznější

fázovou separaci DMSO ($\rho = 1,1 \text{ g/cm}^3$) vzhledem k PCL. Vznikají vlákna „houbovitého“ charakteru s prohlubněmi v řádech stovek nanometrů až jednotek mikrometrů. Průměr vznikajících vláken se pohybuje v řádech jednotek mikrometrů.

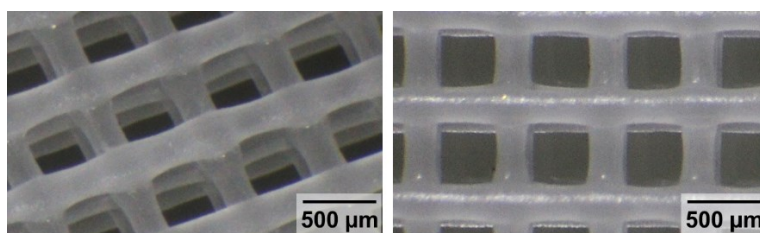
6.1.3 Poly (vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen)

Piezoelektrické vlastnosti syntetického polymeru polyvinylidenfluoridu (PVDF) byly popsány již před více než 50ti lety. [128] Následný objev možnosti vylepšení piezoelektrických vlastností v podobě přípravy kopolymerů na bázi PVDF, kdy jsou využívány různé komonomerní jednotky jako je např. trifluorethylen nebo chlortrifluorethylen, ještě rozšířil jejich aplikační potenciál i v oblasti tkáňového inženýrství [129,130].

6.1.3.1 Příprava PiezoRT vláknenných struktur pomocí extruzního tisku

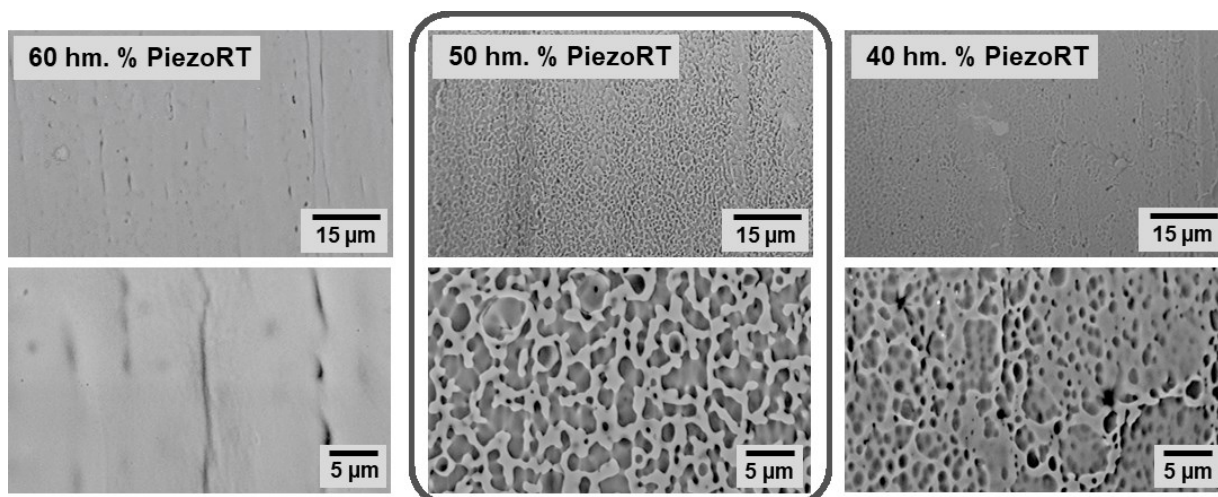
Obdobně jako u polykaprolaktonu i u poly (vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen) (PVDF-TrFE-CTFE) dále značeno „PiezoRT“ byla pro přípravy scaffoldů použita technologie extruzního 3D tisku. Polymer byl zpracováván z roztoku DMSO (či acetonu, triacetinu) nebo ze směsi s dalším polymerním systémem (PCL).

Pomocí extruzního tisku byla zpracována směs PiezoRT a dimethylsulfoxidu o hmotnostním poměru 1:1. DMSO je jedním z rozpouštědel doporučených výrobcem, v nízkých koncentracích není cytotoxické a vykazuje vysokou teplotu vzplanutí ($90 \text{ }^\circ\text{C}$). Optimalizací tiskových parametrů se podařilo připravit více vrstvou mřížku na bázi PiezoRT, Obr. 7. Tisk probíhal při teplotě $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Šířka trysky byla $200 \text{ }\mu\text{m}$ a vzdálenost trysky od podložky 1 mm . Tisková podložka byla vyhřívána na teplotu $65 \text{ }^\circ\text{C}$ pro snadnější přilnutí materiálu. Vytlačovací tlak byl nastaven na 700 kPa a rychlost posuvu hlavy byla 1 mm/s .



Obr. 7 – snímek reálně vytištěného scaffoldu ze směsi PiezoRT:DMSO (1:1). Vlevo mřížka snímaná pod úhlem, vpravo mřížka z vrchu. Obrázky z optického mikroskopu.

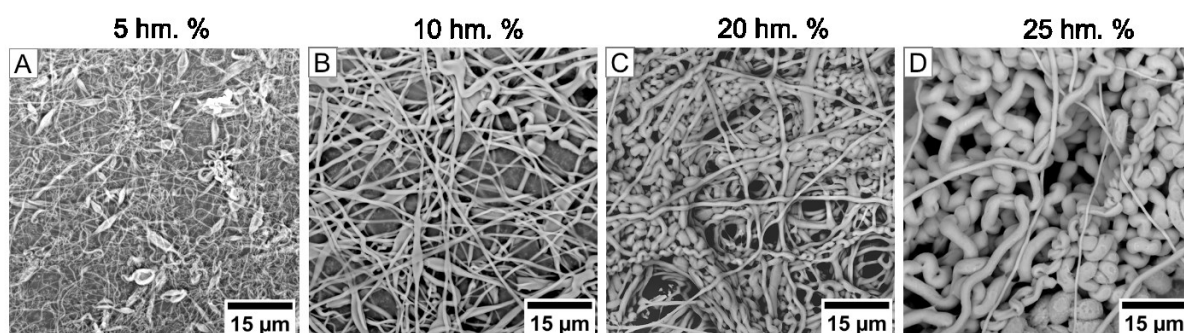
Podobně jako v případě směsi PiezoRT s PCL byly u roztokového způsobu tisku (PiezoRT v DMSO) zkoumány možnosti přípravy strukturovaných vláken. Z experimentálních výsledků uvedených na Obr. 8 plyne, že hmotnostní poměr polymeru v DMSO má zásadní vliv na povrchovou strukturu struny.



Obr. 8 - vliv hmotnostního podílu polymeru PiezoRT v DMSO na změnu povrchového zvrásnění tištěných vláken. Nahoře snímky ze SEM, dole z AFM.

6.1.3.2 Příprava PiezoRT vláken pomocí electrospinningu

Jak bylo diskutováno výše, electrospinning je jednou z častých metod používaných pro vytváření vláknenných struktur aplikovatelných v oblasti regenerativní medicíny [126]. Stejně jako v případě extruzního tisku byl v případě electrospinningu používán roztok PiezoRT s DMSO o různých koncentracích. Vláknina byla spinována při 30 kV a vzdálenosti elektrody od kolektoru 7,6 cm. Na Obr. 9 jsou porovnány výsledky electrospinningu roztoků o různých koncentracích.



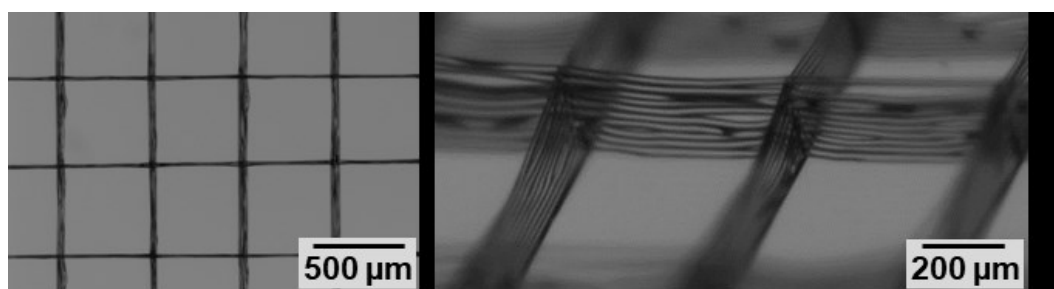
Obr. 9 - vliv koncentrace polymeru v rozpouštědle na vlákna vytvářená pomocí electrospinningu. Materiálem pro electrospinning byl roztok polymeru PiezoRT v DMSO. Obrázky ze SEM.

Ze srovnání vzniklých vláken při electrospinningu roztoků různých koncentrací je zřejmé, že koncentrace polymeru má výrazný vliv na projevy nestabilit vyskytujících se při tomto procesu, Obr. 9. S rostoucí koncentrací polymeru lze sledovat přítomnost nestabilit vyšších řádů. Dalším projevem rozdílných koncentrací je tloušťka výsledných vláken, jejichž průměr se s vyšší koncentrací zvětšuje. Porovnáním uvedených koncentrací lze tedy říci, že v případě materiálu PiezoRT je při vyšších koncentracích polymeru v roztoku velmi obtížné získat

vlákna homogenní tloušťky, tvaru a délky. Lze předpokládat, že tato skutečnost je spojena s vysokou hodnotou piezoelektrického koeficientu [131]. Další proměnnou také zůstává viskozita roztoku (související s koncentrací polymeru), kdy s vyšší koncentrací polymeru v roztoku dochází k výraznějšímu propletení polymerních klubek.

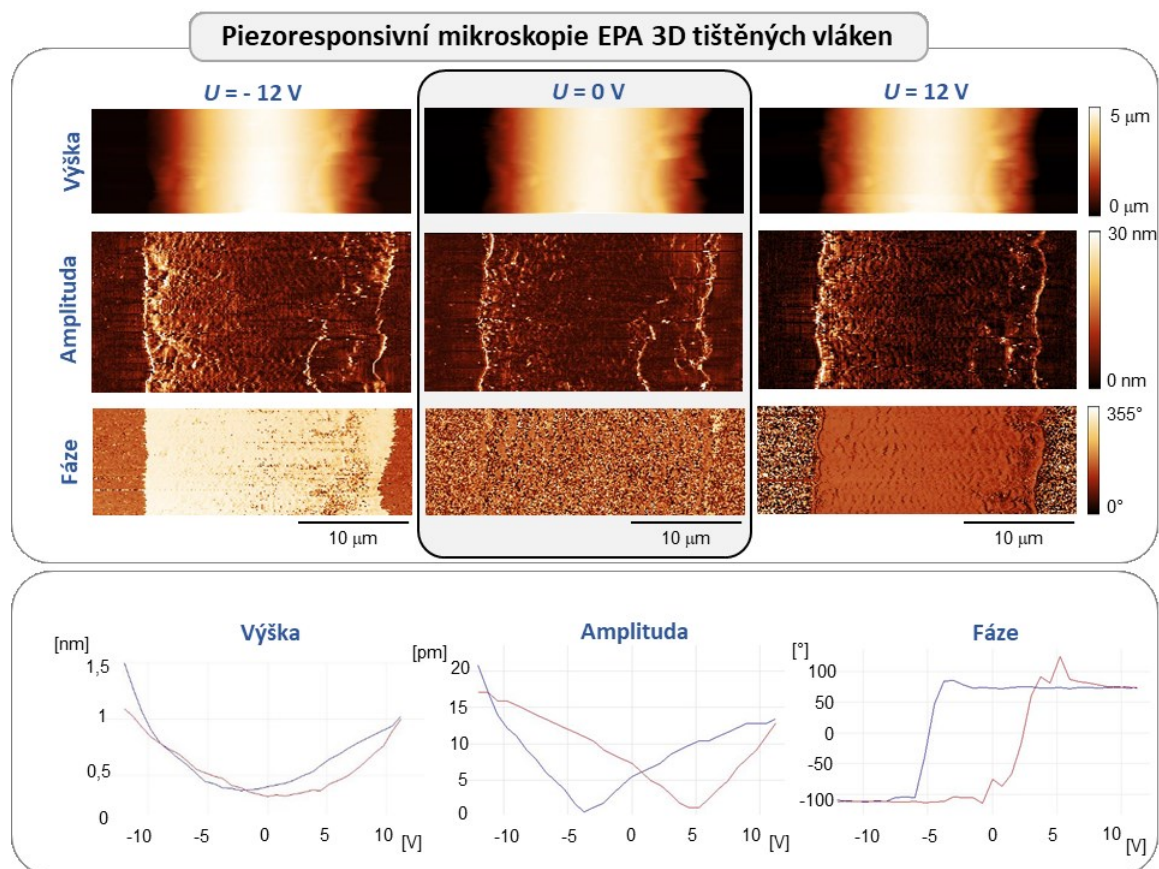
6.1.3.3 Zpracování PiezoRT pomocí elektrickým polem asistovaného 3D tisku

Jedním z poměrně nových zpracovatelských postupů pro přípravu vlákenných struktur pomocí aditivní výroby je elektrickým polem asistovaný 3D tisk (EPA 3D tisk). [41] Jak bylo již dříve diskutováno, electrospinning je charakteristický tvorbou chaoticky orientovaných vláken. EPA 3D tisk však na rozdíl od electrospinningu probíhá při nižších napěťových potenciálech za kontinuálního pohybu podložky, na kterou se definovaně ukládají vytvářená mikroválka. Z provedených experimentů vyplynulo, že nejvhodnější zpracování PiezoRT do podoby mikro vláken pomocí EPA 3D je z roztoku PiezoRT s DMSO v hmotnostním poměru 3,6:6,4, Obr. 10.



Obr. 10 – snímky mřížek tištěných pomocí EPA 3D tisku.

Piezoelektrické vlastnosti materiálu PiezoRT byly charakterizovány pomocí piezoresponsivní silové mikroskopie (PFM). Byla měřena piezoelektrická odezva vlákna PiezoRT připraveného podle postupu uvedeného v předcházejícím odstavci. Před charakterizací pomocí PFM byla vlákna vystavena procesu annealingu při teplotě 110 °C po dobu 2 hodin pro stabilizaci piezoelektrických vlastností polymeru. Na Obr. 11 dole je možné vidět lokální piezoelektrické odezvy tištěného vlákna po procesu annealingu. Měřená plocha byla 30×30 μm a aplikované napětí se pohybovalo v rozmezí -12 V až +12 V.



Obr. 11 – charakteristika PiezoRT pomocí piezoresponsivní silové mikroskopie.

První řada obrázků zobrazuje výškový profil vlákna. Druhá řada je pak tvořena výslednými obrázky měřené amplitudy, kde je možné pozorovat silný piezoelektrický kontrast. Třetí řada zobrazuje obraz vlákna ve fázi, kde je možné zřetelně vidět fázové rozdíly v kladných a záporných hodnotách aplikovaného napětí, jež indikují přítomnost antiparalelních feroelektrických domén v polymerním vláknu. Na Obr. 11 dole jsou pak zobrazeny lokální hysterezní smyčky. Výšková smyčka naznačuje změnu tloušťky vlákna v průběhu napěťových změn. Pro amplitudu je zde patrný charakteristický obraz hysterezní smyčky ve tvaru motýla. Fázová smyčka je pak tvořena klasickým tvarem hysterezní křivky v podobě čtverce.

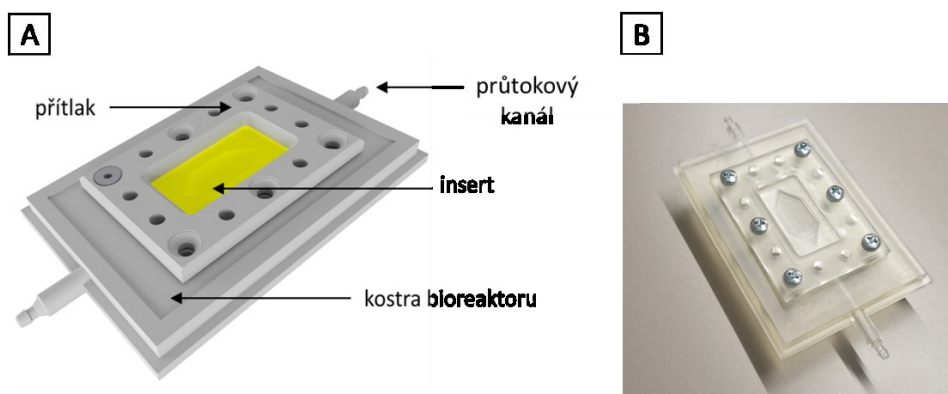
Z grafu hysterezní křivky pro amplitudu je patrné, že nejvyšší hodnota piezoelektrického signálu při aplikaci napětí -12 V dosahuje až k 20 pm . Fázová hysterezní křivka zobrazuje přepnutí dipólových momentů okolo řetězce polymeru při změnách kladného a záporného napětí.

6.2 Návrh bioreaktoru pro simulování tokových *in vivo* podmínek

S ohledem na zaměření práce byla část experimentů věnována vývoji 3D tištěných bioreaktorů pro simulaci tokových *in vivo* podmínek. V prvním kroku byly vybírány nejvhodnější tiskové materiály, které nebudou cytotoxické.

Následně byla řešena vlastní konstrukce průtokových cel a možné způsoby jejich výroby pomocí dostupných SLA a DLP tiskáren.

Byl navržen a následně vyroben bioreaktor, jehož schéma je zobrazeno na Obr. 12. Skládá se ze tří samostatných částí: **kostry** bioreaktoru, do které jsou vkládány **inserty**, které jsou zafixovány pomocí **přítlaků**. Kostra bioreaktoru je opatřena vstupním a výstupním kanálem, jež jsou určeny k proudění kultivačního média.

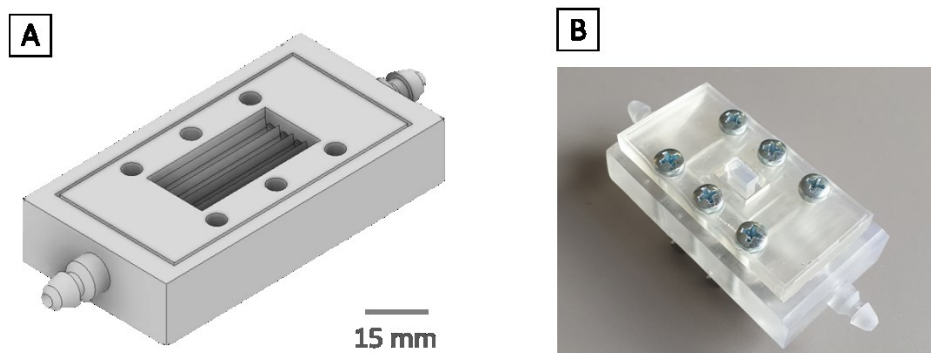


Obr. 12 – model složeného bioreaktoru první generace vytvořený v softwaru Autodesk Inventor A) pohled na celou komoru, B) řez středem bioreaktoru, C) sestavený reaktor vyrobený pomocí 3D tisku.

Samotné testování buněčného chování za dynamických podmínek probíhalo adharováním buněk na povrch insertu. Po tomto kroku následovalo přemístění insertu do bioreaktoru, jeho zajištění přítlaky a do průtokové komory bylo dávkováno médium rychlostí 10 $\mu\text{l/h}$ po dobu 12 hodin.

Z prvotních experimentů vyplynulo, že buňky adharované k povrchu insertu byly odplaveny společně s protékajícím médiem. Jedním z možných důvodů této skutečnosti je vznik tokových nestabilit nad povrchem insertu. Tyto nestability mohou vznikat na rozhraní insertu a vtokového kanálu. Dále mohou být dány obdélníkovým průřezem vnitřního průtokového prostoru bioreaktoru nad zkoumanými povrchy, do/z kterého ústí kruhové kanály o řádově menší šířce, než má prostor s vloženým scaffoldem.

Z výše uvedených důvodů byl vytvořen návrh bioreaktoru druhé generace (Obr. 13), který se od původního liší uspořádáním vtoků k insertu, který měl zabránit vzniku výrazných turbulentních toků nad povrchem scaffoldu. Reaktor druhé generace má jednu vtokovou část, která se v místě umístění insertu dělí na čtyři jednotlivé kanály. Při vložení insertu a připevnění pomocí přítlaku jsou hranice jednotlivých kanálů vzdáleny od insertu cca 200 μm .



Obr. 13 – A) 3D model bioreaktoru druhé generace, B) pohled shora a z boku, C) vytištěný a sestavený reaktor.

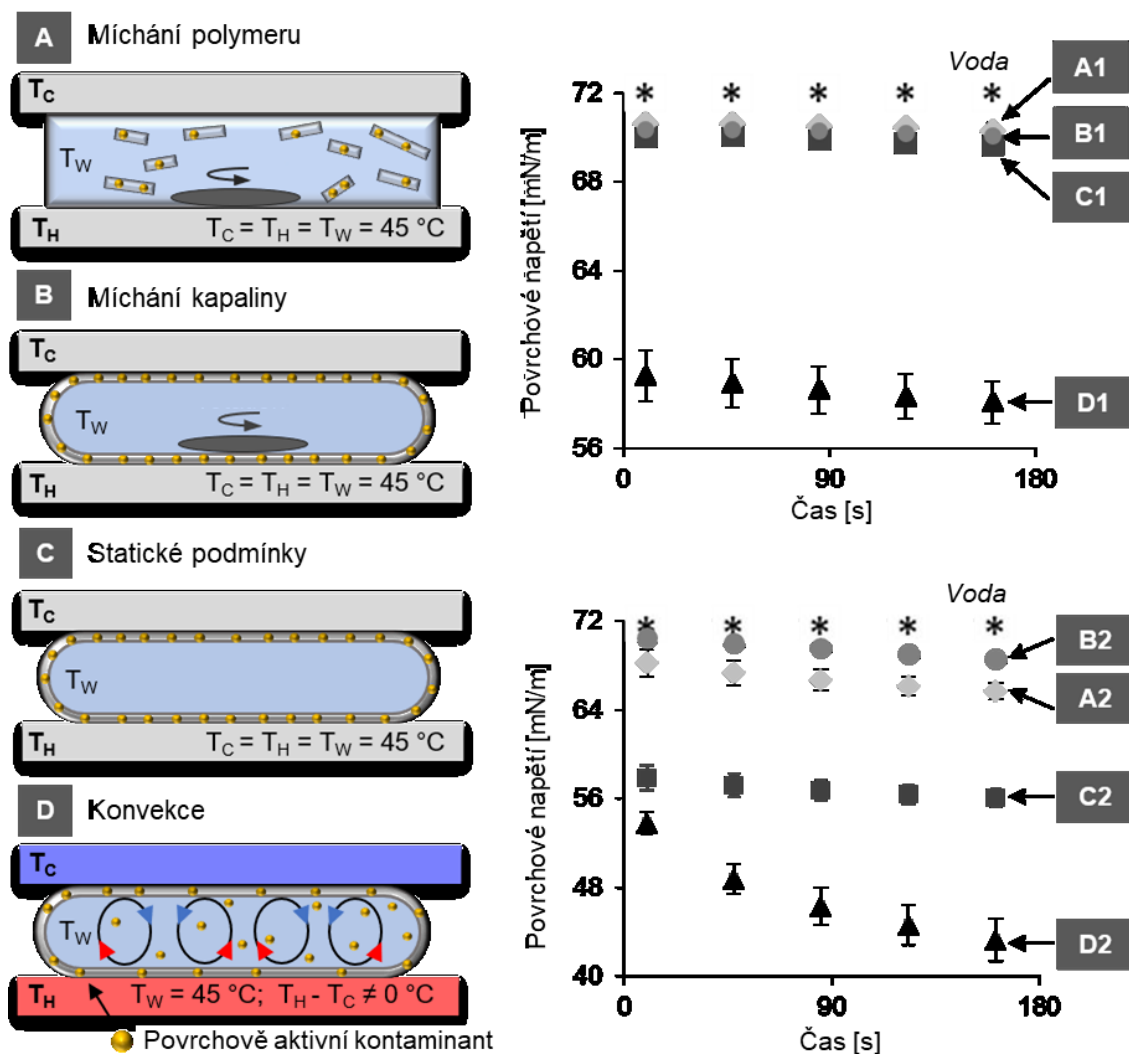
6.2.1 Vliv toků na stabilitu polymerních povrchů

Experimentální testování bioreaktoru představného v předešlé podkapitole ukázalo, že i přes optimalizaci jeho konstrukce stále dochází k odplavování buněk z materiálového povrchu. Ve snaze o odpověď na otázku, do jaké míry za tuto skutečnost může materiálový povrch, byly provedeny pokusy simulující rozdílné tokové chování nad polymerním povrchem.

Jako modelový systém pro tyto testy byl vybrán nízko hustotní polyetylen (LDPE). Tento typ materiálu byl zvolen záměrně vzhledem k jeho širokému aplikačnímu potenciálu nejen v biomedicíně. [132]

Byly navrženy čtyři experimentální postupy, jak je znázorněno na Obr. 14A-D vlevo. Průměrná teplota vody byla ve všech případech udržována na 45 °C. První schéma, Obr. 14A, představuje kousky LDPE ve vodě intenzivně promíchávané magnetickým míchadlem pro simulaci toku kolem povrchu polymeru. Obr. 14B ukazuje míchání vody magnetickým míchadlem v LDPE fólii pro simulaci náhodného proudění tekutiny. Ustálený stav v LDPE fólii bez míchání, Obr. 14C, odpovídá statickým podmínkám ohřevu. Obr. 14D znázorňuje konvekční proudění (tok) vody způsobené teplotním gradientem. Teplotní podmínky byly řízeny a kontrolovány zařízením popsáním ve studii Minaříka a kol. [133]. Po 24 hodinách vystavení LDPE výše uvedeným podmínkám bylo pomocí tenziometrie charakterizováno vyplavování kontaminantů z povrchů LDPE do vody.

Při porovnání křivek povrchového napětí vodných extraktů z farmaceutické LDPE fólie (Obr. 14A1-D1) je možné pozorovat výrazný pokles křivky povrchového napětí (a tedy přítomnost kontaminantů) pouze u extraktu z fólie vystavené teplotnímu gradientu. V případě recyklovaného LDPE vedla nižší čistota materiálu k většímu poklesu povrchového napětí i za statických podmínek (Obr. 14C2) a konvektivního proudění (Obr. 14D2).



Obr. 14 – vlevo – schématické znázornění experimentů: A) míchání LDPE kousků ve vodě v Petriho misce; B) míchání vody v LDPE nádobě; C) voda v LDPE nádobě bez míchání; D) voda v LDPE nádobě s teplotním spádem. T_H – teplota topné plochy; T_C – teplota chladicí plochy; T_W – střední teplota vody. Žluté částice představují povrchově aktivní nečistoty v polymerních nádobách ve formě aditiv nebo kontaminantů. Vpravo – povrchové napětí vodných extraktů. Označení A-D odpovídá schématům experimentálních postupů vlevo. Označení 1 odpovídá extraktům získaným z LDPE fólie s farmaceutickým certifikátem. Označení 2 odpovídá extraktům získaným z fólie z recyklovaného LDPE.

Bylo zjištěno, že konvektivní tok vznikající díky přítomnosti teplotního gradientu má zásadní vliv na uvolňování povrchově aktivních kontaminantů do okolního média, jak je možné pozorovat v nejvýraznějším poklesu křivky závislosti povrchového napětí na čase, Obr. 14D1 a D2.

Rozdíly v uvolňování povrchově aktivních látek lze vysvětlit pomocí teorie hraničních vrstev jejíž problematika je popsána v literatuře popisující mechaniku tekutin, přenos energie a hmoty [134,135]. Tloušťka hraniční vrstvy a povaha transportních procesů v této vrstvě je dána rychlostí proudění, koncentrací látek

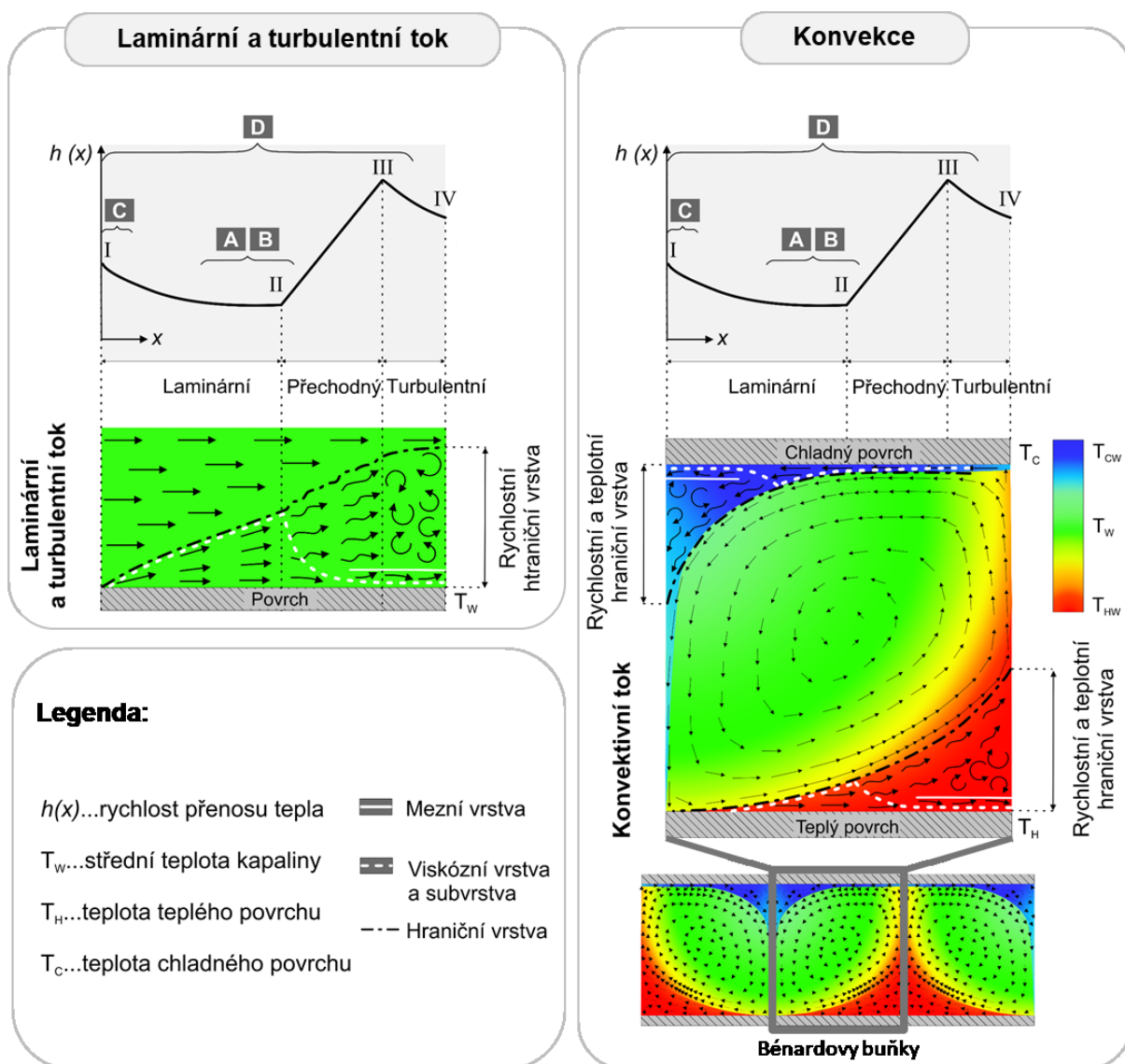
a teplotními gradienty nad pevným povrchem. Je třeba vzít v úvahu také vliv topografie povrchu, chemické složení uvolňovaných látek a jejich afinitu ke kapalnému prostředí obklopujícímu pevný povrch. Z tohoto pohledu je zřejmé, že jednotlivé experimentální systémy (Obr. 14A-D) budou vykazovat různou rychlost extrakce povrchově aktivních látek z povrchu do vodného prostředí.

Povaha proudění má zásadní vliv na rychlost přenosu hmoty a tepla (funkce $h(x)$, Obr. 15). Rozložení rychlosti proudění určuje nejen advektivní složku přenosu tepelné energie, ale také přenos chemických látek v hraniční vrstvě (černá přerušovaná čára na Obr. 15). Podobně jako u rychlostní hraniční vrstvy laminárního toku dochází ve směru proudění (x) k růstu tepelné a koncentrační hraniční vrstvy. Teplotní a koncentrační gradienty v kapalině se ve směru proudění snižují, stejně tak s rostoucí vzdáleností x (přechod z bodu I do bodu II, Obr. 15) dochází k poklesu koeficientu přestupu tepla a hmoty [135].

Výše zmíněné vysvětluje, proč za statických podmínek (Obr. 14C2) dochází ke zvýšenému uvolňování povrchově aktivních látek z polymeru do kapaliny než při simulovaném laminárním a přechodném toku (Obr. 14A2, B2). Za statických podmínek (bod I, Obr. 15) nedochází k tvorbě laminárního toku ani teplotní hraniční vrstvy, které by za jiných okolností tvořily bariéru, přes kterou by bylo uvolňování kontaminantů výrazně zpomaleno. V tomto případě pak lze počítat pouze s vlivem koncentračního gradientu nad povrchem polymeru, jak bylo zmíněno v práci Denberga a kol. [136].

Turbulentní míchání, které je charakteristické velkými gradienty rychlosti, podporuje vznik velkých teplotních i koncentračních gradientů v blízkosti pevného povrchu, a také zapříčiňuje zvýšení koeficientů přenosu tepla a hmoty přes přechodovou oblast (funkce $h(x)$, jdoucí z bodu II do bodu III, Obr. 15). S rostoucí rychlostí turbulentního proudění (procházející z bodu III do bodu IV, Obr. 15) dochází k mírnému poklesu rychlosti přenosu tepla a hmoty v důsledku chaotických změn ve směru a rychlosti proudění. Nárůst přenosu energie a hmoty v přechodové oblasti (jdoucí z bodu II do bodu III, Obr. 15) souvisí se ztenčením laminární viskózní vrstvy do podoby viskózní subvrstvy (přerušovaná bílá čára, Obr. 15). Transport hmoty v této subvrstvě má difúzní charakter. Nad touto podvrstvou se nachází mezní vrstva shora ohraničená plnou bílou čarou na Obr. 15 (vlevo), ve které je vliv difúze a turbulentního míchání srovnatelný. Nad mezní vrstvou se nachází turbulentní zóna, ve které je transport ovlivněn především turbulentním mícháním. Zúžení viskózní vrstvy do subvrstvy (oblast pod bílou přerušovanou čarou, bod II – bod IV, Obr. 15) vede k růstu smykového napětí τ_s , zatímco s rostoucí laminární viskózní vrstvou (bod I – bod II, Obr. 15) toto napětí τ_s klesá. Smykové napětí v tomto případě hraje významnou roli

a nemůže být zanedbáno, protože jeho vlivem může docházet k odtrhávání fragmentů a povrchově aktivních látek z povrchu polymeru do okolní kapaliny.



Obr. 15 - schématické znázornění a srovnání laminárního a turbulentního proudění (vlevo) vs. konvektivního proudění (vpravo). Graf nahoře zobrazuje lokální součinitel prostupu tepla ($h(x)$) pro proudění přes plochou desku. Písmena A,B,C a D odpovídají jednotlivým experimentálním postupům z Obr. 14.

Vliv organizovaného proudění ve formě Rayleigh-Bénardovy konvektivní nestability nelze popsat pouze jedním typem hraniční vrstvy, jak je popsáno v práci Wanga a kol. [137]. Tato problematika je schématicky znázorněna na Obr. 15, vpravo uprostřed. Nad pevným povrchem se v tomto případě netvoří pouze rychlostní, ale také teplotní hraniční vrstva. Nad hranicí jednotlivých rotujících válců kapaliny (Bénardovy buňky) se vyskytují oblasti s minimální viskózní vrstvou, subvrstvou a vyšším smykovým napětím τ_s .

Výše uvedené vede k závěru, že právě kombinací intenzivního přenosu hmoty, energie a smykového napětí τ_s působících na povrch polymeru vlivem minimální viskózní vrstvy (bod I, Obr. 15) a její zúžení do podoby subvrstvy (interval od bodu II do bodu IV, Obr. 15) dochází v případě Rayleigh-Bénardovy konvekce ke zvýšenému uvolňování povrchově aktivních látek do okolního média (Obr. 14D1 a D2).

6.3 Strukturované povrchy a jejich vliv na buňky

Při vývoji vhodných buněčných podpěr (scaffoldů) je nezbytné vzít v potaz celou řadu proměnných. Je třeba ověřit biokompatibilitu zvolených materiálů pro jejich zpracování do požadované podoby. Nově navržené materiály nesmí být cytotoxické a musí mít vhodnou povrchovou strukturu, která nebude negativně ovlivňovat funkce buněk jako je adheze, proliferace a celková viabilita. Jak bylo naznačeno v předešlých podkapitolách a je známo z literatury [109,116,117] nemalou měrou se na finální cytokompatibilitě podílí topografie povrchu, který přichází do kontaktu s buněčnými receptory. Z tohoto důvodu byly vyvíjeny nové postupy vedoucí ke vzniku povrchových prohlubní na vybraných typech biokompatibilních materiálů.

6.3.1 Strukturované povrchy na bázi hedvábného proteinu

Jako zástupce přírodních polymerů byl zvolen hedvábný fibroin získaný z kokonů bource morušového. Je známo, že hedvábný fibroin se vyskytuje ve dvou konformacích. V atmosféře bez vzdušné vlhkosti zaujímá stav SILK I, který se vyznačuje amorfní konformací s převládající přítomností α -šroubovic (α -helix). V přítomnosti zvýšené vlhkosti, alkoholu (methanolu), pod mechanickým namáháním nebo při zvýšené teplotě se fibroinové řetězce přeskupují do konformace β -skládaných listů (β -sheet) a fibroin se tak nachází ve stavu SILK II. [138]

6.3.1.1 Příprava fibroinových vrstev pro povrchovou úpravu

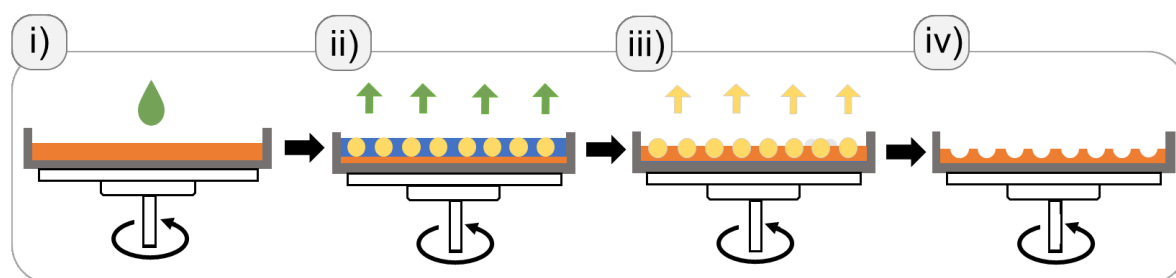
Fibroinové filmy byly připravovány z roztoků regenerovaného hedvábí v hexafluoroisopropanolu (HFIP). Koncentrace fibroinu v HFIP byla 2 % (w/v). Výsledný roztok byl nanášen v množství 450 μ l na sterilní polystyrenové Petriho misky o průměru 3,4 cm. Misky byly umístěny i s víčkem do exikátoru. Výsledkem sušení 2 % roztoku fibroinu v HFIP byly fibroinové filmy o tloušťce $7 \pm 0,5$ μ m. Takto připravené filmy se vzhledem ke způsobu přípravy (vysoušení v atmosféře N_2 bez přítomnosti vlhkosti) nachází v amorfním stavu SILK I.

Vzorky byly následně modifikovány pomocí fázové separace směsi dobrého a špatného rozpouštědla za rotace. Vzhledem k vysoké nestabilitě filmů

v amorfním stavu, kdy vlivem aplikace modifikační směsi za rotace dochází k jeho smývání k okrajům misky, byly fibroinové filmy vystaveny účinkům zvýšené vlhkosti, která zapříčinila částečnou změnu konformace polymerních řetězců do stavu SILK I + SILK II (RH 60 %, 48 hod) nebo SILK II (páry mOH, 24 hod).

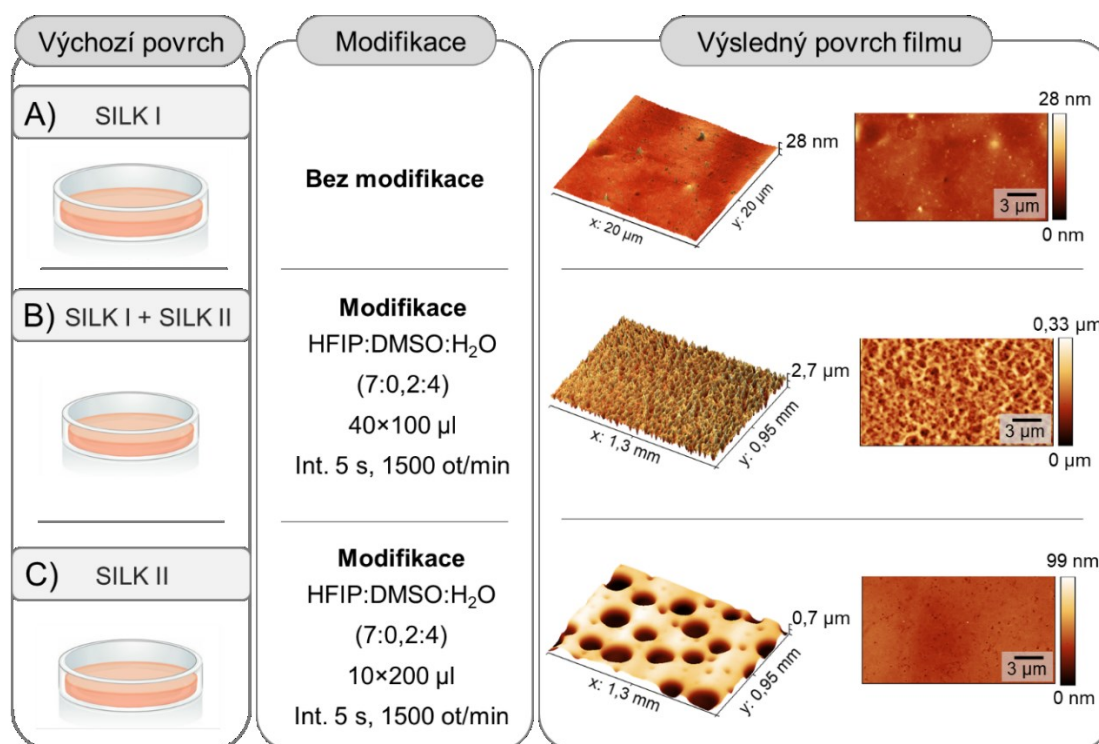
6.3.1 Strukturalizace fibroinových vrstev pomocí fázové separace

Změna struktury povrchů filmů pomocí fázové separace za rotace je podmíněna celou řadou procesních faktorů, podobně jako v případě polystyrenových povrchů diskutovaných v práci E. Wrzecionka [139]. Samotný proces fázové separace za rotace je znázorněn na Obr. 16. Na povrch rotujícího filmu je deponována směs dobrého a špatného rozpouštědla (Obr. 16 i). Dobré rozpouštědlo botná povrch filmu, zatímco špatné se separuje ve formě kapiček, které vytváří šablonu, jež tvoří povrchovou strukturu (Obr. 16 ii). V závěrečné fázi dochází k odpaření špatného rozpouštědla (Obr. 16 iii) a vzniku finální struktury povrchu (Obr. 16 iv).



Obr. 16 – schéma procesu fázové separace směsi dobrého a špatného rozpouštědla za rotace.

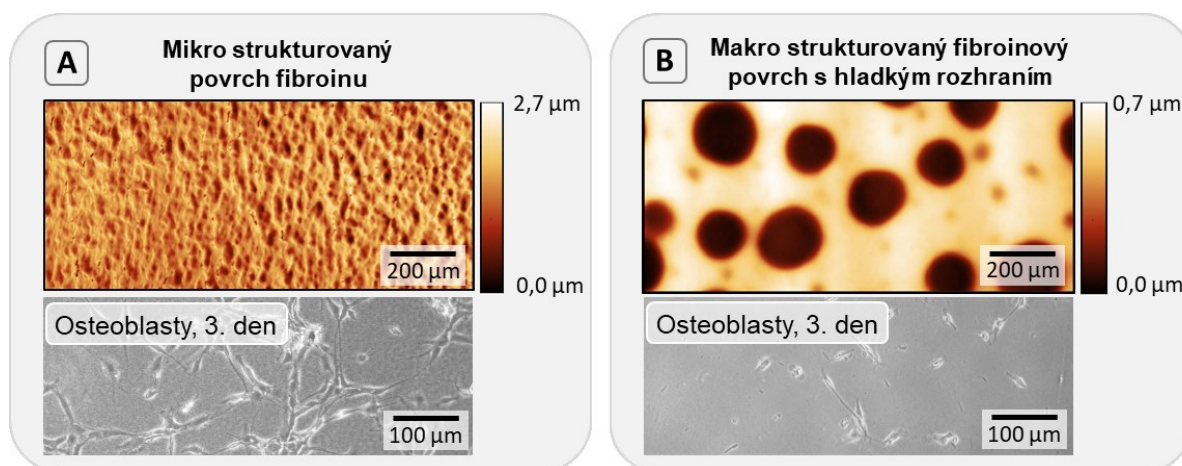
Na Obr. 17A je zobrazen fibroinový film ve stavu SILK I, který nebyl vystaven žádné modifikaci. Obr. 17B zobrazuje hierarchicky strukturovaný povrch fibroinu, jenž byl vytvořen díky vhodné volbě procesních parametrů a aplikaci směsi rozpouštědel na film v kombinovaném stavu SILK I + SILK II. Změnou procesních podmínek modifikace a použitím fibroinového filmu ve stavu SILK II je pak možné připravit makro porézní vrstvu s hladkými rozhraními, Obr. 17C.



Obr. 17 – příprava fibroinových filmů s různou povrchovou texturou. A) příprava a výsledný povrch fibroinového filmu ve stavu SILK I bez modifikace, B) příprava hierarchicky texturovaného povrchu pomocí fázové separace na filmu ve stavu SILK I+SILK II, C) příprava makro porézního povrchu s hladkým rozhraním vytvořený fázovou separací na filmu ve stavu SILK II. Obrázky z AMF a optického profilometru.

Z porovnání Obr. 17B a Obr. 17C lze konstatovat, že pomocí poměrně jednoduchých postupů přípravy fibroinových vrstev a jejich následnou modifikací pomocí fázové separace získáváme velmi rozdílné povrchové struktury s šířkou v řádu desítek až stovek mikrometrů. Vznik rozdílných povrchových struktur podmiňuje podíl amorfní fáze (SILK I), kterou lze z povrchu snáze odstranit vymytím. Fibroinový film ve stavu SILK II obsahuje amorfních prvků méně, proto pozorujeme převážně hladká rozhraní okolo makro prohlubní vznikajících v důsledku vtlačení kapek DMSO do povrchově nabobtnalé polymerní vrstvy.

Ze studia vlivu strukturovaných fibroinových povrchů na chování buněk vyplynulo, že mikro strukturalizace povrchu vede ke zlepšení jejich adheze, Obr. 18A), v porovnání s hladkými nebo makro strukturovanými povrchy, Obr. 18 B). Na makro strukturovaný povrch lze v rámci provedených experimentů pohlížet jako na hladký povrch, vzhledem ke skutečnosti, že makro prohlubně z povrchu po vystavení vodnému prostředí zaniknou, jak je patrné z Obr. 18 B) dole. Zvýšení adheze buněk na mikro strukturovaném fibroinovém povrchu je úspěchem samo o sobě vzhledem ke skutečnosti, že buňky na hladkém fibroinovém filmu se vyznačují nízkou adhezí k povrchu [140].

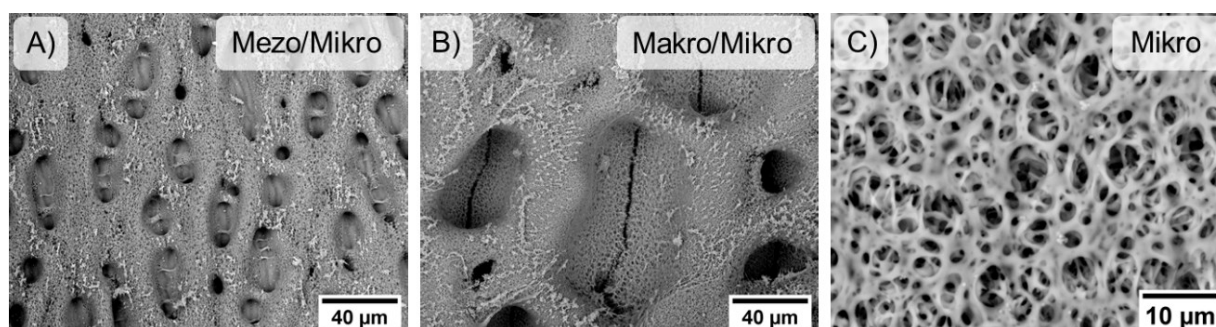


Obr. 18 – porovnání proliferace osteoblastů (MC3T3-E1) na A) mikro a B) makro strukturovaném fibroinovém povrchu. Nahoře obrázky z optického profilometru. Dole obrázky z optické mikroskopie. Testy buněčné kompatibility byly provedeny na Univerzitě v Bayreuthu v rámci zahraniční stáže.

6.4 Strukturované povrchy na bázi polystyrenu

Tato kapitola experimentální práce pojednává o přípravě strukturovaných polystyrenových povrchů. Polystyren jako nosný substrát byl vybrán s ohledem na jeho časté použití při *in vitro* buněčných testech. [141,142] Stejně jako v předchozí kapitole pojednávající o přípravě strukturovaných fibroinových filmů i zde byla využita metoda fázové separace založená na postupném dávkování směsi dobrého a špatného rozpouštědla (případně směsi polymer – dobré – špatné rozpouštědlo).

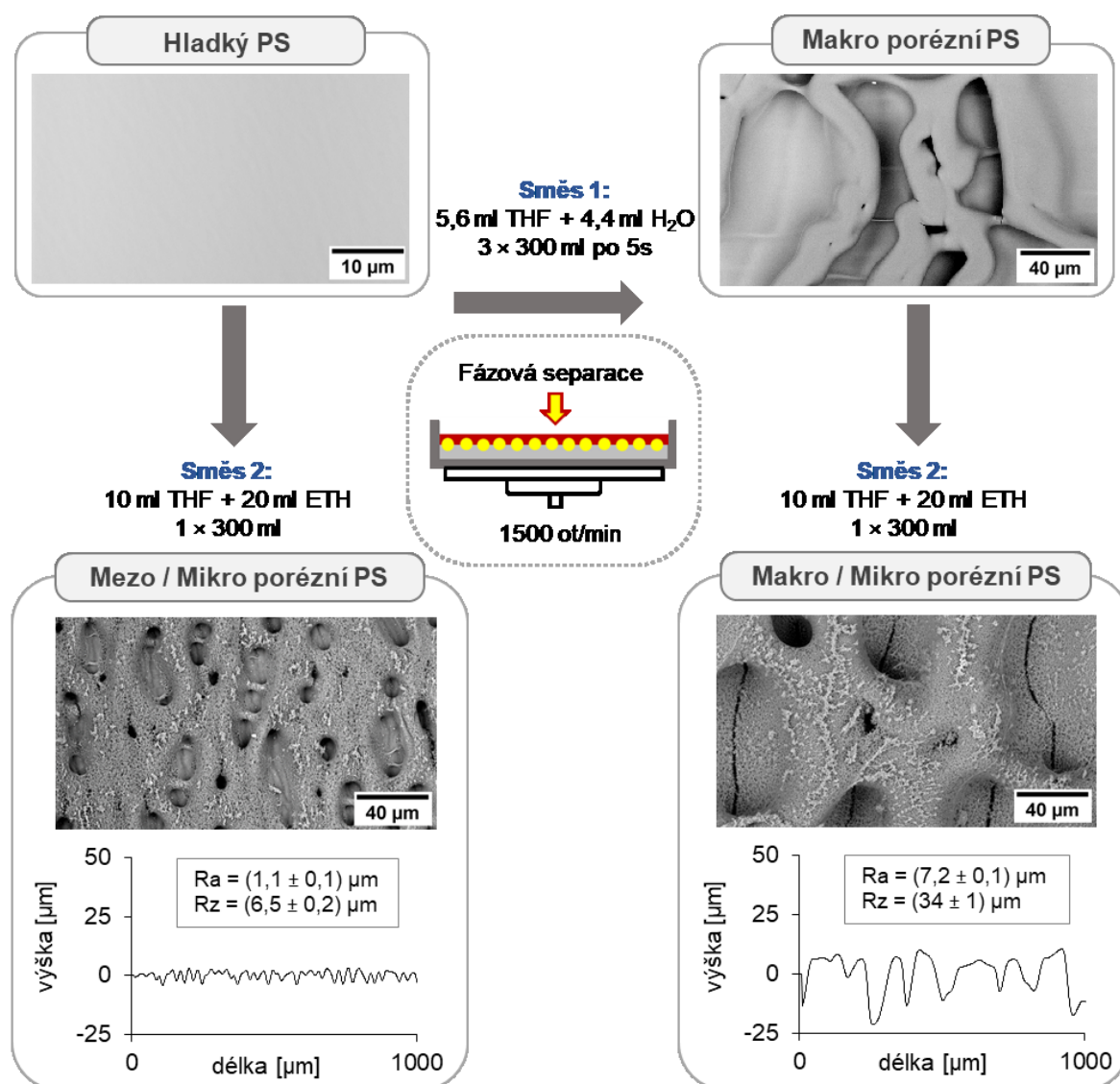
V rámci této práce byl navržen nový postup přípravy hierarchicky strukturovaných povrchů principiálně založený na postupném víceúrovňovém dávkování rozdílných směsí rozpouštědel bez a s přídavkem polymerní složky, Výsledné hierarchicky strukturované povrchy jsou zobrazeny na Obr. 19. Obr. 20 a Obr. 21 popisují proces přípravy těchto povrchů.



Obr. 19 – strukturované PS povrchy připravené fázovou separací/inverzí.³[143]

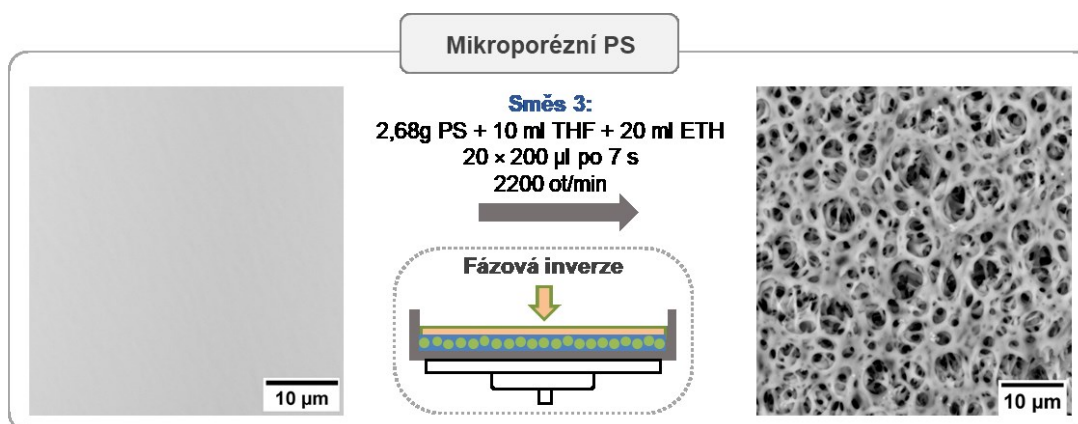
³ Označení „Makro“, „Mezo“ a „Mikro“ začínající velkým písmenem odpovídají názvům konkrétních hierarchicky strukturovaných povrchů (Obr. 19).

Pro přípravu hierarchicky strukturovaného povrchu znázorněného na Obr. 19B byl v prvním kroku vytvořen makro porézní povrch za použití směsi tetrahydrofuranu (THF) a H₂O (Obr. 20 vpravo nahoře) podobně jako v práci [144]. Ve druhém kroku byla na povrch aplikována jedna dávka směsi THF a ethoxyethanolu (ETH). Depozice druhého typu směsi rozpouštědel má za následek vytvoření specifické mikro textury na povrchu primárních makro pórů (Obr. 20 vpravo dole). Sekundární mikro strukturu lze získat nanesením jedné dávky směsi THF + ETH za rotace. Pro srovnání byla směs THF + ETH použita přímo k úpravě plochého povrchu PS. Po nanesení jedné dávky na rotační plochu se vytvoří specifické zvlnění charakterizované středně velkými (mezo) póry o velikosti 10 až 50 μm oddělenými širokými rozhraními s prohlubněmi o velikostech 0,1 až 10 μm, jak je patrné z Obr. 19A a Obr. 20 vlevo dole.



Obr. 20 – schéma přípravy hierarchicky strukturovaných polystyrenových povrchů pomocí jedno či dvou krokové fázové separace. [143]

Postupnou více krokovou fázovou separaci za rotace lze také použít k přípravě objemově porézních mikro struktur. K tomuto účelu je nutné modifikační směs obohatit o polymerní složku – v tomto případě polystyren. Přidaný PS se během rychlého odpařování THF vysráží okolo kapek špatného rozpouštědla (ETH). Z fyzikálně-chemického hlediska tento přístup odpovídá jevu známému jako fázová inverze. [145] Jednou z hlavních podmínek této metody je nalezení vhodného poměru všech složek směsi THF + PS + ETH, kdy ETH musí být přítomno v množství těsně před vysrážením PS z roztoku a zároveň koncentrace PS v THF musí být dostatečně vysoká pro vytvoření porézní vrstvy.

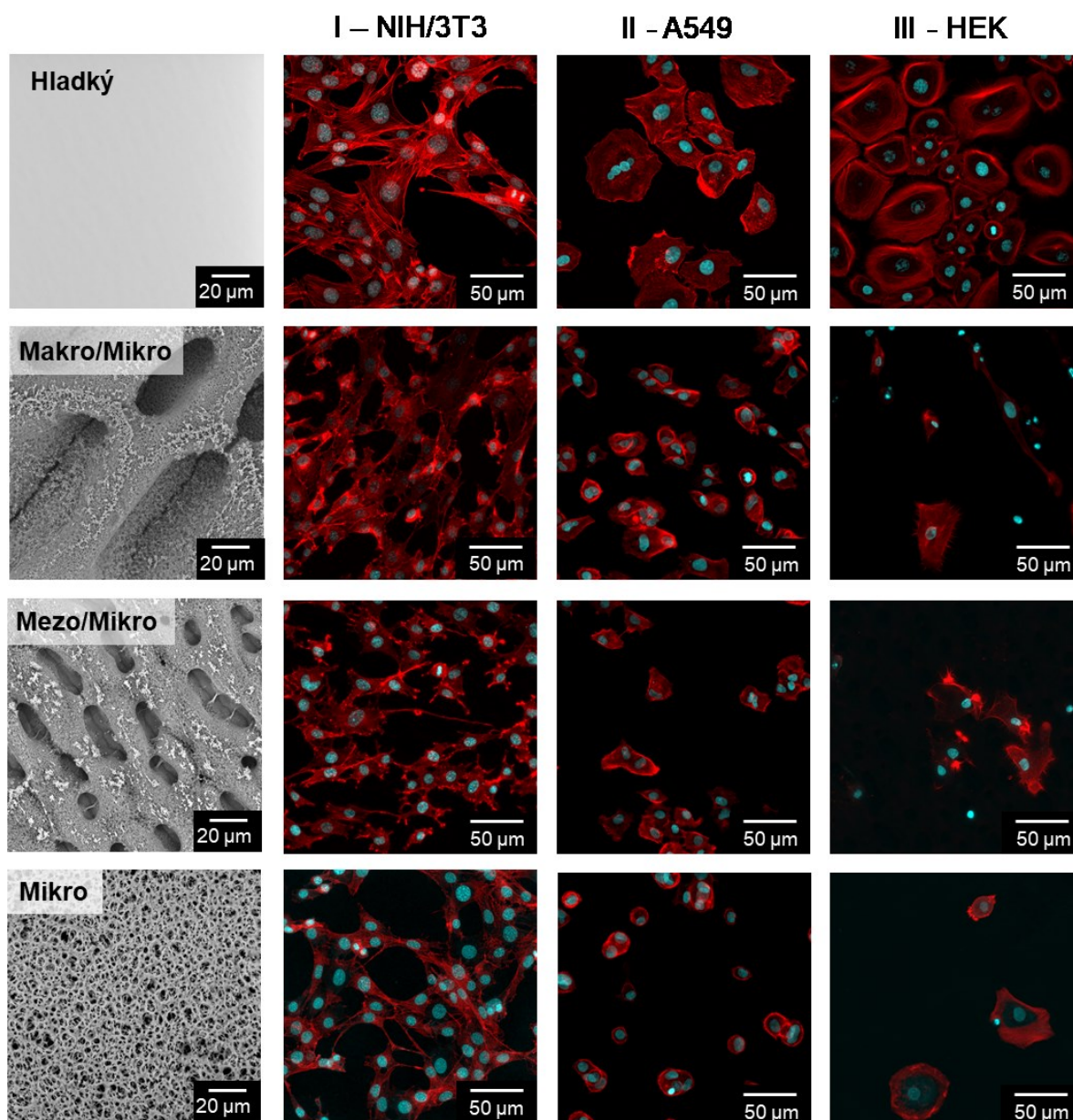


Obr. 21 - porézní PS vrstva připravená pomocí více krokové fázové separace (inverze) ze směsi polystyrenu, dobrého a špatného rozpouštědla. [143]

Jak bylo výše zmíněno, chování buněk silně ovlivňuje struktura povrchu, na který jsou buňky adherovány. Velmi důležitou roli zde hraje přítomnost mikro prohlubní s šířkou v řádech jednotek až desítek mikrometrů na rozhraní makro a mezo prohlubní. Ke stanovení liniově specifické odpovědi na hierarchicky strukturované PS povrchy, Obr. 19, byly testovány⁴ čtyři buněčné linie – myší fibroblasty (NIH/3T3), adenokarcinomické epiteliální buňky (A549), keratinocyty (HEK) a embryonální kmenové buňky (ESC). Výsledné snímky pořízené konfokálním mikroskopem jsou zobrazeny na Obr. 22 a Obr. 23. Modře jsou značena jádra buněk, červeně buněčný cytoskelet.

Jak je vidět na Obr. 22, HEK na jednotlivých površích vykazovaly sníženou proliferaci (Obr. 22, sloupec III). Nízká schopnost proliferace v tomto případě pravděpodobně souvisí s velikostí pórů, které se pohybují v rozmezí 5-150 µm. Pro kultivaci keratinocytů by však póry neměly přesáhnout jednotky mikrometrů, aby byla omezena migrace buněk do pórů. [146]

⁴ Testy buněčné kompatibility, jejichž výsledky jsou uvedené v této kapitole, byly provedeny v laboratořích buněčné biologie na CPS UTB ve Zlíně nebo přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně.

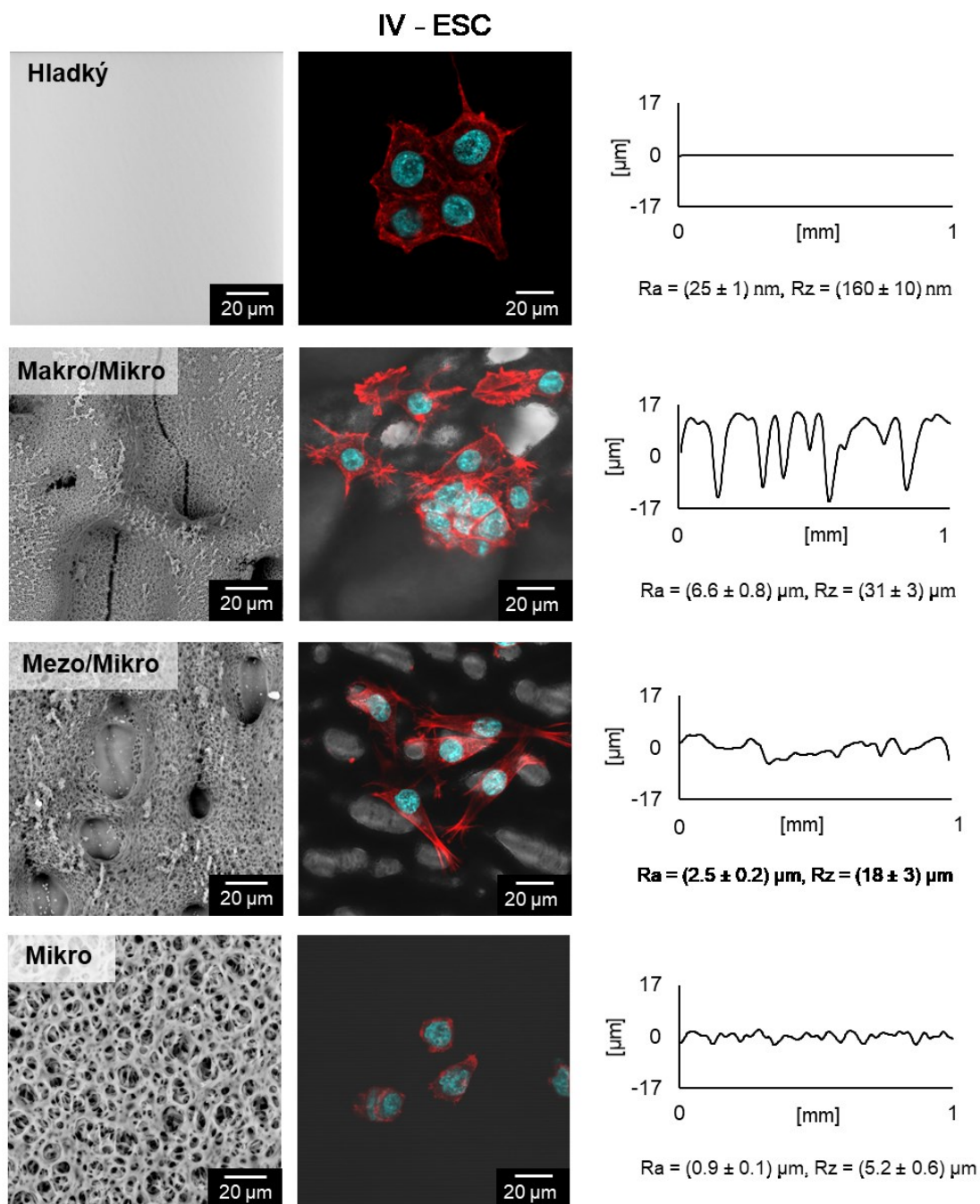


Obr. 22 – snímky různých buněčných linií pořízených konfokálním mikroskopem. Sloupec I – myši fibroblasty (NIH/3T3), sloupec II – adenokarcinomické epiteliální buňky (A549), sloupec III – keratinocyty (HEK). Modře značená jádra buněk, červeně buněčný cytoskelet. [143]

Buňky A549 byly schopny růst na všech hierarchicky strukturovaných površích a nebyla pozorována žádná vizuální změna morfologie (Obr. 22, sloupec II).

V případě použití buněk NIH/3T3 však nastal zvrát, kdy je možné pozorovat zajímavou morfologii myších fibroblastů (Obr. 22, sloupec I). Na strukturovaných površích („Makro/Mikro“ nebo „Mezo/Mikro“) došlo k výrazné eliminaci výskytu stresových vláken, která je spjata především s kultivací fibroblastů na hladkém nebo „Mikro“ PS povrchu, Obr. 22. Toto zjištění přináší možné použití těchto povrchů jako substrátů schopných napodobit architekturu *in vivo* tkáně.

Jednou z dalších testovaných buněčných linií byly embryonální kmenové buňky (ESC). Studované kmenové buňky na mikro porézním povrchu („Mikro“), stejně jako na hladkém povrchu („Hladký“) nemění tvar svého cytoskeletu, viz Obr. 23. Vyznačují se kompaktním tvarem s velkým jádrem (značeno modře).



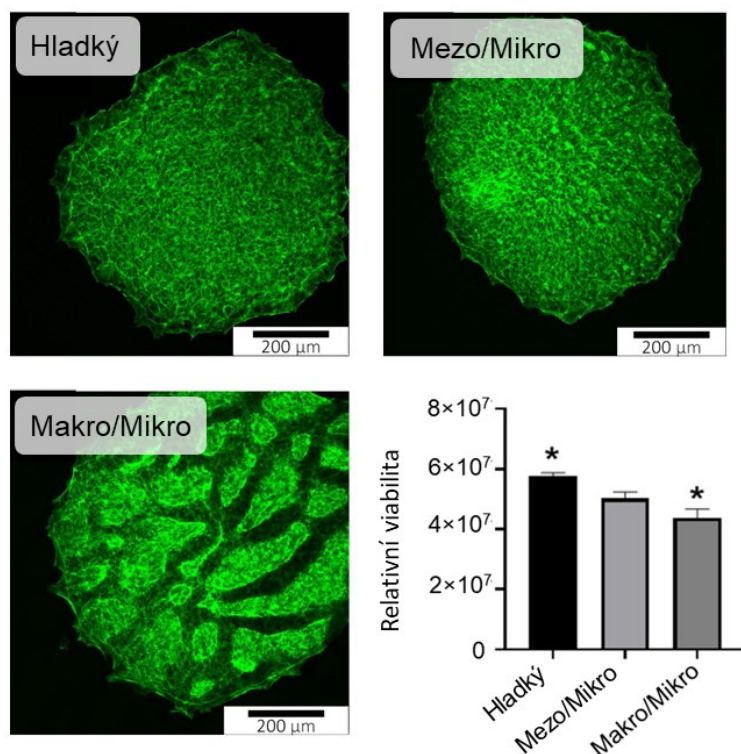
Obr. 23 – snímky embryonálních kmenových buněk (ESC) na PS površích porízené konfokálním mikroskopem. Vpravo – profilové řezy PS povrchů. [143]

Při kontaktu s hierarchicky strukturovanými „Mezo/Mikro“ nebo „Makro/Mikro“ povrchy lze pozorovat výrazné změny ve tvaru cytoskeletu (značen červeně). Na povrchu „Mezo/Mikro“ lze sledovat přednostní umístění

buněčných jader uvnitř pórů. Také je možné sledovat preferenční orientaci cytoskeletu shodnou s orientací mikro pórů. Jak je známo z literatury [147,148], tvar buněčného cytoskeletu je jedním z klíčových faktorů pro další vývoj buňky. Právě tyto specifické orientace cytoskeletu mohou dále souviset s možnou diferenciací kmenových buněk. [149]

Z výsledků a literárních poznatků plyne že geometrie povrchu hraje zásadní roli při vývoji chování kmenových buněk. Z Obr. 23 jasně vyplývá, že buňky, které měly při kultivaci více prostoru, se formovaly primárně do polygonálního tvaru, na rozdíl od buněk na povrchu s menšími póry („Mikro“), které získaly kulovitý tvar podobný nediferenciovanému stavu.

Na vybraných substrátech byla testována další buněčná linie – nediferencovaná forma lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk (hiPSC), která má potenciál tvořit všechny tkáně v lidském těle. [150] Obr. 24 zobrazuje buňky hiPSC na polystyrenových površích. Z grafu na Obr. 24, který zobrazuje relativní viabilitu buněk vyplývá, že povrch „Makro/Mikro“ mírně inhibuje proliferaci hiPSC. I přes tuto skutečnost jsou oba hierarchicky strukturované povrchy („Mezo/Mikro“ a „Makro/Mikro“) vhodné pro kultivaci hiPSC buněk díky vysokým hodnotám relativní viability.

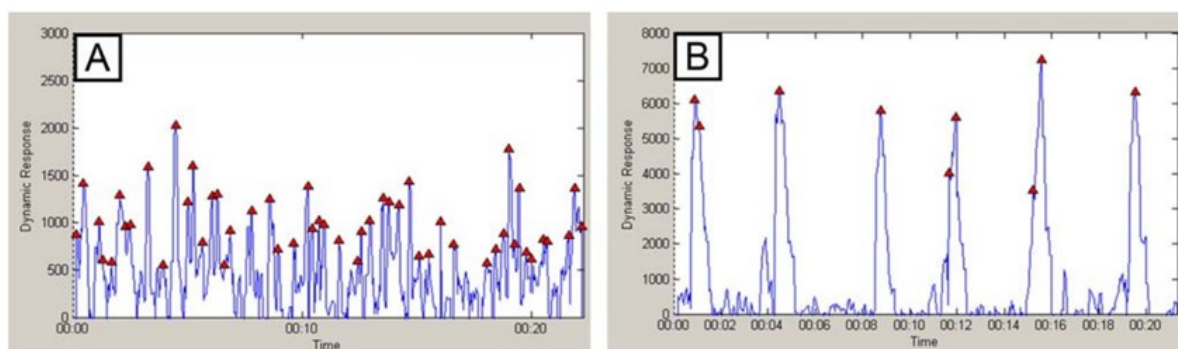


Obr. 24 - hiPSC kultivované na hladkém, „Mezo/Mikro“ a „Makro/Mikro“ substrátech po čtyřech dnech proliferace kontrastně obarvené pomocí Phalloidin-FITC. Graf zobrazuje relativní viabilitu pro všechny povrchy. Indexy * vyjadřují odchylky ($p \leq 0,05$). Testy provedeny na přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. [151]

Buňky hiPSC jsou schopny diferencovat do podoby funkčních kardiomyocytů (iPSC-CM), jak nastalo i v případě zde připravených PS substrátů. Je známo, že proliferace a zrání iPSC-CM je ovlivněna strukturou substrátu. [152,153]

Přítomnost zralých kardiomyocytů je možné stanovit pomocí metody sledující průtok iontů Ca^{2+} . Prostřednictvím této analýzy byly zpozorovány neobvyklé vlastnosti hierarchicky strukturovaného „Makro/Mikro“ PS substrátu, což je patrné z Obr. 25B. Právě tato specifická topografie totiž způsobuje ojedinělé zesílení fluorescenčního signálu. Z výše uvedeného plyne, že úpravu polystyrenového substrátu, který je běžně používán pro tkáňové kultury, je možné využít ke zvýšení citlivosti reakce kardiomyocytů na ionty Ca^{2+} a je tedy možné použít běžnou kameru, která tyto zesílené signály dokáže bez problémů detekovat.

Z vyhodnocení fluorescenčních signálů na různě strukturovaných površích, plyne, že strukturované PS povrchy mají mnohem vyšší autofluorescenční signál než hladké. Tato skutečnost je s největší pravděpodobností způsobena mnohonásobným odrazem jak excitačního, tak emisního záření na různě strukturovaných površích.



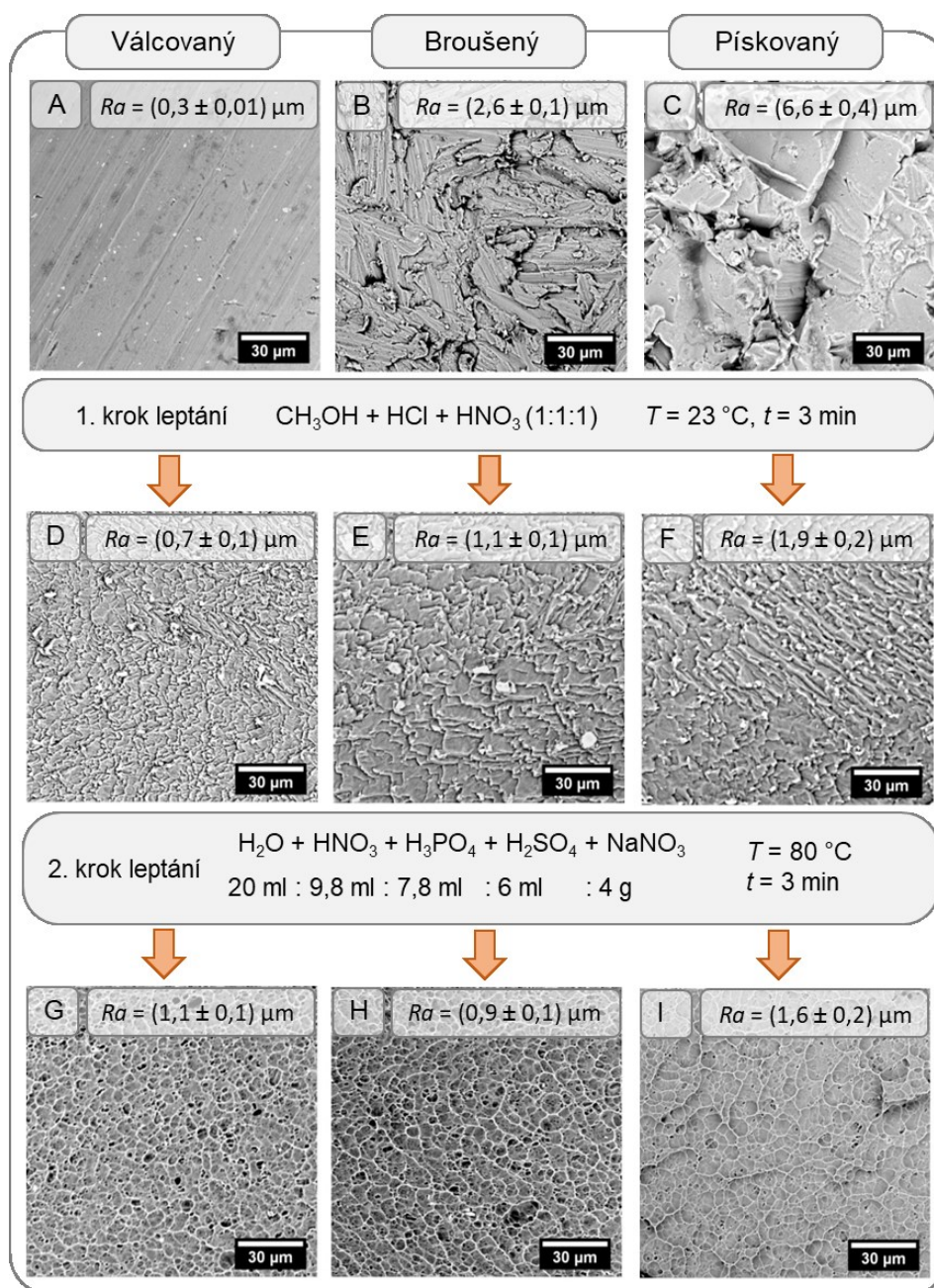
Obr. 25 - záznamy intracelulárních vln iontů Ca^{2+} v tepu kardiomyocytů stanovené sondou Fura4. Záznam růstu hiPSC-CM na A) hladkém a B) Makro/Mikro PS substrátu. Testy provedeny na přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. [151]

6.5 Příprava strukturovaných povrchů na bázi hliníku

Uplatnění hliníku na poli tkáňového inženýrství lze objevit například při přípravě porézních aluminových keramik [154], scaffoldů z oxidu hlinitého nejen pro kostní tkáňové inženýrství [155] nebo použití strukturovaného hliníku a jeho oxidu jako šablony pro replikaci struktury na polymerní materiály [156]. Popis vlivu povrchové struktury hliníku na buněčné chování lze nalézt ve studii Ming-Lianga [157]. Výsledky této studie udávají, že nejlépe proliferují buňky na povrchu s kombinovanými mikro a nano nerovnostmi.

V této práci byly optimalizovány procesní parametry leptacích procesů s cílem připravit specificky strukturované hliníkové povrchy. Byly zkoumány možnosti

jejich hydrofobizace a vliv jejich povrchové textury na adhezi polymerních systémů.



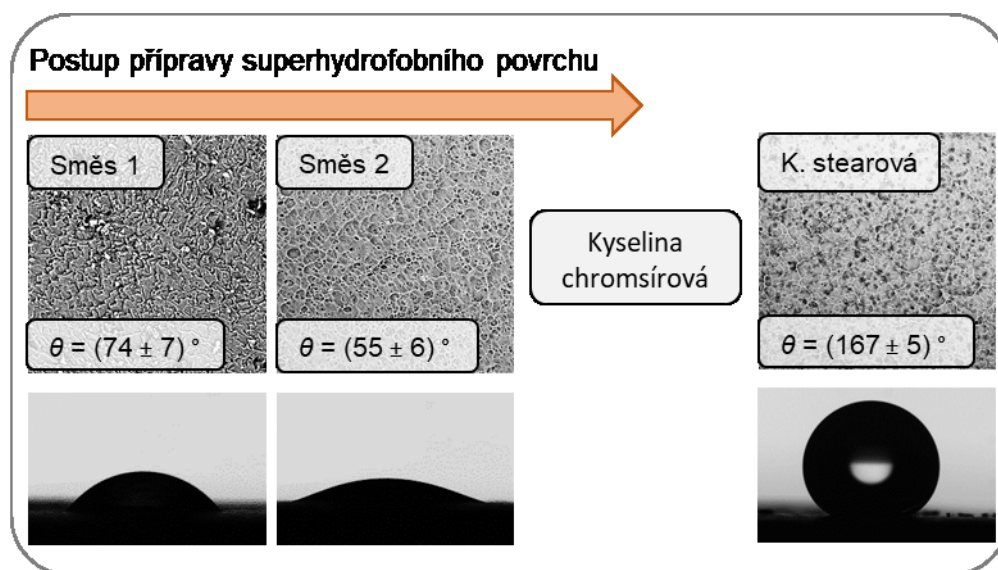
Obr. 26 – povrch hliníku v různých stupních úpravy chemickým leptáním. [158]

Z provedených experimentů vyplynulo, že u většiny použitých leptacích směsí je typ vznikající povrchové struktury podmínován výchozí drsností hliníkového povrchu. Z tohoto důvodu byl vyhledáván leptací postup, který by umožňoval připravovat srovnatelné povrchové struktury bez ohledu na výchozí drsnost povrchu. Bylo zjištěno, že tohoto cíle lze částečně dosáhnout pomocí roztoku $\text{CH}_3\text{OH} + \text{HCl} + \text{HNO}_3$ (1:1:1), dále v textu označována jako „směs 1“, Obr. 26D-F. Proces leptání probíhal při $23\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 3 minut. Na obrázcích jsou uvedeny

hodnoty parametru drsnosti Ra . Experimenty ukázaly, že s pomocí této leptací směsi lze připravit relativně podobné povrchy bez ohledu na výchozí topografii povrchů uvedených na Obr. 26A-C. U válcovaného povrchu dochází k mírnému zvyšování hodnoty Ra po procesu leptání, zatímco u broušeného a pískovaného povrchu dochází ke snižování hodnot Ra .

Pro tvorbu Al povrchů připomínajících porézní strukturu, podobně jako v případě fibroinu a polystyrenu diskutované v předešlých podkapitolách, byla použita leptací směs skládající se z $H_2O + HNO_3 + H_3PO_4 + H_2SO_4 + NaNO_3$ (v poměru složek 20 ml : 9,8 ml : 7,8 ml : 6 ml : 4 g) dále označována jako „směs 2“. Proces leptání touto směsí probíhal při 80 °C po dobu 3 minut. Na výsledných snímcích z elektronového mikroskopu (viz Obr. 26G-I) je možné pozorovat vzniklé strukturované povrchy připomínající povrchové prohlubně.

V následných experimentech byly leptané hliníkové povrchy dále modifikovány tak, aby se vyznačovaly superhydrofobním charakterem, Obr. 27. Z poznatků prezentovaných v literatuře byl převzat postup využívající pro tyto účely kyselinu stearovou [159,160].

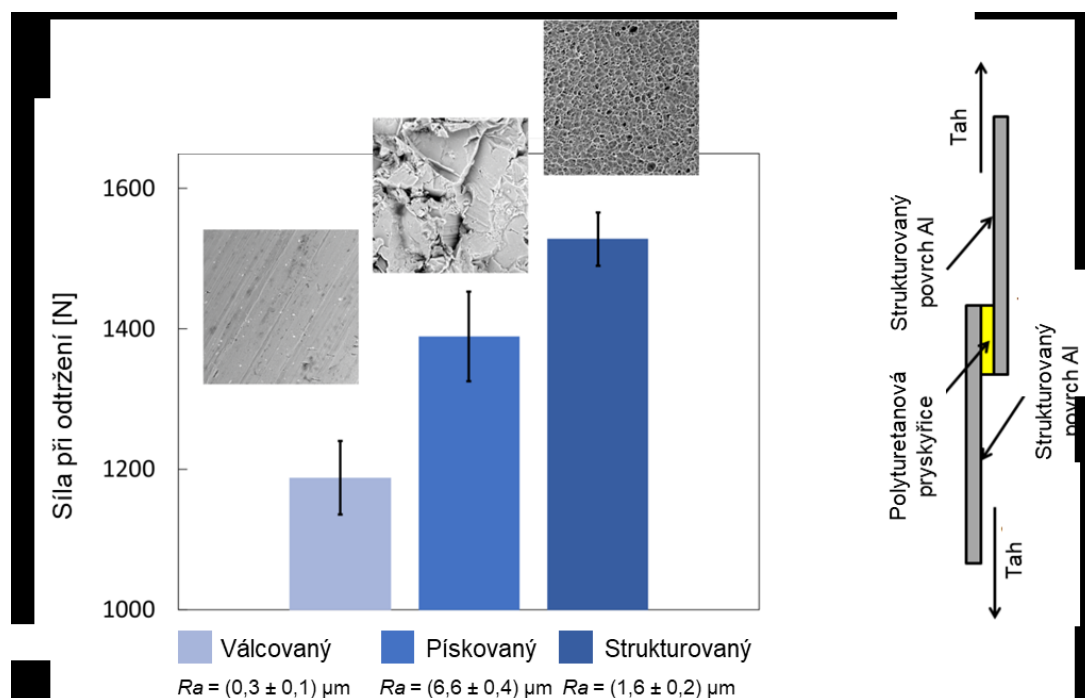


Obr. 27 – schéma přípravy superhydrofobního Al povrchu pomocí leptání a deponování kyseliny stearové. [158]

Z takto provedených experimentů vyplynulo, že kombinací nových leptacích postupů s literárně známým krytím pomocí kyseliny stearové lze připravit povrchy s mnohem vyšší hodnotou kontaktního úhlu smáčení v porovnání s poznatky prezentovanými v literatuře [159–161].

Je známo, že texturované povrchy ovlivňují užité vlastnosti materiálu, zvyšují adhezi [162,163] a podmiňují vývoj buněčných systémů [164,165]. S ohledem na tuto skutečnost byla modelově testována pevnost „lepených“ spojů rozdílně

strukturovaných hliníkových povrchů. Schéma modelového systému je zobrazeno na Obr. 28 vpravo. Hliníkové vzorky byly spojovány pomocí polyuretanové pryskyřice. Rozměr spojované plochy zaujímal 2×2 cm.



Obr. 28 – vliv povrchové struktury hliníku na pevnost lepeného spoje (vlevo) a schéma testovaného systému (vpravo). [158]

Pomocí univerzálního testovacího stroje byly připravené systémy namáhány tahem až po mez, kdy došlo odtržení spojovaných hliníkových ploch. Získané výsledky ukazují, že specifická povrchová struktura v podobě prohlubní vede ke zvýšení mezní síly pro oddělení spojovaných ploch i přes nižší hodnotu R_a v porovnání s pískovaným nebo hladkým povrchem, Obr. 28 vlevo.

7. Přínos pro vědu a praxi

Z teoretického hlediska přináší práce nové poznatky v oblasti využití fázově separačních procesů při formování vlákněných struktur pomocí aditivních výrobních postupů. Neméně důležité jsou poznatky spojené s vlivem rozdílně strukturovaných povrchů na chování buněk. Tyto poznatky lze prakticky využít pro přípravu pokročilých hierarchicky strukturovaných scaffoldů aplikovatelných v oblasti regenerativní medicíny. Takto připravené podpůrné systémy bude možné použít pro vytváření tkáňových modelů určených nejen pro náhradu poškozené nebo chybějící tkáně v lidském těle, ale rovněž pro testování léčebných postupů nebo účinnosti léčiv. Elektricky stimulovatelné scaffoldy na polymerní bázi lze využít pro přípravu inteligentních „4D“ scaffoldů simulujících *in vivo* podmínky při základních laboratorních testech v biologických laboratořích. Stejně tak nově navržené průtokové bioreaktory mohou být nápomocny při vývoji nových typů materiálových soustav aplikovatelných v oblasti regenerativní medicíny.

Z praktického hlediska jsou neméně zajímavé poznatky související se studiem vlivu toků kapaliny na povrch polymerních materiálů. Zjištění, že teplotní gradienty podobně jako povrchové nerovnosti, mohou zásadním způsobem urychlovat uvolňování povrchově aktivních látek a polymerních fragmentů do vodného prostředí, jsou zcela zásadní jak při navrhování průtokových bioreaktorů, tak například při schvalování polymerních materiálů určených pro distribuci pitné vody.

Zcela zásadní jsou poznatky spojené s vlivem sekundární struktury fibroinu na možnosti jeho povrchové strukturalizace. Pochopení této skutečnosti vede k odstranění jedné z nevýhod tohoto biopolymerního systému, a to nízké adheze buněk k jeho povrchu. Odstranění tohoto nedostatku bez zásahu do jeho chemické podstaty otevírá nové aplikační příležitosti tohoto přírodního polymeru s výbornými mechanickými vlastnostmi.

Nové poznatky spojené s povrchovou texturizací hliníkových substrátů vyznačujících se rozdílnou povrchovou drsností mají především praktický význam. Hliník jako konstrukční materiál je používán v širokém spektru průmyslových aplikací, biomateriály nevyjímaje. Pomocí nově navržených leptacích postupů lze připravovat specificky strukturované povrchy pro formování polymerních materiálů. Takto připravené povrchy lze upravit tak, aby vykazovaly samočisticí vlastnosti dané extrémně nízkou smáčivostí vodou nebo je lze použít pro zvýšení pevnosti lepených spojů a možnou adhezi polymerní matrice ke kovovému podkladu.

8. Závěr

Tato práce se zabývala zpracováním materiálových soustav do podoby strukturovaných povrchů aplikovatelných v oblasti regenerativní medicíny. Pro studium buněčných interakcí v simulovaných *in vivo* podmínkách byl navržen a otestován průtokový bioreaktor. Byly provedeny testy stability vybraného polymerního materiálu v rozdílných tokových podmínkách. U vybraných typů byl studován vliv povrchových nerovností na chování buněk.

Teoretická část práce se zabývá vlastnostmi, materiály a metodami výroby scaffoldů pro účely regenerativní medicíny. Byla zde diskutována problematika biokompatibility, biodegradability, mechanických vlastností a porozity scaffoldů. Podrobně byly diskutovány rozdílné výrobní technologie scaffoldů. Mimo to zde byly rozebrány vybrané typy biomateriálů používaných pro výrobu scaffoldů a vliv povrchů na chování buněk.

Pomocí aditivních výrobních postupů 3D tisku, electrospinningu a elektrickým polem asistovaného tisku byly připraveny porézní povrchově strukturované objekty aplikovatelné v oblasti buněčné biologie a regenerativní medicíny.

V prvních fázích experimentální práce byly srovnávány možnosti SLA a DLP tiskových přístupů pro přípravu mřížkových scaffoldů a strukturovaných povrchů. Z těchto experimentů vyplynuly limity daných tiskových zařízení a použitých fotosenzitivních pryskyřic pro přípravu rozměrově přesných mřížek s definovaným povrchem a odstupem stěn menším než $500 \times 500 \mu\text{m}$. Získané poznatky v této oblasti byly aplikovány při přípravě nových typů průtokových bioreaktorů.

Pro přípravu biokompatibilních 3D scaffoldů byly použity polykaprolakton. Tento typ materiálu byl zpracováván především ze směsných roztoků obsahujících dobré a špatné rozpouštědlo. Výsledky z těchto experimentů ukázaly, že s pomocí tohoto přístupu může docházet ve formovaném polymerním systému k fázové separaci, která má za následek vznik unikátních hierarchicky strukturovaných scaffoldů a mikro vlákněných vrstev.

Dále byl představen nový postup přípravy tzv. 4D scaffoldů založený na zvláknění a 3D tisku polymeru s piezoelektrickými vlastnostmi. Do podoby organizovaných mřížkových struktur a náhodně skládaných nano vlákněných vrstev byl zpracováván terpolymer poly(vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlorotrifluorethylen). Bylo prokázáno, že tento polymer lze pomocí zvolených technologií formovat, a také že si po zpracování zachovává svou funkčnost – je schopný pod napětím měnit tvar, mechanické vlastnosti. Mimo to lze ovlivňovat

povrchový reliéf vláken jako takových, což lze s výhodou použít pro přípravu hierarchicky strukturovaných objektů.

Bylo navrženo a pomocí stereolitografického 3D tisku vyrobeno několik funkčních modelů průtokového bioreaktoru pro simulaci *in vivo* podmínek v laboratoři. Během testování byl zjištěn zásadní vliv toku na adhezi buněk. Bylo zjištěno, že i nízké průtočné rychlosti vedou k odplavování buněk. V návaznosti na toto zjištění byla testována stabilita vybraného polymerního systému za rozdílných tokových podmínek. Výsledky těchto experimentů prokázaly, že zejména organizovaný tok kapaliny nad povrchem zkoumaného polymerního materiálu vede k zrychlenému uvolňování povrchově aktivních látek do vodného prostředí. Na vznik nelaminárních toků mohou mít vliv, stejně jako teplotní gradienty, povrchové nerovnosti vyskytující se na površích strukturovaných vrstev a scaffoldů.

S ohledem na skutečnost, že pro přípravu hierarchicky strukturovaných vlákněných vrstev a scaffoldů byly používány roztoky polymerů, při jejichž vysychání mohlo docházet k fázové separaci, vyvolané buďto přítomností špatného rozpouštědla nebo kondenzací vzdušné vlhkosti, byl studován vliv těchto proměnných na formování povrchově strukturovaných vrstev. Pro tyto účely byly zvoleny dva modelové polymerní systémy používané v oblasti buněčné biologie a tkáňového inženýrství. Prvním systémem byl fibroin, druhým tkáňový polystyren. Povrch těchto materiálů byl upravován pomocí více krokové fázové separace. Tímto jednoduchým a rychlým postupem byla připravena celá řada nových typů porézních povrchů a objemových struktur s nerovnostmi v řádech stovek nanometrů až mikrometrů. Takto připravené povrchy byly testovány s ohledem na buněčné chování. Získané poznatky v této oblasti ukazují, že metodu fázové separace lze s výhodou použít pro přípravu struktur podmiňujících chování buněk – jejich adhezi, proliferaci, diferenciaci. Fibroblasty na hierarchicky strukturovaných površích obsahují mnohem méně stresových fibril. Některé typy povrchů mohou iniciovat změnu buněčné morfologie, která může být zásadním faktorem podmiňujícím buněčnou diferenciaci. Hierarchicky strukturované povrchy mohou být nápomocné například při studiu kardiomyocytů, kde bylo zjištěno, že specifická povrchová struktura vytvořená pomocí fázové separace přispívá k výraznému zesílení fluorescenčních signálů, které reflektují specifické buněčné cykly.

Poslední studovanou problematikou byla strukturalizace materiálů na bázi hliníku, které lze využít pro formování polymerních povrchů. Bylo prokázáno, že pomocí specifických leptacích postupů lze připravovat strukturované povrchy, které se svým vzhledem podobají povrchům generovaným pomocí fázové separace. Nově navržené postupy lze použít pro rozdílné typy výchozích povrchových reliéfů, aniž by došlo k ovlivnění cílené povrchové topografie.

Reference

1. Bruen, D.; Delaney, C.; Florea, L.; Diamond, D. Glucose Sensing for Diabetes Monitoring: Recent Developments. *Sensors* 2017, 17.
2. Berry, E.; Guo, J.J.; Kelton, C.M.; Shiyabade, H.; Knight, D.; Heaton, P.C. PMS19 DRUG UTILIZATION AND SPENDING TRENDS OF BISPHOSPHONATE MEDICATIONS MEDICAID PROGRAMS IN THE UNITED STATES. *Value Heal.* **2009**, 12, A67, doi:10.1016/S1098-3015(10)73395-7.
3. Daar, A.S.; Greenwood, H.L. A proposed definition of regenerative medicine. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2007**, 1, 179–184, doi:https://doi.org/10.1002/term.20.
4. Terzic, A.; Folmes, C.D.; Martinez-Fernandez, A.; Behfar, A. Regenerative Medicine: On the Vanguard of Health Care. *Mayo Clin. Proc.* **2011**, 86, 600–602, doi:10.4065/mcp.2011.0325.
5. Nelson, T.J.; Behfar, A.; Terzic, A. Strategies for therapeutic repair: The “R(3)” regenerative medicine paradigm. *Clin. Transl. Sci.* **2008**, 1, 168–171, doi:10.1111/j.1752-8062.2008.00039.x.
6. Langer, R.; Vacanti, J. Tissue engineering. *Science (80-.).* 260, 920–926, doi:10.1126/science.8493529.
7. Eltom, A.; Zhong, G.; Muhammad, A. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes. *Adv. Mater. Sci. Eng.* 2019, 1–13, doi:10.1155/2019/3429527.
8. Stratakis, E. Novel Biomaterials for Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19, doi:10.3390/ijms19123960.
9. Tung, A.; Levin, M. Extra-genomic instructive influences in morphogenesis. *Dev. Biol.* **2020**, 461, 1–12, doi:10.1016/j.ydbio.2020.01.010.
10. Pinet, K.; McLaughlin, K.A. Mechanisms of physiological tissue remodeling in animals. *Dev. Biol.* **2019**, 451, 134–145, doi:10.1016/j.ydbio.2019.04.001.
11. Hasan, A.; Morshed, M.; Memic, A.; Hassan, S.; Webster, T.; Marei, H. Nanoparticles in tissue engineering. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, 13, 5637–5655, doi:10.2147/IJN.S153758.
12. Liaw, C.-Y.; Guvendiren, M. Current and emerging applications of 3D printing in medicine. *Biofabrication* 9, doi:10.1088/1758-5090/aa7279.
13. Lee, G.; Carrillo, M.; McKittrick, J.; Martin, D.G.; Olevsky, E.A. Fabrication of ceramic bone scaffolds by solvent jetting 3D printing and sintering. *Addit. Manuf.* **2020**, 33, doi:10.1016/j.addma.2020.101107.
14. Shie, M.-Y.; Fang, H.-Y.; Lin, Y.-H.; Lee, A.K.-X.; Yu, J.; Chen, Y.-W. Application of piezoelectric cells printing on three-dimensional porous bioceramic scaffold for bone regeneration. *Int. J. Bioprinting* 5, 22–30, doi:10.18063/ijb.v5i2.210.
15. Lopez, C.D.; Diaz-Siso, J.R.; Witek, L.; Bekisz, J.M.; Cronstein, B.N.; Torroni, A.; Flores, R.L.; Rodriguez, E.D.; Coelho, P.G. Three dimensionally printed bioactive ceramic scaffold osseous conduction across critical-sized mandibular defects. *J. Surg. Res.* **2018**, 223, 115–122, doi:10.1016/j.jss.2017.10.027.
16. Shao, H.; He, J.; Lin, T.; Zhang, Z.; Zhang, Y.; Liu, S. 3D gel-printing of hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. *Ceram. Int.* **2019**, 45, 1163–1170, doi:10.1016/j.ceramint.2018.09.300.
17. Ren, X.; Tuo, Q.; Tian, K.; Huang, G.; Li, J.; Xu, T.; Lv, X.; Wu, J.; Chen, Z.; Weng, J.; et al. Enhancement of osteogenesis using a novel porous hydroxyapatite scaffold in vivo and vitro. *Ceram. Int.* **2018**, 44, 21656–21665, doi:10.1016/j.ceramint.2018.08.249.
18. Meißner, R.; Bertol, L.; Rehman, M.A.U.; dos Santos, L.A.L.; Boccaccini, A.R.

- Bioprinted 3D calcium phosphate scaffolds with gentamicin releasing capability. *Ceram. Int.* **2019**, *45*, 7090–7094, doi:10.1016/j.ceramint.2018.12.212.
19. Araújo, M.; Viveiros, R.; Philippart, A.; Miola, M.; Doumet, S.; Baldi, G.; Perez, J.; Boccaccini, A.R.; Aguiar-Ricardo, A.; Verné, E. Bioactivity, mechanical properties and drug delivery ability of bioactive glass-ceramic scaffolds coated with a natural-derived polymer. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *77*, 342–351, doi:10.1016/j.msec.2017.03.169.
 20. Pei, P.; Tian, Z.; Zhu, Y. 3D printed mesoporous bioactive glass/metal-organic framework scaffolds with antitubercular drug delivery. *Microporous Mesoporous Mater.* **2018**, *272*, 24–30, doi:10.1016/j.micromeso.2018.06.012.
 21. Ozaki, Y.; Garcia-Garcia, H.M.; Shlofmitz, E.; Hideo-Kajita, A.; Waksman, R. Second-Generation Drug-Eluting Resorbable Magnesium Scaffold. *Cardiovasc. Revascularization Med.* **2020**, *21*, 127–136, doi:10.1016/j.carrev.2019.10.012.
 22. Cheng, C.-H.; Chen, Y.-W.; Lee, A.K.-X.; Yao, C.-H.; Shie, M.-Y. Development of mussel-inspired 3D-printed poly (lactic acid) scaffold grafted with bone morphogenetic protein-2 for stimulating osteogenesis. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2019**, *30*, doi:10.1007/s10856-019-6279-x.
 23. Helal, M.H.; Hendawy, H.D.; Gaber, R.A.; Helal, N.R.; Aboushelib, M.N. Osteogenesis ability of CAD-CAM biodegradable polylactic acid scaffolds for reconstruction of jaw defects. *J. Prosthet. Dent.* **2019**, *121*, 118–123, doi:10.1016/j.prosdent.2018.03.033.
 24. Turnbull, G.; Clarke, J.; Picard, F.; Riches, P.; Jia, L.; Han, F.; Li, B.; Shu, W. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioact. Mater.* **2018**, *3*, 278–314, doi:10.1016/j.bioactmat.2017.10.001.
 25. Cojocaru, D.G.; Hondke, S.; Krüger, J.P.; Bosch, C.; Croicu, C.; Florescu, S.; Lazarescu, A.; Patrascu, J.; Patrascu, J.; Dauner, M.; et al. Meniscus-shaped cell-free polyglycolic acid scaffold for meniscal repair in a sheep model. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2018**, *108*, 809–818, doi:10.1002/jbm.b.34435.
 26. Otsuki, S.; Nakagawa, K.; Murakami, T.; Sezaki, S.; Sato, H.; Suzuki, M.; Okuno, N.; Wakama, H.; Kaihatsu, K.; Neo, M. Evaluation of Meniscal Regeneration in a Mini Pig Model Treated With a Novel Polyglycolic Acid Meniscal Scaffold. *Am. J. Sports Med.* **2019**, *47*, 1804–1815, doi:10.1177/0363546519850578.
 27. Bruder, L.; Brakmann, K.; Stegner, V.; Sigler, M.; Berger, F.; Schmitt, B. Retraction. *J. Funct. Biomater.* **2019**, *10*, doi:10.3390/jfb10010008.
 28. Zuidema, J.M.; Dumont, C.M.; Wang, J.; Batchelor, W.M.; Lu, Y.; Kang, J.; Bertucci, A.; Ziebarth, N.M.; Shea, L.D.; Sailor, M.J. Porous Silicon Nanoparticles Embedded in Poly(lactic- co -glycolic acid) Nanofiber Scaffolds Deliver Neurotrophic Payloads to Enhance Neuronal Growth. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, doi:10.1002/adfm.202002560.
 29. Li, L.; Shi, X.; Wang, Z.; Guo, M.; Wang, Y.; Jiao, Z.; Zhang, P. Porous Scaffolds of Poly(lactic- co -glycolic acid) and Mesoporous Hydroxyapatite Surface Modified by Poly(γ -benzyl- l -glutamate) (PBLG) for in Vivo Bone Repair. *5*, 2466–2481, doi:10.1021/acsbiomaterials.8b01614.
 30. Zhang, W.; Ullah, I.; Shi, L.; Zhang, Y.; Ou, H.; Zhou, J.; Ullah, M.W.; Zhang, X.; Li, W. Fabrication and characterization of porous polycaprolactone scaffold via extrusion-based cryogenic 3D printing for tissue engineering. **2019**, *180*, doi:10.1016/j.matdes.2019.107946.
 31. Yu, Y.-H.; Lee, D.; Hsu, Y.-H.; Chou, Y.-C.; Ueng, S.W.N.; Chen, C.-K.; Liu, S.-J. <p>A Three-Dimensional Printed Polycaprolactone Scaffold Combined with Co-Axially Electrospun Vancomycin/Ceftazidime/Bone Morphological Protein-2 Sheath-Core Nanofibers for the Repair of Segmental Bone Defects During the Masquelet

- Procedure. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *15*, 913–925, doi:10.2147/IJN.S238478.
32. Silva, J.C.; Carvalho, M.S.; Udangawa, R.N.; Moura, C.S.; Cabral, J.M.S.; da Silva, C.L.; Ferreira, F.C.; Vashishth, D.; Linhardt, R.J. Extracellular matrix decorated polycaprolactone scaffolds for improved mesenchymal stem/stromal cell osteogenesis towards a patient-tailored bone tissue engineering approach. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2020**, *108*, 2153–2166, doi:10.1002/jbm.b.34554.
 33. Wen, Y.; Yu, S.; Wu, Y.; Ju, R.; Wang, H.; Liu, Y.; Wang, Y.; Xu, Q. Spinal cord injury repair by implantation of structured hyaluronic acid scaffold with PLGA microspheres in the rat. *Cell Tissue Res.* **2016**, *364*, 17–28, doi:10.1007/s00441-015-2298-1.
 34. Sanad, R.A.-B.; Abdel-Bar, H.M. Chitosan–hyaluronic acid composite sponge scaffold enriched with Andrographolide-loaded lipid nanoparticles for enhanced wound healing. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *173*, 441–450, doi:10.1016/j.carbpol.2017.05.098.
 35. Chanda, A.; Adhikari, J.; Ghosh, A.; Chowdhury, S.R.; Thomas, S.; Datta, P.; Saha, P. Electrospun chitosan/polycaprolactone-hyaluronic acid bilayered scaffold for potential wound healing applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *116*, 774–785, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.099.
 36. Wang, J.; Sun, X.; Zhang, Z.; Wang, Y.; Huang, C.; Yang, C.; Liu, L.; Zhang, Q. Silk fibroin/collagen/hyaluronic acid scaffold incorporating pilose antler polypeptides microspheres for cartilage tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *94*, 35–44, doi:10.1016/j.msec.2018.09.017.
 37. Pfeifer, C.; Berner, A.; Koch, M.; Krutsch, W.; Kujat, R.; Angele, P.; Nerlich, M.; Zellner, J. Higher Ratios of Hyaluronic Acid Enhance Chondrogenic Differentiation of Human MSCs in a Hyaluronic Acid–Gelatin Composite Scaffold. *Materials (Basel)*. **2016**, *9*, doi:10.3390/ma9050381.
 38. Chia, H.N.; Wu, B.M. Recent advances in 3D printing of biomaterials. *J. Biol. Eng.* **2015**, *9*, doi:10.1186/s13036-015-0001-4.
 39. An, J.; Teoh, J.E.M.; Suntornnond, R.; Chua, C.K. Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues. *Engineering* **2015**, *1*, 261–268, doi:10.15302/J-ENG-2015061.
 40. Do, A.-V.; Khorsand, B.; Geary, S.M.; Salem, A.K. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4*, 1742–1762, doi:10.1002/adhm.201500168.
 41. Dalton, P.D. Melt electrowriting with additive manufacturing principles. *Curr. Opin. Biomed. Eng.* **2017**, *2*, 49–57, doi:10.1016/j.cobme.2017.05.007.
 42. Brown, T.D.; Dalton, P.D.; Hutmacher, D.W. Melt electrospinning today. *Prog. Polym. Sci.* **2016**, *56*, 116–166, doi:10.1016/j.progpolymsci.2016.01.001.
 43. Ng, W.L.; Lee, J.M.; Yeong, W.Y.; Naing, M.W. Microvalve-based bioprinting – process, bio-inks and applications. *Biomater. Sci.* **2017**, *5*, 632–647, doi:10.1039/C6BM00861E.
 44. Maria, C. De; Vozzi, G.; Moroni, L. Multimaterial, heterogeneous, and multicellular three-dimensional bioprinting. *MRS Bull.* **2017**, *42*, 578–584, doi:10.1557/mrs.2017.165.
 45. Park, J.H.; Jang, J.; Lee, J.-S.; Cho, D.-W. Three-Dimensional Printing of Tissue/Organ Analogues Containing Living Cells. *Ann. Biomed. Eng.* **2017**, *45*, 180–194, doi:10.1007/s10439-016-1611-9.
 46. Cui, H.; Zhu, W.; Nowicki, M.; Zhou, X.; Khademhosseini, A.; Zhang, L.G. Hierarchical Fabrication of Engineered Vascularized Bone Biphasic Constructs via Dual 3D Bioprinting. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5*, 2174–2181, doi:10.1002/adhm.201600505.
 47. Wang, X.; Rijff, B.L.; Khang, G. A building-block approach to 3D printing a

- multichannel, organ-regenerative scaffold. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2017**, *11*, 1403–1411, doi:10.1002/term.2038.
48. Lee, V.; Singh, G.; Trasatti, J.P.; Bjornsson, C.; Xu, X.; Tran, T.N.; Yoo, S.-S.; Dai, G.; Karande, P. Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting. *Tissue Eng. Part C Methods* **2014**, *20*, 473–484, doi:10.1089/ten.tec.2013.0335.
 49. Duan, B.; Hockaday, L.A.; Kang, K.H.; Butcher, J.T. 3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2013**, *101A*, 1255–1264, doi:10.1002/jbm.a.34420.
 50. Markstedt, K.; Mantas, A.; Tournier, I.; Ávila, H.M.; Hägg, D.; Gatenholm, P. 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose–Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules* **16**, 1489–1496, doi:10.1021/acs.biomac.5b00188.
 51. Laronda, M.M.; Rutz, A.L.; Xiao, S.; Whelan, K.A.; Duncan, F.E.; Roth, E.W.; Woodruff, T.K.; Shah, R.N. A bioprosthetic ovary created using 3D printed microporous scaffolds restores ovarian function in sterilized mice. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, doi:10.1038/ncomms15261.
 52. Choi, J.-W.; Kim, H.-C.; Wicker, R. Multi-material stereolithography. *J. Mater. Process. Technol.* **2011**, *211*, 318–328, doi:10.1016/j.jmatprotec.2010.10.003.
 53. Kim, Y.; Castro, K.; Bhattacharjee, N.; Folch, A. Digital Manufacturing of Selective Porous Barriers in Microchannels Using Multi-Material Stereolithography. *Micromachines* **2018**, *9*, doi:10.3390/mi9030125.
 54. Miri, A.K.; Nieto, D.; Iglesias, L.; Hosseinabadi, H.G.; Maharjan, S.; Ruiz-Esparza, G.U.; Khoshakhlagh, P.; Manbachi, A.; Dokmeci, M.R.; Chen, S.; et al. Microfluidics-Enabled Multimaterial Maskless Stereolithographic Bioprinting. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, doi:10.1002/adma.201800242.
 55. Choi, J.-W.; Wicker, R.; Lee, S.-H.; Choi, K.-H.; Ha, C.-S.; Chung, I. Fabrication of 3D biocompatible/biodegradable micro-scaffolds using dynamic mask projection microstereolithography. *J. Mater. Process. Technol.* **2009**, *209*, 5494–5503, doi:10.1016/j.jmatprotec.2009.05.004.
 56. Raman, R.; Bashir, R. Stereolithographic 3D Bioprinting for Biomedical Applications. *Essentials 3D Biofabrication Transl.* **2015**, 89–121, doi:10.1016/B978-0-12-800972-7.00006-2.
 57. Warner, J.; Soman, P.; Zhu, W.; Tom, M.; Chen, S. Design and 3D Printing of Hydrogel Scaffolds with Fractal Geometries. *2*, 1763–1770, doi:10.1021/acsbiomaterials.6b00140.
 58. Bens, A.; Seitz, H.; Bermes, G.; Emons, M.; Pansky, A.; Roitzheim, B.; Tobiasch, E.; Tille, C. Non-toxic flexible photopolymers for medical stereolithography technology. *Rapid Prototyp. J.* **13**, 38–47, doi:10.1108/13552540710719208.
 59. Guéhenec, L. Le; hede, D. Van; Plougonven, E.; Nolens, G.; Verlée, B.; Pauw, M. De; Lambert, F. In vitro and in vivo biocompatibility of calcium-phosphate scaffolds three-dimensional printed by stereolithography for bone regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **108**, 412–425, doi:10.1002/jbm.a.36823.
 60. Schmidleithner, C.; Malferrari, S.; Palgrave, R.; Bomze, D.; Schwentenwein, M.; Kalaskar, D.M. Application of high resolution DLP stereolithography for fabrication of tricalcium phosphate scaffolds for bone regeneration. *Biomed. Mater.* **14**, doi:10.1088/1748-605X/ab279d.
 61. Zhu, W.; Qu, X.; Zhu, J.; Ma, X.; Patel, S.; Liu, J.; Wang, P.; Lai, C.S.E.; Gou, M.; Xu, Y.; et al. Direct 3D bioprinting of prevascularized tissue constructs with complex microarchitecture. *Biomaterials* **2017**, *124*, 106–115,

- doi:10.1016/j.biomaterials.2017.01.042.
62. Lee, S.-J.; Kang, H.-W.; Park, J.K.; Rhie, J.-W.; Hahn, S.K.; Cho, D.-W. Application of microstereolithography in the development of three-dimensional cartilage regeneration scaffolds. *Biomed. Microdevices* **2008**, *10*, 233–241, doi:10.1007/s10544-007-9129-4.
 63. Jia, W.; Li, M.; Kang, L.; Gu, G.; Guo, Z.; Chen, Z. Fabrication and Comprehensive Characterization of Biomimetic Extracellular Matrix Electrospun Scaffold for Vascular Tissue Engineering Applications. *J. Mater. Sci.* **2019**, *54*, 10871–10883, doi:10.1007/s10853-019-03667-6.
 64. Pezeshki-Modaress, M.; Zandi, M.; Rajabi, S. Tailoring the gelatin/chitosan electrospun scaffold for application in skin tissue engineering: an in vitro study. *Prog. Biomater.* **2018**, *7*, 207–218, doi:10.1007/s40204-018-0094-1.
 65. Bazmandeh, A.Z.; Mirzaei, E.; Fadaie, M.; Shirian, S.; Ghasemi, Y. Dual spinneret electrospun nanofibrous/gel structure of chitosan-gelatin/chitosan-hyaluronic acid as a wound dressing: In-vitro and in-vivo studies. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *162*, 359–373, doi:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.181.
 66. Li, X.; Huang, L.; Li, L.; Tang, Y.; Liu, Q.; Xie, H.; Tian, J.; Zhou, S.; Tang, G. Biomimetic dual-oriented/bilayered electrospun scaffold for vascular tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2020**, *31*, 439–455, doi:10.1080/09205063.2019.1697171.
 67. Orash Mahmoud Salehi, A.; Nourbakhsh, M.S.; Rafienia, M.; Baradaran-Rafii, A.; Heidari Keshel, S. Corneal stromal regeneration by hybrid oriented poly (ϵ -caprolactone)/lyophilized silk fibroin electrospun scaffold. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *161*, 377–388, doi:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.045.
 68. Karimi, A.; Karbasi, S.; Razavi, S.; Zargar, E.N. Poly(hydroxybutyrate)/chitosan Aligned Electrospun Scaffold as a Novel Substrate for Nerve Tissue Engineering. *Adv. Biomed. Res.* **2018**, *7*, 44, doi:10.4103/abr.abr_277_16.
 69. Aidun, A.; Safaei Firoozabady, A.; Moharrami, M.; Ahmadi, A.; Haghighipour, N.; Bonakdar, S.; Faghihi, S. Graphene oxide incorporated polycaprolactone/chitosan/collagen electrospun scaffold: Enhanced osteogenic properties for bone tissue engineering. *Artif. Organs* **2019**, *43*, E264–E281, doi:https://doi.org/10.1111/aor.13474.
 70. Pauly, H.; Kelly, D.; Popat, K.; Easley, J.; Palmer, R.; Haut Donahue, T.L. Mechanical properties of a hierarchical electrospun scaffold for ovine anterior cruciate ligament replacement. *J. Orthop. Res.* **2019**, *37*, 421–430, doi:https://doi.org/10.1002/jor.24183.
 71. Saidu, N.T.; Wolf, F.; Bas, O.; Keijndener, H.; Huttmacher, D.W.; Mela, P.; De-Juan-Pardo, E.M. Biologically Inspired Scaffolds for Heart Valve Tissue Engineering via Melt Electrowriting. *Small* *15*, doi:10.1002/sml.201900873.
 72. Paxton, N.C.; Daley, R.; Forrestal, D.P.; Allenby, M.C.; Woodruff, M.A. Auxetic tubular scaffolds via melt electrowriting. **2020**, *193*, doi:10.1016/j.matdes.2020.108787.
 73. Bhullar, S.K.; Ko, J.; Cho, Y.; Jun, M.B.G. Fabrication and Characterization of Nonwoven Auxetic Polymer Stent. *Polym. Plast. Technol. Eng.* *54*, 1553–1559, doi:10.1080/03602559.2014.986812.
 74. Ren, X.; Shen, J.; Ghaedizadeh, A.; Tian, H.; Xie, Y.M. A simple auxetic tubular structure with tuneable mechanical properties. *Smart Mater. Struct.* *25*, doi:10.1088/0964-1726/25/6/065012.
 75. McMaster, R.; Hoefner, C.; Hrynevich, A.; Blum, C.; Wiesner, M.; Wittmann, K.; Dargaville, T.R.; Bauer-Kreisel, P.; Groll, J.; Dalton, P.D.; et al. Tailored Melt Electrowritten Scaffolds for the Generation of Sheet-Like Tissue Constructs from

- Multicellular Spheroids. *Adv. Healthc. Mater.* 8, doi:10.1002/adhm.201801326.
76. Grumezescu, A. *Engineering of Nanobiomaterials*; 2.; William Andrew: Chennai, 2016; ISBN 978-0-323-41532-3.
 77. Li, W.-J.; Laurencin, C.T.; Caterson, E.J.; Tuan, R.S.; Ko, F.K. Electrospun nanofibrous structure. *J. Biomed. Mater. Res.* 60, 613–621, doi:10.1002/jbm.10167.
 78. Hay, E.D. *Cell biology of extracellular matrix*; 2nd ed.; Plenum Press: New York; ISBN 03-064-3951-4.
 79. Chung, S.; King, M.W. Design concepts and strategies for tissue engineering scaffolds. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2011**, 58, 423–438, doi:10.1002/bab.60.
 80. Aszódi, A.; Legate, K.R.; Nakchbandi, I.; Fässler, R. What Mouse Mutants Teach Us About Extracellular Matrix Function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2006**, 22, 591–621, doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104258.
 81. Song, A.; Rane, A.A.; Christman, K.L. Antibacterial and cell-adhesive polypeptide and poly(ethylene glycol) hydrogel as a potential scaffold for wound healing. *Acta Biomater.* **2012**, 8, 41–50, doi:10.1016/j.actbio.2011.10.004.
 82. Navrátil, L.; Rosina, J. *Medicínská biofyzika*; 2.; Grada Publishing: Praha, 2019; ISBN 978-80-271-0209-9.
 83. Hollister, S.J. Scaffold Design and Manufacturing. *Adv. Mater.* 21, 3330–3342, doi:10.1002/adma.200802977.
 84. Ambrosio, L. *Biomedical composites*; 2nd editio.; Scitus Academics: Valley Cottage, NY, 2018; ISBN 978-168-1179-926.
 85. O'Brien, F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today* **2011**, 14, 88–95, doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
 86. Babensee, J.E.; Anderson, J.M.; McIntire, L. V; Mikos, A.G. Host response to tissue engineered devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, 33, 111–139, doi:10.1023/B:JMSM.0000030216.73274.86.
 87. Day, R.M.; Boccaccini, A.R.; Maquet, V.; Shurey, S.; Forbes, A.; Gabe, S.M.; Jérôme, R. In vivo characterisation of a novel bioresorbable poly(lactide-co-glycolide) tubular foam scaffold for tissue engineering applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2004**, 15, 729–734, doi:10.1023/B:JMSM.0000030216.73274.86.
 88. Williams, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **2008**, 29, 2941–2953, doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
 89. Chen, G.; Ushida, T.; Tateishi, T. Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromol. Biosci.* **2002**, 2, 67–77.
 90. Aronin, C.E.P.; Sadik, K.W.; Lay, A.L.; Rion, D.B.; Tholpady, S.S.; Ogle, R.C.; Botchwey, E.A. Comparative effects of scaffold pore size, pore volume, and total void volume on cranial bone healing patterns using microsphere-based scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2009**, 89A, 632–641, doi:10.1002/jbm.a.32015.
 91. O'Brien, F.J.; Harley, B.A.; Yannas, I. V; Gibson, L.J. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* **2005**, 26, 433–441, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.052.
 92. Woodfield, T.B.F.; Malda, J.; de Wijn, J.; Péters, F.; Riesle, J.; van Blitterswijk, C.A. Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique. *Biomaterials* **2004**, 25, 4149–4161, doi:10.1016/j.biomaterials.2003.10.056.
 93. YANNAS, I. V Models of Organ Regeneration Processes Induced by Templates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1997**, 831, 280–293, doi:10.1111/j.1749-6632.1997.tb52203.x.
 94. Yannas, I. V *Tissue and Organ Regeneration in Adults*; 2nd editio.; Springer: New York, 2001; ISBN 978-0-387-95214-7.
 95. Hutmacher, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*

- 2000, 21, 2529–2543, doi:10.1016/S0142-9612(00)00121-6.
96. Wong, K. V; Hernandez, A. A Review of Additive Manufacturing. *ISRN Mech. Eng.* **2012**, 2012, 208760, doi:10.5402/2012/208760.
 97. Peltola, S.M.; Melchels, F.P.W.; Grijpma, D.W.; Kellomäki, M. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Ann. Med.* **40**, 268–280, doi:10.1080/07853890701881788.
 98. Jun, I.; Han, H.-S.; Edwards, J.; Jeon, H. Electrospun Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19, doi:10.3390/ijms19030745.
 99. Lannutti, J.; Reneker, D.; Ma, T.; Tomasko, D.; Farson, D. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, 27, 504–509, doi:10.1016/j.msec.2006.05.019.
 100. Rogina, A. Electrospinning process. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, 296, 221–230, doi:10.1016/j.apsusc.2014.01.098.
 101. Seidlits, S.K.; Lee, J.Y.; Schmidt, C.E. Nanostructured scaffolds for neural applications. *Nanomedicine* **2008**, 3, 183–199, doi:10.2217/17435889.3.2.183.
 102. CHIU-WEBSTER, S.; LISTER, J.R. The fall of a viscous thread onto a moving surface. *J. Fluid Mech.* **569**, doi:10.1017/S0022112006002503.
 103. Park, J.; Lakes, R.S. *Biomaterials*; 3rd ed.; Springer: New York, 2007; ISBN 978-0-387-37879-4.
 104. Vats, A.; Tolley, N.S.; Polak, J.M.; Gough, J.E. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* **2003**, 28, 165–172, doi:10.1046/j.1365-2273.2003.00686.x.
 105. Raghunath, J.; Rollo, J.; Sales, K.M.; Butler, P.E.; Seifalian, A.M. Biomaterials and scaffold design. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2010**, 46, 73–84, doi:10.1042/BA20060134.
 106. Ghassemi, T.; Shahroodi, A.; Ebrahimzadeh, M.H.; Mousavian, A.; Movaffagh, J.; Moradi, A. Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. *Arch. Bone Jt. Surg.* **2018**, 6, 90–99, doi:10.22038/abjs.2018.26340.1713.
 107. McNeeley, K.M.; Lyon, J.G.; Bellamkonda, R. Biomaterial strategies to modulate cancer. *Biomater. Cancer Ther.* **2013**, 417–444, doi:10.1533/9780857096760.4.417.
 108. JANOUSKOVÁ, O. Synthetic Polymer Scaffolds for Soft Tissue Engineering. *Physiol. Res.* **2018**, 335–348, doi:10.33549/physiolres.933983.
 109. Hasirci, V.; Kenar, H. Novel surface patterning approaches for tissue engineering and their effect on cell behavior. *Nanomedicine* **2006**, 1, 73–90, doi:10.2217/17435889.1.1.73.
 110. Boudreau, N.; Bissell, M.J. Extracellular matrix signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, 10, 640–646, doi:10.1016/S0955-0674(98)80040-9.
 111. Andersson, A.-S.; Bäckhed, F.; von Euler, A.; Richter-Dahlfors, A.; Sutherland, D.; Kasemo, B. Nanoscale features influence epithelial cell morphology and cytokine production. *Biomaterials* **2003**, 24, 3427–3436, doi:10.1016/S0142-9612(03)00208-4.
 112. Kasemo, B. Biological surface science. *Surf. Sci.* **2002**, 500, 656–677, doi:10.1016/S0039-6028(01)01809-X.
 113. Parsons, J.T.; Horwitz, A.R.; Schwartz, M.A. Cell adhesion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, 11, 633–643, doi:10.1038/nrm2957.
 114. Kramer, I. *Signal Transduction*; 3rd ed.; Academic Press, 2015; ISBN 9780123948199.
 115. Biggs, M.J.P.; Richards, R.G.; McFarlane, S.; Wilkinson, C.D.W.; Oreffo, R.O.C.; Dalby, M.J. Adhesion formation of primary human osteoblasts and the functional response of mesenchymal stem cells to 330 nm deep microgrooves. *J. R. Soc. Interface* **5**, 1231–1242, doi:10.1098/rsif.2008.0035.
 116. Wilkinson, C.D.W.; Riehle, M.; Wood, M.; Gallagher, J.; Curtis, A.S.G. The use of

- materials patterned on a nano- and micro-metric scale in cellular engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2002**, *19*, 263–269, doi:10.1016/S0928-4931(01)00396-4.
117. Flemming, R.G.; Murphy, C.J.; Abrams, G.A.; Goodman, S.L.; Nealey, P.F. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials* **1999**, *20*, 573–588, doi:10.1016/S0142-9612(98)00209-9.
 118. YIM, E.; REANO, R.; PANG, S.; YEE, A.; CHEN, C.; LEONG, K. Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5405–5413, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.01.058.
 119. Dalby, M.J.; Gadegaard, N.; Tare, R.; Andar, A.; Riehle, M.O.; Herzyk, P.; Wilkinson, C.D.W.; Oreffo, R.O.C. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 997–1003, doi:10.1038/nmat2013.
 120. Yim, E.K.F.; Pang, S.W.; Leong, K.W. Synthetic nanostructures inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into neuronal lineage. *Exp. Cell Res.* **2007**, *313*, 1820–1829, doi:10.1016/j.yexcr.2007.02.031.
 121. Ventre, M.; Natale, C.F.; Rianna, C.; Netti, P.A. Topographic cell instructive patterns to control cell adhesion, polarization and migration. *J. R. Soc. Interface* *11*, doi:10.1098/rsif.2014.0687.
 122. Rockwood, D.N.; Preda, R.C.; Yücel, T.; Wang, X.; Lovett, M.L.; Kaplan, D.L. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 1612–1631, doi:10.1038/nprot.2011.379.
 123. Zhang, X.; Wang, J.; Liu, T. 3D printing of polycaprolactone-based composites with diversely tunable mechanical gradients via multi-material fused deposition modeling. *Compos. Commun.* **2021**, *23*, 100600, doi:https://doi.org/10.1016/j.coco.2020.100600.
 124. Prasad, A.; Kandasubramanian, B. Fused deposition processing polycaprolactone of composites for biomedical applications. *Polym. Technol. Mater.* **2019**, *58*, 1365–1398, doi:10.1080/25740881.2018.1563117.
 125. Khandan, A.; Esmaeili, S. Fabrication of polycaprolactone and polylactic acid shapeless scaffolds via fused deposition modelling technology. *J. Adv. Mater. Process.* **2019**, *7*, 16–29.
 126. Martins, A.; Reis, R.L.; Neves, N.M. Electrospinning: processing technique for tissue engineering scaffolding. *Int. Mater. Rev.* **2008**, *53*, 257–274, doi:10.1179/174328008X353547.
 127. Fang, J.; Niu, H.; Lin, T.; Wang, X. Applications of electrospun nanofibers. *Chinese Sci. Bull.* **2008**, *53*, 2265–2286, doi:10.1007/s11434-008-0319-0.
 128. Kawai, H. The Piezoelectricity of Poly (vinylidene Fluoride). *Jpn. J. Appl. Phys.* **1969**, *8*, 975–976, doi:10.1143/jjap.8.975.
 129. Costa, R.; Ribeiro, C.; Lopes, A.C.; Martins, P.; Sencadas, V.; Soares, R.; Lanceros-Mendez, S. Osteoblast, fibroblast and in vivo biological response to poly(vinylidene fluoride) based composite materials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, *24*, 395–403, doi:10.1007/s10856-012-4808-y.
 130. Martins, P.M.; Ribeiro, S.; Ribeiro, C.; Sencadas, V.; Gomes, A.C.; Gama, F.M.; Lanceros-Méndez, S. Effect of poling state and morphology of piezoelectric poly(vinylidene fluoride) membranes for skeletal muscle tissue engineering. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 17938–17944, doi:10.1039/C3RA43499K.
 131. Fukada, E. New Piezoelectric Polymers. *Jpn. J. Appl. Phys.* *37*, 2775–2780, doi:10.1143/JJAP.37.2775.
 132. Ozaltın, K.; Lehocký, M.; Humpolíček, P.; Pelková, J.; Sába, P. A New Route of Fucoïdan Immobilization on Low Density Polyethylene and Its Blood Compatibility and Anticoagulation Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, doi:10.3390/ijms17060908.

133. Minařík, A.; Smolka, P.; Minařík, M.; Mráček, A.; Rajnohová, E.; Minaříková, M.; Gřundělová, L.; Foglarová, M.; Velebný, V. A special instrument for the defined modification of polymer properties in solutions and polymer layers. *Meas. J. Int. Meas. Confed.* **2017**, *97*, 218–225, doi:10.1016/j.measurement.2016.11.006.
134. Schlichting, H.; Gersten, K. Fundamentals of Boundary–Layer Theory. *Boundary-Layer Theory* **2017**, 29–49, doi:10.1007/978-3-662-52919-5_2.
135. Incropera, F.P. *Fundamentals of Heat and Mass Transfer*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2006; ISBN 0470088400.
136. Denberg, M.; Arvin, E.; Hassager, O. Modelling of the release of organic compounds from polyethylene pipes to water. *J. Water Supply Res. Technol.* **2007**, *56*, 435–443, doi:10.2166/aqua.2007.020.
137. Wang, Q.; Wan, Z.-H.; Yan, R.; Sun, D.-J. Multiple states and heat transfer in two-dimensional tilted convection with large aspect ratios. *Phys. Rev. Fluids* **2018**, *3*, 113503, doi:10.1103/PhysRevFluids.3.113503.
138. Sashina, E.S.; Bochek, A.M.; Novoselov, N.P.; Kirichenko, D.A. Structure and solubility of natural silk fibroin. *Russ. J. Appl. Chem.* **2006**, *79*, 869–876, doi:10.1134/S1070427206060012.
139. Wrzecionko, E.; Minařík, A.; Smolka, P.; Minařík, M.; Humpolíček, P.; Rejmontová, P.; Mráček, A.; Minaříková, M.; Gřundělová, L. Variations of Polymer Porous Surface Structures via the Time-Sequenced Dosing of Mixed Solvents. *Appl. Mater. Interfaces* **2017**, 6472–6481, doi:10.1021/acsami.6b15774.
140. Leal-Egana, A.; Scheibel, T. Interactions of cells with silk surfaces. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 14330–14336, doi:10.1039/C2JM31174G.
141. Lerman, M.; Lembong, J.; Muramoto, S.; Gillen, G.; Fisher, J. The Evolution of Polystyrene as a Cell Culture Material. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2018**, *24*, doi:10.1089/ten.TEB.2018.0056.
142. Tasnim, F.; Singh, N.H.; Tan, E.K.F.; Xing, J.; Li, H.; Hissette, S.; Manesh, S.; Fulwood, J.; Gupta, K.; Ng, C.W.; et al. Tethered primary hepatocyte spheroids on polystyrene multi-well plates for high-throughput drug safety testing. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 4768, doi:10.1038/s41598-020-61699-4.
143. Kadlečková, M.; Skopalová, K.; Ptošková, B.; Wrzecionko, E.; Dařová, E.; Kocourková, K.; Mráček, A.; Musilová, L.; Smolka, P.; Humpolíček, P.; et al. Hierarchically Structured Surfaces Prepared by Phase Separation: Tissue Mimicking Culture Substrate. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23052541.
144. DeRosa, M.E.; Hong, Y.; Faris, R.A.; Rao, H. Microtextured polystyrene surfaces for three-dimensional cell culture made by a simple solvent treatment method. *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *131*, doi:https://doi.org/10.1002/app.40181.
145. Kimmerle, K.; Strathmann, H. Analysis of the structure-determining process of phase inversion membranes. *Desalination* **1990**, *79*, 283–302, doi:https://doi.org/10.1016/0011-9164(90)85012-Y.
146. Nashchekina, Y.; Samusenko, I.; Zorin, I.; Kukhareva, L.; Bilibin, A.; Blinova, M. Poly(D,L-lactide)/{PEG} blend films for keratinocyte cultivation and skin reconstruction. *Biomed. Mater.* **2019**, *14*, 65005, doi:10.1088/1748-605x/ab3aa2.
147. Jhala, D.; Vasita, R. A Review on Extracellular Matrix Mimicking Strategies for an Artificial Stem Cell Niche. *Polym. Rev.* **2015**, *55*, 561–595, doi:10.1080/15583724.2015.1040552.
148. Luo, W.; Jones, S.R.; Yousaf, M.N. Geometric control of stem cell differentiation rate on surfaces. *Langmuir* **2008**, *24*, 12129–12133, doi:10.1021/la802836g.
149. Watt, F.M.; Jordan, P.W.; O’Neill, C.H. Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 5576–5580,

- doi:10.1073/pnas.85.15.5576.
150. Stadtfeld, M.; Brennand, K.; Hochedlinger, K. Reprogramming of Pancreatic β Cells into Induced Pluripotent Stem Cells. *Curr. Biol.* **2008**, *18*, 890–894, doi:https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.05.010.
 151. Skopalová, K.; Radaszkiwicz, K.A.; Kadlečková, M.; Pacherník, J.; Minařík, A.; Capáková, Z.; Kašpárková, V.; Mráček, A.; Daďová, E.; Humpolíček, P. Hierarchically Structured Polystyrene-Based Surfaces Amplifying Fluorescence Signals: Cytocompatibility with Human Induced Pluripotent Stem Cell. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms222111943.
 152. Carson, D.; Hnilova, M.; Yang, X.; Nemeth, C.L.; Tsui, J.H.; Smith, A.S.T.; Jiao, A.; Regnier, M.; Murry, C.E.; Tamerler, C.; et al. Nanotopography-Induced Structural Anisotropy and Sarcomere Development in Human Cardiomyocytes Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 21923–21932, doi:10.1021/acsami.5b11671.
 153. Xu, C.; Wang, L.; Yu, Y.; Yin, F.; Zhang, X.; Jiang, L.; Qin, J. Bioinspired onion epithelium-like structure promotes the maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Biomater. Sci.* **2017**, *5*, 1810–1819, doi:10.1039/c7bm00132k.
 154. Yoon, B.-H.; Choi, W.-Y.; Kim, H.-E.; Kim, J.-H.; Koh, Y.-H. Aligned porous alumina ceramics with high compressive strengths for bone tissue engineering. *Scr. Mater.* **2008**, *58*, 537–540, doi:https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2007.11.006.
 155. Davoodi, E.; Zhianmanesh, M.; Montazerian, H.; Milani, A.S.; Hoorfar, M. Nanoporous anodic alumina: fundamentals and applications in tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2020**, *31*, 60, doi:10.1007/s10856-020-06398-2.
 156. Brock, L.; Sheng, J. Robust Fabrication of Polymeric Nanowire with Anodic Aluminum Oxide Templates. *Micromachines* **2020**, *11*, doi:10.3390/mi11010046.
 157. Yen, M.-L.; Hsiao, H.-M.; Huang, C.-F.; Lin, Y.; Shen, Y.-K.; Tsai, Y.-L.; Chang, C.-W.; Yen, H.-J.; Lu, Y.-J.; Kuo, Y.-W. Aluminum Templates of Different Sizes with Micro-, Nano- and Micro/Nano-Structures for Cell Culture. *Coatings* **2017**, *7*, 179, doi:10.3390/coatings7110179.
 158. Kadlečková, M.; Minařík, A.; Smolka, P.; Mráček, A.; Wrzecionko, E.; Novák, L.; Musilová, L.; Gajdošík, R. Preparation of Textured Surfaces on Aluminum-Alloy Substrates. *Materials (Basel)*. **2019**, *12*, doi:10.3390/ma12010109.
 159. Feng, L.; Zhang, H.; Mao, P.; Wang, Y.; Ge, Y. Superhydrophobic alumina surface based on stearic acid modification. *Appl. Surf. Sci. - APPL SURF SCI* **2011**, *257*, 3959–3963, doi:10.1016/j.apsusc.2010.11.143.
 160. Richard, E.; Aruna, S.T.; Basu, B.J. Superhydrophobic surfaces fabricated by surface modification of alumina particles. *Appl. Surf. Sci.* **2012**, *258*, 10199–10204, doi:https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.07.009.
 161. Wang, Q.; Zhang, B.; Qu, M.; Zhang, J. Fabrication of superhydrophobic surfaces on engineering material surfaces with stearic acid. *Appl. Surf. Sci.* **2008**, *254*, 2009–2012, doi:10.1016/j.apsusc.2007.08.039.
 162. Borsellino, C.; Di Bella, G.; Ruisi, V.F. Adhesive joining of aluminium AA6082: The effects of resin and surface treatment. *Int. J. Adhes. Adhes.* **2009**, *29*, 36–44, doi:https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2008.01.002.
 163. Boutar, Y.; Naimi, S.; Mezlini, S.; Ali, M. Effect of surface treatment on the shear strength of aluminum adhesive single-lap joints for automotive applications. *Int. J. Adhes. Adhes.* **2015**, *67*, doi:10.1016/j.ijadhadh.2015.12.023.
 164. Soboyejo, W.O.; Nemetski, B.; Allameh, S.; Marcantonio, N.; Mercer, C.; Ricci, J. Interactions between MC3T3-E1 cells and textured Ti6Al4V surfaces. *J. Biomed.*

Mater. Res. **2002**, 62, 56–72, doi:<https://doi.org/10.1002/jbm.10221>.

165. Mwenifumbo, S.; Li, M.; Chen, J.; Beye, A.; Soboyejo, W. Cell/surface interactions on laser micro-textured titanium-coated silicon surfaces. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, 18, 9–23, doi:[10.1007/s10856-006-0658-9](https://doi.org/10.1007/s10856-006-0658-9).

Seznam obrázků

<i>Obr. 1 – porovnání návrhu modelu získaného ze softwaru AutoCAD Inventor a reálných výtisků připravených pomocí metod 3D tisku A) FDM, B) SLA, C) DLP. Obrázky A), B) a C) ze SEM.</i>	15
<i>Obr. 2 – SEM snímky povrchů výtisků (horní řada) získaných pomocí metody SLA 3D tisku a ukázka jejich orientace v programu PreForm (spodní řada). A) horizontální tisk, B) svislý tisk, C) tisk pod úhlem.</i>	16
<i>Obr. 3 – rekonstrukce vytištěného scaffoldu pomocí SLA tiskárny Form2 (vlevo). Řez středem vytištěné prostorové mřížky (vpravo). Data z rentgenové tomografie.</i>	17
<i>Obr. 4 – snímky reálných 3D tištěných PCL vlákněných scaffoldů pořízené pomocí digitálního mikroskopu.</i>	18
<i>Obr. 5 – detailní pohled na povrch vlákněných PCL scaffoldů uvedených na Obr. 4. Povrchy zobrazeny pomocí SEM.</i>	18
<i>Obr. 6 - hierarchicky strukturovaná mikrovlákna připravená pomocí electrospinningu ze směsi obsahujících PCL s CF/toluenem a DMSO. Obrázky ze SEM.</i>	19
<i>Obr. 7 – snímek reálně vytištěného scaffoldu ze směsi PiezoRT:DMSO (1:1). Vlevo mřížka snímaná pod úhlem, vpravo mřížka z vrchu. Obrázky z optického mikroskopu.</i>	20
<i>Obr. 8 - vliv hmotnostního podílu polymeru PiezoRT v DMSO na změnu povrchového zvrásnění tištěných vláken. Nahoře snímky ze SEM, dole z AFM.</i>	21
<i>Obr. 9 - vliv koncentrace polymeru v rozpouštědle na vlákna vytvářená pomocí electrospinningu. Materiálem pro electrospinning byl roztok polymeru PiezoRT v DMSO. Obrázky ze SEM.</i>	21
<i>Obr. 10 – snímky mřížek tištěných pomocí EPA 3D tisku.</i>	22
<i>Obr. 11 – charakteristika PiezoRT pomocí piezoresponsivní silové mikroskopie.</i>	23
<i>Obr. 12 – model složeného bioreaktoru první generace vytvořený v softwaru Autodesk Inventor A) pohled na celou komoru, B) řez středem bioreaktoru, C) sestavený reaktor vyrobený pomocí 3D tisku.</i>	24
<i>Obr. 13 – A) 3D model bioreaktoru druhé generace, B) pohled shora a z boku, C) vytištěný a sestavený reaktor.</i>	25
<i>Obr. 14 – vlevo – schématické znázornění experimentů: A) míchání LDPE kousků ve vodě v Petriho misce; B) míchání vody v LDPE nádobě; C) voda v LDPE nádobě bez míchání; D) voda v LDPE nádobě s teplotním spádem. T_H – teplota topné plochy; T_C – teplota chladičí plochy; T_W – střední teplota vody. Žluté částice představují povrchově aktivní nečistoty v polymerních nádobách ve formě aditiv nebo kontaminantů. Vpravo – povrchové napětí vodních extraktů. Označení A-D odpovídá schématům experimentálních postupů vlevo. Označení 1 odpovídá extraktům získaným z LDPE fólie s farmaceutickým certifikátem. Označení 2 odpovídá extraktům získaným z fólie z recyklovaného LDPE.</i>	26

<i>Obr. 15 - schématické znázornění a srovnání laminárního a turbulentního proudění (vlevo) vs. konvektivního proudění (vpravo). Graf nahoře zobrazuje lokální součinitel prostupu tepla ($h(x)$) pro proudění přes plochou desku. Písmena A,B,C a D odpovídají jednotlivým experimentálním postupům z Obr. 14.</i>	<i>28</i>
<i>Obr. 16 – schéma procesu fázové separace směsi dobrého a špatného rozpouštědla za rotace.</i>	<i>30</i>
<i>Obr. 17 – příprava fibroinových filmů s různou povrchovou texturou. A) příprava a výsledný povrch fibroinového filmu ve stavu SILK I bez modifikace, B) příprava hierarchicky texturovaného povrchu pomocí fázové separace na filmu ve stavu SILK I+ SILK II, C) příprava makro porézního povrchu s hladkým rozhraním vytvořený fázovou separací na filmu ve stavu SILK II. Obrázky z AMF a optického profilometru.</i>	<i>31</i>
<i>Obr. 18 – porovnání proliferace osteoblastů (MC3T3-E1) na A) mikro a B) makro strukturovaném fibroinovém povrchu. Nahoře obrázky z optického profilometru. Dole obrázky z optické mikroskopie. Testy buněčné kompatibility byly provedeny na Univerzitě v Bayreuthu v rámci zahraniční stáže.</i>	<i>32</i>
<i>Obr. 19 – strukturované PS povrchy připravené fázovou separací/inverzí.</i>	<i>32</i>
<i>Obr. 20 – schéma přípravy hierarchicky strukturovaných polystyrenových povrchů pomocí jedno či dvou krokové fázové separace.</i>	<i>33</i>
<i>Obr. 21 - porézní PS vrstva připravená pomocí více krokové fázové separace (inverze) ze směsi polystyrenu, dobrého a špatného rozpouštědla.</i>	<i>34</i>
<i>Obr. 22 – snímky různých buněčných linií pořízených konfokálním mikroskopem. Sloupec I – myši fibroblasty (NIH/3T3), sloupec II – adenokarcinomické epiteliální buňky (A549), sloupec III – keratinocyty (HEK). Modře značená jádra buněk, červeně buněčný cytoskelet.</i>	<i>35</i>
<i>Obr. 23 – snímky embryonálních kmenových buněk (ESC) na PS povrchích pořízené konfokálním mikroskopem. Vpravo – profilové řezy PS povrchů.</i>	<i>36</i>
<i>Obr. 24 - hiPSC kultivované na hladkém, „Mezo/Mikro“ a „Makro/Mikro“ substrátech po čtyřech dnech proliferace kontrastně obarvené pomocí Phalloidin-FITC. Graf zobrazuje relativní viabilitu pro všechny povrchy. Indexy * vyjadřují významné odchylky ($p \leq 0,05$). Testy provedeny na přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně.</i>	<i>37</i>
<i>Obr. 25 - záznamy intracelulárních vln iontů Ca^{2+} v tepu kardiomyocytů stanovené sondou Fura4. Záznam růstu hiPSC-CM na A) hladkém a B) Makro/Mikro PS substrátu. Testy provedeny na přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně.</i>	<i>38</i>
<i>Obr. 26 – snímky povrchu hliníku v různých stupních úpravy chemickým leptáním.</i>	<i>39</i>
<i>Obr. 27 – schéma přípravy superhydrofobního Al povrchu pomocí leptání a deponování kyseliny stearové.</i>	<i>40</i>
<i>Obr. 28 – vliv povrchové struktury hliníku na pevnost lepeného spoje (vlevo) a schéma testovaného systému (vpravo).</i>	<i>41</i>

Seznam symbolů a zkratk

- TE – tkáňové inženýrství
 ECM – extracelulární matrice
 RP – rapid prototyping

MEW – melt electrowritingu
EPA – elektrickým polem asistovaný
SLA – stereolitografie
PCL – polykaprolakton
PLA – kyselina polyléčná
FDM – fused deposition modelling
CAD – computer-aided design
DLP – digital light processing
DMSO – dimethylsulfoxid
PS – polystyren
SEM – skenovací elektronová mikroskopie
 τ_s – smykové napětí
HFIP – hexafluoroisopropanol
RH – relativní vlhkost
mOH – methanol
THF – tetrahydrofuran
ETH – ethoxyethanol
NIH/3T3 – myší embryonální fibroblasty
A549 – buňky lidského plicního karcinomu
HEK – keratinocyty
ESC – lidské embryonální kmenové buňky
hiPSC – lidské indukované pluripotentní kmenové buňky
iPSC-CM – diferencovaná podoba hiPSC do podoby kardiomyocytů
LDPE – nízkohustotní polyethylen
Al – hliník
H₃PO₄ – kyselina fosforečná
HNO₃ – kyselina dusičná
HCl – kyselina chlorovodíková
H₂SO₄ – kyselina sírová
H₂O – voda
NaNO₃ – dusičnan sodný
DiOx – dioxan
CF – chloroform
MC3T3-E1 – osteoblasty
PVDF-TrFE-CTFE – poly(vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen)

Publikační aktivity autora

Články publikované v impaktovaných časopisech:

1. **KADLEČKOVÁ, Markéta**, Kateřina SKOPALOVÁ, Barbora PTOŠKOVÁ, Erik WRZECIONKO, Eliška DAĐOVÁ, Karolína KOCOURKOVÁ, Aleš MRÁČEK, Lenka MUSILOVÁ, Petr SMOLKA, Petr HUMPOLÍČEK a Antonín MINAŘÍK. Hierarchically Structured Surfaces Prepared by Phase Separation: Tissue Mimicking Culture Substrate. *International Journal of Molecular Sciences*. **2022**, 23(5). ISSN 1422-0067. DOI:10.3390/ijms23052541.
2. SKOPALOVÁ, Kateřina, Katarzyna Anna RADASZKIEWICZ, **Markéta KADLEČKOVÁ**, Jiří PACHERNÍK, Antonín MINAŘÍK, Zdenka CAPÁKOVÁ, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Aleš MRÁČEK, Eliška DAĐOVÁ a Petr HUMPOLÍČEK. Hierarchically Structured Polystyrene-Based Surfaces Amplifying Fluorescence Signals: Cytocompatibility with Human Induced Pluripotent Stem Cell. *International Journal of Molecular Sciences*. **2021**, 22(21). ISSN 1422-0067. DOI:10.3390/ijms222111943.
3. **KADLEČKOVÁ, Markéta**, Antonín MINAŘÍK, Petr SMOLKA, Aleš MRÁČEK, Erik WRZECIONKO, Libor NOVÁK, Lenka MUSILOVÁ a Radek GAJDOŠÍK. Preparation of Textured Surfaces on Aluminum-Alloy Substrates. *Materials*. **2019**, 12(1). ISSN 1996-1944. DOI: 10.3390/ma12010109.
4. NOVÁK, Libor, Ladislav FOJTL, **Markéta KADLEČKOVÁ**, Lukáš MAŇAS, Ilona SMOLKOVÁ, Lenka MUSILOVÁ, Antonín MINAŘÍK, Aleš MRÁČEK, Tomáš SEDLÁČEK a Petr SMOLKA. Surface Modification of Metallic Inserts for Enhancing Adhesion at the Metal–Polymer Interface. *Polymers*. **2021**, 13(22). ISSN 2073-4360. DOI: 10.3390/polym13224015.
5. MATTA, Ashish, Tomáš SEDLÁČEK, **Markéta KADLEČKOVÁ** a Anežka LENGÁLOVÁ. The effect of surface substrate treatments on the bonding strength of aluminium inserts with glass-reinforced poly phenylene sulphide. *Materials* **2022**, **15(5)**. ISSN 1996-1944. DOI:10.3390/ma15051929.
6. ŠERÁ, Jana, **Markéta KADLEČKOVÁ**, Ahmad FAYYAZBAKSH, Veronika KUČABOVÁ a Marek KOUTNÝ. Occurrence and Analysis of Thermophilic Poly(butylene adipate-co-terephthalate)-Degrading Microorganisms in Temperate Zone Soils. *International Journal of Molecular Sciences*. **2020**, 21(21). ISSN 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms21217857.
7. PLACHÝ, Tomáš, Jan ŽITKA, Miroslav MRLÍK, Pavel BAŽANT, **Markéta KADLEČKOVÁ**, Miroslava TRCHOVÁ a Jaroslav STEJSKAL. Electrorheology of polyindole. *Polymer*. **2021**, 217, 123448. ISSN 00323861. DOI: 10.1016/j.polymer.2021.123448.
8. VINTER, Štěpán., Vratislav BEDNAŘÍK, María Teresa MONTAÑÉS, Alena ČERNOTOVÁ a **Markéta KADLEČKOVÁ**. Microencapsulation of zinc plating waste using silicone polymers. *Journal of Hazardous Materials*. **2021**, 412, 125225. ISSN 03043894. DOI:10.1016/j.jhazmat.2021.125225.

Články připravované k recenznímu řízení:

9. **KADLEČKOVÁ, Markéta**, Antonín MINAŘÍK, Karolína KOCOURKOVÁ, Aleš MRÁČEK, Petr SMOLKA, Tomáš SEDLÁČEK, Lenka MUSILOVÁ a Petr FILIP. Organized fluid flow caused by temperature gradient – a phenomenon threatening water quality.
10. MINAŘÍK, Antonín, **Markéta KADLEČKOVÁ**, Juliane KADE, Miroslav MRLÍK, Petr SMOLKA a Paul DALTON. Fibers Systems based on P(VDF-TrFE-CTFE) Terpolymer Prepared from DMSO solutions.
11. KOCOURKOVÁ, Karolína, **Markéta KADLEČKOVÁ**, Martina KAŠPAROVÁ, Petr HUMPOLÍČEK, Aleš MRÁČEK, Thomas SCHEIBEL, Martin HUMENÍK a Antonín MINAŘÍK. Textured silk surfaces prepared by phase separation approach.

Odborný životopis autora

Jméno: **Ing. Markéta Kadlečková, Ph.D.**
Datum narození: 13.8.1993
Místo narození: Znojmo
Adresa: Ublo 99, Vizovice 763 12
Email: m1_kadleckova@utb.cz
Telefon: +420 775 898 816

Vzdělání

2017 – dosud Doktorské studium – Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, FT, UFMI; doktorský studijní program: Technologie makromolekulárních látek. Téma disertační práce: Příprava polymerních materiálových soustav pro 3D tisk v biologických aplikacích
2015 – 2017 Magisterské studium – Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, FT, UFMI; magisterský studijní program: Chemie a technologie materiálů – Materiálové inženýrství. Závěrečná práce: Příprava texturovaných povrchů na bázi hliníku
2012 - 2015 Bakalářské studium – Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, FT, UIP; bakalářský studijní program: Chemie a technologie materiálů – Polymerní materiály a technologie. Závěrečná práce: Testování stability polymerních folií vystavených účinkům teplotních gradientů
2008 – 2012 Gymnázium a Jazyková škola s právem státní jazykové zkoušky Zlín

Zaměstnání

2018 – dosud Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, třída Tomáše Bati 5678, 760 01 Zlín; Výzkumný projektový pracovník

Zahraniční stáž

2018 (červenec) 1 měsíc na Univerzitě Bayreuth, Německo
2018 (listopad) 1 měsíc na Univerzitě Bayreuth, Německo

Projekty

2022 GAČR 22-33307S (člen řešitelského týmu), Vývoj nových 3D hierarchicky strukturovaných polysacharidových a proteinových porézních systémů
2020 GAČR 19-16861S (člen řešitelského týmu), Interakce biomateriálů s kmenovými buňkami v simulovaných in vivo podmínkách
2020 IGA/FT/2020/005 (hlavní řešitel), Příprava strukturovaných materiálů na bázi biopolymerů
2019 IGA/FT/2019/012 (člen řešitelského týmu), Příprava strukturovaných biomateriálů
2018-2019 TE1020216 (člen řešitelského týmu), Centrum pokročilých polymerních a kompozitních materiálů
2018 IGA/FT/2018/011 (člen řešitelského týmu), Příprava mikroporézních biopolymerních povrchů metodami fázové separace

Odvedené práce

2021 Bakalářská práce na téma – Příprava a charakterizace 3D tištěných struktur na bázi syntetických polymerů, student: Adam Pančocha

Ing. Markéta Kadlečková, Ph.D.

**Příprava polymerních materiálových soustav
pro 3D tisk v biologických aplikacích**

Preparation of polymer material systems for 3D printing
in biological applications

Teze disertační práce

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

Náklad: vyšlo elektronicky

Sazba: Ing. Markéta Kadlečková, Ph.D.

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2022

Pořadí vydání: první

ISBN 978-80-7678-079-8

