

Charakterizace porézních systémů na bázi biopolymerů pomocí rentgenové tomografie

Bc. Filip Mikulka

Diplomová práce
2021

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Akademický rok: 2020/2021

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

Jméno a příjmení: **Bc. Filip Mikulka**
Osobní číslo: **T19522**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Materiálové inženýrství**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Charakterizace porézních systémů na bázi biopolymerů pomocí rentgenové tomografie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na dané téma.
2. Pomocí 3D tisku připravte porézní systémy na bázi hydrogelů. Prozkoumejte vliv procesních parametrů tisku na tvarovou přesnost vytvářených struktur.
3. Připravené struktury charakterizujte pomocí rentgenové tomografie.
4. Získané výsledky přehledně diskutujte a uveďte hlavní závěry práce.

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

Seznam doporučené literatury:

1. Murphy, S.V., Atala, A., 3D Bioprinting of Tissues and Organs, *Nature Biotechnology*, 2014, 32, 8, 773-785.
2. Stock, S.R., *MicroComputed Tomography: Methodology and Applications*, CRC Press, 2009. ISBN 13:978-1-4200-5876-5.
3. Ligon, S.C., et.al, Polymers for 3D printing and Customized Additive Manufacturing, *Chemical Reviews*, 2017, 117, 15, 10212-10290.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Lenka Musilová, Ph.D.**
Ústav fyziky a mater. inženýrství

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

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Ve Zlíně dne 19. února 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá 3D tiskem biomateriálů na bázi želatiny, síťované pomocí Schiffových bází. Připravené materiálové sady se liší typem želatiny (hovězí a králičí), poměrem želatiny a oxidovaného dextransu (1 ku 1, 2 ku 1, 3 ku 1), počtem natisknutých vrstev (1, 3, 5) a typem aktivačního činidla (NH₃, TEA). Cílem této práce bylo posouzení vlivu přípravy materiálu a tiskových podmínek na výslednou porozitu vzorků (počet, velikost, objem pórů) pomocí metody SEM a CT. Tiskový materiál na bázi želatiny představuje slibný materiál pro přípravu matrice pro implementaci kmenových buněk *in vivo*. Její velkou nevýhodou je rozpustnost ve vodě a slabá mechanická stabilita, znemožňující její použití v 3D tisku, jehož řešení spočívá v dodatečné síťování. Proces síťování však v mnoha případech může vést k nárůstu cytotoxicity. Tento problém lze vyřešit síťováním pomocí Schiffových bází. Výsledky této diplomové práce potvrdily, že celková porozita materiálů na bázi želatiny, se liší v závislosti na původu želatiny, počtu tiskových vrstev, použitém poměru želatiny k oxidovanému dextransu a typu aktivačního činidla. Připravený materiál, tak představuje velký potenciál v přípravě bioinku, především díky jeho biokompatibilitě, nízké toxicitě, i možnosti jeho použití při 3D tisku různých struktur.

Klíčová slova: Porozita, 3D tisk, Biomateriály, Želatina, Síťování

ABSTRACT

This diploma thesis deals with 3D printing of biomaterials based on gelatin, crosslinked using Schiff bases. The prepared material differs in type of gelatin (bovine and rabbit), ratio between gelatin and oxidized dextran (1 to 1, 2 to 1, 3 to 1), number of printed layers (1, 3, 5) and type of activating agent (NH₃, TEA). The aim of this work was to assess the influence of material preparation and printing conditions on the resulting porosity of samples (number, size, total volume of pores) using SEM (scanning electron microscopy) and CT (computed tomography). The gelatin-based printing material is a promising material matrix for implementation of stem cells *in vivo*. A great disadvantage is its solubility in water and poor mechanical stability, which makes it impossible to be used in 3D printing. The solution to this problem lies in additional cross-linking. However, the cross-linking process can in many cases lead to an increase of cytotoxicity. This situation can be solved by cross-linking using

Schiff bases. The results of this thesis confirmed, that the overall porosity of gelatin-based materials depends on the source of gelatin, the number of printing layers, the ratio of gelatin and oxidized dextran and the type of activating agent. Prepared material shows a great potential in preparation of bioink, mainly due to its biocompatibility, low toxicity, and the possibility to use it in 3D printing of various structures.

Keywords: Porosity, 3D print, Biomaterials, Gelatin, Crosslinking

Chtěl bych tímto poděkovat vedoucí diplomové práce paní Ing. Lence Musilové, PhD za příkladné vedení, obrovskou trpělivost, množství věnovaného času, nedocenitelné rady, názory a podporu při práci. Dále bych chtěl obrovsky poděkovat své rodině za velmi ceněnou podporu a trpělivost nejen při studiích, ale i v životě, neboť bez jejich podpory by uskutečnění této práce nebylo možné. Na závěr bych chtěl poděkovat svému kolegovi a kamarádovi Bc. Tomáši Teichmannovi za podporu a pochopení při psaní této diplomové práce, i za pomoc při studiu během uplynulých let.

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

OBSAH

ÚVOD	10
SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	12
I TEORETICKÁ ČÁST	14
1 PORÉZNÍ SYSTÉMY	15
1.1 ROZDĚLENÍ PÓRŮ	15
1.1.1 Distribuce pórů v matrici	15
1.1.2 Přístupnost pórů	16
1.1.3 Tvar pórů	16
1.1.4 Příprava porézních systémů	17
2 3D TISK	18
2.1 ROZDĚLENÍ METODY ADITIVNÍ VÝROBY PODLE MATERIÁLŮ A SPECIFIKACÍ.....	18
2.1.1 Materiály na bázi pryskyřic pro stereolitografii (SLA).....	18
2.1.2 Pevné materiály a materiály vhodné pro extruzi (FDM).....	20
2.1.3 Materiály na bázi velmi jemných prášků (SLS, SLM)	22
2.1.4 3D tiskové materiály na bázi přírodních polymerů.....	23
3 3D BIOTISK	24
3.1 ZÁKLADNÍ ROZDĚLENÍ 3D BIOTISKU	25
3.1.1 Laserem asistovaný biotisk (Laser assisted bioprinting)	25
3.1.2 Inkoustový tisk (Inkjet printing)	26
3.1.3 Extruzní tisk (Extrusion-Based Deposition)	27
4 BIOPOLYMERY	28
4.1 PROTEINY	29
4.1.1 Globulární proteiny (sféroproteiny)	30
4.1.2 Fibrilární proteiny (skleroproteiny).....	31
4.1.3 Membránové proteiny	32
4.1.2 Želatina.....	35
4.2 POLYSACHARIDY	38
4.2.1 Zásobní polysacharidy	39
4.2.2 Strukturální polysacharidy	39
5 METODY ANALÝZY VZORKŮ	43
5.1 RENTGENOVÁ TOMOGRAFIE	43
5.1.1 Rentgenové záření	43
5.1.2 Počítačová tomografie (CT).....	44
5.2 SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE (SEM).....	44
II PRAKTICKÁ ČÁST	46
6 POPIS EXPERIMENTU	47
6.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A JEJICH PŘÍPRAVA.....	47

6.2	NÁVRHY MODELŮ PRO 3D TISK.....	50
6.3	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	51
6.3.1	3D tisk vzorků.....	51
6.3.2	Lyofilizace vzorků	52
6.3.3	Charakterizace připravených vzorků.....	52
7	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	55
7.1	MATERIÁLY PŘIPRAVENÉ POMOCÍ NH ₃	55
7.1.1	Poměr želatiny k DEX-OX 1 ku 1	55
7.1.2	Poměr želatiny k DEX-OX 2 ku 1	61
7.1.3	Poměr želatiny k DEX-OX 3 ku 1	67
7.2	MATERIÁLY PŘIPRAVENÉ POMOCÍ TEA	72
7.2.1	Poměr želatiny k DEX-OX 1 ku 1	73
7.2.2	Poměr želatiny k DEX-OX 2 ku 1	78
7.2.3	Poměr želatiny k DEX-OX 3 ku 1	83
7.2.4	Vzorky připravené z králičí želatiny s označením 3-R-T	86
7.3	ZPĚTNĚ HYDRATOVANÉ VZORKY.....	89
7.4	DISKUZE A POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ VŠECH ANALYZOVANÝCH VZORKŮ.....	91
7.4.1	Porovnání celkového počtu pórů všech lyofilizovaných vzorků v závislosti na poměru želatiny a dex-ox	91
7.4.2	Porovnání celkového objemu pórů všech lyofilizovaných vzorků v závislosti na poměru želatiny a dex-ox	94
7.4.3	Porovnání lyofilizovaných a hydratovaných vzorků želatiny (poměru 2ku1, 3 vrstvy)	96
	ZÁVĚR	98
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	101
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	109
	SEZNAM OBRÁZKŮ	110
	SEZNAM TABULEK.....	113
	SEZNAM GRAFŮ	114

ÚVOD

Porozitu lze definovat jako fyzikální veličinu, pomocí níž můžeme popisovat vnitřní strukturu materiálu. Často bývá popisována jako podíl objemu pórů vůči celkovému objemu samotného materiálu. Póry jsou místa, ve kterých není obsažen primární materiál a místo něj je zde „jakási“ výduť (kavita), která nemusí být vždy žádoucí. Porézní přírodní materiály (například pískovce, vápence, křemičitany atd.) se vyskytují hojně po celé planetě, ať už tvoří skalní útvary či korálové útesy. Právě porozita u těchto materiálů poskytuje výborné prostředí pro existenci organismů. Této vlastnosti využívají i živočišné organismy. Příkladem takové porézní struktury u živočichů jsou například kosterní osteoblasty, které strukturou v řezu připomínají houbovitou strukturu. Ze znalosti moderní biologie víme, že růst buněk je podmíněn hned několika podmínkami, mezi které řadíme i prostor, který buňku obklopuje a dovoluje jí růst. V tomto případě je výzkum porézních struktur pro růst buněk na cestě k popsání chování materiálů a nalezení těch nejvhodnějších, které budou moci být v budoucnu aplikovány například v medicíně ve tkáňovém inženýrství. [1]

Proto, aby v porézním systému mohl dobře vegetovat buněčný systém, musí být vnitřní struktura porézní, a póry musí být dostatečně otevřené, aby docházelo k distribuci živin pro výživu těchto buněk. Tento růst buněk se v odborné literatuře označuje jako proliferace. K zajištění a podpoře buněčné proliferace v porézních materiálech je zapotřebí ještě splnit hned několik dalších klíčových parametrů, mezi které patří například teplota, vlhkost, pH prostředí aj. Moderní medicínské aplikace se čím dál více posouvají dopředu ve vývoji a kultivaci buněčných tkání v laboratorních podmínkách, kde lze pomocí různých metod připravit buněčné nosiče, do kterých jsou následně implantovány živé buňky, které pak mohou dále proliferovat. Návrhy a konstrukce takových struktur však nejsou zcela jednoduché. [2]

Světovým fenoménem je dnes 3D tisk, díky němuž dokážeme rychle vyrábět prototypy různých struktur podle 3D modelů, u kterých je možno vytvářet rozmanitou strukturu a vzhled (například velikost, tvar a vnitřní porozita). Právě možnost vytvářet definovanou strukturu je klíčovým faktorem při tkáňovém inženýrství, nebo při vytváření specifických náhrad v medicíně (zuby, kosti, kůže atd.). Při tomto procesu můžeme použít místo názvu 3D tisk více popisující název 3D biotisk, neboť pracujeme s materiály ať už obsahující živé buňky, nebo poslouží jako nosiče těchto živých buněk. [3]

3D biotisk patří v současné době mezi nejpoužívanější metodu vývoje živé tkáně v laboratorních podmínkách. Na rozdíl od klasického 3D tisku, který pracuje s materiály na bázi již upravených polymerů s dlouhou životností, se zde pracuje za velmi striktních podmínek (teplota, rychlost tisku, tlak, okolní prostředí atd.), neboť zde pracujeme s potenciálně živými materiály, které budou sloužit jako nosiče buněk. V experimentu bylo cílem úspěšně realizovat tisk specifické struktury z hydrogelu. Stejně tak jako u klasických aditivních technologií, byla na samém začátku provedena modelace počítačové předlohy. Jako model byla použita strukturální mřížka s definovanými póry. Za pomoci tiskárny Bio X (Cellink) byla následně vytisknuta struktura zamýšleného hydrogelu. Samotný hydrogel představuje pouze obecné označení materiálu, neboť materiály pro biotisk jsou stále ve vývoji a neustále dochází k jejich zdokonalování. [4] V rámci experimentu byly použity hydrogely na bázi želatiny a polysacharidů. Tato metoda přípravy porézní struktury slibuje homogenní distribuci pórů v celém objemu vzorku.

K charakterizaci vzorků byly použity 2 metody. (1) Analýza pomocí elektronového mikroskopu (SEM) a (2) počítačová tomografie (CT). Pomocí elektronového mikroskopu Phenom G2 Pro (*Phenom World*) jsme schopni snímat povrch vzorků (řezů), čímž můžeme charakterizovat porozitu na jednotlivých snímcích zkoumaných vzorků za použití programu *Image J*. Počítačová tomografie díky tomografu Skyscan 1074 (Bruker) analyzuje strukturu v celém objemu vzorku, díky čemuž je rozdílnou metodou oproti elektronovému mikroskopu. Získaná data jsme následně schopni rekonstruovat ve výsledný počítačový model, který se pomocí programů analyzuje. Díky tomu pak budeme mít zpětnou vazbu o námi vytištěném vzorku a následně pak můžeme změnit parametry tisku či posoudit vhodnost použitého materiálu.

Cílem této práce bylo připravit hydrogely na bázi biopolymerů, pomocí 3D tisku. Provedením analýzy vytištěných vzorků pomocí CT a elektronovým mikroskopem získáme náhled na chování materiálu za daných podmínek tisku, díky čemuž budeme moci porovnat jednotlivé typy hydrogelů a nastavení tisku z hlediska výsledné porozity vzorků.

SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Moderní medicína klade vysoký důraz na vývoj nových technologií, zejména v oblasti 3D tisku a tedy i vývoji nových materiálů (inků, bioinků), které se liší především typem použitého materiálu. [4] V současné době existuje celá řada 3D tiskových metod zabývajících se tiskem biomateriálů například SLA, EBD, LAB. Mezi klíčové parametry rozhodující o volbě konkrétní tiskové metody (tisk na principu extruze, sterolytografický tisk atd.) patří typ materiálu (biopolymery, polymery, keramika, potraviny), jeho skupenství (kapalné, pevné, atd.) a jeho aplikace (výroba prototypů pro automobilový i letecký průmysl, náhrady tkání a protetik). Problematikou 3D tisku biomateriálů se zabývali autoři Guifang Gao a kolektiv (2018) [5]. Ve své práci podrobně rozebrali přínos konkrétních tiskových metod, zejména tisk náhrady tkání v oblasti tkáňového inženýrství. Podrobněji se touto problematikou zabývali i autoři Shen Ji a Murat Guvendiren (2021) [6]. Velmi slibnou metodu 3D tisku biomateriálů představuje metoda založená na principu extruze (EBD). Autoři Fu Zhouquan a kolektiv (2021) [7], popisují metodu extruze jako jednu z nejuniverzálnějších tiskových metod, kterou lze použít mimo jiné při tisku velmi objemných vzorků.

Metody přípravy materiálů pro tvorbu scaffoldů, potenciálně nesoucích živé buňky, tvoří důležitou oblast výzkumu tkáňového inženýrství, kterou se zabývá řada autorů [8]–[10]. Mezi klíčové faktory přípravy materiálů pro 3D tisk scaffoldů, mimo jiné patří typ použitého materiálu (želatina, polyethyleneglykol, hyaluronan atd.) a metoda jeho síťování (UV záření, Schiffovy báze). Materiály na bázi želatiny či kolagenu představují velký potenciál v oblasti 3D tisku a biotisku, především díky její dostupnosti, přírodnímu původu, biodegradabilitě a nízké cytotoxicitě. Chování želatiny jako biopolymeru při 3D tisku z pohledu reologie ve své práci popisují autoři Tayebi Lobat a kolektiv (2017) [11]. Z jejich výsledků je zřejmé, že při vhodném nastavení tiskových parametrů (rychlost tisku, teplota, rychlost vytlačování) může želatina tvořit stabilní scaffoldy, které lze použít například v již zmíněném tkáňovém inženýrství. Neméně důležitou roli pro udržení stabilního chování želatiny ve styku s živou tkání představuje způsob jejího síťování. Protože ne všechny dostupné a účinné síťovací metody vykazují nulovou toxicitu a nežádoucí vliv na případnou proliferaci buněk v matici. Metodami síťování želatiny se zabývá celá řada autorů [12]–[14]. Jednu, z často využívaných možností síťování, představuje síťování pomocí UV záření. Podmínkou tohoto způsobu síťování je přítomnost materiálů na bázi akrylátů [15], [16]. I přes velkou popularitu tohoto způsobu síťování, upozorňuje řada autorů na případnou toxicitu, projevující

se poškozením DNA buněk. Zajímavou alternativou síťování biomateriálu, představuje síťování pomocí Schiffových bází. Tento způsob síťování želatiny ve spojení s 3D tiskem, popisují ve své práci autoři Yani Jiang a kolektiv (2018) [17]. Jako tiskový materiál používají želatinu s přídavkem nanokrystalů celulózy, jehož výsledkem byl materiál, který nevykazoval žádné známky cytotoxicity. Podobnou problematikou se zabývali i autoři Zengmin Du a kolektiv (2017) [18], kteří posuzovali vliv pH a reakční doby na síťování želatiny pomocí oxidovaného dextranu. Všichni tito autoři se shodli na skutečnosti, že tímto způsobem připravený biomateriál bude hrát v oblasti 3D tisku i biotisku významnou roli. I přes uvedený přehled publikovaných prací, je vidět že v problematice 3D tisku biopolymerů na bázi želatiny je stále mnoho nevyřešených otázek, které je potřeba zodpovědět a kterými se zabývá i tato diplomová práce.

TEORETICKÁ ČÁST

1 PORÉZNÍ SYSTÉMY

V případě, že hovoříme o porézních systémech, myslíme tím systémy, které obsahují uvnitř své struktury tzv. volné dutiny. Může se jednat o různé 2D povrchy, u kterých lze porézní struktury dosáhnout např. (1) leptacím procesem, tzn. procesem, při kterém dochází k redukci povrchu daného materiálu; nebo (2) 3D tiskem, u kterého tyto vnitřní póry (dutiny) vznikají působením různých chemických či fyzikálních procesů. Výsledkem je tzv. specifický povrch, jehož nejčastější využití připadá do oblasti různých biotechnologií. [19] Samotný tvar, velikost a distribuce pórů má velký význam zejména při využití samotného materiálu v konkrétní technologii. Pokud budeme postupovat od největších rozměrů, pak póry s velikostí v řádech *mikrometrů*, lze využít jako filtry částic, membrány nebo jako součásti senzorických zařízení. Naopak materiály s póry o velikosti v řádech *nanometrů* lze uplatnit např. jako součást optických materiálů (vliv na fotocitlivost, vedení a lom světla). [20]

Samotné póry jsou nejčastěji rozděleny podle jejich velikosti na tzv. *mikropóry* (< 2 nm), *mesopóry* (od 2 nm do 50 nm) a *makroporézní systémy* (větší > 50 nm). Toto rozdělení je však velmi subjektivní, protože v literatuře lze najít rozdílné hodnoty.

Tabulka 1- Rozdělení velikosti pórů podle různých autorů [1].

Klasifikace	Definované typy pórů d (mm)					
	makro -	mezo -	mikro -	supermikro -	ultramikro -	submikro -
IUPAC	> 50	50 -2	< 2, resp. 2-04	2 - 0,7	< 0,7	< 0,4
Dubinin	> 400 - 200	400-200 > d > 3-3,2	< 1,4-1,2	3,2-3 > d > 1,4-1,2	-	-
Cheremskoj	> 2000	-	2000 > d > 200	-	< 4 - 2	< 200
Kodikara	10 ⁶ -10 ⁴	-	3*10 ⁴ - 10 ³	10 ³ - 25	< 4 - 3	-

1.1 Rozdělení pórů

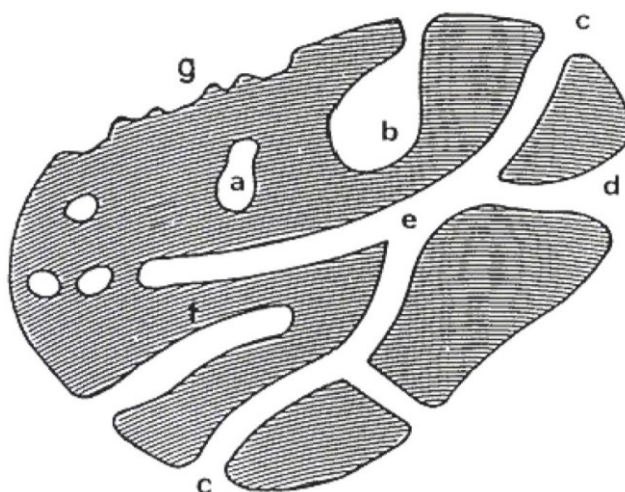
1.1.1 Distribuce pórů v matici

Porozitu můžeme definovat jako objem volného vnitřního prostoru uvnitř matrice. Tento volný prostor je tvořen malými kavitami (póry), které obklopuje materiál samotné matrice. V důsledku volného prostoru je výsledná hustota matrice daleko menší. Porozita materiálu je závislá na řadě faktorů, jako je typ materiálu, ochota materiálu vytvářet póry či okrajové podmínky ovlivňující jejich vznik. Rozdělení pórů v matici je důležitým rysem porézní struktury využívaným při charakterizaci porézních materiálů. Póry lze rozdělit např. z pohledu polohy a původu samotného póru. Hovoříme-li o pórech uvnitř matrice, jedná se o

tzv. vnitro-částicové póry. Jak samotný název napovídá, jde o póry, které jsou umístěné uvnitř zkoumaných materiálů, tzn. že, póry byly součástí materiálové matrice od samého počátku, nevznikly až v průběhu. Tyto typy pórů pak můžeme označit za tzv. „pravé póry“. Naopak póry vytvořené vlivem působení např. plynu či zvýšené teploty, lze označit za tzv. „přidané vnitřní póry“. Jako „nevlastní póry“ lze označit póry, které byly do matrice implementovány s cizí složkou (např. polymery, slitiny kovů), jež byla následně odstraněna. [1], [20], [21]

1.1.2 Přístupnost pórů

S ohledem na možnosti využití pórů, se póry dají rozdělit i podle jejich přístupnosti na póry *uzavřené, otevřené a průběžné* (viz obrázek č. 1). *Uzavřené póry* se velmi obtížně definují, a proto se zavádí různé definice vymezující pojem uzavřeného póru. Příkladem takové definice je tvrzení, že uzavřeným pórem jest takový, který není přístupný pro molekuly Helia, jejichž kritický průměr (d_{krit}) odpovídá hodnotě 0,2 nm. Touto definicí tedy popisujeme stav volného prostoru uvnitř materiálu, který je zcela izolovaný od okolních prostorů tak, že ani částice malá jako je jeden atom nedokáže do tohoto prostoru samovolně vniknout. [1]



Obrázek č. 1 - Grafické znázornění přístupnosti pórů dle IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry): (a) – uzavřený pór; (b, f) – póry uzavřené jen na jednom konci; (c, d, g) – otevřené póry; (e) – průběžné póry. [1]

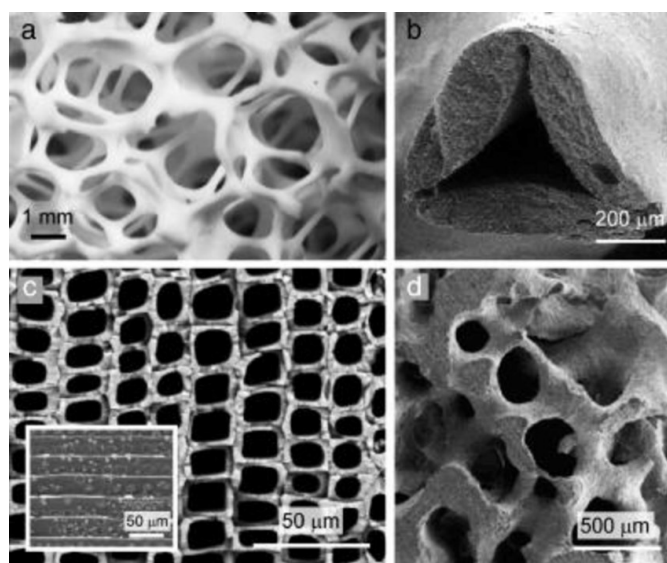
1.1.3 Tvar pórů

Mezi další parametr, podle kterého lze póry rozdělit patří jejich tvar (geometrie). Rozdělení pórů dle tvaru představuje spíše takové zjednodušení, jehož cílem je lepší zařazení a následnou kategorizaci porovnávaných pórů. Mezi tyto tvary patří různé destičky, válce či

kužele. Příkladem mohou být póry obsahující oxidy hliníku a hořčíku, které bývají přirovnávány ke tvaru válce. Nejčastější zastoupení mají tzv. póry sférolitické, které lze najít např. u silikagelů. [1]

1.1.4 Příprava porézních systémů

Porézní matrice či materiály se hojně vyskytují v přírodě. Můžou to být různé rostlinné i nerostné (pískovce, vápence) materiály. V závislosti na typu porézního materiálu a jeho aplikaci, rozlišujeme několik základních metod přípravy. Příkladem může být tzv. reprodukce z předlohy, např. replikační technika. Její princip spočívá v modelaci předlohy z dobře tvárného materiálu (polyuretany), který je následně potažen filmem z požadovaného materiálu (např. keramika). Poslední fáze replikační techniky spočívá v odstranění materiálové předlohy (pokud je to nezbytně nutné), čímž získáme výsledný porézní materiál. Příklad porézního materiálu je zobrazen na obrázku č. 2. Metoda replikační techniky je v současné době velmi populární a známe ji spíše pod názvem 3D tisk. [22]



Obrázek č. 2 – Mikrostruktury produkované replikační technologií. (a) Hliníková otevřená struktura připravená pomocí polyurethanové předlohy; (b) detail výstupku keramické matrice získané z polymerní předlohy (tvar dosažen pyrolýzou organické složky v předloze); (c) vysoce orientovaná mřížka z keramického SiC připravená po kontaktu plynu s předlohou z celulózy (d) makroporézní struktura připravená z mořského korálu. [22]

2 3D TISK

Jedná se o metodu tzv. aditivní výroby produktů s předdefinovanými rozměry. Tato tisková metoda je hojně využívána v mnoha oblastech vývoje nových technologií jak v laboratorních (automobilový a letecký průmysl) tak i průmyslových podmínkách. Díky jednotlivým variacím metody 3D tisku, například metody FDM (fused deposition modeling) či SLA (stereolitography), dokážeme vytvářet výrobky různých vlastností či tvaru (designu), a rozšířit tak jejich oblast použití, mezi které jistě patří automobilový nebo letecký průmysl či medicína. [23]

Díky technologii 3D tisku dokážeme vytvořit porézní systémy s definovanou strukturou, například řízenou velikostí pórů, jejich tvarem, polohou v matici nebo i tím, zda jsou póry otevřené či uzavřené. Princip metody 3D tisku je založen na 3 základních krocích. V prvním kroku je potřeba nakreslit vhodný model s využitím příslušného programu (např. CAD (*computer aided designe*), Catia, Inventor), který by měl odpovídat požadovanému výtisku (tvar, velikost, počet vrstev atd.). V druhém kroku je nakreslený model převeden do rozhraní tiskárny, ve kterém následně dojde k jeho rozřezání tzv. slicování. Při procesu slicování je navržený 3D model rozložen na 2D řezy, podle kterých tiskárna vrství (tiskne) příslušnou vrstvu materiálu (výška tisku udává velikost posunutí tiskové hlavy ve směru osy z). V posledním, třetím kroku, je tiskárna zapnuta, naplněna požadovaným materiálem a spuštěna funkce tisku. Po uplynutí tiskového času získáme požadovaný výtisk v reálném měřítku použitého modelu. [24]

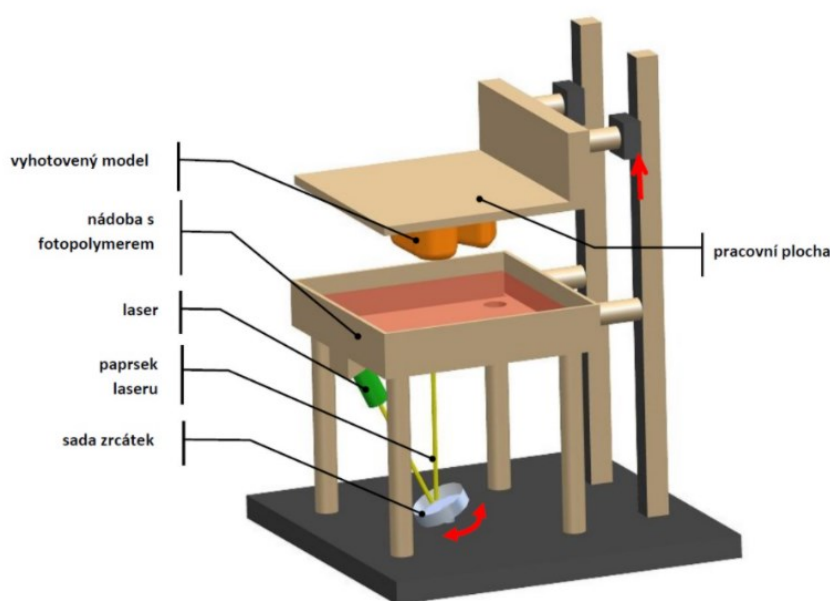
Spektrum používaných tiskových materiálů závisí na použité metodě tisku. Mezi ty nejnámější a nejpoužívanější materiály patří převážně polymery (syntetické či přírodní). Jejich charakteristické vlastnosti jako je dobrá zpracovatelnost, mechanická odolnost s nízkými náklady na výrobu je předurčují k nejvyššímu uplatnění v 3D tisku. Chování tiskových materiálů se liší v závislosti na molekulové hmotnosti, plnivu či samotném typu polymeru (termoplast, termoset, krystalický či amorfni polymer). Volba tiskového polymeru záleží výhradně na koncovém uživateli. [25]

2.1 Rozdělení metody aditivní výroby podle materiálů a specifikací

2.1.1 Materiály na bázi pryskyřic pro stereolitografii (SLA)

Mezi nejstarší metodu 3D tisku lze zařadit metodu SLA (*stereolitografie*). Základní princip této metody (viz obrázek č. 3) spočívá ve využití fotoreakce vyvolané specifickým

světelným zářením, díky kterému dochází k následnému vytvrzení polymerní pryskyřice. Tímto způsobem vzniká vrstva vytvrzeného materiálu ve 2D řezu. Vznik 3D je zajištěn posuvem stolu (ve vertikálním směru osy z v kartézském souřadném systému), na kterém je tištěn výsledný produkt. Vzorek je po vytvrzení nanesené vrstvy i se stolem ponořen znovu do pryskyřice s požadovanou výškou hladiny, která odpovídá možnostem a nastavení tiskárny. Při tisku velmi jemných struktur a složitějších modelů často dochází k výskytu (ve vnitřním prostoru výtisku) nedotvrzené pryskyřice. Proto je takový typ výrobku následně umístěn do lázně s vhodným rozpouštědlem a poté dotvrzen ve vytvrzovací komoře, kde dojde k finálnímu dotvrzení výtisku (pomocí UV záření). [26]



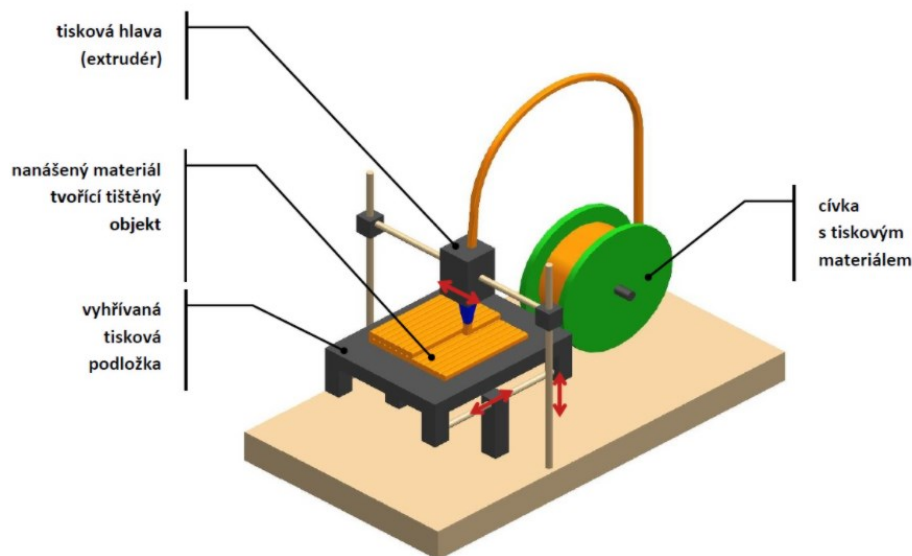
Obrázek č. 3 – Znárodnění principu metody tiskárny na bázi stereolitografie (SLA) [27]

Používané polymerní pryskyřice bývají na bázi fotocitlivého polymeru, který mění své vlastnosti právě při kontaktu se světlem o specifické vlnové délce. V závislosti na použité vlnové délce světla, kterým může být například UV laser, se bude lišit typ použité polymerní pryskyřice (typ použitého fotoinicátoru). Polymerní pryskyřici tvoří směs *monomerů* (např. styren, akrylát), *oligomerů* (např. urethany, polyethery, polyestery, epoxidy) a *fotoinicátoru*. Příkladem může být směs styrenu a akrylátu, které při použití UV vynikají svou rychlostí síťování a vytváří velmi hustě síťovanou strukturu. U prvního typu vytvrzování je reakce řízena iontově a jako fotoinicátor lze využít kationtové iniciátory např. jodoniové a sulfoniové soli, organokovy či pyridiniové soli. Druhým typem vytvrzovací reakce je radikálová polymerace, využívající převážně adičních reakcí uhlíkových dvojných vazeb v

akrylátech nebo methakrylátech, hojně používaných ve fotolitografii a stereolitografii. Mezi nejpoužívanější fotoiniciátory se používají iniciátory dvousložkové a jednosložkové. Dvousložkové iniciátory obsahují radikály tzv. koiniciátory z donorové sloučeniny (*benzofenony, xanthyony a chinony*). U jednosložkového systému jsou radikály generovány štěpením vazeb (*ethery, benzoyloximy a acetofenony*). Použití SLA metody aditivní výroby pokrývá široké spektrum oblastí všedního života, lékařství a vědy. V medicíně je aplikace 3D tisku využívána zejména díky její preciznosti a jemnosti požadovaných výtisků, ale i díky možnosti vytvářet porézní systémy pro růst tkání. [26]

2.1.2 Pevné materiály a materiály vhodné pro extruzi (FDM)

Příkladem tiskové metody, která při tisku používá pevný materiál (nejčastěji ve formě struny) je metoda FDM (fused deposition modeling). U metody FDM, jejíž princip nastiňuje obr. 4, rozlišujeme 2 základní uspořádání. Obě metody jsou založeny na principu extruze polymerního materiálu skrz trysku tiskové hlavy, kdy lze pohybovat buď (1) *samotnou tiskovou hlavu* a tisková podložka je pevně fixovaná a zabezpečuje pouze pohyb ve vertikálním směru osy z , nebo lze pohybovat (2) *tiskovou podložkou*, a fixována je naopak tisková hlava pohybující se ve směru osy z (viz obrázek č. 4). Jako tiskový materiál se používají polymerní struny (filamenty). Filament je dávkován do extruzní hlavy, kde postupně dochází k jeho natavení (ohřátí nad $T_{tání}$ v závislosti na použitém materiálu) a následnému položení (natisknutí) na tiskovou podložku ve tvaru, který odpovídá kreslené předloze.



Obrázek č. 4 – Princip FDM metody na bázi extruze. [27]

V případě, že požadovaný model je velmi složitý a poloha jeho těžiště by mohla způsobit zhroucení výrobku (během tisku), přidávají se k výtisku tzv. podpěry. Podpěry bývají často z cenově dostupnějšího materiálu či materiálu rozpustného ve vodě například BVOH (*Butenediol vinylalkoholový kopolymer*). Po vyištění se podpěry odstraní.

Tiskové materiály (filamenty) jsou vystaveny vysoké teplotě a deformaci ve výstupní štěrbině tiskové hlavy, jehož výsledkem může být výskyt stejných nestabilit, jako při extruzi jiných polymerních výrobků. Znalosti toku jednotlivých materiálů jsou velmi důležité, a tím předcházet vzniku jejich vzniku.

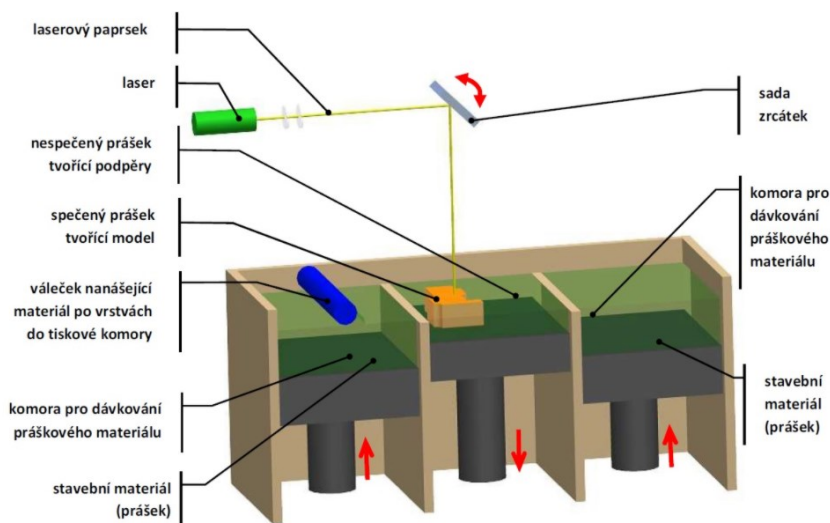
Nejpoužívanější tiskové materiály můžeme rozdělit do dvou základních kategorií na polymery *syntetické* a *přírodní*. Syntetické polymery se převážně získávají z ropy. Mezi ty nejpoužívanější patří ABS (*akrylonitril butadien styren*), PVA (*polyvinyl alkohol*), PC (*polykarbonát*) či PET (*polyethlene tereftalát*). Z polymerů přírodních se nejčastěji používá kyselina polymlečná (PLA), která se získává ze škrobu obsaženého v kukuřici či jiných plodinách bohatých na škrob. Výhoda použití právě PLA, ve srovnání s polymery syntetickými, spočívá v jeho rozložitelnosti (biodegradaci) v přírodě.

V případě metody FDM, lze použít takřka jakýkoliv materiál s definovanými tokovými vlastnostmi. Mimo standartních materiálů jako jsou polymerní vlákna, lze využít materiály na bázi keramiky, betonu či proteinů (např. potraviny z proteinových past). [28]

2.1.3 Materiály na bázi velmi jemných prášků (SLS, SLM)

Metody SLS (*selective laser sintering*) a SLM (*selective laser melting*) jsou tiskové metody, které pracují s materiály ve formě velmi jemných prášků (průměr zrn $d_{krit}=100 - 10\mu m$), (viz obrázek č. 5). Nejčastěji se jedná o materiály na bázi polymeru, kovu (hliníkové slitiny) či různé oxidy (křemíku a zirkonu) používané zejména v medicínských aplikacích. Součástí práškového materiálu mohou být také různá aditiva, která mohou výrazně zlepšit např. mechanické vlastnosti nebo soudržnost materiálu. Příkladem těchto aditiv může být wolfram, křemík nebo chrom.

Základní rozdíl mezi zmíněnými metody (SLA a SLM) spočívá v teplotním rozsahu jejich použití. Sintovací metoda SLS využívá energeticky výkonného paprsku (laseru), který materiál spéká na hranici zrn a nepřekračuje teplotu tání materiálu. Naopak metoda SLM materiál roztaví, čímž následně dochází k vytvoření pevnější struktury. Nicméně řízení procesu tavení materiálu je velmi obtížné a nese sebou jisté těžkosti. Například při zpracování prášků na bázi hliníku a hořčíku nastávají problémy při tisku struktur s vnitřními meziprostory, kde lze jen stěží dodržet řízení a přesnost. Mezi nejčastější oblasti využití metod SLA patří oblast leteckého a kosmického (vesmírného) vývoje. Například příprava nosných struktur z lehkých slitin matematicky definovaných modelů tak, aby byla zajištěna co nejvyšší pevnost, lehkost a zároveň bylo využito co nejméně materiálu. Uplatnění aditivní výroby keramických materiálů lze najít v různé formě zubních či kostních náhrad a jejich vyztužení. Metodám SLA a SLM nejčastěji konkuruje vysokotlaké spékání či modelace pomocí předloh. Jedná se o méně energeticky nákladné metody s možností vyšší produkce, protože nejsou zdaleka tak časově náročné. [29]



Obrázek č. 5 – Princip tisku práškových materiálů (SLA, SLS). [27]

2.1.4 3D tiskové materiály na bázi přírodních polymerů

Moderní medicína je dnes hnacím motorem pro výzkum v oblasti 3D tisku. Metoda samotného tisku je velmi podobná tisku syntetických materiálů, s tím rozdílem, že tiskové podmínky, nastavení tiskárny a materiály samotné, vyžadují specifické zacházení, neboť mohou přijít do styku s živými buňkami (např. fibroblasty, osteoblasty atd.).

Jako vhodný materiál lze nejčastěji použít biopolymery, tzn. materiály získané z přírodních a nejlépe obnovitelných zdrojů, ať už rostlinného či živočišného původu, jako jsou například proteiny (kolagen), polysacharidy (dextran, hyaluronan sodný) atd. Právě tisk přírodních materiálů je dnes velmi diskutovaným tématem. Tyto materiály však nelze použít pro všechny tiskové metody (např. vysoké teploty tání u SLM). V současné době se tisknou materiály na bázi termoplastických elastomerů plněných železem, které se jeví jako dobré nosiče buněk. Mezi další takové materiály řadíme například Bioglass, které je dnes hojně používáno při opravách kostí. [10]

3 3D BIOTISK

3D biotisk lze jednoduše definovat jako tiskovou metodu, jejímž výsledkem jsou 3D struktury osazené již živými buňkami (fibroblasty, kmenové buňky, osteoblasty). Připravené struktury lze potencionálně využít např. jako náhrady tkání, kostí atd. Tkáňové inženýrství představuje obor zabývající se přípravou biologicky ekvivalentních náhrad tkání nebo orgánů z biokompatibilního materiálu, tak aby imunitní systém přijal tuto náhradu za vlastní. Biokompatibilitu si můžeme představit jako snášenlivost látek a materiálů v biologickém prostředí. Biokompatibilní materiál je posuzován z pohledu celé řady testů, především jde o cytotoxické působení, dále jsou to toxikologické a alergické reakce a karcinogenita či mutagenita. Materiálové náhrady musí rovněž splňovat řadu jiných kritérií, mezi která patří např. cytotoxicita, stabilita materiálu (v závislosti na teplotě vlhkosti, pH), velikost a distribuce pórů v materiálu, či velikost a tvar náhrady, odvíjejících se od konkrétního použití náhrady aj. Jednou z metod, kterou lze při výrobě materiálových náhrad využít je právě metoda 3D tisku, tedy metoda aditivní výroby, která za pomoci již zmíněných metod tisku vytváří struktury z materiálů, které mohou sloužit jako nosiče živých buněk.

Práce se syntetickými materiály (polymery), je daleko jednodušší, protože podmínky jako jsou např. teplota, rychlost tisku a smykové deformace mají širší možnosti nastavení. Jednotné nastavení tiskového procesu (rychlost tisku, dávkování filamentu, volba tiskového modelu, okolní prostředí), lze navíc použít bez ohledu na typ používaného polymeru (syntetického). Výjimku tvoří pouze správné nastavení tiskové teploty u konkrétního materiálu (PLA, ABS, PMMA aj.). V případě tisku materiálů přírodních (želatina, polysacharidy, PEG) jsou možnosti tiskového procesu omezené. Velkou roli zde hraje teplota, vlhkost, čas, rychlost smykové deformace nebo volba okolního prostředí. Většina zmíněných parametrů rozhodne o tom, zda je vůbec možné přírodní polymer při 3D tisku použít.[30]

Rychlost tisku vypovídá o tom, kolik času bude na tisk požadované struktury zapotřebí. Při použití neúměrné rychlosti může docházet k nárůstu napětí v materiálu, které může způsobit degradaci materiálu. Jak už bylo zmíněno, neméně důležitá je teplota tisku. Chování materiálů se může velmi lišit i při malé změně teploty.

Obrovský rozdíl mezi tiskem materiálů jako je např. kolagen a materiály jako jsou různé polymery u metody FDM (ABS, PLA, PE) je právě v chování při tisku a stabilita výsledného produktu. U kolagenu použitý materiál nezmění příliš svoji viskozitu v průběhu celého

procesu, kdežto polymerní materiály jsou zahřívány na vysokou teplotu tak, aby došlo k jejich roztavení pro snazší tisk, a následně vlivem okolní teploty ztuhnou do původní pevné struktury. Tedy kolagen bude mít stále želatinovou strukturu a chování měkkého materiálu, kdežto polymer se nejdříve taví a následně opětovně tuhne do pevné struktury.

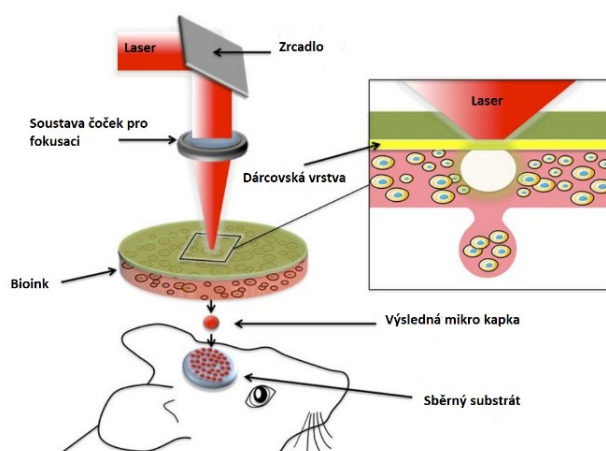
Biotisk se vyvíjel z metod, které již byly popsány, ale pro zlepšení procesu tisku se tyto metody inovovali tak, aby se více zaměřili na tisk biologických materiálů s ohledem na náročnost tisku. [31], [32]

3.1 Základní rozdělení 3D biotisku

Rozdělení 3D biotisku, lze stejně jako u 3D tisku, rozlišit na základě principu tisku a jeho parametrů. Mezi základní parametry tisku patří, jak už bylo zmíněno, připravit samotný model, zvolit vhodný materiál a nastavit parametry tiskového procesu. I přesto máme několik rozdílných technik, neboť každá z nich umožňuje jiné nastavení těchto parametrů nebo je vhodnější pro daný typ tiskového materiálu. Počítačový model se i u jednotlivých metod může měnit, v závislosti na softwaru tiskárny či typu metody. Mezi nejpoužívanější metody biotisku patří Laserem asistovaný biotisk, Injekční tisk a Extruzní tisk. [31]

3.1.1 Laserem asistovaný biotisk (Laser assisted bioprinting)

Tato metoda sice nepředstavuje klasickou metodou 3D tisku, nicméně díky specifickému principu můžeme docílit velmi vysokého rozlišení tisku. Samotná tisková soustava je složena z laseru, který má zacílit paprsek na desku složenou ze dvou vrstev, kde první je tzv. dárcovská vrstva, zatímco druhá vrstva obsahuje daný biomateriál.

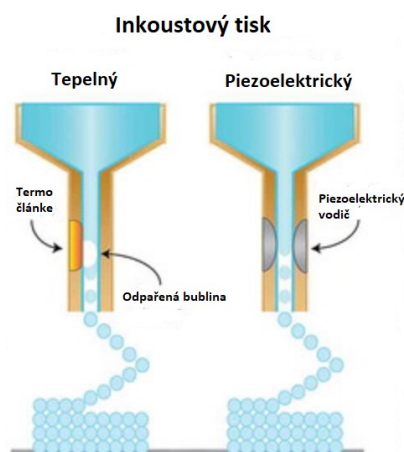


Obrázek č. 6 - Příklad laserem asistovaného biotisku [33]

Princip metody, zobrazený na obrázku č. 6, je založen na generování energie pomocí laserového paprsku dopadajícího na první tzv. dárcovskou vrstvu (donor layer), která tuto energii absorbuje, následně přemění na teplo, díky čemuž dojde ke zvýšení tlaku na vrstvu druhou s biomateriálem. Tím dojde k oddělení velmi malého množství materiálu, který ve formě kapky dopadne na sběrný substrát. Tato tisková metoda představuje ve srovnání s ostatními metodami, velmi precizní avšak časově náročnou metodu, kterou lze dále rozvíjet především v oblasti rychlosti produkce dopadajících kapek na substrát, tedy rychlosti tisku. [33]

3.1.2 Inkoustový tisk (Inkjet printing)

Metodu inkoustového tisku lze jednoduše přirovnat k tzv. „drop-on-demand“, tedy „kapnutí na povel“. Jak už je patrné ze samotného názvu, princip inkoustového tisku spočívá ve vytvoření kapky, odpovídající průměru jehly tiskové hlavy, dané na základě vnějšího impulzu pomocí piezoeletrického zařízení nebo termočlánku.

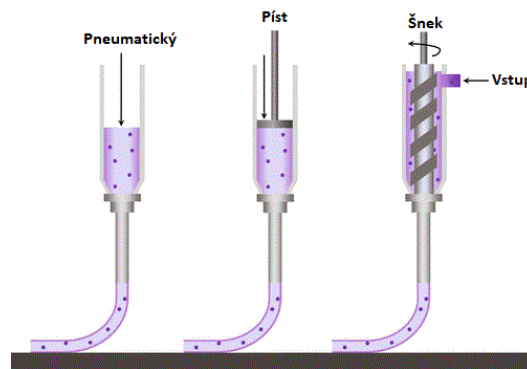


Obrázek č. 7 – Příklad inkoustového tisku a jeho 2 variant (Tepelný, Piezoelektrický). [34]

V případě piezoeletrického zařízení se jedná o impulz vyvolaný pomocí elektrického napětí, který uvolní kapku z tiskové hlavy. V případě termočlánku dochází k vyvolání impulzu vlivem zvýšení teploty. Celý proces má daleko vyšší frekvenci dopadajících kapek na substrát a je méně časově nákladný než laserem asistovaný tisk. [34]

3.1.3 Extruzní tisk (Extrusion-Based Deposition)

Asi nejčastěji používanou metodou 3D tisku přírodních materiálů je metoda extruzního tisku. Při tisku se využívá tlaku neboli síly, která působí na materiál umístěný v tiskové hlavě a tím dochází k jeho extruzi neboli vytlačování. Tlak lze generovat několika způsoby například s využitím pneumatického tlaku, tedy pomocí stlačeného plynu, který následně tlačí materiál z extruderu (vytlačovacího stroje). Další možností spočívá v použití pístu, který tlačí na materiál a tím dochází k jeho vytékání. Můžeme si jej představit stejně jako princip injekční stříkačky. V neposlední řadě, lze k dopravě materiálu do extruzní části tiskové hlavy využít šnek, který si jednoduše můžeme představit jako mlýnek na maso nebo vytlačovací stroj (extruder). [35]



Obrázek č. 8 – Příklady extruzního tisku pro 3 typy uvažovaných tiskových hlav. [36]

4 BIOPOLYMERY

Skupinu materiálů pro 3D biotisk, bychom mohli souhrnně označit jako biopolymery. Jedná se tedy o takové polymery, které mohou být (1) přírodního původu a zároveň biodegradabilní, (2) přírodního původu, ale ne biodegradabilní, a (3) syntetického původu a zároveň biodegradabilní. Biodegradabilita lze označit jako proces, při kterém vlivem organismů (bakterie, houby, živočichové atd.) dojde zcela k rozložení polymeru (materiálu) za vzniku biomasy, vody či oxidu uhličitého. Ideálním biopolymerem je materiál přírodního původu (např. kolagen), který je zcela biodegradabilní. Lze se setkat s přírodními polymery, které nejsou biodegradabilní (*bio-polyethylen, bio-propylen atd.*) a naopak s polymery syntetického původu, které jsou biodegradabilní (například. *poly(butylen)sukcinát*). Zatímco biomateriály můžeme označit za materiály uměle vytvořené pro kontakt s živou tkání tak, aniž aby narušili její funkci. Společným rysem těchto materiálů je polymerní chování, které je do značné míry ovlivněno molární hmotností polymeru, větvením, délkou polymerního řetězce, funkčními skupinami atd. [37]

Biopolymery na bázi přírodních materiálů, často vynikají vysokou biokompatibilitou, nízkou toxicitou, biodegradabilitou a představují tak materiál vhodný nejen pro biotisk. Jejich nevýhodou často bývá cena, odvíjející se od čistoty a zdroje, ze kterého byly použity. Za nejpoužívanější polymery živočišného původu lze označit kolagen, sodnou sůl kyseliny hyaluronové nebo chitosan, zatímco rostlinného původu to jsou polysacharidy například zmíněný alginát sodný, dextran, celulóza či agaróza. [11], [38]. Mezi nejrozšířenější zdroje kolagenu patří hovězí, vepřová a králičí kůže, srst, drůbeží pařáty. Chitosan lze získat ze skořápek mušlí a korýšů či kostí kalamárů. Mořské řasy zase slouží k získávání alginátu sodného či agarósy, které jsou k tomuto účelu speciálně pěstovány na mořských farmách. [39]

Všechny tyto biopolymery mají z pohledu tisku jednu velkou nevýhodu, a to horší mechanickou stabilitu a rozpustnost po vytisknutí. Aby bylo možné tyto materiály použít při aditivní výrobě, je potřeba je chemicky modifikovat či zesíťovat (fyzikálně, chemicky, fyzikálně-chemicky) tedy je natolik zpevnit aby, materiál po vytisknutí zachoval požadovaný tvar a strukturu. Zpevnění materiálu lze dosáhnout např. síťováním, tzn. vytvořením prostorové sítě (množství spojů) mezi makromolekulami polymeru nebo jeho roztoku. Tyto spoje (uzly) mohou vznikat vlivem působení fyzikálních sil nebo chemické reakce. Dle způsobu síťování či charakteru vytvořených uzlů, lze gely rozdělit na fyzikálně

síťované a chemicky síťované. Klíčovými parametry, kterými lze proces síťování ovlivnit jsou čas, teplota, vlhkost, molekulová hmotnost, koncentrace, použité síťovadlo (koncentrace). Pokud by materiál nebyl po vytisknutí dostatečně viskózní a pevný, mohlo by dojít k jeho deformaci a roztečení. Neméně důležitým parametrem je výsledná porozita vzorku (výtisku), především velikost a množství pórů. Porozita výtisku je kritickým faktorem pro růst buněk. Distribuce buněk a živin pro jejich růst v matrici musí být dostatečně velká, aby byl zaručen co nejefektivnější růst těchto buněk. V případě, že póry uvnitř matrice jsou zcela uzavřené, nebude docházet ke správné distribuci buněk ani živin pro jejich růst. Pokud buňky nebudou mít dostatečně velký prostor pro růst, opět bude jejich vývoj brzděn ba i zcela zastaven. Porozita má tedy nezanedbatelný vliv na proliferaci a diferenciaci buněk v materiálové matrici. [40]–[42]

4.1 Proteiny

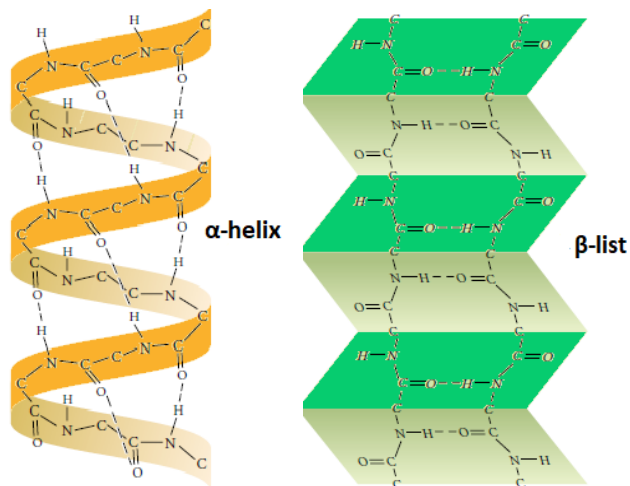
Proteiny představují skupinu materiálů, které tvoří základní složky organismů. Jejich makromolekuly jsou tvořeny dlouhými řetězci aminokyselin, jejichž konkrétní zastoupení a sekvence v polymerním řetězci je vzájemně odlišuje od jednotlivých proteinů a tím předurčuje jejich prostorové uspořádání a výsledné vlastnosti. [43]

Kondenzací dvou a více aminokyselin spojených pomocí pevné kovalentní vazby CO-NH (peptidová vazba) vznikají peptidy, které můžeme rozdělit podle počtu vázaných aminokyselin na oligopeptidy (tvořeny 2 až 10 aminokyselinami) a polypeptidy (obsahují více než 10 aminokyselin). Pomyslnou hranici mezi polypeptidy a proteiny tvoří relativní molekulová hmotnost 10.000. [44], [45]

U proteinů rozlišujeme jejich prostorové uspořádání tzn. *primární, kovalentní, sekundární, terciární a kvartérní strukturu*.

Primární struktura proteinů určuje pořadí (sekvenci) aminokyselinových zbytků v peptidovém řetězci. Správné pořadí aminokyselin je pro funkci proteinu velmi důležité. Záměna aminokyseliny za jinou aminokyselinu v určité pozici proteinu, která se může projevit jako důsledek DNA mutace, může výrazně ovlivnit funkčnost proteinu. Sekundární struktura proteinu představuje prostorové uspořádání polypeptidového řetězce v jeho určitých místech zejména vzájemné natáčení rovin peptidových vazeb. Společným bodem sousedních rovin je tzv. alfa uhlík (α - uhlík). Vazby, které z α - uhlíku vycházejí, svírají úhel $109^{\circ}28'$. Sekundární struktury proteinů mohou být pravidelné a opakující se. Příkladem

sekundární struktury je α -*Helix* (helikální struktura), který odpovídá tvaru šroubovice. Tvar helikální šroubovice má například hemoglobin či DNA. β -*List* (struktura skládaného listu) naopak zaujímá například fibroin. Příklad těchto uspořádání je vidět na obrázku č. 9.



Obrázek č. 9 – Příklad zobrazení sekundární struktury proteinů.

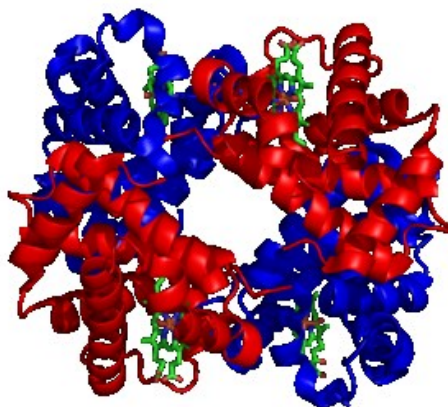
Terciální struktura představuje prostorové uspořádání všech částí polypeptidového řetězce. Znamená to tedy, že se na polypeptidový řetězec díváme z většího nadhledu, sledujeme vzájemné uspořádání prvků struktury sekundární, případně rozlišujeme jiná typová uspořádání sekundární struktury případně relativně samostatné strukturní celky řetězce tzv. domény. Výsledný tvar řetězce drží různé slabé a silnější interakce např. vodíkové vazby, disulfidové můstky, nebiřkovinné složky, disperzní síly atd. Některé proteiny jsou tvořeny z více samostatných polypeptidových řetězců (podjednotek), jejichž prostorové uspořádání popisuje kvartérní struktura. V případě, že je protein tvořen pouze jedním polypeptidovým vláknem, tak kvarterní strukturu neuvažujeme. [46]

Podle tvaru molekul můžeme proteiny rozdělit do 3 základních skupin na *globulární*, *fibrilární* a *membránové*. [46]

4.1.1 Globulární proteiny (sféroproteiny)

Jak už název sám napovídá, bude se jednat o „globe like“ struktury, připomínající sférický tvar. Na rozdíl od jiných proteinů jsou díky přítomnosti dipólových vazeb rozpustné ve vodě, ve které vytváří koloidní suspenze. Jejich tvar určují rozdíly v polaritě aminokyselin, které se proto skládají do tohoto specifického tvaru. [47]

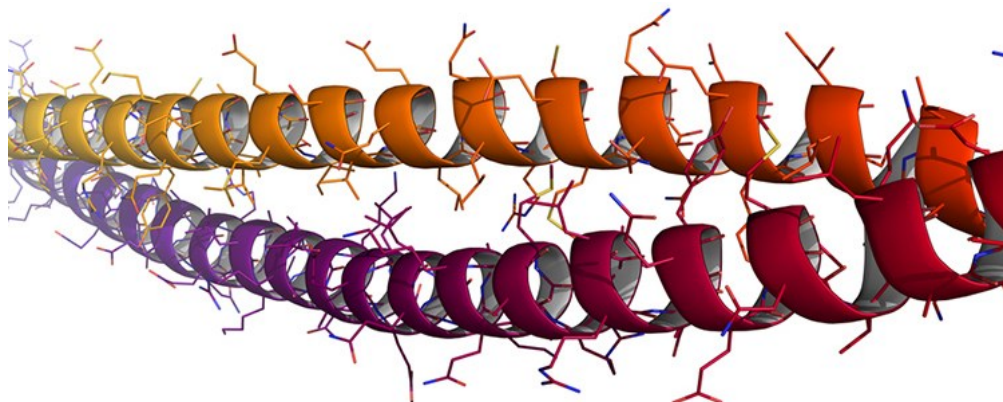
Globulárními proteiny jsou enzymy (biokatalyzátory), protilátky či různé albuminy. Dopravují informace zajišťující řízení procesů, transportují jiné látky přes membrány nebo slouží jako zásobárna aminokyselin. Mezi globulární proteiny patří například hemoglobin (zajišťuje transport kyslíku a oxidu uhličitého v krvi), myoglobin (zajišťuje transport obou plynů ve svalech) a neuroglobin. [48]



Obrázek č. 10 – Počítačová projekce globulárního proteinu hemoglobinu. [49]

4.1.2 Fibrilární proteiny (skleroproteiny)

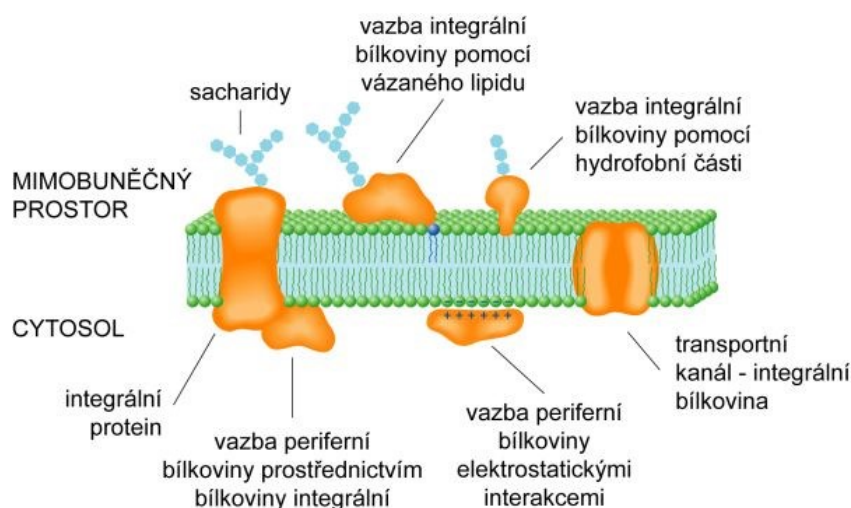
Fibrilární nebo také vlákenné proteiny jsou charakteristické dlouhými řetězci složených z polypeptidů a strukturou připomínají zapletená vlákna. Na rozdíl od globulárních proteinů jsou jen velmi obtížně rozpustné ve vodě. Jejich hlavní funkce spočívá především ve vytvoření strukturní stavební části organismů a jejich ochraně. Jedná se o různé typy vazů, šlach, kloubních pouzder a svalových tkání. Mezi typické zástupce patří keratin, obsahující α -*Helix*, jehož pružnost ovlivňuje množství disulfidových vazeb. V přírodním hedvábí zase tvoří vlákna fibroin, ve kterém můžeme najít opakující se antiparalelní β -*list*, kde každou druhou aminokyselinu tvoří glycin. Nejrozšířenějším fibrilárním proteinem u obratlovců je kolagen, který tvoří základ pojivových tkání, jako jsou kosti, zuby, chrupavky či šlachy. [50]



Obrázek č. 11 – Zobrazení keratinu počítačovou modelací. [51]

4.1.3 Membránové proteiny

Speciální skupinou proteinů tvoří membránové proteiny, které jsou součástí buněčných membrán. Struktura membránových proteinů závisí na jejich pozici v membráně. V závislosti na polaritě řetězce se uskupují v membráně, čímž způsobují vznik kanálů jako integrální proteiny, nebo jsou umístěny na povrchu membrány, kde zachytávají polární částice (receptory). Fungují, jako receptory zajišťují transport látek, enzymatické procesy a slouží v imunitním systému. Mezi takové řadíme například cytosol, cholesterol a fosfatidylcholin (receptory) [52]



Obrázek č. 12 – Schéma funkcí membránového proteinu pro cytosol. [53]

4.1.1 Kolagen

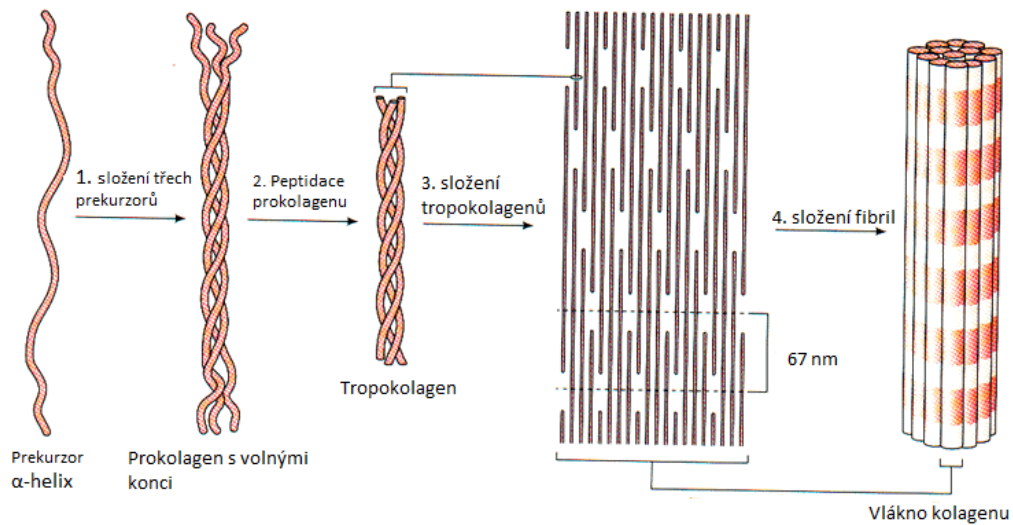
Jeho název pochází z řeckého „κόλλα! (kólla), což v překladu znamená lepidlo. Jde o fibrilární protein, který se vyskytuje v organismech převážně jako spojovací materiál tkání, vazů, svalů či kostí. Tvoří významnou část cévních stěn, rohovek, kůže či jiných orgánů těla. Mezi jeho klíčové funkce patří opěrná a ochranná funkce. Množství kolagenu obsaženého v lidském těle odpovídá třetině obsahu všech proteinů.

Primární strukturu kolagenu tvoří aminokyseliny (20 základních) obsahující velké množství glycínu, velký podíl aminokyselin prolinu a hydroxyprolinu. Naproti tomu aminokyseliny jako cystein a cystin jsou v sekvenci řetězce proteinu obsaženy pouze v malém množství nebo se nevyskytují vůbec. Celková sekvence aminokyselin pak určuje výsledné vlastnosti kolagenu, tedy rozdílný původ kolagenu zajišťuje rozdílné vlastnosti. Z pohledu primární struktury zde dochází ke střídání oblastí nepolárních (sekvence *glycin – prolin – jiná aminokyselina*) a polárních.

Sekundární strukturu kolagenu tvoří levotočivá protáhlá šroubovice (α -helix) s nepravidelnou symetrií kolem osy, která je charakteristická pouze pro kolageny nebo podobné bílkoviny.

Terciální struktura uspořádání kolagenu odpovídá tzv. „triple helix“ troj-šroubovici, připomínající tři propletená polypeptidová vlákna. Tato troj-šroubovice tvoří tropokolagen, základní stavební jednotku tvořící fibrilární útvary. Tropokolagen vzniká pouze v případě přiblížení řetězců, kdy na třetí pozici je glycín, který neobsahuje vedlejší řetězec.

Kvartérní strukturu kolagenu zapřičiňuje tropokolagen, který v extracelulárním prostoru tvoří hierarchicky uspořádané struktury (fibrily). Kolagen svoji strukturou připomíná bílé, neprůhledné vláknité útvary obalené proteoglykany a jinými bílkovinami v závislosti na zdroji původu. Mezi jeho základní vlastnosti patří například bobtnání či histologická barvitelnost. (zbarvení tkáně) Mimo fibril dokáže kolagen tvořit i jiné útvary (sítě, FACIT (*Fibril-associated collagens with interrupted triple helix*) neboli vláknitě spojené kolageny obsahující trojitou šroubovici), vyskytující se v tkáních v omezené míře. [54], [55]



Obrázek č. 13 – Schéma vzniku vlákna kolagenu. [56]

V současné době existuje více jak 20 různých typů kolagenu, které se od sebe liší zejména složením aminokyselin v řetězci, délkou molekuly či helikálním koncem. Společným rysem těchto typů však zůstává struktura troj-šroubovice a základní stavební jednotka tropokolagenu. Nejrozšířenějšími typy jsou typ I, II, III, IV, V. [55]

Kolagen typu I. představuje kolagen kostí, šlach, vazů a zaujímá téměř 90% veškerého kolagenu obsaženého v lidském těle. Typ II se vyskytuje hlavně ve chrupavkách, a obsahuje ve srovnání s typem I vysoké množství hydroxylisinu (23 ku 5 zbytkům *hydroxylisinu* na 1000 aminokyselin). Je velmi málo rozpustný ve vodě. Typ III bývá často spojován s výskytem typu I a to v kůži, kostech či svalech. Pro tento typ kolagenu je typický jeho vysoké množství hydroxyprolinu a přítomnost cysteinu, díky kterému dochází ke vzniku kovalentní disulfidické vazby stabilizující strukturu kolagenu. Typ IV se vyskytuje v membránách a je stejně jako typ III tvořený vysokým množstvím hydroxyprolinu. Je jen velmi málo rozpustný ve vodě a získává se tzv. enzymatickou cestou. Typ V se vyskytuje v bazálních membránách, ale jeho struktura spíše odpovídá globulárním proteinům, stabilizovaných disulfidickou vazbou, která brání agregaci do vyšších celků. [55]

Kolagen má široké spektrum vlastností a použití. Šlachy, kůže a kosti obsahují velmi tlusté fibrily, které jsou dále spojovány do větších celků a oproti tomu stojí kolagen obsažený ve chrupavce, který tvoří tenké a jemné sítě z fibril. Kolagen je ve výsledku velmi pevný díky kovalentním vazbám, dobře rozpustný ve vodě a schopen bobtnat. Představuje naprosto ideální biopolymer, neboť jeho přírodní původ mu zaručuje jeho biokompatibilitu a nulovou

toxicitu. Může být uchován konzervováním přídavkem soli. Má velmi široké spektrum uplatnění od potravinářského průmyslu až po vědní disciplíny, kde se projevil jako možný budoucí materiál vhodný pro matrice ve tkáňovém inženýrství například jako potenciální bioinkoust v oblasti 3D tisku. [55], [57]

4.1.2 Želatina

Specifickým druhem kolagenu je želatina, která vzniká jeho zahříváním ve vodném prostředí. Jedná se o biopolymer, hojně používaný v potravinářství, ale i moderní medicíně zejména díky její schopnosti tvořit gel, biokompatibilitě, biodegradabilitě a cenové dostupnosti. Při působení vlivu tepla, slabé kyseliny či zásady, dochází k narušení vlákenné struktury kolagenu, jehož výsledkem je želatina. Výsledné vlastnosti želatiny se odvíjí od způsobu jejího zpracování (kyselý, alkalický, enzymatický způsob) ale i použitého zdroje kolagenu (hovězí, vepřové kůže atd.). Při přeměně kolagenu v želatinu rozlišujeme tyto přechody: (a) tzv. štěpení příčných kovalentních intermolekulárních vazeb (úroveň kvartérní struktury), (b) tzv. denaturace na úrovni struktury terciální, (c) tzv. hydrolytické štěpení peptidických vazeb polypeptidových řetězců (molekulární úroveň). Z pohledu výsledných fyzikálních vlastností želatiny je žádoucí, aby těchto zásahů do struktury (degradace, depolymerace) bylo co nejméně, jedná o jevy nežádoucí. [58], [59]

4.1.2.1 Struktura a vlastnosti želatiny

Želatinu tvoří stejně jako kolagen fibrily s výrazně kratší délkou řetězce ($1/3$ až $1/4$ původní délky), zapříčiněnou její přípravou. Teplota procesu zpracování kolagenu pro přeměnu v želatinu odpovídá 60°C . Celkový proces přípravy želatiny je nevratný, byť v některých částech struktury řetězce zůstávají místa s vratným charakterem. Při zpracování kolagenu na želatinu dochází ke změně původní krystalické (uspořádané) struktury kolagenu na strukturu spíše amorfní (neuspořádanou) odpovídající tzv. „statistickému klubku“. Kolagen je stabilní díky slabým kovalentním vazbám spojující řetězce (Van der Waalsovi síly, polární vazby, vodíkové můstky), které při zvyšující se teplotě snižují energii vazebných interakcí, čímž zvýší entropii systému, jehož výsledkem dochází ke vzniku příčných vazeb. Naopak nevýhodou želatiny spočívá v její teplotní nestabilitě a rozpustnosti v polárních rozpouštědlech (voda, glycerol atd.). Například z pohledu jejího využití v 3D tisku, je želatina slibným materiálem, i přes poměrně vysokou viskozitu, která může samotný proces tisku a jeho nastavení ztížit. Možností jak tyto nevýhody obejít spočívá v jejím zesíťování. [59]

4.1.3 Síťování želatiny

Jak už bylo řečeno, vlastnosti želatiny se od kolagenu liší převážně její strukturou. Při jejím síťování dochází k vzájemnému propojení jednotlivých řetězců za vzniku komplexní sítě, která má rozdílné fyzikální vlastnosti (pevnost, pružnost či absorpci látek například vody). Síťování lze obecně rozlišit dle fyzikálního způsobu, chemického způsobu případně jejich kombinaci. [60]

4.1.3.1 Fyzikální síťování

Jednou z klíčových vlastností želatiny je, že za nízké teploty přechází v gel elastického charakteru. Při jejím opětovném zahřátí na teplotu v rozmezí (30 – 50 °C) dochází k náhodnému uspořádání řetězců projevující se roztečením (taje), přechází na sol a při následném ochlazení pod teplotu 30 °C, dojde k vytvoření vodíkových vazeb mezi řetězci, které se projeví jejím ztuhnutím. Jedná se o tzv. přechod sol-gel. Výhodou sol-gel přechodu je, že se jedná o inverzní děj, který je řízen pouze koncentrací želatiny (podíl sušiny) a teplotou okolí, bez použití externích chemických síťovadel. Inverznost toho to děje je možná díky působení velmi slabých vazebných interakcí (vodíkové můstky, elektrostatické síly či Van der Waalsovy síly), které v průběhu procesu vznikají. Nicméně celý proces podléhá jistým kritériím a výsledný gel nemusí být plně stabilní. Se změnou pH dochází i ke změnám síťovací (přechodové) teploty. Tento děj je způsoben právě změnou iontové povahy koncových skupin v důsledku změny pH, kde dochází i k narušení vzniku nových vodíkových vazeb. Metoda fyzikálního síťování je sice nízkonákladovou metodou, ale výsledný produkt není tak stabilní jako v případě chemického síťování. Navíc z pohledu výskytu slabých vazeb není vždy materiál stabilní (například změna teploty). [61]

4.1.3.2 Chemické síťování

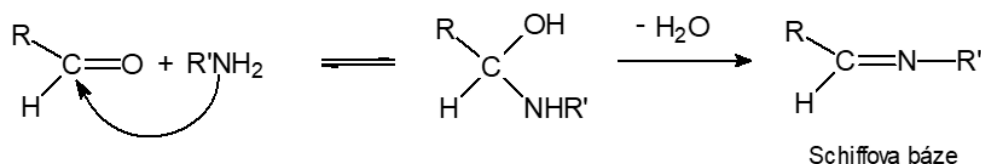
Při chemickém síťování želatiny dochází ke vzniku nových vazeb kovalentního či iontového typu. Mezi metody vedoucí k chemickému síťování želatiny patří například radikálová polymerace, kondenzace či použití síťovacího činidla. Jednou z nich je např. použití glutaraldehydů. Jedná se o velmi efektivní přípravu želatinové struktury, jejíž princip spočívá ve vytvoření vazeb mezi volnými aminokyselinami v řetězci a aldehydovou skupinou, kterou obsahuje právě přidávaný glutaraldehyd. Byť se jedná o velmi efektivní a levný proces, z pohledu toxicity však není v oblasti buněčných aplikací

příliš žádoucí, a je třeba ji uvážit. [62]

Další možností chemického síťování je využití síťovacích látek na bázi přírodních látek, čímž odstraníme problém s toxicitou. Příklad může být genipin (chemické síťovadlo), který vytváří vazby s aminokyselinovými skupinami. Nevýhodou jeho použití je vznik tmavě modré barvy. Jako další přírodní síťovadlo, by mohl posloužit například fenol jako fenolová kyselina. Díky extrakci fenolové kyseliny z rostlin, dochází k reakci s aminokyselinami v řetězci proteinů. [12]

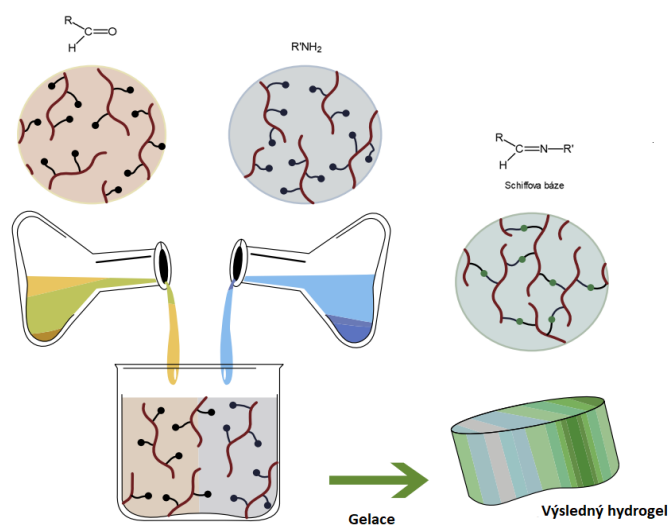
4.1.3.2.1 Metoda Shiffových bází (*Schiff base*)

Metoda Shiffových bází je založena na reakci mezi molekulami obsahující specifickou funkční skupinu, mezi které řadíme alkoholovou, hydrazidovou či amidovou skupinu. Obecně při reakci znázorněné na obrázku 12 vznikne vazba adicí dusíku aminové složky na chirální uhlík karbonylové skupiny, přičemž následnou eliminací vody vzniká vazba C=N, tedy Shiffova báze. Tento typ reakce je běžný u některých enzymatických reakcí v biochemii.



Obrázek č. 14 – Znázornění vzniku Shiffovi báze.

Využití tohoto způsobu síťování nevyžaduje žádné náročné podmínky probíhající reakce a je tedy použitelný pro práci s materiály citlivými na okolní prostředí, jako jsou například živé buňky. [63]



Obrázek č. 15 – Praktická příprava Shiffovi báze. [63]

4.2 Polysacharidy

Sacharidy patří mezi nejrozšířenější přírodní látky, jež jsou přítomné ve všech rostlinných a živočišných buňkách. Jejich molekuly (cukernou jednotku) tvoří jedna či více monosacharidových jednotek, spojených pomocí tzv. glykosidické vazby, tedy kovalentní vazby mezi uhlíkem jednoho řetězce a dalším substituentem druhého řetězce. Tyto jednotky bychom mohli označit za *primární strukturu*. Podle počtu monosacharidových jednotek v řetězci je můžeme rozdělit na monosacharidy (1 jednotka), oligosacharidy (2-10 jednotek) a polysacharidy (více než 10 jednotek), které tvoří *strukturu sekundární* a v případě polysacharidů i *terciální strukturu*. Oligosacharidy představují jen velmi malé řetězce rozpustné v polárních rozpouštědlech, jako je například voda. Mají nasládlou chuť a jako konkrétní příklad lze uvést sacharózu, maltózu či laktózu. Polysacharidy tvoří uhlovodíkové řetězce složené z desítek jednotek monosacharidů, jejímž výsledkem je polymerní struktura. [45]

Polysacharidy můžeme rozdělit podle různých kritérií např. podle počtu monosacharidových jednotek v makromolekule (homopolysacharidy a heteropolysacharidy), stavby řetězce (nerozvětvené a rozvětvené), funkce v organismu (stavební, zásobní, speciální). Uspořádanost řetězců nebývá příliš pravidelná. Heterogenní vzhled s častými modifikacemi opakujících se jednotek v řetězci jim předurčují rozdílné vlastnosti. [45] Jednoduché cukry slouží jako okamžitý zdroj energie a právě polysacharidy bývají díky své struktuře využívány jako zásoba energie či strukturální funkce. [64]

4.2.1 Zásobní polysacharidy

Jak bylo zmíněno, tento typ polysacharidů slouží převážně ke shromažďování energie ve formě makromolekul, které svou energii uvolní při štěpení glykosidických vazeb, čímž dochází ke zjednodušení makromolekuly, kterou lze dále enzymaticky štěpit [65]

Škrob

Nejpopulárnější a nejrozšířenější zásobním polysacharidem je škrob. Tedy polymer, tvořený lineárním řetězcem amylozy a rozvětveným řetězcem amylopektinu. Vysoký obsah škrobu mají např. brambory, rýže či kukuřice. Jeho využití lze najít v celé řadě odvětví např. potravinářství (zahušťování potravin) textilním (škrobení oděvů) a farmaceutickém průmyslu (aditiva léčiv). [65]

Glykogen

Jedná se o sacharid připomínající škrob, který hraje významnou roli v *anilin-glukózovém cyklu* mezi orgánovou výměnou látek (mezi svaly a játry). Především o transport amoniaku vzniklého degradací aminokyselin do jater, kde probíhá glukogeneze, výroba energie. Jedná se převážně o tzv. pohotovostní zásobu energie využívanou v případě náhlého poklesu glukózy v těle. Glykogen je uložen převážně ve svalové tkáni (svalový glykogen), kde slouží především jako okamžitá zásoba energie a v játrech (jaterní glykogen) stabilizuje hladinu cukru v krvi. [65]

4.2.2 Strukturní polysacharidy

Jejich úkolem je výstavba těl rostlin a živočichů. Mezi nejznámější strukturní polysacharidy patří například celulóza, chitin, dextran a sodná sůl kyseliny hyaluronové. Jejich struktura je podobná zásobním polysacharidům. [66]

Celulóza

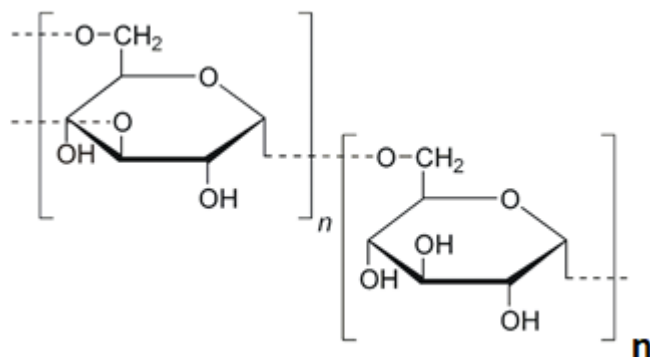
Celulóza tvoří základní stavební polysacharid všech rostlinných organismů složený z opakujících se jednotek glukózy. Skládá se z jednotek $\beta - D - \text{glukózy}$ spojených pomocí glykosidické vazby. Celulózu tvoří dlouhé, nerozvětvené řetězce zcela nerozpustné ve vodě, které dále slouží k výstavbě vyšších struktur spojených slabšími vazebnými interakcemi. Jde o nejrozšířenější biopolymer na zemském povrchu. Celulózu je možno získat izolací z rostlinných organismů (dřevo). Její použití lze nalézt od výroby papíru až po výrobu umělých vláken. Nitrací celulózy vzniká nitrocelulóza (střelná bavlna). [66]

Chitin

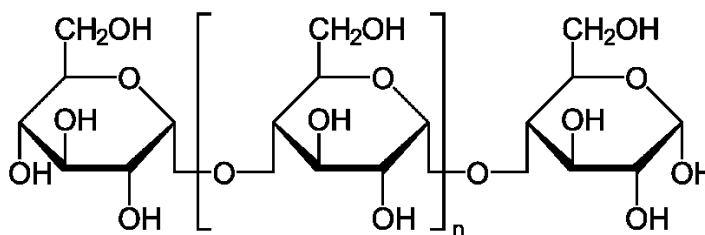
Druhým nejrozšířenějším polysacharidem je chitin. Je tvořen jednotky *N-acetyl-D-glukosaminu* spojených glykosidickou vazbou. Vyskytuje se ve třech různých modifikacích α , β a γ . Chitin je díky silným vodíkovým vazbám uvnitř molekuly nerozpustný ve vodném prostředí. Modifikované deriváty chitinu (například chitosan) lze jednak rozpustit ve vodě (v závislosti na pH), a zároveň je použit k přípravě vláken, hydrogelů, membrán a pěnových struktur. Nejčastěji je obsažen ve schránkách členovců, které často slouží i jako zdroj při jeho získání a následném využití ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. [66]

Dextran

Dextran, jehož strukturální jednotku zobrazuje obrázcích č. 16 a 17, řadíme k polysacharidům přírodního původu, jehož objevení je spojováno s produkcí vína francouzským biologem Louise Pasteura. Jeho struktura je tvořena opakující se jednotkou glukanu spojeného α -1,6 glykosidickou vazbou. Dextran je často zaměňován za dextrin (viz obr. 15), který je ovšem tvořen odlišnou strukturou vazby mezi řetězci. Dextran je větvený polysacharid s vazbami na pozicích α -1,3 zatímco dextrin má řetězec nevětvený. [67]



Obrázek č. 16 – Strukturální jednotka větveného dextranu.



Obrázek č. 17 – Strukturální jednotka lineárního dextrin.

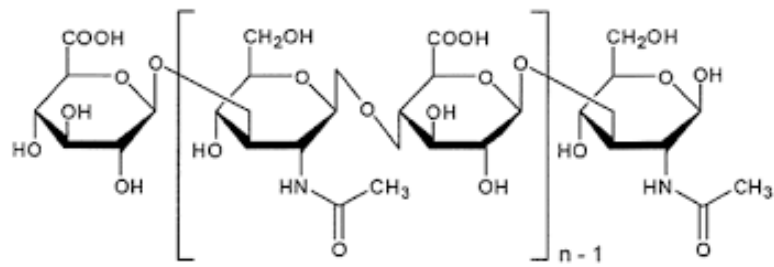
Výroba dextransu probíhá pomocí mikroorganismů, jejichž výsledkem je velký rozptyl molekulových hmotností a rozdílné hustoty větvení. Pro komerční účely se dextran vyrábí pomocí biologické syntézy nepatogenních organismů, mezi které patří například *Leuconostoc mesenteroides* (NRRL B-512). Základem reakce je katalýza dextran-sacharózy pomocí sacharózy a fruktózy. Výsledné větvení dextransu odpovídá rozsahu hodnot od 5% do 40% v závislosti na použitém typu monomeru. Molekulová hmotnost dextransu se pohybuje okolo 9-500 MDa. [68]

Dextran je velmi dobře rozpustný ve vodě a dalších organických rozpouštědlech (dimethylsulfid, ethylenglykol, glycerol). Jeho použití ve tkáňovém inženýrství a medicíně předurčuje zejména jeho biokompatibilita, možnost chemické modifikace jeho struktury (např. oxidace) či modifikace jinými bioaktivními látkami (náhrada plazmy). Dextran jako takový, nelze využít jako materiál pro tkáňové inženýrství napřímo (nízká pevnost, rozpustnost a stabilita na vzduchu), ale musí být vhodně modifikován (např. chemicky) nebo kombinován s jinými materiály (polymer) jako je například kolagen nebo hyaluronan. [68]

Sodná sůl kyseliny hyaluronové (hyaluronan)

Hyaluronan je představuje důležitou složkou mezibuněčné hmoty. Lidské tělo o hmotnosti 70 kg obsahuje přibližně 12 – 15 g této látky, která je neustále obnovována Sodná sůl kyseliny hyaluronové neboli hyaluronan je přírodní polysacharid tvořený z lineárně se opakujících jednotek *beta-(1-4)-D-glukoronové kyseliny* a *beta-(1-3)-N-acetyl-D-glukosaminu*, vzájemně spojených glykosidickou vazbou. Mezi jejich významné vlastnosti lze zařadit její schopnost na sebe vázat velké množství vody a napomáhat tím k hydrataci tkání. Jako tzv. signální molekula se aktivně účastní imunologických procesů, čímž ovlivňuje mobilitu a adhezi buněk v rámci jejich proliferace a diferenciaci.

Díky chemické modifikaci ji lze použít k přípravě nanovláken, bandáží, či hydrogelů a to s využitím celé řady derivátů například *1,3,5-benzen-(trikarboxy trihydrazin)* nebo radikálovou polymerací glycidů. Po síťování je schopna si udržet svůj tvar. Její molární hmotnost závisí na použitém zdroji, kvalitě čistícího procesu a metodě její izolace a může dosahovat až $10^7 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. [69]



Obrázek č. 18 – Strukturní jednotka kyseliny hyaluronové. [70]

Jak už bylo zmíněno, sodná sůl kyseliny hyaluronové představuje jednu z hydrofilních přírodních molekul, často označovanou za přirozené hydratační činidlo. Její viskoelastický charakter spolu s její biokompatibilitou a schopností nevyvolávat imunitní reakci organismu, ji předurčují k mnoha klinickým aplikacím, například doplňování synoviální tekutiny při artritidě, použití jako lubrikantu v ortopedii, k ochraně očních tkání a zrakových buněk nebo jako látky zvyšující viskozitu očních kapek v oftalmologii. Kromě toho ji lze označit za materiál, který napomáhá hydrataci pokožky, zvyšuje její elasticitu a přispívá k vyhlazení vrásek. V neposlední řadě stojí za zmínku, že hyaluronan stimuluje migraci epidermálních buněk a dovoluje biologicky aktivním látkám, které jsou běžnou součástí kosmetických přípravků, setrávat anebo penetrovat do epidermis. [71]

5 METODY ANALÝZY VZORKŮ

5.1 Rentgenová tomografie

Jedná se o metodu spojující princip rentgenového záření a počítačové tomografie. Díky pronikavému záření jsme schopni detekovat prošlé elektrony, čímž dostáváme obrazce. Tyto obrazce jsou pak následně počítačem seskupeny dohromady a sestrojí výsledný digitální 3D model, který zcela dokonale představuje zkoumaný vzorek a umožní náhled do jeho vnitřní struktury. [72]

5.1.1 Rentgenové záření

Záření o vlnové délce 10^{-12} až 10^{-8} nm, které bylo objeveno již na konci 19. století. Energie paprsku tohoto záření bývá mezi 5-200keV. Vzhledem ke znalosti dualismu vlny a částice, můžeme takovéto paprsky považovat za letící fotony s příslušnou energií, které mají dostatek energie na to vyrazit elektrony z atomového obalu. Následkem toho dojde u atomů k různým změnám v elektronovém obalu, a právě tato změna nám dovoluje vidět rozdíly u zkoumaných objektů. Vznik záření je způsoben emisí elektronů, které vlivem například tepelné iniciace či přivedením vysokého napětí uvolní specifické kvantum energie ve formě záření. Příkladem může být rentgenka, což je vakuová trubice obsahující anodu a katodu, které jsou vyrobeny nejčastěji z wolframu.

Uvolnění záření má dva důvody. Tím prvním je ionizace elektronového obalu atomu, čímž dochází k uvolnění jedné z vnitřních energetických hladin, v takovém případě je tato hladina obsazena elektronem z hladiny vyšší a díky tomu vzniká kvantum energie, které označíme jako rentgenové záření. Tím druhým důvodem je možné zabrzdění letícího elektronu, díky čemuž letící elektron odevzdá kvantum energie, které také popisujeme jako rentgenové záření. Díky tomu dostáváme dvě varianty rentgenového záření a to brzdné a charakteristické. [73]

Z rovnice pro energii fotonu,

$$E = h \cdot f \quad (1)$$

Kde:

h – Planckova konstanta ($6,626\ 070\ 15 \times 10^{-34}$ J·s)

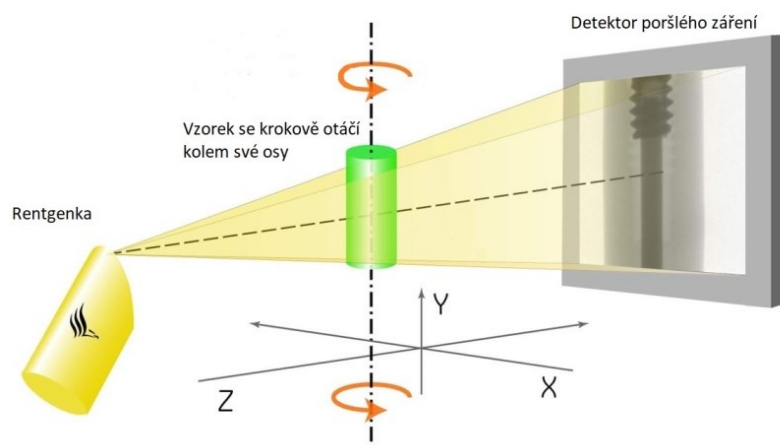
f – frekvence fotonu (Hz),

je vidět, že výsledné spektrum brzdného záření je spojité, neboť je schopno emitovat veškeré vlnové délky na rozdíl od charakteristického, které dokáže vyzářit pouze specifickou hodnotu délky právě v závislosti na rozdílu hladin dvou elektronů. [74]

5.1.2 Počítačová tomografie (CT)

Dnes disciplína s širokou paletou působnosti, která patří mezi důležité neinvazivní zobrazovací metody. Principem této metody, který je znázorněn na obr. 19, je založen na skládání již zaznamenaných dat ve formě například fotografií, do celistvého trojrozměrného modelu.

V případě rentgenové tomografie dochází k vystavení vzorku rentgenovému záření. Při tomto procesu je materiál vystaven záření, které pohlcuje, vzniká tak stín, zaznamenaný ve formě dat připomínajících fotografii. Pootáčením vzorku o 360 ° docházím ke snímání celého objektu a následnou počítačovou rekonstrukci ze zaznamenaných dat. [73]



Obrázek č. 19– Schéma principu rentgenového tomografu [75]

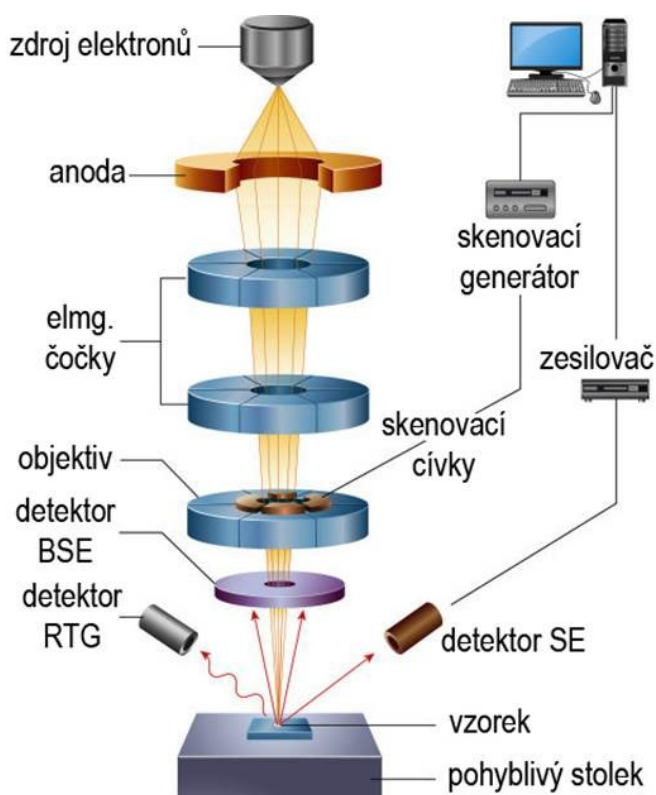
5.2 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Jedná se o speciální mikroskopickou metodu, která umožňuje zobrazit velmi vysoká rozlišení povrchů preparátů (viz obrázek č. 20). SEM neboli skenující elektronová mikroskopie, využívá ostřelování preparátu pomocí svazku elektronů o vysoké energii. Tím dochází k interakci mezi elektrony obsaženými v preparátu a nastávají tak dva případy. Prvním je, že elektrony svazku s vysokou energií narazí na elektron v obalu atomu preparátu.

Elektron předá svou energii, čímž mírně zbrzdí a odrazí se s menší energií. Pomocí vhodného detektoru je následně takový elektron zachycen a počítačově převeden do informace, díky které se následně poskládá hotový obraz. Druhou možností je, že elektron preparátem projde. Zde opět může odevzdat svou energii, čímž bude docházet k prosvícení ploch. Tam kde má elektron jen velmi malý odpor bude povrch tmavý, a tam, kde je mu kladen odpor, bude povrch světlý, výsledkem zobrazení tak bude černo bílý obraz.

Speciálním typem elektronů jsou pak sekundární elektrony. V tomto případě dojde k interakci elektronu ze svazku s elektronem uvnitř atomového obalu preparátu. Elektron z obalu bude vystřelen se specifickou energií, která bude opět zachycena na detektoru a pomocí počítačové modelace dojde k vytvoření výsledného obrazu. Tato metoda se často využívá u metalických vzorků.

Specifickou metodou elektronové mikroskopie je transmisní elektronová mikroskopie (TEM), kterou si můžeme představit jako klasický světelný mikroskop, který místo světla využívá právě svazku elektronů. Je to metoda používaná převážně pro velmi tenké vzorky s tloušťkou zhruba 100 nm. [76]

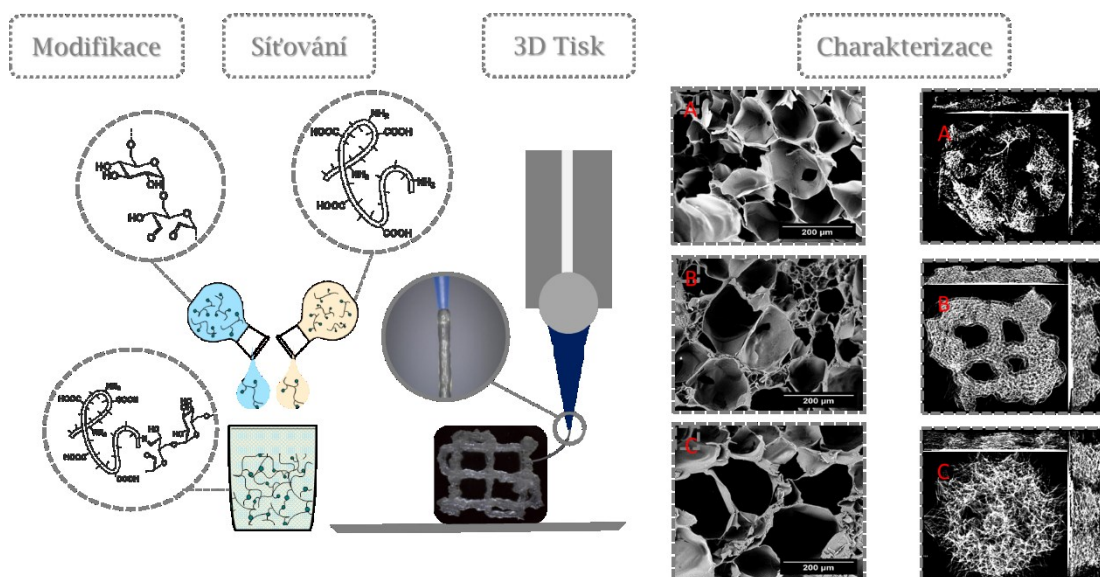


Obrázek č. 20 – Schéma principu elektronového mikroskopu [77]

I. PRAKTICKÁ ČÁST

6 POPIS EXPERIMENTU

Experimentální část práce popisuje přípravu materiálů na bázi želatiny (králíčí, hovězí) a dextranu (metoda Shiffovi báze) pro 3D tisk a jejich následnou charakterizaci. Schéma provedeného experimentu je zobrazeno na obrázku 21. Materiály byly připraveny v různém vzájemném poměru a s různou aktivační složkou (čpavek (NH_3), triethylamin (TEA)). Hlavním důvodem použití aktivačního činidla, byla (1) schopnost zvýšení pH směsi s hydrolyzátem (silná zásada) a (2) schopnost tzv. měniče protonů během síťovací reakce. Zesíťovaný materiál byl přenesen do injekční stříkačky, která byla vložena do tiskové hlavy (mechanický typ hlavy) 3D tiskárny *Bio X* (*Cellink*). Nastavením 3D modelu a tiskových parametrů (*printhead speed*, *temperature*, *extrusion rate atd.*) byla z připraveného materiálu (začátek tisku vždy 10 od začátku síťovací reakce) vytištěna 3D struktura. Hotový výtisk, byl pro následnou charakterizaci (elektronový mikroskop, počítačová tomografie) lyofilizován (Lyofilizátor ALPHA 2- 4 LSC, Martin Christ). U reprezentativních vzorků byla provedena charakterizace (počítačová tomografie) i v nativním (zbožtnalém) stavu.

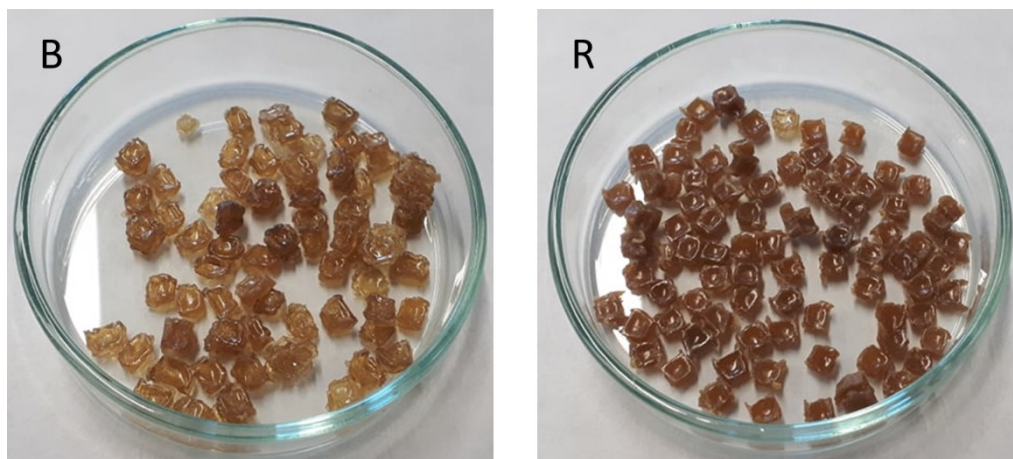


Obrázek č. 21 – Schéma navrženého experimentu

6.1 Použité materiály a jejich příprava

Příprava roztoku želatiny (využití skupiny (-NH₂))

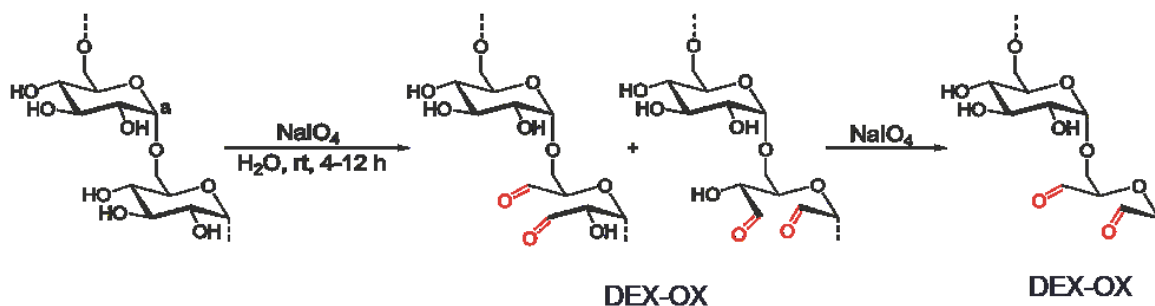
Jak už bylo uvedeno výše, za zdroj želatiny byl použit králičí (obsah sušiny 86,5 %, $M_w = 157\,800$ g/mol) a hovězí hydrolyzát (obsah sušiny 91,3 %, $M_w = 209\,600$ g) ve formě sušeného granulátu (viz obrázek č. 21) od firmy Tanex Vladislav, a.s. Ten byl následně rozpuštěn v de-ionizované (DEMI) vodě (15 % (hm%)) při teplotě 37 °C po dobu 24h. Takto připravený roztok byl dále síťován.



Obrázek č. 22 – Granulát hovězího (snímek B vlevo) a králičího (snímek R vpravo) hydrolyzátu.

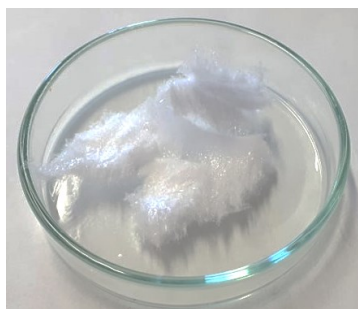
Příprava oxidovaného dextranu (příprava skupiny (=O))

K síťovací reakci byl použit dextran ($M_w = 40\,400$ g/mol) jako zdroj aldehydické skupiny. Nejprve byla provedena oxidace dextranu. K roztoku dextranu, který byl připraven rozpuštěním v DEMI vodě (13 hm. %) při teplotě 50 °C po dobu 24h, byl přidán 0,4 molární násobek NaIO_4 , předem rozpuštěný v 5 ml DEMI vody.



Obrázek č. 23 - Schéma přípravy oxidovaného dextranu.

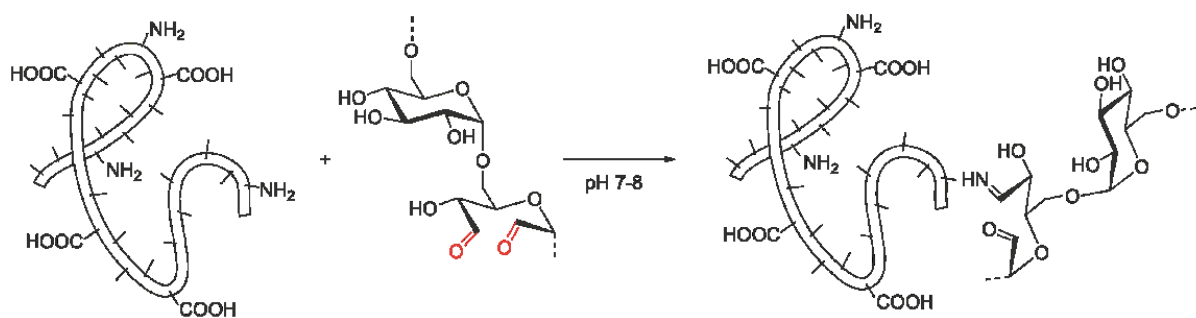
Reakční směs byla poté míchána na magnetickém míchadle při laboratorní teplotě po dobu 4h (na tmavém místě). Reakční směs byla následně zředěna DEMI vodou a přelita do dialyzační membrány (celulóza, cut-off 12 000 g/mol). Surový produkt byl poté purifikován dialýzou proti DEMI vodě po dobu 3 dnů. Po purifikaci byl roztok nalit na skleněnou Petriho misku (průměr 20 cm), zamrazen a následně lyofilizován. Čistý produkt byl získán ve výtěžku 90% a jeho Mw odpovídala hodnotě 21 083 g/mol. Počet aldehydových skupin na 100 podjednotek glukózy odpovídal hodnotě 56,5 a byl stanoven pomocí metody hydroxylaminhydrochloridu. [68] Pro měření byl použit automatický titrátor T50 (Metler Tolledo). Oxidovaný dextran (označený jako DEX-OX) byl použit k síťování želatiny jeho rozpuštěním příslušné navážky DEX-OX v DEMI vodě (2 % (hm. %) roztok). Rozpuštění probíhalo na magnetickém míchadle za laboratorní teploty po dobu 24 h.



Obrázek č. 24 – Forma oxidovaného dextranu (dex-ox) před jeho rozpuštěním.

Příprava zesíťovaného materiálu (hydrogelu)

Síťované materiály byly připraveny následovně. Roztok Dex-Ox (2 hm. %) byl smíchán s roztokem želatiny (15% hm. %, hovězí, králičí) v daném poměru (1:1, 1:2, 1:3). Ke směsi bylo následně přidáno aktivační činidlo (NH_3 , TEA) a všechny reaktanty byly smíchány.



Obrázek č. 25 – Schéma síťování oxidovaného dextranu a želatiny.

Připravená směs byla převedena do 3ml injekční stříkačky a následně tištěna na 3D tiskárně. Konkrétní poměry všech látek použitých při síťování včetně příslušného označení vzorku jsou uvedeny v tabulce č. 2.

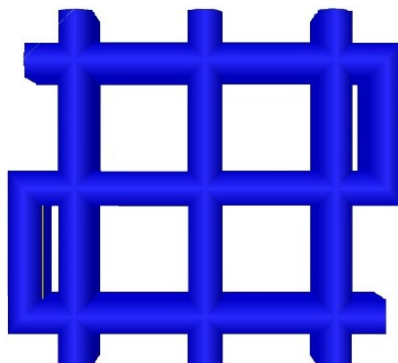
Tabulka 2– Souhrn všech připravených materiálových kombinací s příslušnými poměry (Pozn. B – bovine (hovězí); R – rabbit (králíčí))

Název vzorku (poměr-původ-síťovadlo)	želatina (ml)		Dextran	Typ síťovadla	
	typ	Objem (ml)	Objem (ml)	Typ	Objem (μl)
1-B-N	hovězí	1	1	NH ₃	50
1-R-N	králíčí	1	1	NH ₃	50
2-B-N	hovězí	1	0,5	NH ₃	50
2-R-N	králíčí	1	0,5	NH ₃	50
3-B-N	hovězí	1,5	0,5	NH ₃	75
3-R-N	králíčí	1,5	0,5	NH ₃	75
1-B-T	hovězí	1	1	TEA	9
1-R-T	králíčí	1	1	TEA	9
2-B-T	hovězí	1	0,5	TEA	9
2-R-T	králíčí	1	0,5	TEA	9
3-B-T	hovězí	1,5	0,5	TEA	12
3-R-T	králíčí	1,5	0,5	TEA	12

6.2 Návrhy modelů pro 3D tisk

Tiskový model byl navržen v programu *HeartOS* verze 1.8.2 vyvinutý společností *Cellink*. S ohledem na materiál byl tiskový model zvolen tak, aby měl připravený tiskový materiál

dostatečný čas pro jeho položení na podložku a nedocházelo k jeho zbytečnému slinování a model byl pokud možno co nejjednodušší.



Obrázek č. 26 – Navržený model pro 3D tisk

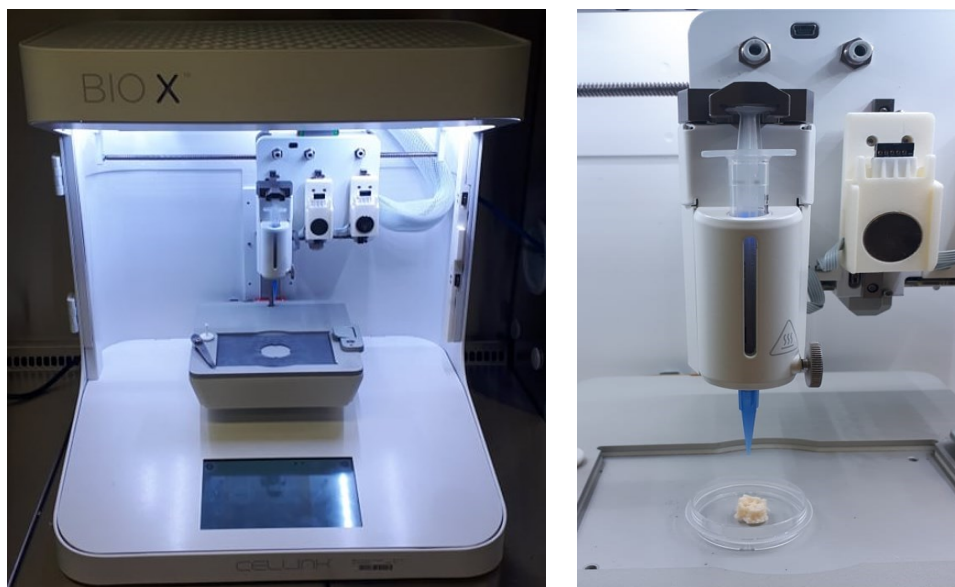
6.3 Použité přístroje

6.3.1 3D tisk vzorků

K 3D tisku připravených materiálů byla využita tiskárna *Bio X* od firmy *Cellink*. Tiskárna je vybavena celkem 3 porty pro uchycení různých typů tiskových hlav (mechanická, pneumatická, termoregulační), jejichž použití je dáno volbou tiskového materiálu. Do tiskové hlavy je vložena injekční stříkačka s tiskovým materiálem. Píst tiskové hlavy stlačuje píst stříkačky, díky čemuž z ní kontinuálně vytéká materiál. Tento způsob tisku (extruzní tisk) je velmi žádoucí při tisku viskózních materiálů. U každého vzorku byly vytištěny vždy 2 sady 1, 3 a 5 vrstev materiálu.

Při tisku bylo použito následující nastavení:

- 0.41 mm polypropylenová špička, 3 ml propylenová stříkačka, mechanický typ tiskové hlavy.
- printhead speed (2 mm/s), extrusion rate (1.75 ul/s), retraction volume (0,30 ul), teplota (37°C).



Obrázek č. 27 - 3D tiskárna Bio X od firmy Cellink (vlevo), detail tisku (vpravo).

6.3.2 Lyofilizace vzorků

Lyofilizace je proces, při kterém dochází k odstranění veškeré vody ze vzorku, aniž by při tom došlo k destrukci vzorku. Výsledkem byl vzorek, který byl dále charakterizován. Před lyofilizací, byl každý vzorek zamrazen nejprve na teplotu $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (24 h), a poté na teplotu $-82\text{ }^{\circ}\text{C}$ (24 h). Zamrazený produkt byl lyofilizován při teplotě $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ a tlaku 0,06 mbar (30h), po jejímž skončení byl tlak snížen na hodnotu 0,001mbar (15h). Při lyofilizaci bylo použito zařízení ALPHA 2- 4 LSC, Martin Christ).

6.3.3 Charakterizace připravených vzorků

6.3.3.1 Stanovení porozity pomocí elektronového mikroskopu (SEM)

K určení porozity připravených vzorků byl využit elektronový mikroskop *Phenom G2 Pro* (*Phenom World*). S využitím elektronového mikroskopu je možné zobrazit strukturu s velmi vysokým rozlišením, přiblížením a provádět různé optické změny (kontrast, podsvícení, hloubka ostrosti atd.). Vzorky byly seříznuty v příčném řezu. Z důvodu přesnějšího zobrazení byly vzorky pokoveny platinou (napětí 18 mA, doba procesu 45 s) a následně zobrazeny el. mikroskopem při urychlovacím napětí 10 kV. Velikost pórů a celková porozita jednotlivých řezů vzorků byla určena pomocí programu *Image J*, vždy z 5 pořízených snímků v místě řezu vzorku. Program *Image J* dovoluje uživateli převedení fotografie z formátu v pixelech na požadovaný rozměr (například μm). Pomocí funkce treshold dojde

k převedení fotografie do černobílého formátu s možností zvýraznit tmavé plochy (například vnitřní části pórů) dle potřeby a následně analyzovat tyto tmavé plochy. Výsledné hodnoty byly uvedeny jako průměr s příslušnou chybou měření. Tato metoda však vyžaduje destrukci výsledných lyofilizovaných vzorků, což znemožňuje jejich další použití.



Obrázek č. 28 – SEM Phenom G2 Pro

6.3.3.2 Rentgenový tomograf (CT)

Strukturní analýza v celém objemu vzorku (tvar, porozita) u lyofilizovaných a pro porovnání i u vybraných zpětně hydratovaných vzorků byla provedena pomocí počítačem řízené tomografie za pomoci přístroje *Skyscan 1174* od firmy Bruker (USA). Zařízení je vybaveno zdrojem rentgenového záření (napětí 20 – 50 kV o maximálním výkonu 40 W) a detektorem RTG paprsků. Disponuje kamerou s rozlišením 1.3 MPix s přiblížením 1:6. Snímky byly pořizovány při napětí 36 kV a proudem 592 μ A. Byly zachyceny vždy 2 snímky s pootočením 0,1 $^{\circ}$. Celkový proces měření trval přibližně 10 h. Surové snímky byly rekonstruovány programem *Nrecon* od firmy Bruker (USA). Celková analýza pak probíhala pomocí programů *DataViewer* a *CTAn*.



Obrázek č. 29 – Rentgenový tomograf Skyscan 1074

Všechny materiálové kombinace uvedené v tabulce č. 2, byly dle navrženého 3D modelu vytištěny na 3D tiskárně a charakterizovány (SEM, CT) dle zobrazeného schématu (viz obrázek č. 29).

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Jak už bylo uvedeno, při přípravě tiskových materiálů byly použity 2 různé typy hydrolyzátů (hovězí, králičí), které byly spolu s oxidovaným dextranem míchány v různém poměru (1:1, 1:2, 1:3) a s různým aktivačním činidlem (TEA, NH_3). Celkem tak bylo připraveno 12 různých sad vzorků. Každý vzorek byl připraven s různým počtem natisknutých vrstev (1, 3, 5 vrstev) vždy ve třech vyhotoveních.

7.1 Materiály připravené pomocí NH_3

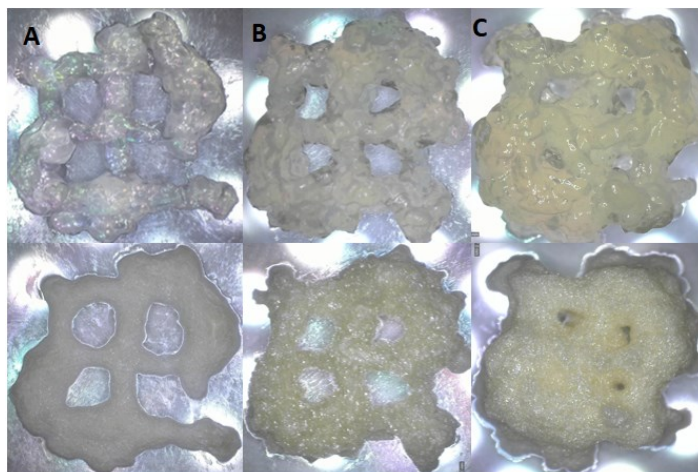
Aktivační činidlo, kterým byl v prvním případě čpavek (NH_3), má molekuly uspořádané do tvaru trojúhelníkové pyramidy. Množství přidaného čpavku vždy odpovídalo 0,05 ml na 1 ml želatiny. Začátek gelace síťovací reakce, při které byl čpavek použit, byl pozorován kolem 3 minuty.

7.1.1 Poměr želatiny k DEX-OX 1 ku 1

U první série vzorků byl použit poměr želatiny k dex-ox (1:1), tzn. že na 1 ml želatiny připadal 1 ml DEX-OX. Připravený vzorek byl po smíchání převeden do stříkačky a následně umístěn do tiskové hlavy 3D tiskárny. Samotný tisk byl proveden až po 10 minutách od začátku síťovací reakce (po přidavku NH_3). Vzorek byl tištěn na PS misku o průměr 3,5 cm v různém počtu vrstev (1, 3, 5). Po vytisknutí byl vzorek vyfocen, zamražen a následně lyofilizován.

7.1.1.1 Vzorky připravené z hovězí želatiny s označením 1-B-N

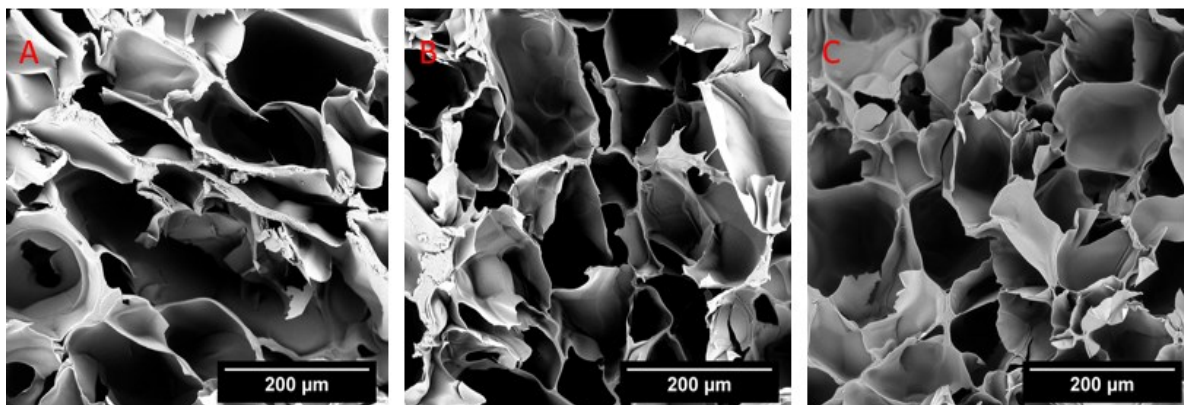
První sada vzorků s hovězí želatiny (v poměr (1:1)) iniciována NH_3 , tištěná s různým počtem vrstev (1, 3, 5) před a po lyofilizaci, je zobrazena na obrázku č. 30.



Obrázek č. 30 – Vytisknuté vzorky I-B-N (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

Na obrázku č. 30 je vidět, že s rozdílným počtem vrstev, se výrazně liší výsledná struktura. U nativních vzorků s rostoucím počtem vrstev dochází k jejich postupnému slnutí, s následným uzavřením vnitřního prostoru (navrženého 3D modelu), způsobeného lokálním nahromaděním materiálu. Pozorovaný defekt bude pravděpodobně souviset s viskozitou materiálu. Při tisku hraje roli i použitá špička injekční stříkačky, která slouží jako výstupní štěrbinu pro materiál. Tato špička má sbíhavou štěrbinu, díky čemuž v ní dochází k narůstání napětí po délce špičky, což má za následek narůstání materiálu za výstupní štěrbinou vlivem nekontinuálního toku. K eliminaci tohoto jevu by mohlo dojít použitím špičky ve tvaru jehly. Ta díky svému dlouhému, nesbíhavému tvaru dodá materiálu dostatek času k relaxaci a eliminuje tak vysoké napětí, které způsobí narůstání na konci výstupní štěrbiny. Použití špičky ve tvaru jehly však bylo nemožné, neboť síla potřebná k protlačení materiálu skrz tuto štěrbinu byla nad rámec možností použité tiskové hlavy a tisklo se tedy pouze špičkou se sbíhavou štěrbinou ($d = 0,41\text{mm}$). Tisk první sady byl zpočátku náročný na vyladění nastavení, ale po pár testovacích vzorcích se podařilo vytisknout všechny vzorky.

Po lyofilizaci tištěných vzorků je vidět, že došlo ke ztrátě rozlišení tištěných vrstev. Nejvýrazněji je tento efekt pozorován u vzorku C. Vnitřní část modelu byla zcela zaplněna materiálem. Lyofilizované vzorky byly následně rozřezány ve vertikálním směru a analyzovány pomocí SEM, jehož výsledky lze vidět na obrázku č. 31.



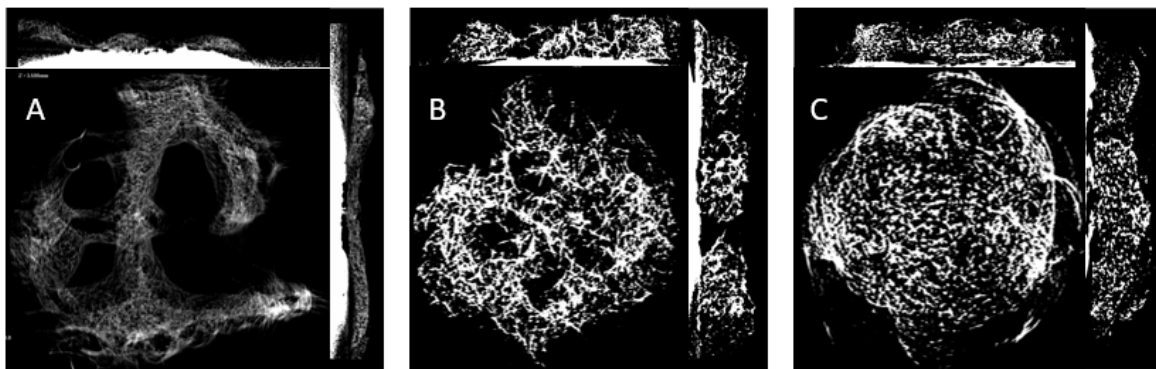
Obrázek č. 31 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků I-B-N (pořizené pomocí SEM).
Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 µm.

Ze SEM snímků je patrný rozdíl ve velikosti i tvaru zobrazených pórů. Většinu snímku tvoří otevřené póry (v místě řezu vzorku) o velikosti 100 mikrometrů a méně. Tuto skutečnost potvrzuje i provedená analýza porozity pomocí *Image J*, jejíž výsledky shrnuje tabulka č. 3. Nejvyšší počet pórů byl potvrzen u vzorku A, zatímco vzorky B a C, obsahují jejich srovnatelný počet. Z důvodu zpřesnění informací o porozitě vzorku v celém jeho objemu, nikoliv jen v místě řezu vzorku, byla provedena i jejich analýza s využitím CT.

Tabulka 3 – Analýza snímku ze SEM pomocí programu *Image J*.

Počet vrstev	Počet pórů	Celková plocha (μm^2) $\cdot 10^3$	Plocha jednoho póru (μm^2) $\cdot 10^3$	Procento obsazenosti (%)
1	46,60 ± 11,12	5,9 ± 14,5	1,33 ± 0,22	20,2 ± 4,5
3	18,4 ± 4,5	179,3 ± 8,9	104,4 ± 0,72	63,6 ± 3,4
5	23,2 ± 2,2	169,9 ± 4,3	7,16 ± 0,63	58,2 ± 1,6

Pomocí tomografu byla provedena analýza v celém objemu vzorku. Jednotlivé složené řezy analyzovaných vzorků, můžeme vidět na obrázku č. 32. S rostoucím počtem vrstev má rekonstruovaný obraz lepší rozlišení. Postupný nárůst porozity pozorujeme při pohledu na obrázky zleva doprava. Na obrázku A, reprezentující 1 tiskovou vrstvu, můžeme vidět strukturu a porozitu, která ve srovnání s obrázkem B (3vrstvy) působí velmi jemně. Obrázek B má velmi dobře viditelné vnitřní póry a vnitřní prostory. U obrázku C, který odpovídá 5 vrstvám, je vnitřní struktura spíše různorodá a nelze u ní rozlišit jednotlivé póry, jako již u zmíněného obrázku B.



Obrázek č. 32 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek I-B-N.

Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

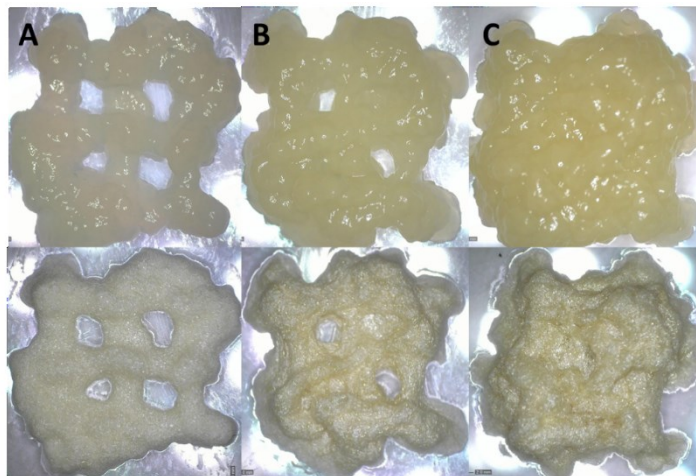
Při zhodnocení porozity provedené v celém objemu vzorků, uvedené v tabulce č. 4 je vidět, že s rostoucím počtem natisknutých vrstev, roste počet detekovaný pórů v matrici. Nejvyšší podíl pórů byl však detekován u vzorku B (3 vrstvy). Tato skutečnost, může být způsobena několika různými vlivy např. samotnou lyofilizací (rozdíl před a po lyofilizací), CT analýzou či jejím vyhodnocením.

Tabulka 4 – CT analýza řezů vzorku I-B-N pomocí programů DataViewer a CTAn.

Počet vrstev	Počet pórů	Objem pórů (μm^3)	Procento obsazenosti (%)
1	8381	$72,25 \cdot 10^9$	74,14
3	31430	$316,7 \cdot 10^9$	73,66
5	13845	$260,9 \cdot 10^9$	73,08

7.1.1.2 Vzorky připravené z králičí želatiny s označením I-R-N

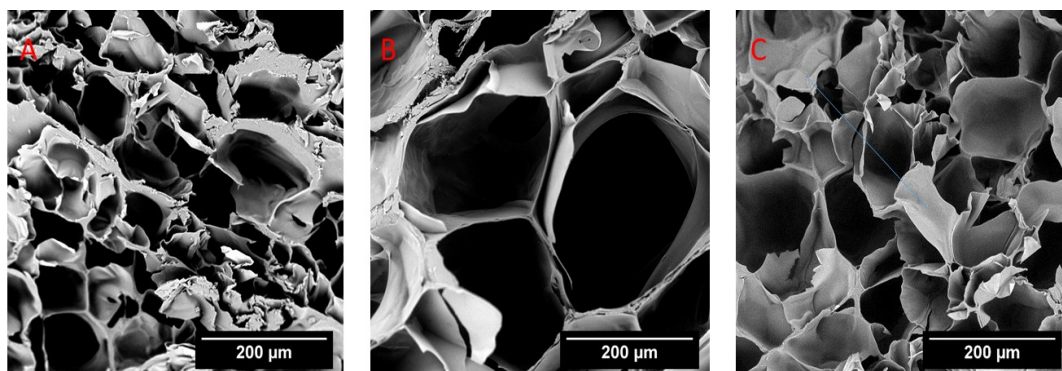
Druhá sada vzorků připravená z králičí želatiny (poměr (1:1)) iniciována NH_3 , tištěná s různým počtem vrstev (1, 3, 5) před a po lyofilizaci, je zobrazena na obrázku č. 31.



Obrázek č. 33 – Vytisknuté vzorky I-R-N (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

Z obrázku je zřejmé, že u nativních vzorků (horní řada A-C) je vidět opět postupné slinutí vrstev, s následným uzavřením vnitřního prostoru (navrženého 3D modelu), způsobeného lokálním nahromaděním materiálu. Tento defekt byl pozorován i u předchozí sady s hovězí želatinou. Příčinou může být i fakt, že králičí želatina má daleko vyšší viskozitu (obsah sušiny 86,5 %, $M_w = 157\,800$ g/mol). Vlivem vyšší viskozity bude pravděpodobně docházet k mnohem vyššímu narůstání napětí po délce špičky, jehož výsledkem bude právě pozorované narůstání materiálu za výstupní šterbinou. Při pokusu použít špičku ve tvaru jehly, a tím i k vyrelaxování napětí, se nepodařilo jí protlačit materiál.

U lyofilizovaných vzorků (spodní řada obr. č. 33) je podobnost se vzorky v nativním stavu, mnohem lepší. I přesto, že lze jen stěží rozlišit jednotlivé tiskové vrstvy. Lyofilizované vzorky byly následně rozřezány ve vertikálním směru a analyzovány pomocí SEM, jehož výsledky lze vidět na obrázku č. 34.



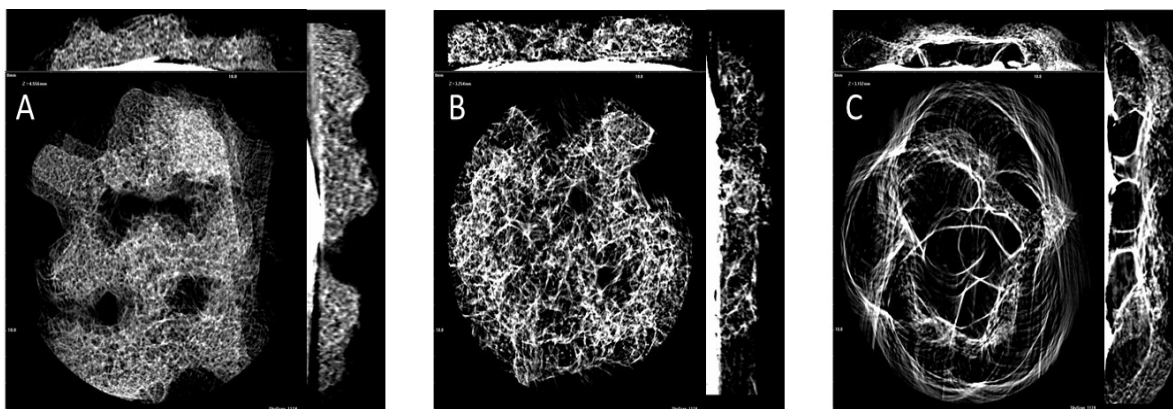
Obrázek č. 34 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků I-R-N (pořízené pomocí SEM). A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 µm.

Ze SEM snímků je patrná rozdílnost ve velikosti i tvaru zobrazených pórů. Většinu snímku tvoří otevřené póry (v místě řezu vzorku) o velikosti 100 mikrometrů a méně. Výjimkou je vzorek B (3 vrstvy), u kterého lze pozorovat také póry o velikosti přes 200 mikrometrů. Při provedení analýzy porozity pomocí *Image J*, jejíž výsledky shrnuje tabulka č. 5, vidíme, že největší průměrnou plochu jednoho póru mají vzorky na obrázku C (5 vrstev). Nejvyšší počet pórů byl potvrzen u vzorku A a B, které obsahují téměř shodný počet pórů. U vzorku C odpovídá plocha jednoho póru nejvyšší hodnotě. Příčinou poklesu porozity může být postupné slinutí dalších vrstev tištěných na sebe.

Tabulka 5 – Analýza snímku ze SEM pomocí programu Image J.

Počet vrstev	Počet pórů	Celková plocha (μm^2) * 10^3	Plocha jednoho póru (μm^2) * 10^3	Procento obsazenosti (%)
1	15,80 ± 1,46	197,4 ± 3,2	13,2 ± 1,3	68,77 ± 2,20
3	15,40 ± 3,21	178,8 ± 8,1	12,6 ± 1,3	61,10 ± 2,80
5	9,40 ± 2,07	172,9 ± 12,7	19,5 ± 3,9	61,62 ± 4,11

Pomocí tomografu byla provedena analýza porozity v celém objemu vzorku. Jednotlivé složené řezy analyzovaných vzorků, můžeme vidět na obrázku č. 35. S rostoucím počtem vrstev má rekonstruovaný obraz lepší rozlišení porozity. Postupný nárůst velikosti pórů pozorujeme při pohledu na obrázky zleva doprava. Na obrázku A, reprezentující 1 tiskovou vrstvu, můžeme slabě vidět strukturu a jednotlivé póry. Na obrázku B (3 vrstvy) je vidět zvětšení vnitřních pórů a snížení jejich počtu oproti obrázku A. U obrázku C (5 vrstev) tvoří vnitřní strukturu spíše prázdný prostor, případně tzv. makropóry. Ty budou pravděpodobně odpovídat vnitřní struktuře tiskového modelu.



Obrázek č. 35 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 1-R-N.

A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

Při porovnání výsledků porozity provedené v celém objemu vzorků, uvedené v tabulce č. 6 je vidět, že s rostoucím počtem natisknutých vrstev, klesá počet detekovaný pórů v matici, zatímco jejich celkový objem pórů spíše roste. Nejvyšší počet pórů byl detekován u vzorku A (1 vrstva), zatímco největší celkový objem u vzorku C (5 vrstev). Tato skutečnost, může být způsobena několika různými vlivy např. samotnou lyofilizací (rozdíl před a po lyofilizací), CT analýzou či jejím vyhodnocením.

Tabulka 6 – CT analýza řezů vzorku 1-R-N pomocí programů DataViewer a CTAn.

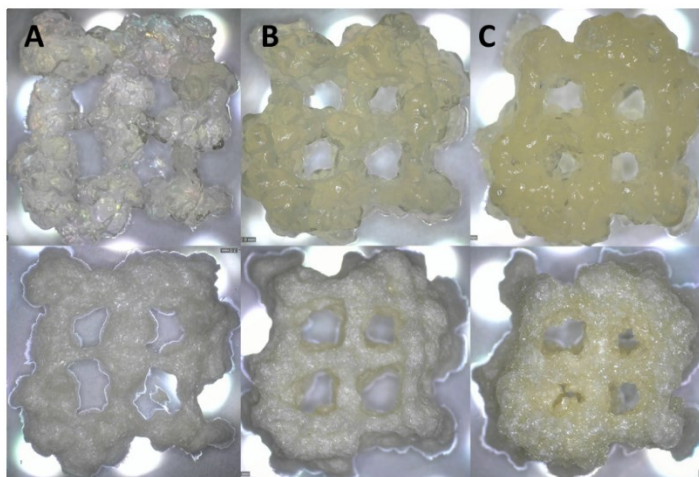
Počet vrstev	Počet pórů	Objem pórů (μm^3)	Procento obsazenosti póry (%)
1	12385	111,7. 10^9	55,18
3	11873	126,7. 10^9	56,81
5	9688	182,8. 10^9	54,65

7.1.2 Poměr želatiny k DEX-OX 2 ku 1

U druhé série vzorků byl použit vyšší poměr želatiny k dex-ox na (2:1), tzn. že na 1 ml želatiny připadalo 0,5 ml DEX-OX. Připravený vzorek byl po smíchání převeden do stříkačky a následně umístěn do tiskové hlavy 3D tiskárny. Samotný tisk byl proveden až po 10 minutách od začátku síťovací reakce (po přidavku NH_3). Vzorek byl tištěn na PS misku o průměr 3,5 cm v různém počtu vrstev (1, 3, 5). Po vytisknutí byl vzorek vyfocen, zamražen a následně lyofilizován.

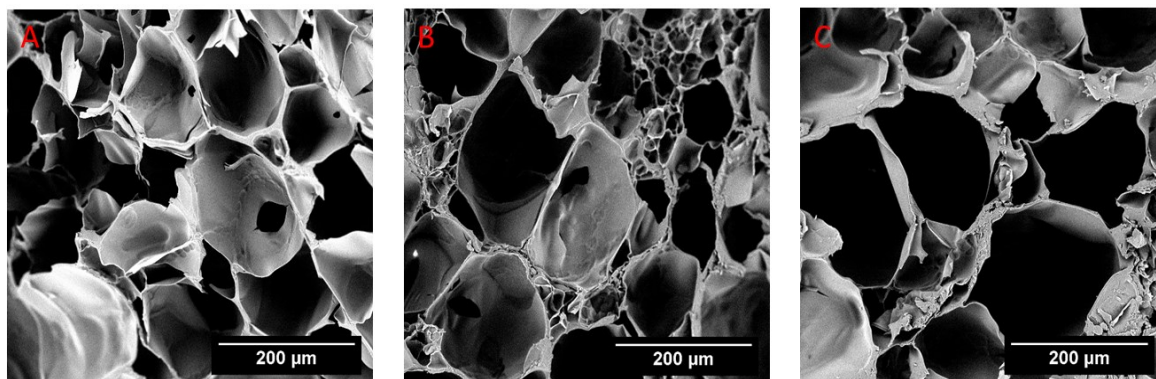
7.1.2.1 Vzorky připravené z hovězí želatiny s označením 2-B-N

Třetí sada vzorků, která byla tvořena hovězí želatinou (poměr (2:1)) iniciována NH_3 , tištěná s různým počtem vrstev (1, 3, 5) před (horní řada snímků) a po lyofilizaci (spodní řada snímků), je zobrazena na obrázku č. 36.



Obrázek č. 36 – Vytisknuté vzorky 2-B-N (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

Při prvním pohledu na obrázek vtištěné struktury (snímek A) je mnohem lépe detekovatelná trajektorie navrženého 3D modelu. U vzorků s vyšším poměrem želatiny v matrici, nedocházelo k tak výraznému nahromadění materiálu na jednom místě. Výjimku tvoří pouze vzorek C (5 vrstev), u kterého je v levém spodním rohu vidět slinutí natisknutých vrstev. Jak už bylo zmíněno výše, tento defekt souvisí s přílišným nahromaděním materiálu v důsledku použité špičky kónického tvaru. Výrazného zlepšení, je vidět i u lyofilizovaných vzorků, které byly následně rozřezány ve vertikálním směru a analyzovány pomocí SEM.



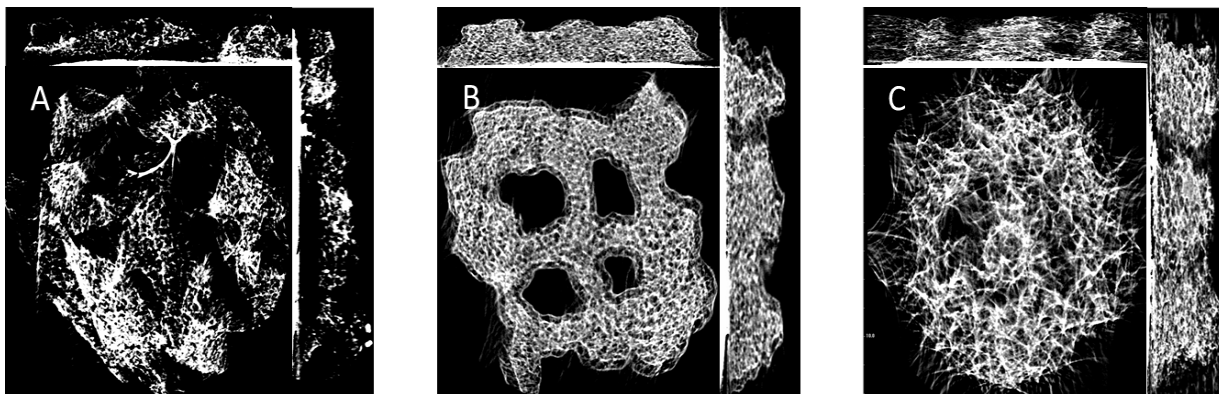
Obrázek č. 37 - Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 2-B-N (pořízené pomocí SEM). Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 µm.

Na snímcích pořízených ze SEM (viz obr. č. 37) je patrná rozdílnost ve velikosti i tvaru zobrazených pórů. Na obrázcích B a C byla potvrzena přítomnost velmi malých pórů (do 50 mikrometrů), které se shlukují pouze v jednom místě. Jednou z možných příčin mohlo být přidání vyšší množství želatiny, která v daném místě reagovala s aktivačním činidlem po kratší dobu (vliv míchání). Na většině snímků jsou zřejmé otevřené póry (v místě řezu vzorku) o velikosti 150 mikrometrů a méně. U vzorku C (5 vrstev) pozorujeme také póry o velikosti přes 150 mikrometrů. U tohoto vzorku byla rovněž potvrzena největší průměrná plocha jednoho póru. Celkový počet pórů s rostoucím počtem tiskových vrstev klesá, zatímco celkový objem pórů roste.

Tabulka 7 – Analýza snímku ze SEM pomocí programu Image J.

Počet vrstev	Počet pórů	Celková plocha (μm^2)*10^3	Plocha jednoho póru (μm^2)*10^3	Procento obsazenosti (%)
1	41,80 ± 6,62	147,1 ± 15,9	4,1 ± 0,9	51,11 ± 5,50
3	30,60 ± 7,20	181,6 ± 7,7	7,9 ± 2,2	63,45 ± 2,70
5	28,60 ± 2,00	190,1 ± 5,8	6,9 ± 0,4	66,34 ± 2,10

Jednotlivé složené řezy analyzovaných vzorků pomocí CT, můžeme vidět na obrázku č. 38. S rostoucím počtem vrstev má rekonstruovaný obraz lepší rozlišení vnitřní porozity a lépe odpovídá reálnému objemu vzorku. Postupný nárůst velikosti pórů lze pozorovat při pohledu zleva doprava. Na obrázku A, reprezentující 1 tiskovou vrstvu, lze jen nepatrně vidět tištěnou strukturu a jednotlivé póry. O něco lépe se to podařilo v případě obrázku B (3 vrstvy), u kterého se podařilo rozlišit přítomné vnitřní póry a to v celém řezu celého vzorku. U obrázku C (5 vrstev) vidíme zvětšení pórů, kde ovšem vzhled řezu příliš neodpovídá jeho reálné lyofilizované podobě (viz obrázek č. 36).



Obrázek č. 38 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 2-B-N.

Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

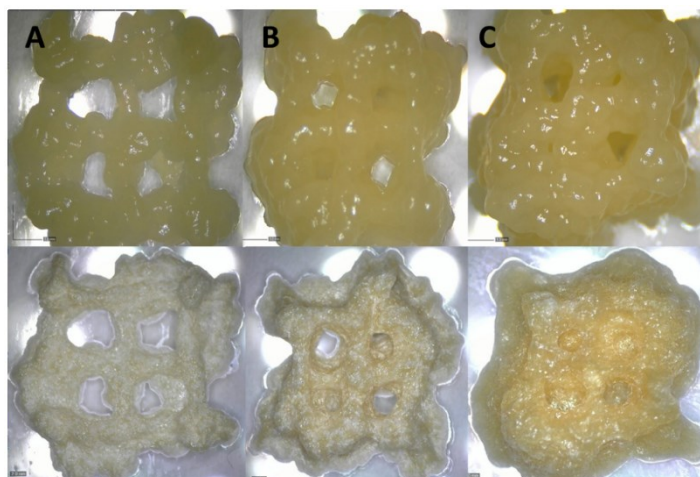
Při porovnání výsledků porozity provedené v celém objemu vzorků, uvedené v tabulce č. 8 je vidět, že s rostoucím počtem natisknutých vrstev, roste počet detekovaný pórů v matrici, a roste i celkový objem pórů. Nejvyšší počet pórů, stejně jako největší objem, byl detekován u vzorku C (5 vrstev). Tyto informace tak potvrzují předpoklad, že s rostoucím počtem tiskových vrstev roste jednak počet vnitřních pórů i tak i celkový objem.

Tabulka 8 – CT analýza řezů vzorku 2-B-N pomocí programů DataViewer a CTAn.

Počet vrstev	Počet pórů	Objem pórů (μm^3)	Procento obsazenosti (%)
1	3851	$195,8 \cdot 10^9$	87,82
3	27991	$237,9 \cdot 10^9$	57,41
5	40778	$450,3 \cdot 10^9$	56,59

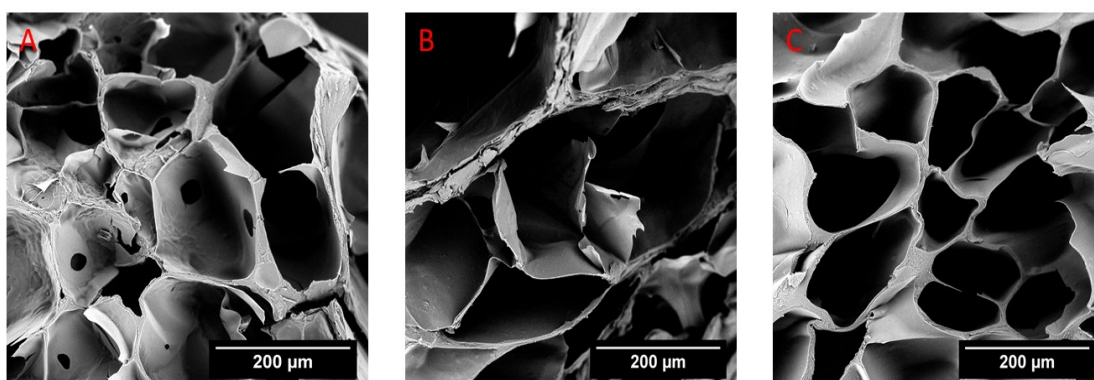
7.1.2.2 Vzorky připravené z králičí želatiny s označením 2-R-N

Čtvrtá sada vzorků z králičí želatiny (poměr (2:1)) iniciována NH_3 , tištěná s různým počtem vrstev (1, 3, 5) před a po lyofilizaci, je zobrazena na obrázku č. 39.



Obrázek č. 39 – Vytisknuté vzorky 2-R-N (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

Při tisku vzorků s králičí želatinou se mnohem výrazněji projevil efekt její vyšší viskozity. S nárůstem viskozity docházelo mnohem častěji k nahromadění tiskového materiálu v jednotlivých částech vzorku, a jejich následnému slnutí. Výsledkem je zcela uzavřený vnitřní prostor modelu na snímku B a C. Při porovnání nativních (horní řada) a lyofilizovaných (spodní řada) snímků, lze nalézt jen nepatrnou shodu. Při lyofilizaci došlo zcela ke ztrátě rozlišení tiskových vrstev, které se nejvíce projevilo v případě vzorku C (5 vrstev).



Obrázek č. 40 - Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 2-R-N (pořízené pomocí SEM). Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 µm.

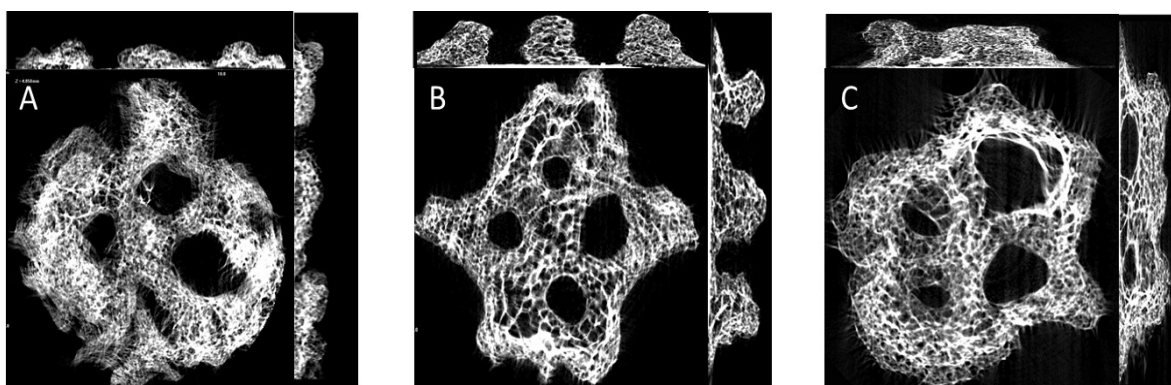
Při porovnání SEM snímků je vidět rozdílná velikost i tvar zobrazených pórů. Na snímku B (3 vrstvy) jsou vidět výrazně větší póry než u ostatních vzorků. Většinu snímku tvoří otevřené póry (v místě řezu vzorku) o velikosti 150 mikrometrů a méně. Při provedení analýzy porozity pomocí *Image J*, jejíž výsledky shrnuje tabulka č. 9, vidíme, že největší

průměrnou plochu jednoho póru mají póry na obrázku C (5 vrstev). Počet pórů byl pro všechny 3 zkoumané vzorky téměř shodný. Nejvyšší počet pórů byl potvrzen u vzorku B (3 vrstvy). Nejvyšší celková plocha pórů byla potvrzena u vzorku C (5 vrstev), jehož hodnota je 10x větší než u předešlých vzorků.

Tabulka 9 – Analýza snímku ze SEM pomocí programu Image J.

Počet vrstev	Počet pórů	Celková plocha (μm^2)* 10^3	Plocha jednoho póru (μm^2)* 10^3	Procento obsazenosti (%)
1	24,60 ± 1,81	170,1 ± 11,3	18,7 ± 11,3	66,92 ± 1,60
3	25,80 ± 3,50	164,2 ± 12,4	21,1 ± 13,3	59,13 ± 3,80
5	23,20 ± 2,50	2747,3 ± 14,5	129,6 ± 19,1	66,03 ± 3,50

Při analýze jednotlivých CT snímků, zobrazených na obrázku č. 41, je vidět, že s rostoucím počtem vrstev má rekonstruovaný obraz lepší rozlišení vnitřní porozity. Postupný nárůst velikosti pórů pozorujeme při pohledu na obrázky zleva doprava. Na obrázku A, reprezentující 1 tiskovou vrstvu, lze pouze stěží rozlišit reálnou strukturu a jednotlivé póry. Na obrázku B (3 vrstvy) lze pozorovat zvětšení vnitřních pórů a snížení jejich počtu. Na obrázku C jsou velmi dobře vidět póry v širokém zastoupení tvarů a velikostí. U obrázku C (5 vrstev) naopak vidíme zvětšení pórů, a navíc jeho rekonstruovaný tvar odpovídá lyofilizovanému vzorku s viditelnými makropóry (viz obrázek č. 41).



Obrázek č. 41 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 2-R-N.

Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

Při porovnání výsledků porozity v celém objemu vzorků, uvedené v tabulce č. 10, bylo potvrzeno, že s rostoucím počtem natisknutých vrstev, roste počet detekovaný pórů v matici, a tím i celkový objem pórů. Nejvyšší počet pórů, stejně jako celkový objem byl zjištěn u vzorku C (5 vrstev). Tyto informace tak potvrzují předpoklad, že s rostoucím počtem tiskových vrstev poroste počet vnitřních pórů i jejich celkový objem.

Tabulka 10 – CT analýza řezů vzorku 2-R-N pomocí programů DataViewer a CTAn.

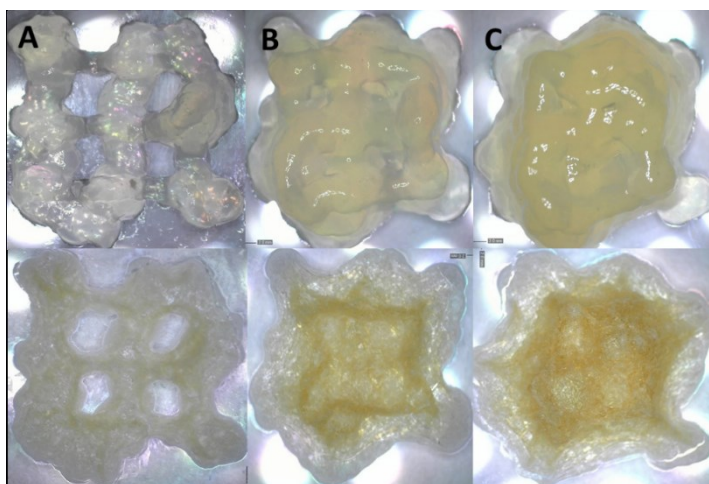
Počet vrstev	Počet pórů	Objem pórů (μm^3)	Procento obsazenosti póry (%)
1	7313	$152,5 \cdot 10^9$	69,24
3	15626	$354,5 \cdot 10^9$	73,23
5	32890	$394,3 \cdot 10^9$	58,16

7.1.3 Poměr želatiny k DEX-OX 3 ku 1

U třetí série vzorků byl poměr želatiny k dex-ox zvýšen na poměr (3:1), tzn. že na 1,5 ml želatiny připadalo 0,5 ml DEX-OX. Připravený vzorek byl po smíchání převeden do stříkačky a následně umístěn do tiskové hlavy 3D tiskárny. Samotný tisk byl proveden až po 10 minutách od začátku síťovací reakce (po přidavku NH_3). Vzorek byl tištěn na PS miskou o průměr 3,5 cm v různém počtu vrstev (1, 3, 5). Po vytisknutí byl vzorek vyfocen, zamražen a následně lyofilizován.

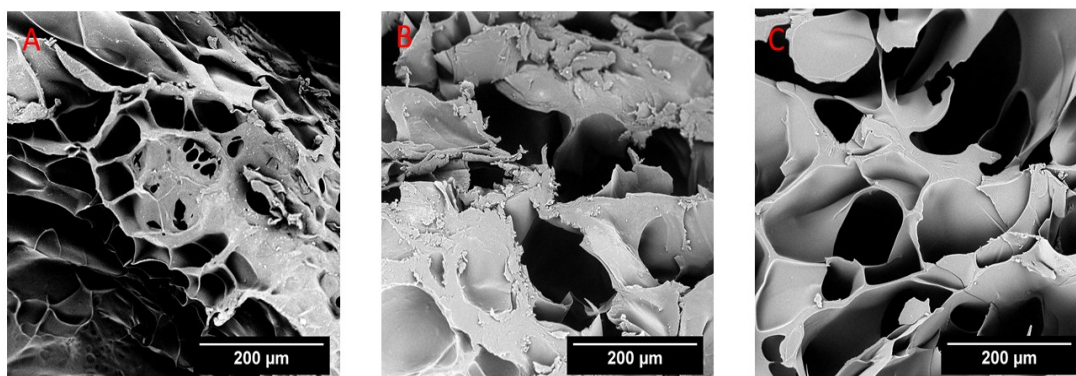
7.1.3.1 Vzorky připravené z hovězí želatiny s označením 3-B-N

Pátá sada vzorků z hovězí želatiny (poměr (3:1)) iniciována NH_3 , tištěná s různým počtem vrstev (1, 3, 5) před a po lyofilizaci, je zobrazena na obrázku č. 42.



Obrázek č. 42 – Vytisknuté vzorky 3-B-N (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

Na obrázku č. 42 je vidět, že s rozdílným počtem vrstev, se výrazně lišila i jejich výsledná struktura, která spíš připomínala hromadu navršeného materiálu. Čím víc vrstev bylo natištěno, tím víc docházelo k jejich slinutí. Vnitřní prostor modelu byl zcela uzavřen (nahromadění materiálu). Lyofilizované vzorky (spodní řada) svým tvrem připomínaly spíše film. Nejvíce je to viditelné v případě vzorku C (5 vrstev).



Obrázek č. 43 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 3-B-N (pořízené pomocí SEM). Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 µm.

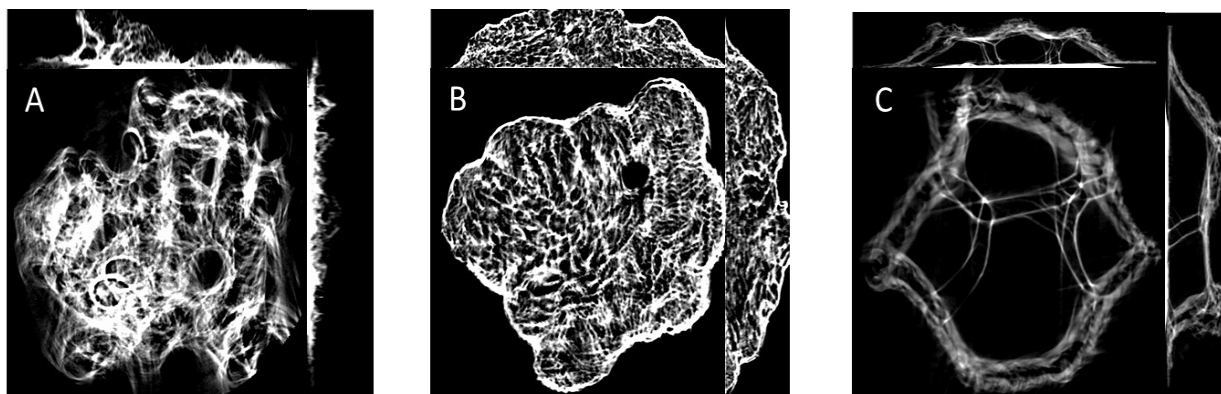
Na SEM snímku A (1 vrstva) byla potvrzena přítomnost pouze několika pórů, což bylo pravděpodobně způsobeno vysokým podílem želatiny, protože při tak vysokém podílu želatiny dochází k jejímu velmi pomalému síťování. Obdobně tomu bylo i v případě vzorků B (3 vrstvy) a C (5 vrstev). Většinu snímku tvoří spíše otevřené póry (v místě řezu vzorku) o velikosti 100 mikrometrů a méně. Největší průměrná a celková plocha póru byla potvrzena u vzorku A (1 vrstva). To může být způsobeno nepřesnou analýzou při rozpoznávání pórů v programu *Image J*. Počet pórů byl téměř shodný u vzorku A (1 vrstva) a B (3 vrstvy).

Tabulka 11 – Analýza snímku ze Sem pomocí programu *Image J*.

Počet vrstev	Počet pórů	Celková plocha (μm^2) * 10^3	Plocha jednoho póru (μm^2) * 10^3	Procento obsazenosti (%)
1	9,20 ± 0,50	230,3 ± 6,51	25,3 ± 1,19	80,13 ± 2,2
3	8,80 ± 1,00	90,12 ± 27,1	9,67 ± 2,61	35,99 ± 7,70
5	13,20 ± 3,80	168,1 ± 11,2	17,4 ± 4,58	58,67 ± 3,90

CT analýza celého objemu vzorků, které je přiložena na obrázku č. 44 ukázala, že s rostoucím počtem vrstev má rekonstruovaný obraz lepší rozlišení vnitřní porozity. Postupný nárůst velikosti pórů pozorujeme při pohledu na obrázky zleva doprava. Na obrázku A,

reprezentující 1 tiskovou vrstvu, můžeme vidět vnitřní strukturu. U tohoto vzorku obsahují naměřená data chybu, způsobenou částečným zkroucením vzorku (vliv zvýšené teploty uvnitř měřicí komory CT). Na obrázku B (3vrstvy) je vnitřní struktura mnohem lépe zobrazena. Můžeme zde velmi dobře rozlišit póry v širokém zastoupení tvarů a velikostí. U obrázku C (5 vrstev) došlo k nárůstu velikosti pórů až makropórů, jejichž vzhled řezu odpovídá lyofilizovanému vzorku (viz obrázek č. 44).



Obrázek č. 44 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 3-B-N.

Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

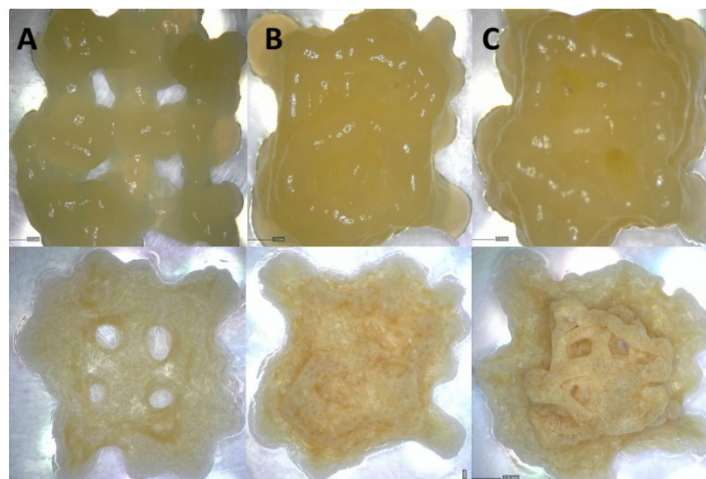
Při porovnání výsledků porozity provedené v celém objemu vzorků, uvedené v tabulce č. 12 je vidět, že s rostoucím počtem natisknutých vrstev, roste počet detekovaný pórů v matici, spolu s jejich celkovým objemem. Nejvyšší počet pórů byl detekován u vzorku B (3 vrstvy). Celkový největší objem pórů byl, především díky obsahu velkých makropórů, stanoven u vzorku C (5vrstev).

Tabulka 12 - CT analýza řezů vzorku 3-B-N pomocí programů DataViewer a CTAn.

Počet vrstev	Počet pórů	Objem pórů (μm^3)	Procento obsazenosti póry (%)
1	785	44,3. 10^9	75,27
3	11369	238,5. 10^9	72,28
5	1306	359,5. 10^9	81,19

7.1.3.2 Vzorky připravené z králičí želatiny s označením 3-R-N

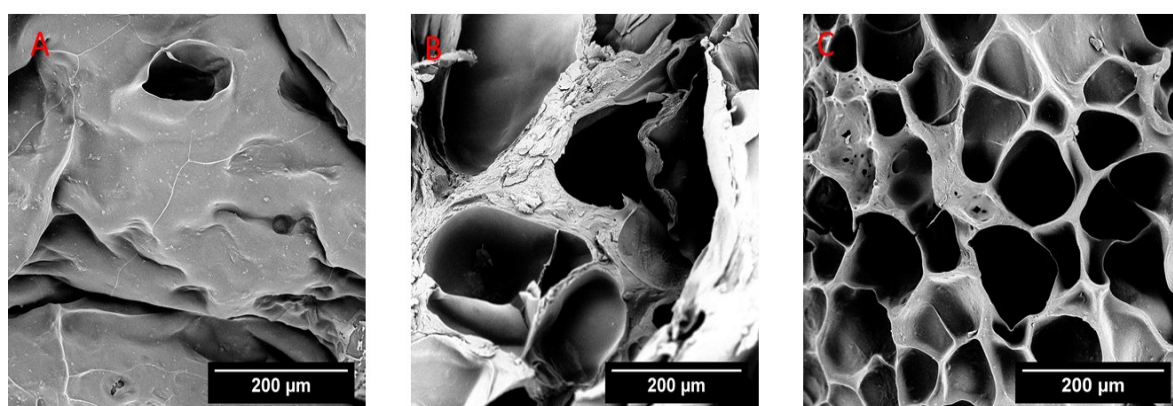
Šestá sada vzorků z králičí želatiny (poměr (3:1)) iniciována NH_3 , tištěná s různým počtem vrstev (1, 3, 5) před a po lyofilizaci, je zobrazena na obrázku č. 45.



Obrázek č. 45 – Vytisknuté vzorky 3-R-N (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

Jak už jde na první pohled vidět, s rozdílným počtem vrstev, se příliš neliší výsledná struktura a spíše než tiskový model, vzorek připomíná hromadu navršeného materiálu. Příčinu tohoto chování lze s jistotou najít ve vysokém podílu králičí želatiny. Na první pohled je vidět slinutí jednotlivých vrstev. Zcela došlo k uzavření vnitřního prostoru modelu (důsledek nahromadění materiálu). Při pokusu použít místo tiskové špičky ve tvaru kónusu, špičku ve tvaru jehly, nebylo možné tiskový materiál skrze špičku protlačit.

U lyofilizovaných vzorků (spodní řada) lze jen velmi těžko najít podobnost se vzorky nativními. Tento jev se nejvíce projevil v případě vzorku B (3vrstvy) a C (5 vrstev).



Obrázek č. 46 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 3-R-N (pořízené pomocí SEM). A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 µm.

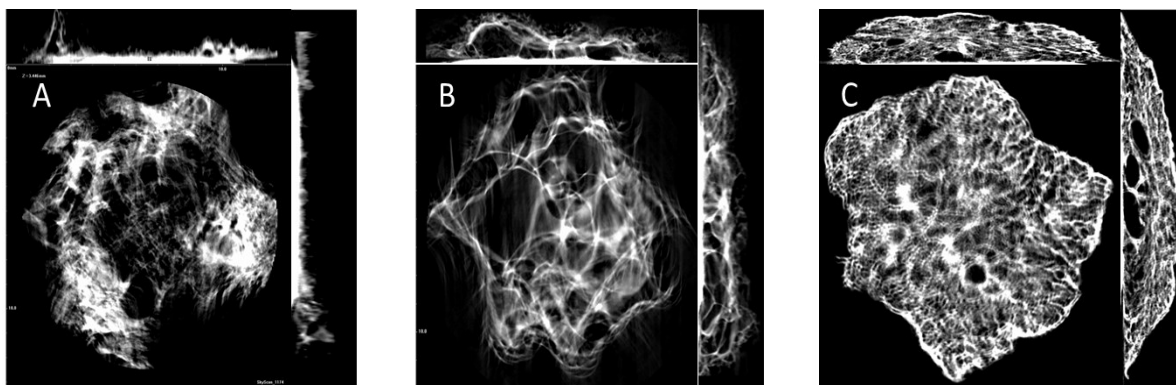
Na snímcích pořízených ze SEM (viz obrázek č. 46) je vidět rozdíl ve velikosti, tvaru i počtu zobrazených pórů. Na snímku A (1 vrstva) je vidět pouze jediný pór, který splňuje definici

popsanou v teoretické části. To je způsobeno vysokým podílem želatiny ve směsi, protože při tak vysokém podílu želatiny nemusí docházet k síťování v takové míře jako u předchozích poměrů, a pro tisk pouze 1 vrstvy je tento poměr a použitá želatina nevhodný. U vzorků B (3 vrstvy) a C (5 vrstev) byla potvrzena přítomnost většího počtu pórů. Většinu snímku B a C tvoří otevřené póry (v místě řezu vzorku) o velikosti 150 mikrometrů a méně. Při provedení analýzy porozity pomocí *Image J*, jejíž výsledky shrnuje tabulka č. 13, vidíme, že největší průměrnou plochu jednoho póru mají póry na obrázku C (5 vrstev), zatímco největší celkovou plochu pórů má vzorek B (3 vrstvy). Počet pórů u vzorku A (1 vrstva) je mnohem vyšší, než bychom čekali (viz obrázek č. 46). Tento fakt může být způsoben nepřesnou analýzou pórů. Nejvyšší počet pórů spolu s celkovou plochu pórů má vzorek B (3 vrstvy). Z důvodu zpřesnění informací o porozitě vzorku v celém jeho objemu, nikoliv jen v místě řezu vzorku, byla provedena analýza s využitím CT.

Tabulka 13 – Analýza snímku ze SEM pomocí programu Image J.

Počet vrstev	Počet pórů	Celková plocha (μm^2) * 10^3	Plocha jednoho póru (μm^2) * 10^3	Procento obsazenosti (%)
1	15,00 ± 2,00	84,87 ± 14,8	5,62 ± 0,60	31,38 ± 4,20
2	28,00 ± 2,00	161,2 ± 7,05	5,88 ± 0,54	57,60 ± 2,60
3	8,40 ± 1,90	138,1 ± 15,0	24,3 ± 10,1	48,80 ± 5,10

Z CT rekonstruovaných snímků zobrazených na obr č. 47, lze předpokládat, že s rostoucím počtem vrstev bude mít rekonstruovaný obraz lepší rozlišení vnitřní porozity. Postupný nárůst velikosti pórů pozorujeme při pohledu na obrázky zleva doprava. Na obrázku č. 47 (1 vrstva), můžeme vidět náznak vnitřní struktury. Na obrázku B (3 vrstvy) je vidět vnitřní struktura, spolu s póry v širokém zastoupení tvarů a velikostí. U obrázku C (5 vrstev) vidíme mnohem menší póry.



Obrázek č. 47 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 3-R-N.
Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

Rovněž lze z CT analýzy vidět, že s rostoucím počtem natisknutých vrstev, roste jak počet detekovaný pórů v matrici, tak i celkový objem pórů. Nejvyšší počet pórů s jejich největším objemem byl detekován u vzorku C (5 vrstev). Naopak velmi nízký počet pórů byl potvrzen v případě vzorku A (1 vrstva), což při pohledu na SEM snímky není nijak překvapivé zjištění (viz obrázek č. 46).

Tabulka 14 – CT analýza řezů vzorku 3-R-N pomocí programů DataViewer a CTAn.

Počet vrstev	Počet pórů	Objem pórů (μm^3)	Procento obsazenosti póry (%)
1	124	20,16. 10^9	71,86
3	1902	117,6. 10^9	55,92
5	2555	293,2. 10^9	68,35

7.2 Materiály připravené pomocí TEA

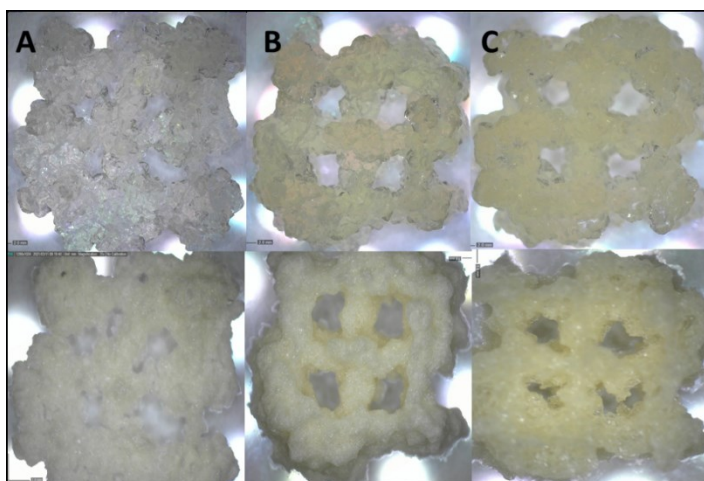
TEA (99 %) na rozdíl od NH_3 (25 %), obsahuje daleko více aktivních center, čímž je daleko účinnější při síťování želatiny. Množství přidávané látky bylo stanoveno výpočtem tak, aby výsledná reakční směs obsahovala stejné množství aktivačního činidla tak, jako v případě NH_3 . Množství přidaného činidla TEA, tak vždy odpovídalo 0,009 ml na 1 ml želatiny. Začátek gelace síťovací reakce, při které byla použita TEA, byl pozorován již kolem 30 vteřin.

7.2.1 Poměr želatiny k DEX-OX 1 ku 1

U sedmé série vzorků byl použit poměr želatiny k dex-ox (1:1), tzn. že na 1 ml želatiny připadal 1 ml DEX-OX. Připravený vzorek byl po smíchání převeden do stříkačky a následně umístěn do tiskové hlavy 3D tiskárny. Samotný tisk byl proveden až po 10 minutách od začátku síťovací reakce (po přidavku TEA). Vzorek byl tištěn na PS misku o průměr 3,5 cm v různém počtu vrstev (1, 3, 5). Po vytisknutí byl vzorek vyfocen, zamražen, lyofilizován a charakterizován.

7.2.1.1 Vzorky připravené z hovězí želatiny s označením 1-B-T

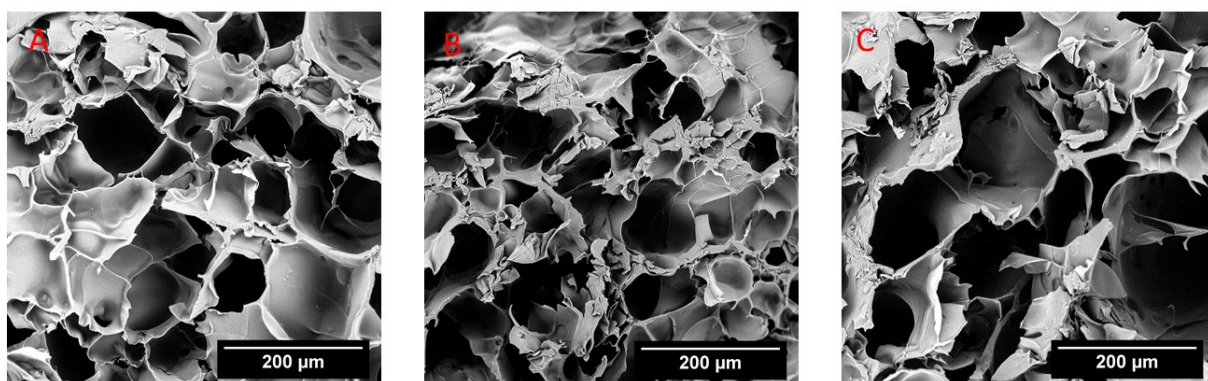
Sedmá sada vzorků z hovězí želatiny (poměr (1:1)) iniciována TEA, tištěná s různým počtem vrstev (1, 3, 5) před a po lyofilizaci, je zobrazena na obrázku č. 48.



Obrázek č. 48 – Vytisknuté vzorky 1-B-T (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

Na obrázku č. 48 je vidět porovnání nativních vzorků (horní řada) se vzorky lyofilizovanými (spodní řada) v závislosti na rostoucím počtu natisknutých vrstev. Při jejich porovnání se vzorky, u nichž byla reakce iniciována pomocí NH_3 (viz obrázek č. 30), vidíme zřetelný rozdíl ve struktuře tištěného materiálu. Tištěný materiál je jakoby více zrnitý, a na první pohled vypadá mnohem stabilněji (z pohledu mechanické stability). Při tisku více vrstev, nedocházelo k takovému slnutí materiálu, jako u předchozích materiálových sad. Samotný tisk materiálu byl mnohem jednodušší a komfortnější, protože i přes viditelné nežádoucí nárůstání materiálu za výstupní šterbinou kónické špičky, odpovídaly natisknuté vzorky 3D modelu se zachovalým vnitřním prostorem modelu. Při pokusu eliminovat nárůstání

materiálu za výstupní šterbinou, použitím špičky ve tvaru protáhlé jehly, se nepodařilo protlačit tiskový materiál skrze jehlu vlivem vysoké viskozity materiálu. Při porovnání lyofilizovaných vzorků (spodní řada) se vzorky nativními lze vidět, že se podařilo zachovat tištěnou strukturu připravených vzorků. I přesto však došlo ke ztrátě rozlišení tiskových vrstev stejně tak jako u předchozích materiálů. Nejvíce se tento efekt projevil u vzorku C s vyšším počtem vrstev (5 vrstev).



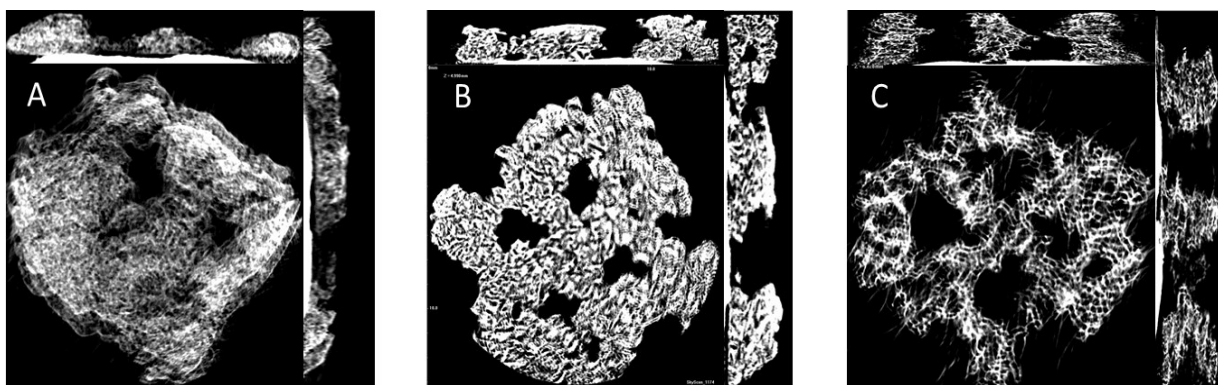
Obrázek č. 49 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 1-B-T (pořízené pomocí SEM).
Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 µm.

Na snímcích pořízených ze SEM je patrná rozdílnost ve velikosti i tvaru zobrazených pórů. Na snímku C (5 vrstev) jsou vidět výrazně větší póry než u ostatních vzorků, kde vzorky A (1 vrstva) a B (3 vrstvy) mají podobné póry (velikost, tvar). Většinu snímku tvoří otevřené póry (v místě řezu vzorku) o velikosti 150 mikrometrů a méně. Při provedení analýzy porozity pomocí *Image J*, jejíž výsledky shrnuje tabulka č. 15, vidíme, že největší průměrnou plochu jednoho póru mají póry na obrázku B (3 vrstvy). Počet pórů nedodrhuje trend vyššího počtu pórů s vyšším počtem tiskových vrstev. Nejvyšší počet pórů obsahoval vzorek A (1 vrstva). Nejvyšší celkovou plochu pórů má vzorek B (3 vrstvy), což poukazuje na jev již viděný u poměru 1 ku 1 s aktivačním činidlem NH_3 (viz tabulka č. 3). Z důvodu zpřesnění informací o porozitě vzorku v celém jeho objemu, nikoliv jen v místě řezu vzorku, byla provedena analýza s využitím CT.

Tabulka 15 – Analýza snímků sady I-B-T ze SEM pomocí programu Image J sady.

Počet vrstev	Počet pórů	Celková plocha (μm^2) * 10^3	Plocha jednoho póru (μm^2) * 10^3	Procento obsazenosti (%)
1	26,80 ± 1,80	156,0 ± 7,4	5,9 ± 0,51	54,52 ± 2,70
3	16,20 ± 1,90	192,4 ± 6,8	10,1 ± 1,7	67,03 ± 2,40
5	20,00 ± 2,40	143,9 ± 4,4	7,6 ± 1,3	50,06 ± 1,50

Pomocí tomografu byla provedena analýza v celém objemu vzorku. Jednotlivé složené řezy analyzovaných vzorků, můžeme vidět na obrázku č. 50. S rostoucím počtem vrstev má rekonstruovaný obraz lepší rozlišení vnitřní porozity. Postupný nárůst velikosti pórů pozorujeme při pohledu na obrázky zleva doprava. Na obrázku A, reprezentující 1 tiskovou vrstvu, můžeme slabě vidět strukturu a jednotlivé póry. Na obrázku B (3 vrstvy) je vidět zvětšení vnitřních pórů a snížení jejich počtu oproti obrázku A. Velmi dobře jsou vidět póry různých tvarů a velikostí. U obrázku C (5 vrstev) lze potvrdit nárůst velikosti pórů s jasně ohraničenými mezerami vnitřní části modelu.



Obrázek č. 50 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek I-B-T.

Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

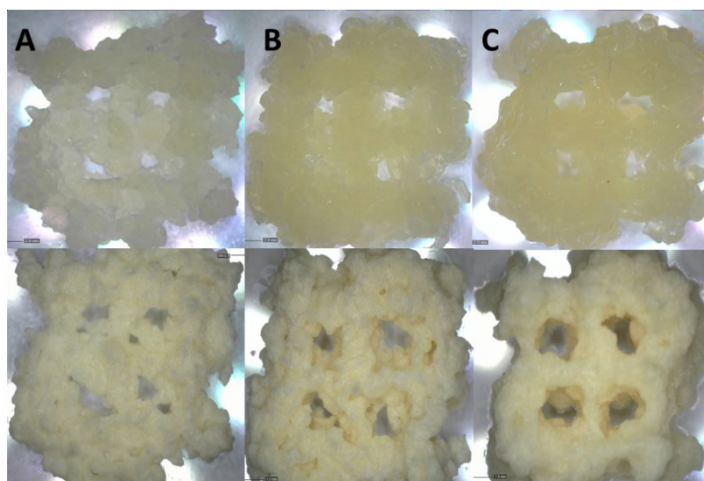
Při porovnání výsledků porozity stanovené v celém objemu vzorků, uvedené v tabulce č. 16 je vidět, že s rostoucím počtem natisknutých vrstev, roste počet detekovaný pórů v matici, stejně jako i celkový objem pórů. Nejvyšší počet pórů spolu s celkovým objemem pórů byl detekován u vzorku C (5 vrstev).

Tabulka 16 - CT analýza řezů vzorku 1-B-T pomocí programů DataViewer a CTAn.

Počet vrstev	Počet pórů	Objem pórů (μm^3)	Procento obsazenosti póry (%)
1	3769	$88,4 \cdot 10^9$	63,97
3	12645	$249,3 \cdot 10^9$	74,72
5	16098	$468,8 \cdot 10^9$	70,88

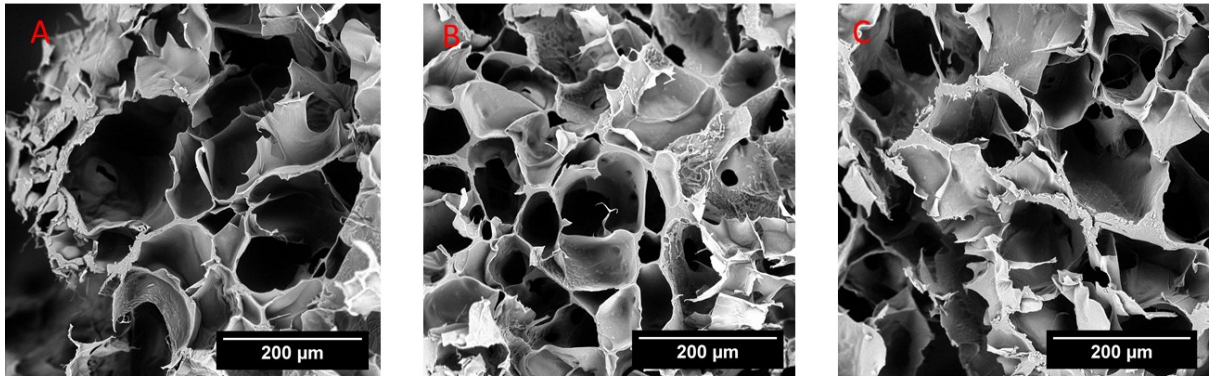
7.2.1.2 Vzorky připravené z králičí želatiny s označením 1-R-T

Osmá sada vzorků z králičí želatiny (poměr (1:1)) iniciována TEA, tištěná s různým počtem vrstev (1, 3, 5) před a po lyofilizaci, je zobrazena na obrázku č. 51.



Obrázek č. 51 – Vytisknuté vzorky 1-R-T (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

Z obrázku č. 51 je vidět zřetelná struktura tištěného materiálu (horní řada snímků). Materiál je jakoby více zrnitý, a na první pohled vypadá mnohem pevněji a stabilněji. I přesto je vidět, že s rostoucím počtem natisknutých vrstev dochází ke slnutí materiálu, které však není tak výrazné, jako u předchozích materiálových sad. Při tisku tohoto materiálu došlo k částečnému uzavření vnitřních částí modelu tisknutým materiálem, způsobeným zřejmě vyšší tuhostí králičí želatiny. U lyofilizovaných vzorků (spodní řada) se podařilo zachovat původní strukturu.



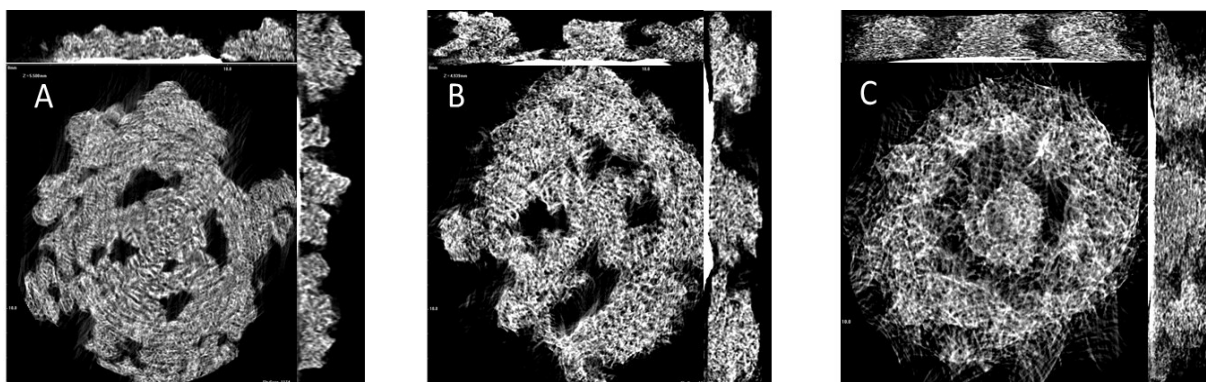
Obrázek č. 52 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 1-B-T (pořízené pomocí SEM). Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 µm.

Na snímcích pořízených ze SEM je patrný rozdíl ve velikosti i tvaru zobrazených pórů. Na snímku A (1 vrstva) jsou vidět výrazně větší póry než u ostatních vzorků. Druhým v pořadí dle velikosti pórů je vzorek C (5 vrstev). Nejmenší viditelné póry byly zjištěny u vzorku B (3 vrstvy). Většinu snímku tvoří otevřené póry s občasným výskytem uzavřených pórů (například v případě vzorku B) o velikosti 150 mikrometrů a méně. Při provedení analýzy porozity pomocí *Image J*, jejíž výsledky shrnuje tabulka č. 17, vidíme, že největší průměrnou plochu jednoho póru mají póry vzorku C (5 vrstev). Nejvyšší počet pórů obsahoval vzorek B (3 vrstvy), který má viditelně nejmenší póry a dle analýzy i nejmenší celkovou plochu pórů. Nejvyšší celkovou plochu pórů má vzorek C (5 vrstev).

Tabulka 17 – Analýza snímku sady 1-R-T ze SEM pomocí programu *Image J*.

Množství vrstev	Počet pórů	Celková plocha (µm ²) * 10 ³	Plocha jednoho póru (µm ²) * 10 ³	Procento obsazenosti (%)
1	25,00 ± 1,40	148,8 ± 1,1	5,9 ± 0,27	51,71 ± 0,40
2	36,60 ± 4,40	129,2 ± 7,9	4,3 ± 0,61	47,86 ± 1,60
3	16,80 ± 1,50	173,6 ± 5,2	10,8 ± 0,78	65,96 ± 3,20

Z provedené CT analýzy jednotlivých řezů analyzovaných vzorků, zobrazené na obrázku č. 53, lze potvrdit, že s rostoucím počtem vrstev má rekonstruovaný obraz lepší rozlišení vnitřní porozity. Postupný nárůst velikosti pórů pozorujeme při pohledu na obrázky zleva doprava. Na obrázku A, reprezentující 1 tiskovou vrstvu, můžeme vidět 3D strukturu s jednotlivými póry, u kterých je vidět přítomnost tzv. kruhového defektu při provedené rekonstrukci obrazu. Na obrázku B (3 vrstvy) zůstaly zachovány vnitřní části tiskového modelu a detekované póry odpovídají spíše těm menším. U obrázku C (5 vrstev) lze vidět nárůst velikosti detekovaných pórů.



Obrázek č. 53 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 1-R-T.

Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

Výsledky porozity z CT analýzy, uvedené v tabulce č. 18, naznačují, že s rostoucím počtem natisknutých vrstev, roste počet detekovaný pórů v matrici, a roste i celkový objem pórů. Nejvyšší počet pórů byl detekován u vzorku C (5 vrstev).

Tabulka 18 – CT analýza řezů vzorku 1-R-T pomocí programů DataViewer a CTAn.

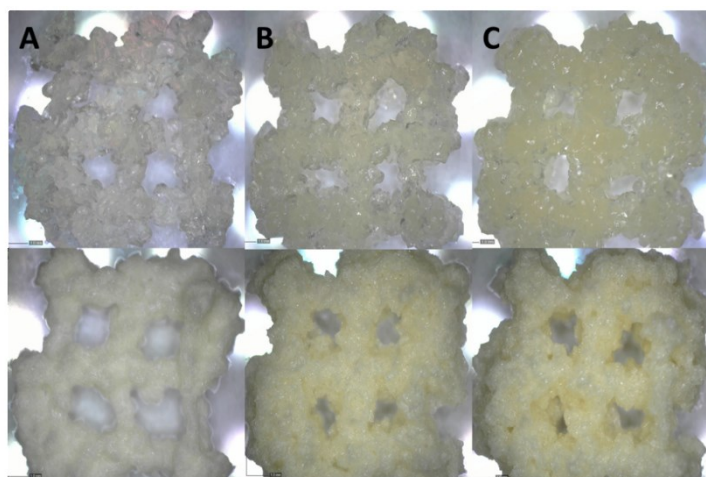
Množství vrstev	Počet pórů	Objem pórů (μm^3)	Procento obsazenosti póry (%)
1	7305	$73,9 \cdot 10^9$	47,28
3	21071	$227,7 \cdot 10^9$	56,61
5	42631	$350,1 \cdot 10^9$	48,05

7.2.2 Poměr želatiny k DEX-OX 2 ku 1

U další série vzorků byl použit vyšší poměr želatiny k dex-ox (2:1), tzn. že na 1 ml želatiny připadal 0,5 ml DEX-OX. Připravený vzorek byl po smíchání převeden do stříkačky a následně umístěn do tiskové hlavy 3D tiskárny. Samotný tisk byl proveden až po 10 minutách od začátku síťovací reakce (po přidavku TEA). Vzorek byl tištěn na PS misku o průměr 3,5 cm v různém počtu vrstev (1, 3, 5). Po vytisknutí byl vzorek vyfocen, zamražen a následně lyofilizován.

7.2.2.1 Vzorky připravené z hovězí želatiny s označením 2-B-T

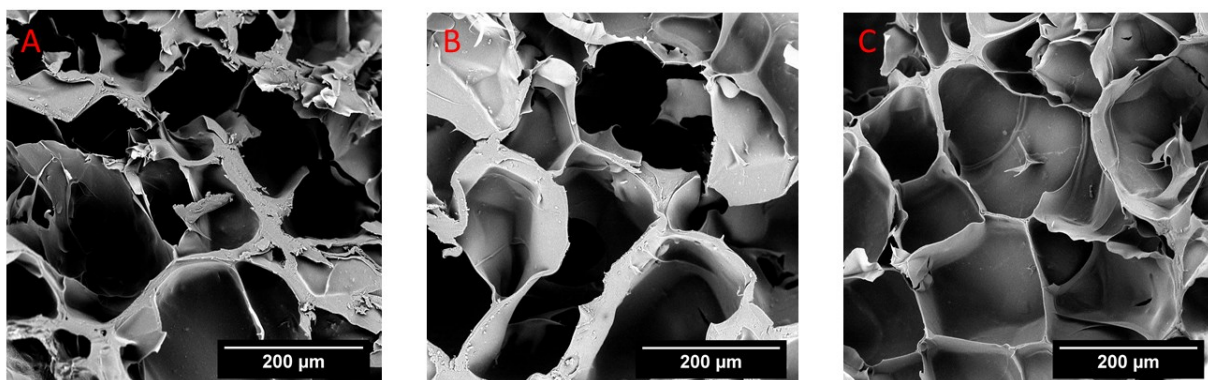
Devátá sada vzorků z hovězí želatiny (poměr (2:1)) iniciována TEA, tištěná s různým počtem vrstev (1, 3, 5) před a po lyofilizaci, je zobrazena na obrázku č. 54.



Obrázek č. 54 – Vytisknuté vzorky 2-B-T (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

Na obrázku č. 54 vidíme změnu struktury tištěného materiálu. Tištěný materiál působí více zrnitě, a zároveň více stabilně (z pohledu pevnosti). Při tisku více vrstev dochází ke slnutí materiálu, které sice není tak výrazné, jako u předchozích sad. Tisk tohoto materiálu nebyl výrazně ovlivněn tzv. zaslepováním vnitřních prostorů modelu tisknutým materiálem. Při pokusu použít špičku ve tvaru jehly, místo jehly kónického tvaru, nedošlo k protlačení materiálu skrze jehly vlivem vysoké viskozity a tuhosti materiálu.

U lyofilizovaných vzorků (spodní řada) se podařilo zachovat původní strukturu tisknutého modelu. Nicméně i přesto zde došlo ke ztrátě rozlišení tiskových vrstev stejně tak jako u sad předchozích. Lyofilizované vzorky byly následně rozřezány ve vertikálním směru a analyzovány pomocí SEM, jehož výsledky lze vidět na obrázku č. 55.



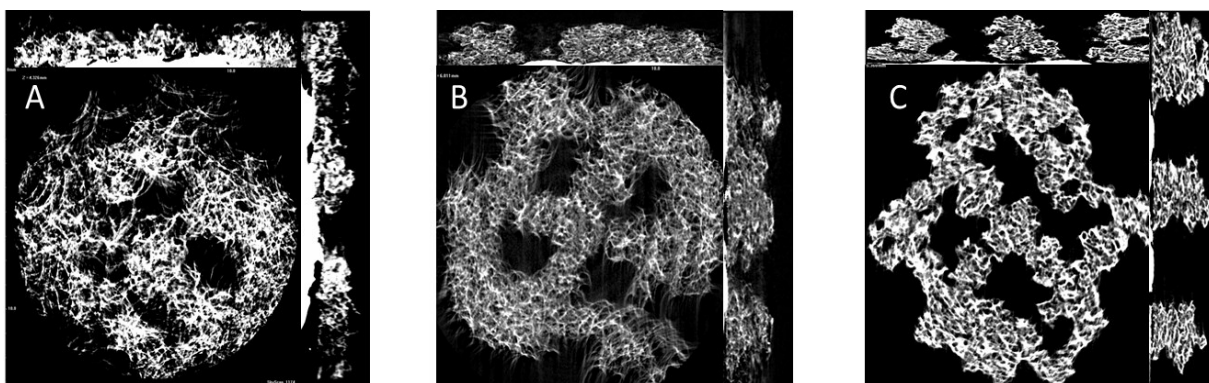
Obrázek č. 55 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 2-B-T (pořízené pomocí SEM). Kde A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 μm.

Na SEM snímku A (1 vrstva) a B (3 vrstvy) jsou vidět póry otevřené i částečně uzavřené. U vzorku C (5 vrstev) převažují póry spíše uzavřené. Velikost pórů na všech snímcích odpovídá velikosti 200 mikrometrů a méně. Při provedení analýzy porozity pomocí *Image J*, jejíž výsledky shrnuje tabulka č. 19, vidíme, že největší průměrnou plochu jednoho póru mají póry na obrázku C (5 vrstev). Shodný počet póru byl potvrzen u vzorku B (3 vrstvy) a C (5 vrstev), přičemž nejvyšší počet má vzorek A (1 vrstva). Nejvyšší celkovou plochu, a plochu jednoho póru má vzorek C (5 vrstev). Z důvodu zpřesnění informací o porozitě vzorku v celém jeho objemu, nikoliv jen v místě řezu vzorku, byla provedena analýza s využitím CT.

Tabulka 19 – Analýza snímku sady 2-B-T ze SEM pomocí programu Image J.

Počet vrstev	Počet pórů	Celková plocha (μm^2) * 10^3	Plocha jednoho póru (μm^2) * 10^3	Procento obsazenosti (%)
1	29,20 ± 4,10	158,4 ± 16,6	6,3 ± 1,6	51,91 ± 4,80
3	13,40 ± 0,90	160,6 ± 10,1	12,4 ± 1,6	55,24 ± 3,40
5	14,00 ± 1,80	184,7 ± 8,56	14,5 ± 2,8	63,69 ± 3,00

Jednotlivé složené řezy analyzovaných vzorků, jsou vidět na obrázku č. 56. S rostoucím počtem vrstev má rekonstruovaný obraz lepší rozlišení vnitřní porozity. Postupný nárůst velikosti pórů pozorujeme při pohledu na obrázky zleva doprava. Na obrázku A, reprezentující 1 tiskovou vrstvu, můžeme vidět strukturu a jednotlivé póry. Na obrázcích B (3 vrstvy) a C (5 vrstev) došlo k zachování vnitřních pórů modelu. Díky dobré rekonstrukci obrazu je vidět i celkový tvar, který odpovídá lyofilizovaným předlohám (viz obrázek č. 54).



Obrázek č. 56 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 2-B-T.

Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

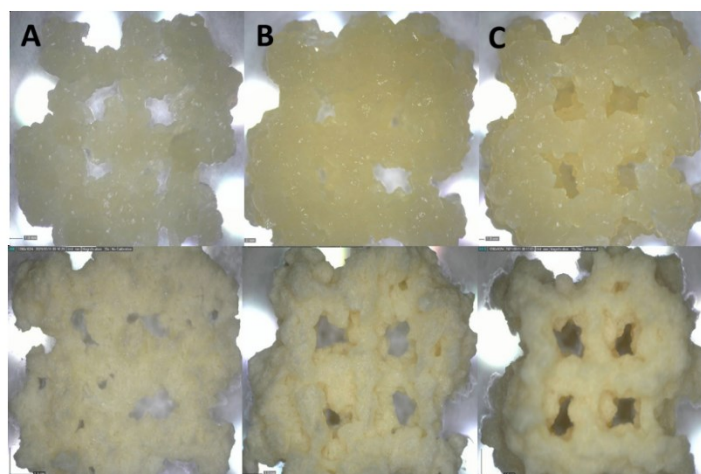
Při porovnání výsledků porozity v celém objemu vzorků, uvedené v tabulce č. 20 je vidět, že s rostoucím počtem natisknutých vrstev, roste počet detekovaný pórů v matici, a roste i celkový objem pórů. Nejvyšší počet pórů byl detekován u vzorku B (3 vrstvy), což je výsledek, se kterým jsme se setkali již dříve. Důvodem by mohla být vyšší distribuce velikostí pórů, kdy se ve vzorku vyskytují i velmi malé póry, zkreslující tento výsledek. Celkový největší objem pórů byl potvrzen u vzorku C (5vrstev).

Tabulka 20 – CT analýza řezů vzorků 2-B-T pomocí programů DataViewer a CTAn.

Počet vrstev	Počet pórů	Objem pórů (μm^3)	Procento obsazenosti póry (%)
1	5538	121,8. 10^9	73,87
3	30345	158,4. 10^9	40,15
5	21659	461,8. 10^9	73,12

7.2.2.2 Vzorky připravené z králičí želatiny s označením 2-R-T

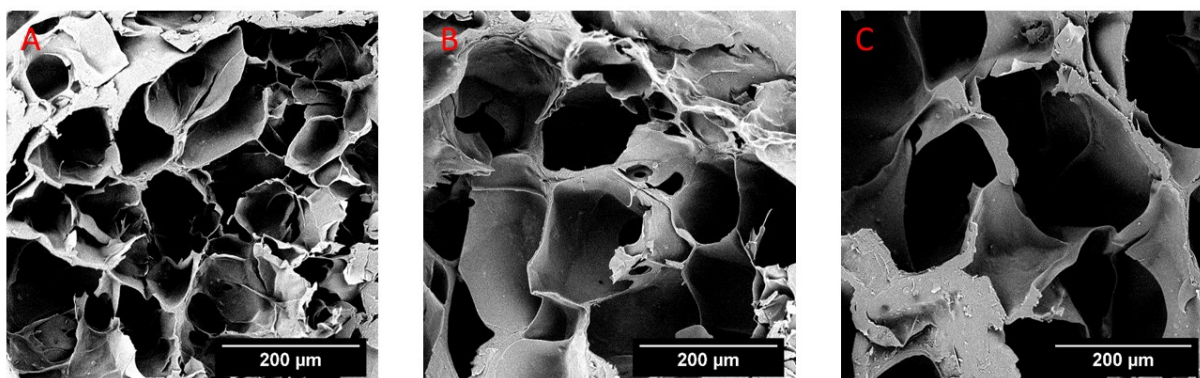
V pořadí desátá sada vzorků z králičí želatiny (poměr (2:1)) iniciována TEA, tištěná s různým počtem vrstev (1, 3, 5) před a po lyofilizaci, je zobrazena na obrázku č. 57.



Obrázek č. 57 – Vytisknuté vzorky 2-R-T (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

U nativních vzorků (horní řada) je vidět, zřetelná změna struktury tištěného materiálu. Tištěný materiál je více zrnitý, a na první pohled vypadá více stabilně. Při tisku více vrstev docházelo ke slinutí, které nebylo výrazné, jako u předchozích sad. Při tisku tohoto materiálu docházelo k zalepení vnitřních prostorů modelu tisknutým materiálem. U lyofilizovaných

vzorků (spodní řada snímků) došlo ke ztrátě rozlišení tiskových vrstev stejně tak jako u sad předchozích. Nejvíce se tento efekt projevil u vzorku C (5 vrstev). Lyofilizované vzorky byly následně rozřezány ve vertikálním směru a analyzovány pomocí SEM, jehož výsledky lze vidět na obrázku č. 58.



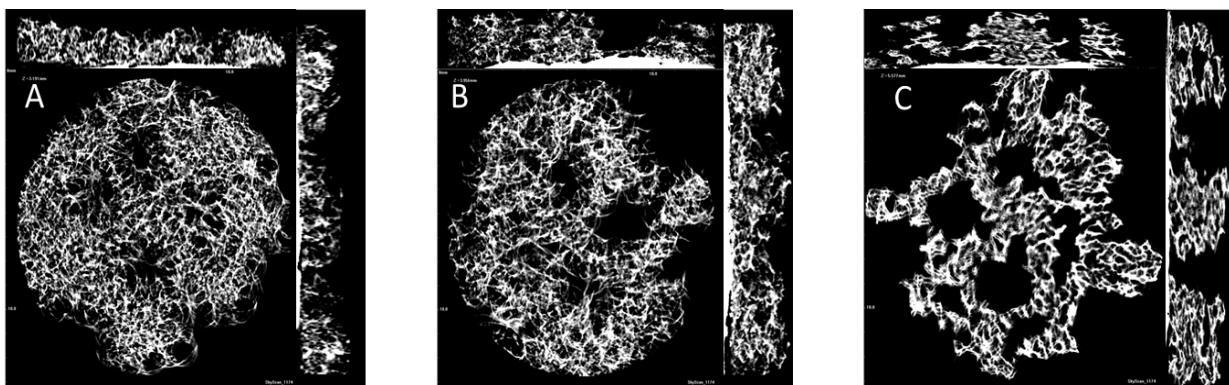
Obrázek č. 58 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 2-R-T (pořízené pomocí SEM).
Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 µm.

Na snímcích pořízených ze SEM je vidět, že s rostoucím počtem natisknutých vrstev dochází k nárůstu velikosti pórů a zároveň ke snížení jejich počtu. Velikost pórů na všech snímcích leží v intervalu od 100 do 200 mikrometrů (ve směru zleva doprava). Největší průměrnou plochu jednoho póru mají póry na obrázku C (5 vrstev). Rovněž bylo zjištěno, že počet detekovaných pórů s vyšším počtem tiskových vrstev klesá, přičemž nejvyšší počet pórů byl zjištěn u vzorku A (1 vrstva). Nejvyšší celkovou plochu, a plochu jednoho póru má vzorek C (5 vrstev).

Tabulka 21 – Analýza snímku vzorku 2-R-T ze SEM pomocí programu Image J.

Počet vrstev	Počet pórů	Celková plocha (μm^2) * 10^3	Plocha jednoho póru (μm^2) * 10^3	Procento obsazenosti (%)
1	19,40 ± 3,40	169,8 ± 9,5	9,8 ± 1,5	60,61 ± 3,50
2	16,20 ± 2,20	171,3 ± 10,7	11,9 ± 2,5	59,02 ± 3,70
3	10,40 ± 1,80	185,6 ± 9,3	23,1 ± 7,8	64,23 ± 3,30

Provedená CT analýza porozity v celém objemu vzorku, které je přiložena na obrázku č. 59, potvrdila, že s rostoucím počtem vrstev má rekonstruovaný obraz lepší rozlišení vnitřní porozity. Postupný nárůst velikosti pórů pozorujeme při pohledu na obrázky zleva doprava. Na obrázcích B (3vrstvy) a C (5vrstev) se podařilo zobrazit vnitřní část modelu.



Obrázek č. 59 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 2-R-T.

Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

Při porovnání CT výsledků porozity provedené v celém objemu vzorků, uvedené v tabulce č. 22 je vidět, že s rostoucím počtem natisknutých vrstev, roste počet detekovaný pórů v matrici, a roste i celkový objem pórů. Nejvyšší počet pórů a celkový objem byl detekován u vzorku C (5 vrstev), což je námi předpokládaný výsledek. Rozdíl ve výsledném počtu pórů mezi vzorky B (3vrstvy) a C (5vrstev) je poměrně nízký, kdy v předešlých případech byl počet u vzorku B i vyšší.

Tabulka 22 – CT analýza řezů vzorku 2-R-T pomocí programů DataViewer a CTAn.

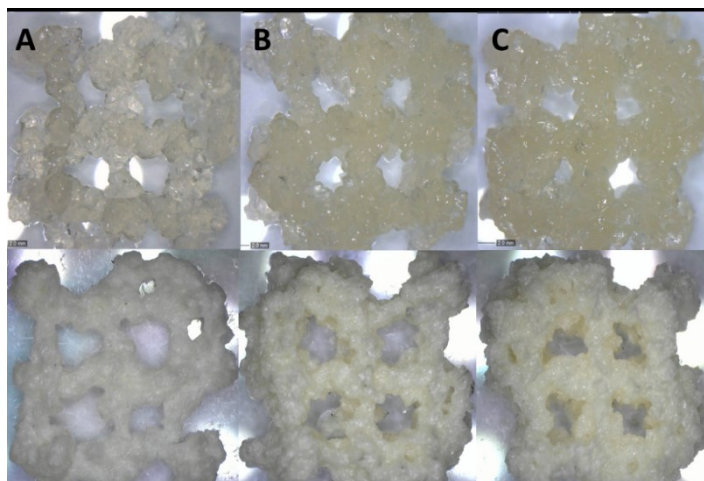
Počet vrstev	Počet pórů	Objem pórů (μm^3)	Procento obsazenosti póry (%)
1	5894	$109,7 \cdot 10^9$	69,32
3	12074	$241,9 \cdot 10^9$	66,62
5	12599	$550,6 \cdot 10^9$	76,02

7.2.3 Poměr želatiny k DEX-OX 3 ku 1

U poslední šesté série vzorků byl použit nejvyšší poměr želatiny k dex-ox (3:1), tzn. že na 1 ml želatiny připadal 0,5 ml DEX-OX. Připravený vzorek byl po smíchání převeden do stříkačky a následně umístěn do tiskové hlavy 3D tiskárny. Samotný tisk byl proveden až po 10 minutách od začátku síťovací reakce (po přidavku TEA). Vzorek byl tištěn na PS misku o průměr 3,5 cm v různém počtu vrstev (1, 3, 5). Po vytisknutí byl vzorek vyfocen, zamražen a následně lyofilizován.

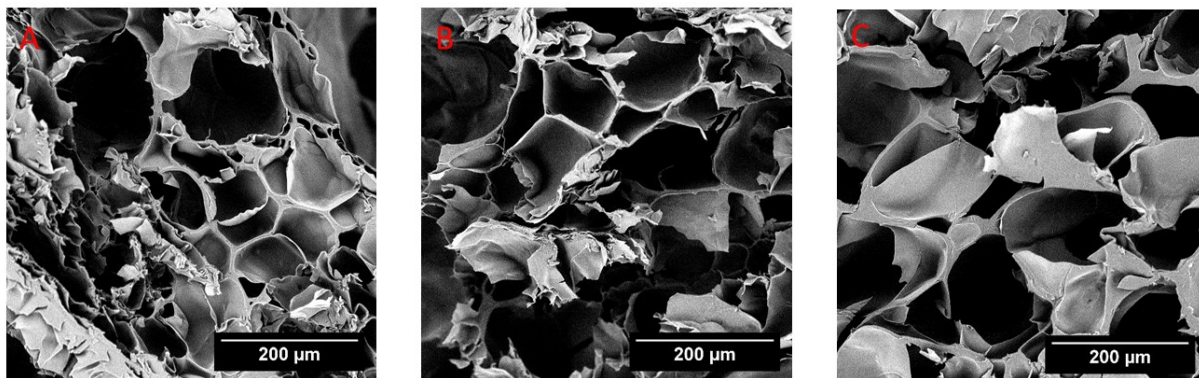
7.2.3.1 Vzorky připravené z hovězí želatiny s označením 3-B-T

Jedenáctá sada vzorků z hovězí želatiny (poměr (3:1)) iniciována TEA, tištěná s různým počtem vrstev (1, 3, 5) před a po lyofilizaci, je zobrazena na obrázku č. 60.



Obrázek č. 60 – Vytisknuté vzorky 3-B-T (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

Na obrázku č. 60 opět je vidět, že při srovnání se vzorky síťované pomocí NH_3 (viz obrázek č. 42), vidíme zlepšení zobrazené struktury tištěného materiálu. Tištěný materiál měl mnohem stabilnější strukturu. Při tisku více vrstev docházelo k mírnému slnutí materiálu nanesených vrstev, které nebylo tak výrazné, jako u předchozích sad obsahujících aktivační činidlo NH_3 . Lyofilizované vzorky (spodní řada) si zachovaly původní strukturu modelu a mají podobnost se vzorky v nativním stavu. Rozlišení jednotlivé tištěných vrstev nezůstalo zachované. Nejvíce se tento efekt projevil v případě vzorku C (5 vrstev).



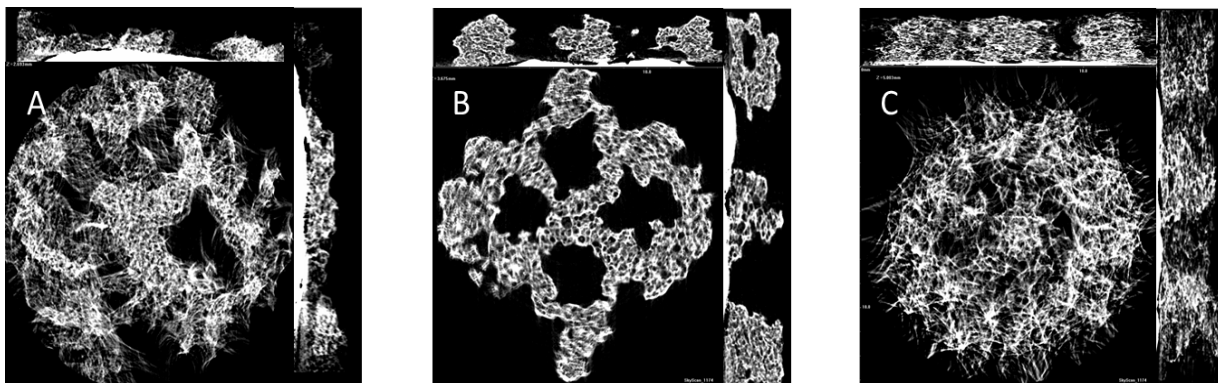
Obrázek č. 61 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 3-B-T (pořízené pomocí SEM).
Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 µm.

Na snímcích pořízených ze SEM jsou vidět rozdíly ve velikosti zobrazených pórů. Velikost pórů na všech snímcích odpovídá rozsahu hodnot od 100 do 200 mikrometrů (při pohledu zleva doprava). Výsledky analýzy porozity pomocí *Image J*, jejíž výsledky shrnuje tabulka č. 23, potvrdila, že největší průměrnou plochu jednoho póru mají póry na obrázku C (5 vrstev). Stejný počet pórů byl detekován u vzorku A (1 vrstva) a C (5 vrstev). Nejvyšší celkovou plochu má vzorek B (3 vrstvy).

Tabulka 23 – Analýza snímku vzorku 3-B-T ze SEM pomocí programu *Image J*.

Počet vrstev	Počet pórů	Celková plocha (μm^2) * 10^3	Plocha jednoho póru (μm^2) * 10^3	Procento obsazenosti (%)
1	21,00 ± 4,10	139,9 ± 11,2	7,9 ± 1,8	48,05 ± 3,80
2	16,60 ± 2,00	178,9 ± 7,8	11,3 ± 1,3	61,50 ± 2,70
3	21,00 ± 1,30	157,1 ± 12,8	77,1 ± 1,1	54,94 ± 3,70

Výsledky CT analýzy jednotlivých složených řezů analyzovaných vzorků, které můžeme vidět na obrázku č. 62, potvrzují postupný nárůst velikosti pórů (při pohledu zleva doprava). Na obrázcích B (3 vrstvy) a C (5 vrstev) je vidět zachovalé zobrazení vnitřních pórů oproti obrázku A (1 vrstva). Opět je zde patrný rozdíl v rekonstrukci obrázků, kdy obrázek B (3 vrstvy) má nejlépe zobrazenou strukturu.



Obrázek č. 62 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 3-B-T. Kde:
A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

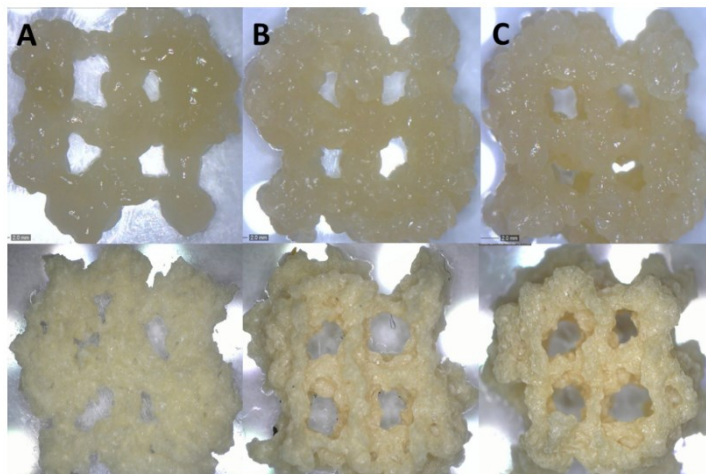
Při porovnání výsledků porozity provedené pomocí CT, uvedené v tabulce č. 24 je vidět, že s rostoucím počtem natisknutých vrstev, roste počet detekovaný pórů v matrici, a roste i celkový objem pórů. Nejvyšší počet pórů a celkový objem byl detekován u vzorku C (5 vrstev), což je předpokládaný výsledek.

Tabulka 24 - CT analýza řezů vzorku 3-B-T pomocí programů DataViewer a CTAn

Počet vrstev	Počet pórů	Objem pórů (μm^3)	Procento obsazenosti póry (%)
1	4977	$67,7 \cdot 10^9$	64,38
3	14787	$253,1 \cdot 10^9$	68,61
5	32381	$319,4 \cdot 10^9$	53,95

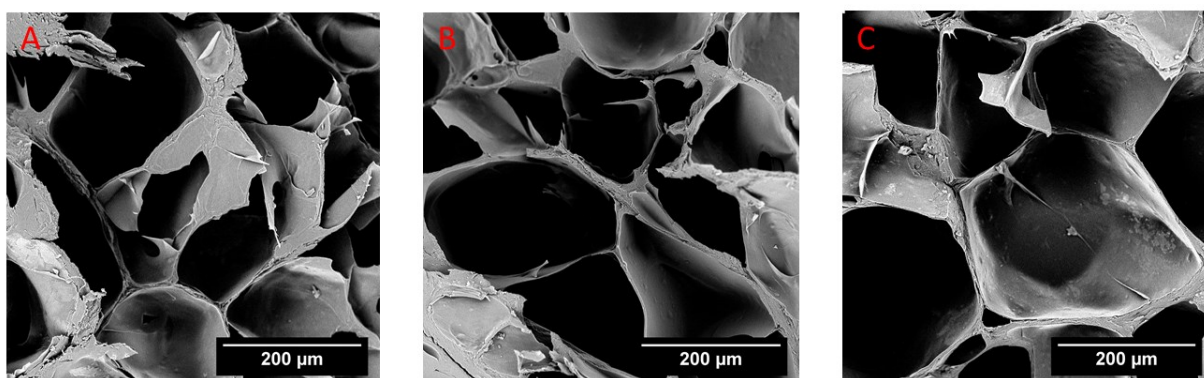
7.2.4 Vzorky připravené z králičí želatiny s označením 3-R-T

Dvanáctá a poslední sada vzorků z králičí želatiny (poměr (3:1)) iniciována TEA, tištěná s různým počtem vrstev (1, 3, 5) před a po lyofilizaci, je zobrazena na obrázku č. 63.



Obrázek č. 63 – Vytisknuté vzorky 3-R-T (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

Na obrázku č. 63 je zachyceno porovnání nativních (horní řada) a lyofilizovaných (spodní řada snímků) vzorků v závislosti na rostoucím počtu natisknutých vrstev. Při použití vyššího podílu želatiny ve směsi je vidět, že tištěný materiál má méně stabilní strukturu. Při tisku více vrstev docházelo ke slnutí jednotlivých vrstev materiálu. U lyofilizovaných vzorků (spodní řada) se podařilo zachovat původní tištěnou strukturu. Nedošlo k zaplnění vnitřních částí vzorku hromaděním materiálem, způsobeným narůstáním profilu za výstupní šterbinou špičky kónického tvaru. Lyofilizované vzorky byly následně rozřezány ve vertikálním směru a analyzovány pomocí SEM, jehož výsledky lze vidět na obrázku č. 64.



Obrázek č. 64 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 3-R-T (pořízené pomocí SEM). Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 µm.

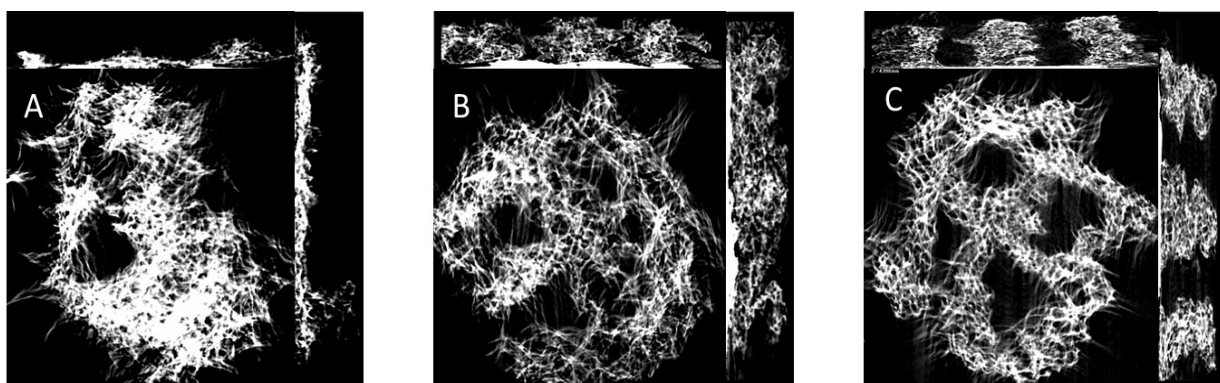
Na snímcích pořízených ze SEM je vidět, že s rostoucím počtem tištěných vrstev dochází k nárůstu velikosti pórů a poklesu jejich počtu zachycených na snímku. Velikost pórů na všech snímcích leží v rozmezí hodnot od 100 do 300 mikrometrů (při pohledu zleva doprava). Při

provedení analýzy porozity pomocí *Image J*, jejíž výsledky shrnuje tabulka č. 25, vidíme, že největší průměrnou plochu jednoho póru mají póry na obrázku B (3 vrstvy). Přibližně stejný počet pórů mají vzorky B (3 vrstvy) a C (5 vrstev), zatímco největší počet pórů byl potvrzen u vzorku A (1 vrstva). Nejvyšší celková plocha pórů byla zjištěna u vzorku C (5 vrstev).

Tabulka 25 – Analýza SEM snímků sady vzorků 3-R-T pomocí programu Image J.

Počet vrstev	Počet pórů	Celková plocha (μm^2) * 10^3	Plocha jednoho póru (μm^2) * 10^3	Procento obsazenosti (%)
1	22,60 ± 6,90	154,1 ± 4,3	10,3 ± 3,6	53,32 ± 1,50
2	11,20 ± 1,60	159,5 ± 9,6	15,8 ± 2,7	54,80 ± 3,30
3	11,80 ± 1,00	168,5 ± 6,3	14,8 ± 1,5	57,76 ± 2,30

Z provedené CT analýzy porozity, zobrazené na obrázku č. 65 je vidět, že s rostoucím počtem tištěných vrstev roste i počet pórů (při pohledu zleva doprava). Na obrázcích B (3 vrstvy) a C (5 vrstev) se podařilo zachovat vnitřní strukturu modelu. Opět je zde patrný rozdíl v rekonstrukci obrázků vlivem zvyšujícího se počtu vrstev.



Obrázek č. 65 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 3-B-T. Kde:

A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.

Při porovnání výsledků porozity provedené v celém objemu vzorků, uvedené v tabulce č. 26 je vidět, že s rostoucím počtem natisknutých vrstev, roste počet detekovaný pórů v matrici, a roste i celkový objem pórů. Nejvyšší počet pórů a jejich celkový objem byl detekován u vzorku C (5 vrstev), což je předpokládaný výsledek.

Tabulka 26 – CT analýza řezů vzorků 3-R-T pomocí programů DataViewer a CTAn.

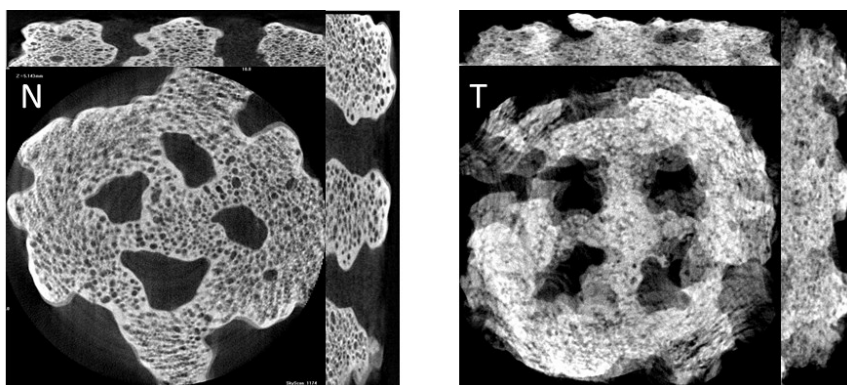
Počet vrstev	Počet pórů	Objem pórů (μm^3)	Procento obsazenosti póry (%)
1	2393	$87,8 \cdot 10^9$	75,69
3	10737	$174,3 \cdot 10^9$	58,8
5	23023	$345,8 \cdot 10^9$	58,63

7.3 Zpětně hydratované vzorky

U nejlepších vzorků byla provedena jejich rehydratace v DEMI vodě po dobu 1 h při laboratorní teplotě. Při nabobtnání navázal vzorek želatiny cca 0,5 g vody. Po zbobtnání byl vzorek znovu analyzován metodou CT.

7.3.1.1 Vzorky připravené z hovězí želatiny s označením 2-B-N-H a 2-B-T-H

Lyofilizované vzorky hovězí želatiny označené 2-B-N a 2-B-T byly znovu hydratovány a následně znovu analyzovány pomocí CT. Výsledky porozity hydratovaných vzorků byly poté vzájemně porovnány se vzorky lyofilizovanými. CT analýza byla provedena v celém objemu vzorku. Výsledky jednotlivých řezů jsou zobrazeny na obrázku č. 66. Struktura hydratovaných vzorků se značně liší od struktury lyofilizovaných vzorků. I přesto, že materiál na sebe navázal cca 0,5 g vody, můžeme vidět zřetelné zobrazení porézní struktury. Výhodou měření hydratovaných vzorků je, že při měření na CT nedojde vlivem tepla k tak rychlé destrukci celého vzorku, jako při jeho analýze ihned po zesíťování.



Obrázek č. 66 – Řezy pořízené z tomografu pro poměr 2-1 pro hovězí želatinu. Počet tisknutých vrstev 3. Kde: N – vzorek s NH_3 ; T – vzorek s TEA.

Při porovnání výsledků porozity provedené v celém objemu vzorků, uvedené v tabulce č. 27 je vidět znatelný rozdíl v počtu pórů i v jejich celkovém objemu. Nejvyšší počet pórů měl vzorek připravený pomocí NH₃ a naopak celkový objem póru byl detekován u vzorku připraveného s TEA. Lze předpokládat, že aktivační činidla mají vliv při zpětné hydrataci na počet a velikost vnitřních pórů.

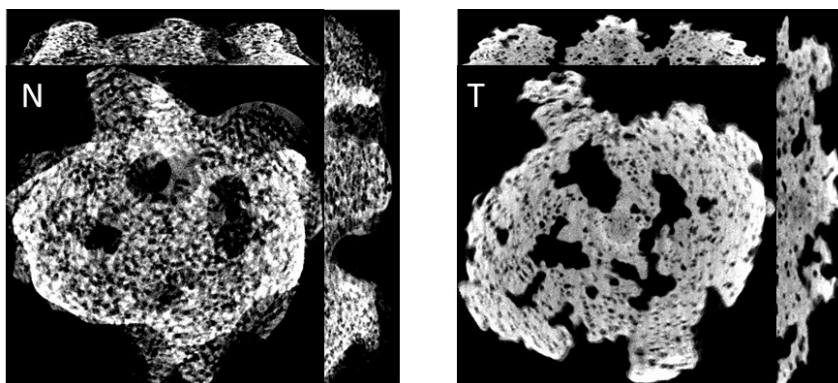
Tabulka 27 – CT analýza řezů vzorků 2-B-N-H a 2-B-T-H pomocí programů DataViewer a CTAn.

Typ síťovadla	Počet pórů	Objem pórů (μm ³)	Procento obsazenosti póry (%)
N	29883	549,8. 10 ⁹	80,45
T	27009	662,4. 10 ⁹	75,45

7.3.1.2 Vzorky připravené z králičí želatiny s označením 2-R-N-H a 2-R-T-H

Stejným způsobem byly připraveny a rehydratovány i vzorky obsahují králičí želatinu a to v poměru s dex-ox 2 ku 1 (3 vrstvy).

Pomocí tomografu byla provedena analýza v celém objemu vzorku. Jednotlivé složené řezy analyzovaných vzorků, můžeme vidět na obrázku č. 67. Při porovnání hydratované a lyofilizované struktury vzorků je vidět zřetelný rozdíl v jejich zobrazení. I přesto, že materiál na sebe navázal cca 0,5 g vody, můžeme vidět zřetelné zobrazení porézni struktury.



Obrázek č. 67 – Řezy pořízené z tomografu pro poměr 2-1 pro králičí želatinu. Počet tisknutých vrstev 3. Kde: N – vzorek s NH₃; T – vzorek s TEA.

Při porovnání výsledků porozity provedené v celém objemu vzorků, uvedené v tabulce č. 27 je vidět rozdíl v počtu pórů i v jejich celkovém objemu. Nejvyšší počet pórů a celkový objem měl vzorek připravený pomocí s NH₃. Při porovnání hydratovaných vzorků králičí želatiny

s různým aktivačním činidlem, nebylo potvrzeno, že by použití rozdílného aktivačního činidla mělo zásadní vliv na výslednou porozitu materiálu.

Tabulka 28 - CT analýza řezů vzorků 2-R-N-H a 2-R-T-H pomocí programů DataViewer a CTAn.

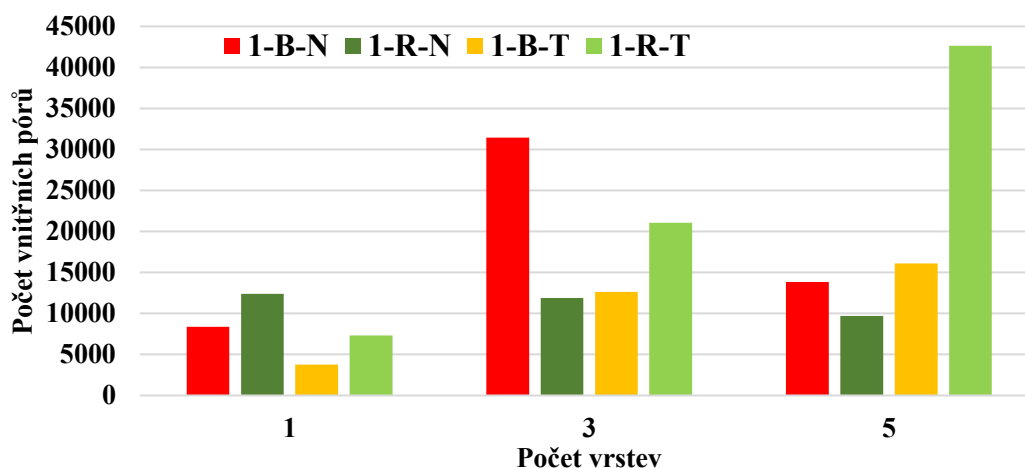
Typ síťovadla	Počet pórů	Objem pórů (μm^3)	Procento obsazenosti póry (%)
N	33639	263,1. 10^9	73,61
T	29365	235.7 10^9	69,52

7.4 Diskuze a porovnání výsledků všech analyzovaných vzorků

Porovnání všech připravených materiálových sad vzorků umožní celkové zhodnocení všech získaných dat a zároveň to pomůže určit nejlepší a naopak nejhorší vzorky, či zjistit trendy, které před počátkem experimentu nebyly známi.

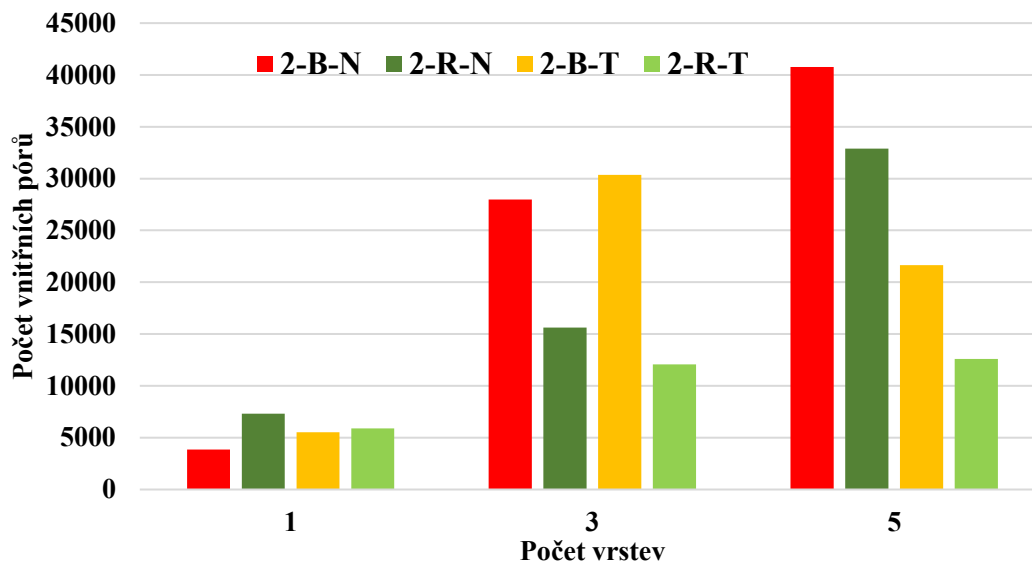
7.4.1 Porovnání celkového počtu pórů všech lyofilizovaných vzorků v závislosti na poměru želatiny a dex-ox

Na grafu č. 1 vidíme všechny vzorky připravené v poměru želatiny a dex-ox (1:1) s oběma typy aktivačních činidel i želatin. Vzorky síťované s NH_3 vykazují poněkud nahodilou závislost počtu pórů s rostoucím počtem vrstev. Rovněž tyto výsledky ukázaly, že v případě hovězí želatiny byl zaznamenán i vyšší počet pórů v matrici. Výrazně to jde vidět u vzorků tištěných ve třech vrstvách. U vzorků, které byly naopak připraveny pomocí činidla TEA (žlutá a světle zelená barva sloupce) je vidět, že s rostoucím počtem tištěných vrstev, roste počet pórů ve vzorku a to jak u králičí (světle zelené sloupce) tak hovězí želatiny (žlutá barva sloupce). Výrazně vyšší počty póru byly detekovány u želatiny králičí.



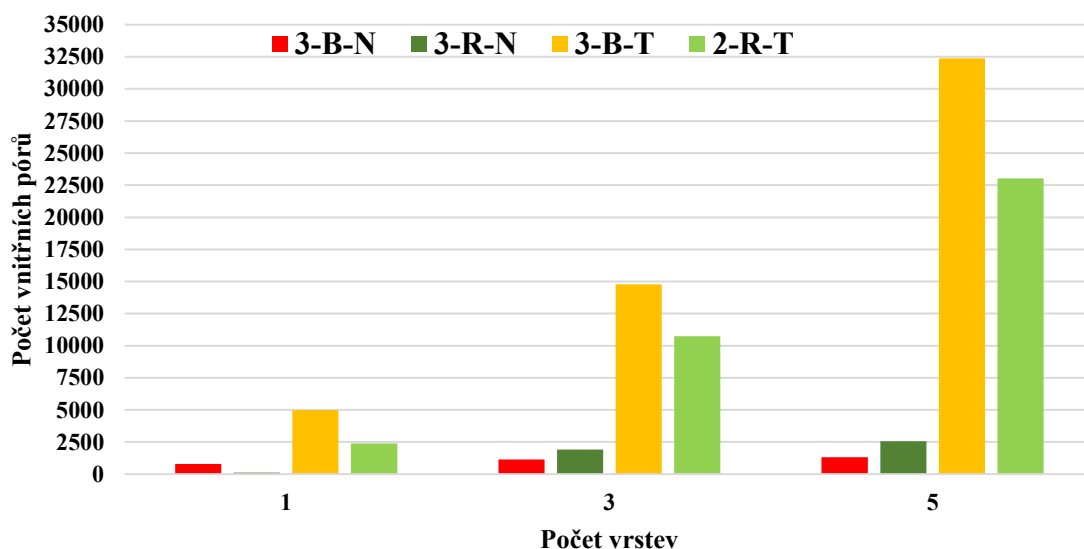
Graf č. 1 – Porovnání počtu vnitřních pórů v závislosti na počtu tisknutých vrstev pro poměr želatiny a dex-ox (1ku1) síťované s činidly (Kde: N-NH₃, T- TEA).

Závislost počtu pórů vzorků připravených v poměru želatiny a dex-ox (2:1) s oběma typy aktivačních činidel i želatin, je vynesena na grafu č. 2. V tomto případě lze potvrdit, že u vzorků síťovaných s NH₃ i TEA roste počet detekovaných pórů v matrici s rostoucím počtem tištěných vrstev. Při tisku všech vzorků pouze v 1 vrstvě, byl potvrzen výskyt téměř stejného počtu pórů. Při zvýšení počtu vrstev z 1 na 3, jde vidět výrazný nárůst v počtu pórů u vzorku hovězí želatiny (červený a oranžový sloupec). V případě želatiny králičího původu, tak výrazný nárůst v počtu pórů zaznamenán nebyl (tmavě a světle zelený sloupec). Nejvyšší počet pórů v matrici byl potvrzen u sady vzorků síťovaných s NH₃ (5 vrstev). U druhého činidla TEA, je naopak vidět jasný pokles počtu pórů (světle zelený a žlutý sloupec). Tento jev může být způsoben nedostatečným prosíťováním celého objemu vzorku, dodatečným procesem lyofilizace či nevhodně zvoleným poměrem želatiny a dex-ox.



Graf č. 2 – Porovnání počtu vnitřních pórů v závislosti na počtu tisknutých vrstev pro poměr želatiny a dex-ox (2ku1) síťované s činidly (Kde: N-NH₃, T- TEA).

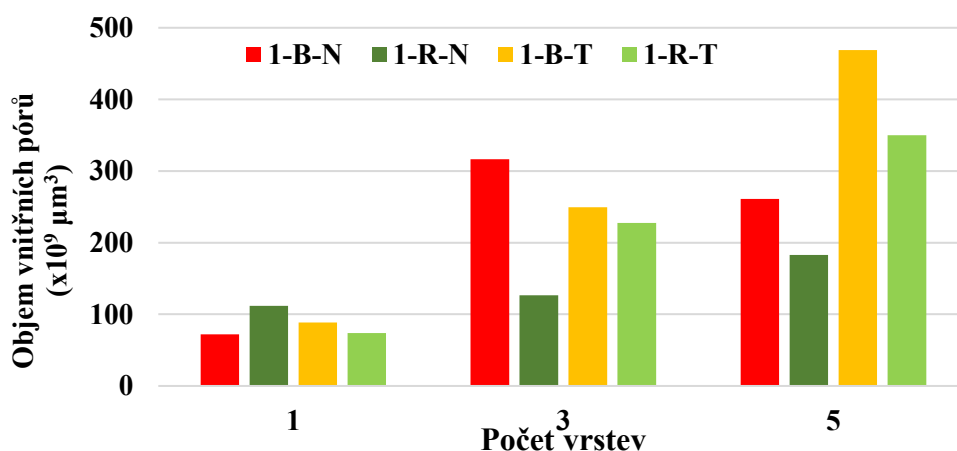
Sada vzorků připravených v poměru želatiny k dex-ox (3:1) s oběma typy aktivačních činidel i želatin je vynesena v grafu č. 3. Na první pohled je zřejmé, že počet pórů v matrici u vzorků síťovaných s NH₃ odpovídá maximálně hodnotě 2500 a tato hodnota se s rostoucím počtem vrstev nikterak nemění. Opačný vývoj v počtu přítomných pórů v matrici byl zaznamenán při použití TEA. U těchto vzorků dochází k postupnému nárůstu pórů s rostoucím počtem natisknutých vrstev. Zdá se tedy, že při použití aktivačního činidla TEA, běží síťovací reakce mnohem rychleji a účinněji a to ve všech navržených poměrech želatiny a dex-ox, jejímž výsledkem je dostatečná porozita. Nejvyšší počet pórů byl zaznamenán u vzorků s hovězí želatinou (žlutý sloupec).



Graf č. 3 – Porovnání počtu vnitřních pórů v závislosti na počtu tisknutých vrstev pro poměr želatiny a dex-ox (3ku1) síťované s činidly (Kde: N-NH₃, T- TEA).

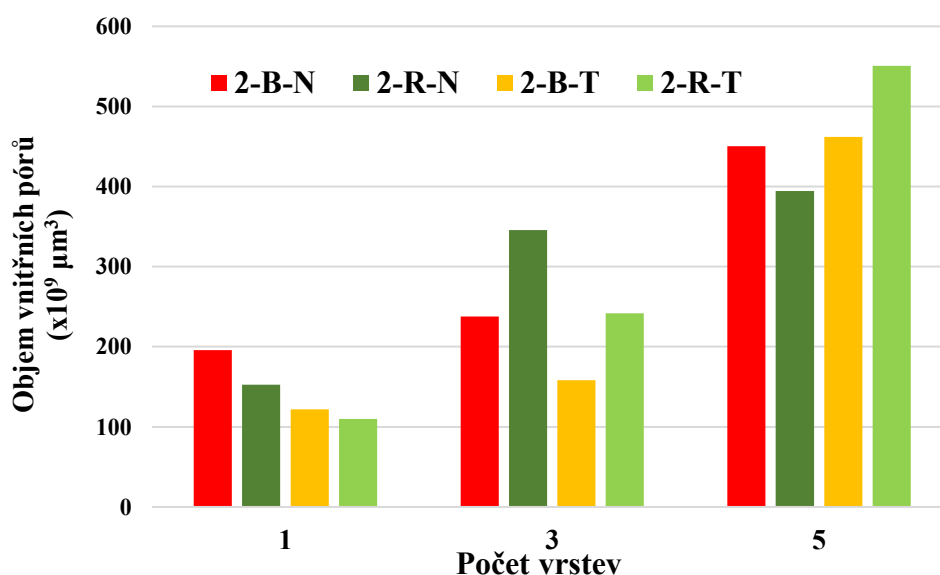
7.4.2 Porovnání celkového objemu pórů všech lyofilizovaných vzorků v závislosti na poměru želatiny a dex-ox

Výsledky porovnání celkovému objemu pórů vzorků připravených v poměru želatiny a dex-ox (1:1) s oběma typy aktivačních činidel i želatin jsou vyneseny v grafu č. 4. U všech vzorků je vidět znatelný trend růstu objemu pórů v závislosti na počtu natištěných vrstev. Výrazněji je tento růst potvrzen u sady vzorků želatiny síťované s TEA (žlutá a světle zelená barva sloupce). U vzorků želatiny síťované s NH₃ není tento trend nikterak výrazný.



Graf č. 4 – Porovnání celkového objemu vnitřních pórů v závislosti na počtu tištěných vrstev pro poměr želatiny a dex-ox (1ku1) síťované s činidly (Kde: N-NH₃, T- TEA).

Při zvýšení poměru želatiny k dex-ox na (2 ku1), vynesném v grafu č. 5, lze pozorovat postupný růst objemu pórů s rostoucím počtem vrstev v matici u vzorků síťovaných s aktivačním činidlem NH₃ i TEA. Celkový růst navíc závisí jednak na typu použité želatiny ale i na aktivačním činidle. U vzorků tištěných v maximálně třech vrstvách dominují (velikost objemu pórů) vzorky s NH₃. Při zvýšení počtu vrstev z 3 na 5 vrstev se situace změní a přímo skokově vzroste objem detekovaných pórů v matici u činidla TEA ato v případě hovězí i králičí želatiny (světle zelená a žlutá barva sloupce).



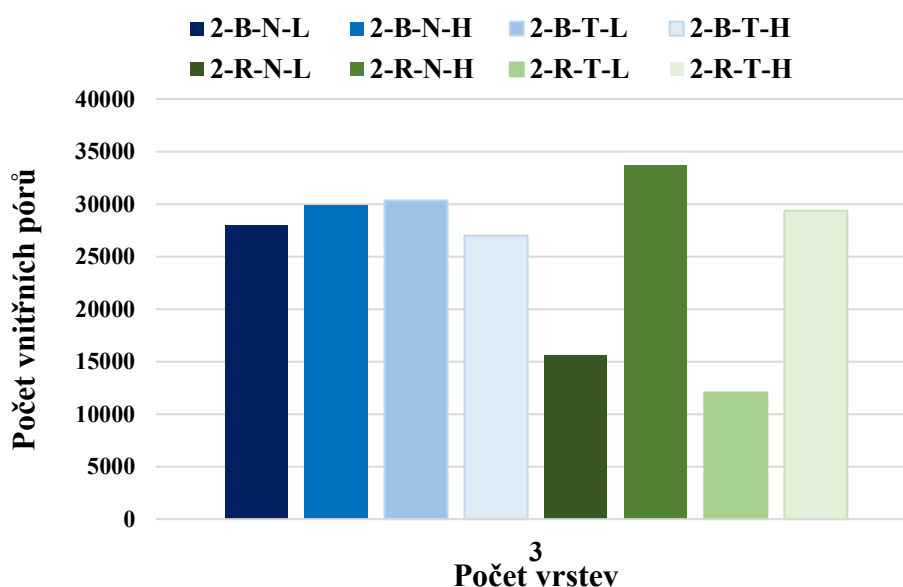
Graf č. 5 – Porovnání celkového objemu vnitřních pórů v závislosti na počtu tištěných vrstev pro poměr želatiny a dex-ox (2ku1) síťované s činidly (Kde: N-NH₃, T- TEA).

Při porovnání závislosti objemu pórů na počtu tisknutých vrstev nejvyššího poměru želatiny k dex-ox (3ku1) vynesném v grafu č. 6, je vidět nárůst detekovaného objemu pórů s rostoucím počtem vrstev u všech vzorků. Zajímavé je, že námi zjištěný nízký počet pórů u stejného poměru vzorků (viz graf č. 3), se rovněž neprojevil i nízkou hodnotou celkového objemu pórů (viz graf č. 6).

Graf č. 6 - Porovnání celkového objemu vnitřních pórů v závislosti na počtu tištěných vrstev pro poměr želatiny a dex-ox (3ku1) síťované s činidly (Kde: N-NH₃, T- TEA).

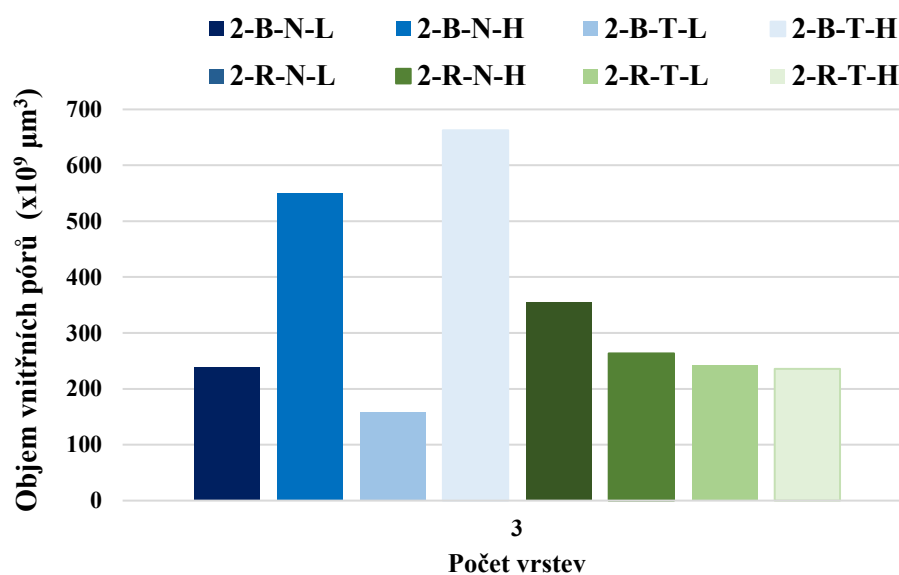
7.4.3 Porovnání lyofilizovaných a hydratovaných vzorků želatiny (poměru 2ku1, 3 vrstvy)

Porovnání nejlepších lyofilizovaných a zpětně hydratovaných vzorků želatiny (králíčí, hovězí) připravené v poměru (2ku1), je vyneseno v příloženém grafu č. 7. Z této závislosti je vidět zřetelný rozdíl mezi hovězí a králíčí želatinou. U vzorků připravených z hovězí želatiny je vidět, že lyofylizované a rehydratované vzorky vykazují stále stejný počet detekovaných pórů. Zcela jiná situace panuje u želatiny králíčí. U těchto vzorků dochází k intenzivnímu nárůstu počtu pórů v hydratované matici (NH_3 i TEA). Tento nárůst může být pravděpodobně spojován se zvětšením volného objemu, v důsledku hydratace lyofilizovaného vzorku vodou.



Graf č. 7: Porovnání počtu vnitřních pórů lyofilizovaných a hydratovaných vzorků želatiny k dex-ox (poměr 2ku1) s rozdílným aktivačním činidlem (Kde: B-hovězí, R-králíčí; N- NH_3 , T-TEA; L-lyofilizované, H – Hydratované vzorky).

Kromě počtu pórů přítomných v materiálové matici, byl u lyofilizovaných a hydratovaných vzorků porovnán i celkový objem pórů (viz grafu č. 8).



Graf č. 8 – Porovnání počtu vnitřních pórů lyofilizovaných a hydratovaných vzorků želatiny k dex-ox (poměr 2ku1) s rozdílným aktivačním činidlem (Kde: B-hovězí, R-králíčí; N-NH₃, T-TEA; L-lyofilizované, H – Hydratované vzorky).

Z těchto výsledků je zřejmý zcela opačný trend, než který byl pozorován v případě jejich počtu. Vzorky připravené z hovězí želatiny vykazují po hydrataci zřetelný nárůst celkového objemu (sloupce v modré barvě). V případě králíčí želatiny, se do výsledků celkového objemu pórů proces hydratace nijak nepromítne. Znamená to tedy, že hydratací se v případě králíčí želatiny nezmění jejich celková plocha, kterou jednotlivé póry zaujímají v matici, zatímco se zvětší jejich počet.

ZÁVĚR

V experimentální části této práce bylo pomocí 3D tiskárny (Bio X, Cellink) připraveno celkem 12 sad vzorků (hydrogelů) na bázi síťované želatiny (metoda Schiffovy báze). Připravené vzorky se lišily typem použité želatiny (hovězí, králičí), poměrem želatiny a oxidovaného dextranu (1 ku 1, 2 ku 1, 3 ku 1), počtem natištěných vrstev (1, 3, 5) a typem aktivačního činidla (NH₃, TEA). Všechny vzorky byly vytištěny, nafoceny, zamrazeny, lyofilizovány a poté charakterizovány pomocí metody (1) SEM a (2) CT.

Metoda Schiffových bází je založena na chemické reakci mezi molekulami obsahující amidovou (NH₂) a aldehydovou skupinu (=O), jejímž výsledkem je vznik vazby C=N, tedy Schiffova báze. K síťovací reakci byl jako zdroj aldehydické skupiny použit oxidovaný dextran a jako zdroj (-NH₂) skupiny želatina. Síťované vzorky byly připraveny postupným smícháním všech 3 složek (želatina, oxidovaný dextran a aktivační činidlo). Samotný tisk byl proveden až po 10 minutách od začátku síťovací reakce. Jeho realizace byla díky specifickému materiálu náročná, zejména na nastavení tiskových parametrů, které odpovídalo tomuto nastavení (Rychlost tisku 2,0 mm/s; rychlost vytlačování materiálu 1,78 μl/s; teplota v tiskové hlavě 35,5 °C). Při vlastním tisku docházelo pouze k malému zvýšení rychlosti vytlačovaného množství materiálu (cca 0,3 μl/s), především vlivem vysoké viskozity materiálu. Právě vysoká viskozita materiálu působila problémy spojené s vytlačováním materiálu. Tvar použité špičky (d=0,41 mm) injekční stříkačky, odpovídal tvaru kužele, který se ukázal jako nevhodný. Na jeho okrajích totiž docházelo ke vzniku vysokých smykových napětí (vlivem vysoké rychlosti smykové deformace). Materiál tak neměl dostatek času vyrelaxovat, a proto docházelo k jeho (1) narůstání za výstupní štěrbinou, jettingu (narušení kontinuálního toku materiálu) nebo k die drool tzn. ulpívání materiálu na výstupní štěrbině. Přítomnost všech těchto jevů způsobila v některých případech deformaci tvaru tištěného vzorku vlivem nahromaděného materiálu. Při pokusu tento jev eliminovat použitím odlišné výstupní štěrbinu ve tvaru jehly s delší výstupní sekcí, nedošlo k vytlačení materiálu skrze navrženou výstupní štěrbinu. Příčinou byla příliš vysoká viskozita materiálu, díky které neměl píst tiskárny dostatečný výkon k jeho stlačení. Proto byla viskozita materiálu snížena, zvýšením poměru želatiny k DEX-OX.

Při porovnání porozity všech připravených vzorků v lyofilizovaném stavu bylo zjištěno, že v případě želatiny (králičí, hovězí) iniciované pomocí NH₃, dochází k nárůstu počtu pórů i jejich objemu, s rostoucím počtem vrstev. Mimo jiné bylo zjištěno, že s rostoucím podílem

želatiny ve směsi, dochází k poklesu viskozity, a tedy i k výraznému poklesu rychlosti síťovací reakce. Což se projevilo celkovou destrukcí vzhledu vytištěných vzorků (viz obrázky č. 42 a 45), i počtem detekovaných vnitřních pórů (viz graf č. 3) v matici (především vzorky tištěné v 1 vrstvě). Paradoxně s vyšším počtem vrstev (3 vrstvy, 5 vrstev) tento pokles v objemech pórů nepozorujeme. Sady obsahující aktivační činidlo TEA, jevíly daleko stabilnější chování při tisku i se zvyšujícím se poměrem želatiny k DEX-OX. Výsledné hodnoty porozity potvrdily, že s rostoucím počtem tištěných vrstev roste i počet detekovaných pórů v matici i jejich celkový objem.

Nejvyšší počet pórů byl zjištěn u sady vzorků s hovězí želatinou a NH₃ (s označením 2-B-N) vytištěného v 5 vrstvách (cca 40 000 pórů). V případě sady vzorků používající činidlo TEA, byl nejvyšší počet pórů detekován u vzorku s označením 3-B-T (poměr 3 ku 1) a to (cca 32 500 pórů). U králičí želatiny síťované pomocí NH₃, byl nejvyšší počet pórů zjištěn u vzorku s označením 2-R-N (poměr 2 ku 1), jejíž hodnota odpovídala (cca 32 500 pórů). V případě činidla TEA, byl nejvyšší počet pórů zjištěn u vzorku (s označením 1-R-T) a jednalo se o (cca 42 500 pórů). Ze všech připravených materiálových kombinací lze konstatovat, že z hlediska počtu pórů, lze za nejlepší poměr označit poměr 2 ku 1.

Nejvyšší celkový objem pórů byl zjištěn u sady vzorků obsahující hovězí želatinu s označením 2-B-N (poměr 2ku1, NH₃, 5 vrstev) a odpovídal hodnotě okolo 450 x 10⁹ μm³. Srovnatelný objem pórů byl potvrzen i u vzorku s označením 1-B-T (poměr 1ku1, TEA, 5 vrstev) a jeho hodnota odpovídala 470 x 10⁹ μm³. V případě sady vzorků s králičí želatinou, byl vysoký objem pórů určen u vzorku s označením 2-R-N (poměr 2ku1, NH₃, 5 vrstev), jehož hodnota odpovídala 390 x 10⁹ μm³. O něco vyšší hodnota byla určena u vzorku s označením 2-R-T (poměr 2ku1, TEA, 5 vrstev), který obsahoval 550 x 10⁹ μm³. Ze všech připravených materiálových kombinací lze konstatovat, že z hlediska objemu pórů, lze za nejlepší poměr označit poměr 2 ku 1.

Ze všech 12 materiálových sad byla vybrána nejlepších kombinace, u které bylo provedeno jejich rehydratování v DEMI vodě. Po zbobtnání (vzorek navázal cca 0,5g vody), byl vzorek znovu analyzován metodou CT (z pohledu porozity) a porovnán s daty získanými před hydratací. Jednalo se o 2 vzorky hovězí (2-B-N (NH₃) a 2-B-T (TEA)) a 2 vzorky králičí želatiny (2-R-N (NH₃) a 2-R-T (TEA)). Při porovnání celkového počtu pórů, bylo zjištěno, že u vzorků obsahujících hovězí želatinu, vykazovaly lyofilizované a rehydratované vzorky stále stejný počet detekovaných pórů, zatímco v případě želatiny králičí, došlo

k intenzivnímu nárůstu počtu pórů v hydratované matrici (NH₃ i TEA). Kromě počtu pórů přítomných v materiálové matrici, byl u lyofilizovaných a hydratovaných vzorků porovnán i celkový objem pórů. Vzorky připravené z hovězí želatiny vykazovaly po hydrataci zřetelný nárůst celkového objemu, zatímco v případě králičí želatiny, se do výsledků celkového objemu pórů proces hydratace nijak nepromítnul. Hydratací, se tedy v případě králičí želatiny, nezmění jejich celková plocha, kterou jednotlivé póry zaujímaly v matrici, ale zvětšil se jejich počet.

Na základě všech provedených experimentů, uvedených v této práci, lze konstatovat, že mezi parametry, které se podílí na změně porozity materiálů na bázi želatiny, lze zařadit typ želatiny, počet tiskových vrstev, poměr želatiny a dex-ox i typ aktivačního činidla. Připravený materiál představuje velký potenciál v přípravě bioinku, především díky jeho biokompatibilitě, nulové toxicitě, i možnosti jeho použití při 3D tisku různých struktur.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] B. D. Zdravkov, J. J. Čermák, M. Šefara, and J. Janků, “Pore classification in the characterization of porous materials: A perspective,” *Cent. Eur. J. Chem.*, vol. 5, no. 2, pp. 385–395, 2007, doi: 10.2478/s11532-007-0017-9.
- [2] O. M. Yaghi, M. O’Keeffe, N. W. Ockwig, H. K. Chae, M. Eddaoudi, and J. Kim, “Reticular synthesis and the design of new materials,” *Nature*, vol. 423, no. 6941, pp. 705–714, 2003, doi: 10.1038/nature01650.
- [3] F. Rengier *et al.*, “3D printing based on imaging data: review of medical applications,” *Int. J. Comput. Assist. Radiol. Surg.*, vol. 5, no. 4, pp. 335–341, 2010, doi: 10.1007/s11548-010-0476-x.
- [4] J. Jang *et al.*, “3D printed complex tissue construct using stem cell-laden decellularized extracellular matrix bioinks for cardiac repair,” *Biomaterials*, vol. 112, pp. 264–274, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.10.026>.
- [5] G. Gao, Y. Huang, A. F. Schilling, K. Hubbell, and X. Cui, “Organ Bioprinting: Are We There Yet?,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 7, no. 1, p. 1701018, Jan. 2018, doi: <https://doi.org/10.1002/adhm.201701018>.
- [6] S. Ji and M. Guvendiren, “Complex 3D bioprinting methods,” *APL Bioeng.*, vol. 5, no. 1, 2021, doi: 10.1063/5.0034901.
- [7] Z. Fu, S. Naghieh, C. Xu, C. Wang, W. Sun, and D. X. Chen, “Printability in extrusion bioprinting,” *Biofabrication*, 2021, doi: 10.1088/1758-5090/abe7ab.
- [8] T. Li, J. Chang, Y. Zhu, and C. Wu, “3D Printing of Bioinspired Biomaterials for Tissue Regeneration,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 9, no. 23, SI, 2020, doi: 10.1002/adhm.202000208.
- [9] S. Wasti and S. Adhikari, “Use of Biomaterials for 3D Printing by Fused Deposition Modeling Technique: A Review,” *Front. Chem.*, vol. 8, no. May, pp. 1–14, 2020, doi: 10.3389/fchem.2020.00315.
- [10] U. Jammalamadaka and K. Tappa, “Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering,” *J. Funct. Biomater.*, vol. 9, no. 1, 2018, doi: 10.3390/jfb9010022.
- [11] M. Salah, L. Tayebi, K. Moharamzadeh, and F. B. Naini, “Three-dimensional bio-

- printing and bone tissue engineering: technical innovations and potential applications in maxillofacial reconstructive surgery,” *Maxillofac. Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 42, no. 1, p. 18, 2020, doi: 10.1186/s40902-020-00263-6.
- [12] H. C. Liang, W. H. Chang, H. F. Liang, M. H. Lee, and H. W. Sung, “Crosslinking structures of gelatin hydrogels crosslinked with genipin or a water-soluble carbodiimide,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 91, no. 6, pp. 4017–4026, 2004, doi: 10.1002/app.13563.
- [13] A. Kimura, F. Yoshida, M. Ueno, and M. Taguchi, “Application of radiation crosslinking technique to development of gelatin scaffold for tissue engineering,” *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 180, p. 109287, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2020.109287>.
- [14] S. Ahammed, F. Liu, J. Wu, M. N. Khin, W. H. Yokoyama, and F. Zhong, “Effect of transglutaminase crosslinking on solubility property and mechanical strength of gelatin-zein composite films,” *FOOD Hydrocoll.*, vol. 116, 2021, doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106649.
- [15] W.-H. Lin and W.-B. Tsai, “In situ UV-crosslinking gelatin electrospun fibers for tissue engineering applications,” *Biofabrication*, vol. 5, no. 3, p. 35008, 2013, doi: 10.1088/1758-5082/5/3/035008.
- [16] J. Liu, L. Zhang, C. Liu, X. Zheng, and K. Tang, “Tuning structure and properties of gelatin edible films through pullulan dialdehyde crosslinking,” *LWT*, vol. 138, p. 110607, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110607>.
- [17] Y. Jiang *et al.*, “Dialdehyde cellulose nanocrystal/gelatin hydrogel optimized for 3D printing applications,” *J. Mater. Sci.*, vol. 53, no. 16, pp. 11883–11900, 2018, doi: 10.1007/s10853-018-2407-0.
- [18] Z. Du *et al.*, “Physiological pH-dependent gelation for 3D printing based on the phase separation of gelatin and oxidized dextran,” *Chem. Commun.*, vol. 53, no. 97, pp. 13023–13026, 2017, doi: 10.1039/c7cc08225h.
- [19] M. S. Jeon *et al.*, “Fabrication of three-dimensional porous carbon scaffolds with tunable pore sizes for effective cell confinement,” *Carbon N. Y.*, vol. 130, pp. 814–821, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2018.01.050>.
- [20] A. Muñoz-Bonilla, M. Fernández-García, and J. Rodríguez Hernández, “Towards

- hierarchically ordered functional porous polymeric surfaces prepared by the breath figures approach,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 39, pp. 510–554, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.08.006.
- [21] J. J. Klawitter, J. G. Bagwell, A. M. Weinstein, B. W. Sauer, and J. R. Pruitt, “An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 10, no. 2, pp. 311–323, Mar. 1976, doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.820100212>.
- [22] G. D’Amico, “Si-SiC based materials obtained by infiltration of silicon: study and applications,” 2015.
- [23] A. Bandyopadhyay, S. Vahabzadeh, A. Shivaram, and S. Bose, “Three-dimensional printing of biomaterials and soft materials,” *MRS Bull.*, vol. 40, no. 12, pp. 1162–1169, 2015, doi: DOI: 10.1557/mrs.2015.274.
- [24] D. Shilo, O. Emodi, O. Blanc, D. Noy, and A. Rachmiel, “Printing the Future-Updates in 3D Printing for Surgical Applications.,” *Rambam Maimonides Med. J.*, vol. 9, no. 3, Jul. 2018, doi: 10.5041/RMMJ.10343.
- [25] M. Píška, *Speciální technologie v obrábění*. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2009.
- [26] R. Xiao, M. Ding, Y. Wang, L. Gao, R. Fan, and Y. Lu, “Stereolithography (SLA) 3D printing of carbon fiber-graphene oxide (CF-GO) reinforced polymer lattices,” *Nanotechnology*, vol. 32, no. 23, p. 235702, 2021, doi: 10.1088/1361-6528/abe825.
- [27] Dk metal prominent s.r.o., “Přehled technologií 3D tisku.” <http://www.dkmp.cz/onas/detail/prehled-technologie-3d-tisku>.
- [28] V. Shanmugam *et al.*, “Fatigue behaviour of FDM-3D printed polymers, polymeric composites and architected cellular materials,” *Int. J. Fatigue*, vol. 143, p. 106007, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfatigue.2020.106007>.
- [29] J. An, J. E. M. Teoh, R. Suntornnond, and C. K. Chua, “Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues,” *Engineering*, vol. 1, no. 2, pp. 261–268, 2015, doi: <https://doi.org/10.15302/J-ENG-2015061>.
- [30] S. Pina *et al.*, “Scaffolding strategies for tissue engineering and regenerative medicine applications,” *Materials (Basel)*, vol. 12, no. 11, 2019, doi: 10.3390/ma12111824.

- [31] T. H. Jovic, E. J. Combella, Z. M. Jessop, and I. S. Whitaker, “3D Bioprinting and the Future of Surgery,” *Front. Surg.*, vol. 7, no. November, pp. 1–10, 2020, doi: 10.3389/fsurg.2020.609836.
- [32] Y. J. Choo, M. Boudier-Revéret, and M. C. Chang, “3D printing technology applied to orthosis manufacturing: narrative review,” *Ann. Palliat. Med.*, vol. 9, no. 6, pp. 4262–4270, Nov. 2020, doi: 10.21037/apm-20-1185.
- [33] V. Keriquel *et al.*, “In situ printing of mesenchymal stromal cells, by laser-assisted bioprinting, for in vivo bone regeneration applications,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 1778, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-01914-x.
- [34] M. K. DeBari, M. N. Keyser, M. A. Bai, and R. D. Abbott, “3D printing with silk: considerations and applications,” *Connect. Tissue Res.*, vol. 61, no. 2, pp. 163–173, Mar. 2020, doi: 10.1080/03008207.2018.1553959.
- [35] I. T. Ozbolat, “Extrusion-Based Bioprinting,” in *3D BIOPRINTING: FUNDAMENTALS, PRINCIPLES AND APPLICATIONS*, 125 LONDON WALL, LONDON EC2Y 5AS, ENGLAND: ACADEMIC PRESS LTD-ELSEVIER SCIENCE LTD, 2017, pp. 93–124.
- [36] Abdominal Key, “3D Bioprinting for Tissue Engineering.” abdominalkey.com/3d-bioprinting-for-tissue-engineering/.
- [37] M. Niaounakis, *Biopolymers: Application and trends*. 2015.
- [38] K. J. Seon, H. Soyoun, and H. Changmo, “Bio-ink Materials for 3D Bio-printing,” *J. Int. Soc. Simul. Surg.*, vol. 3, no. 2, pp. 49–59, Dec. 2016, doi: 10.18204/JISSIS.2016.3.2.049.
- [39] A. Bouhamed *et al.*, “Customizing hydrothermal properties of inkjet printed sensitive films by functionalization of carbon nanotubes,” *Nanotechnology*, vol. 32, no. 10, p. 105708, 2020, doi: 10.1088/1361-6528/abcc95.
- [40] T. B. Ngo, B. S. Spearman, N. Hlavac, and C. E. Schmidt, “Three-Dimensional Bioprinted Hyaluronic Acid Hydrogel Test Beds for Assessing Neural Cell Responses to Competitive Growth Stimuli,” *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 6, no. 12, pp. 6819–6830, Dec. 2020, doi: 10.1021/acsbomaterials.0c00940.
- [41] X. Li *et al.*, “3D-printed biopolymers for tissue engineering application,” *Int. J.*

- Polym. Sci.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/829145.
- [42] P. S. Gungor-Ozkerim, I. Inci, Y. S. Zhang, A. Khademhosseini, and M. R. Dokmeci, “Bioinks for 3D bioprinting: an overview,” *Biomater. Sci.*, vol. 6, no. 5, pp. 915–946, 2018, doi: 10.1039/C7BM00765E.
- [43] G. O. Phillips and P. A. B. T.-H. of F. P. Williams, Eds., “Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition,” in *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, Woodhead Publishing, 2011, pp. xv–xxii.
- [44] G. O. Phillips and P. A. B. T.-H. of F. P. Williams, Eds., “Copyright,” in *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, Woodhead Publishing, 2011, p. iii.
- [45] C. K. and K. E. V. H. Mathews, *Biochemistry*, Second. Calif: Benjamin/Cummings, 1996.
- [46] Y. F. Chin, R. Hassan, and M. S. Mohamad, “Optimized Local Protein Structure with Support Vector Machine to Predict Protein Secondary Structure,” in *KNOWLEDGE TECHNOLOGY*, 2012, vol. 295, pp. 333–342.
- [47] V. Tolstoguzov, “Origins of globular structure in proteins,” *FEBS Lett.*, vol. 444, no. 2–3, pp. 145–148, Feb. 1999, doi: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00040-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00040-X).
- [48] C. Travaglini-Allocatelli, Y. Ivarsson, P. Jemth, and S. Gianni, “Folding and stability of globular proteins and implications for function.,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 3–7, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.sbi.2008.12.001.
- [49] R. Wheeler, “Hemoglobin,” 2007. https://en.wikipedia.org/wiki/Hemoglobin#/media/File:1GZX_Haemoglobin.png.
- [50] J. B. SPEAKMAN, “Fibrous Proteins,” *Nature*, vol. 158, no. 4014, pp. 473–476, 1946, doi: 10.1038/158473b0.
- [51] As. J. Riley, “No Tihe Keratin Trilogy: Skin, Hair and Nails.tle,” 2015. <https://www.ausmed.com/cpd/articles/what-is-keratin>.
- [52] S. M. Smith, “Strategies for the Purification of Membrane Proteins,” in *PROTEIN CHROMATOGRAPHY: METHODS AND PROTOCOLS, 2ND EDITION*, vol. 1485, Walls, D and Loughran, ST, Ed. 999 RIVERVIEW DR, STE 208, TOTOWA, NJ 07512-1165 USA: HUMANA PRESS INC, 2017, pp. 389–400.

- [53] VŠCHT, “Membránové bílkoviny.” https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/bilkoviny_membranove.html.
- [54] L. L. J. Peta Peterková, “KOLAGEN - VLASTNOSTI, MODIFIKACE A APLIKACE,” *Chem. List.*, [Online]. Available: <http://chemicke-listy.cz/docs/full/archiv/2000-PDF/06-PDF/371-379.pdf>.
- [55] A. Blažej, *Technologie kůže a kožešin*. Praha: SNTL, 1984.
- [56] P. O’Donnell, “Collagen,” 2019. <https://www.orthobullets.com/basic-science/9013/collagen>.
- [57] F. F. Felician, C. Xia, W. Qi, and H. Xu, “Collagen from Marine Biological Sources and Medical Applications,” *Chem. Biodivers.*, vol. 15, no. 5, p. e1700557, May 2018, doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700557>.
- [58] G. H. Xia, X. R. Shen, Z. Liu, P. Li, and Z. Q. Jiu, “Study on the Emulsifying Properties of Tilapia Skin Gelatin,” *Adv. Mater. Res.*, vol. 690–693, pp. 1390–1394, 2013, doi: [10.4028/www.scientific.net/AMR.690-693.1390](https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.690-693.1390).
- [59] R. S. and H. Gareis, *Gelatin handbook*. 2007.
- [60] Q. Xing, K. Yates, C. Vogt, Z. Qian, M. C. Frost, and F. Zhao, “Increasing mechanical strength of gelatin hydrogels by divalent metal ion removal,” *Sci. Rep.*, vol. 4, pp. 1–10, 2014, doi: [10.1038/srep04706](https://doi.org/10.1038/srep04706).
- [61] D. Hellio and M. Djabourov, “Physically and chemically crosslinked gelatin gels,” *Macromol. Symp.*, vol. 241, pp. 23–27, 2006, doi: [10.1002/masy.200650904](https://doi.org/10.1002/masy.200650904).
- [62] J. Ratanavaraporn, R. Rangkupan, H. Jeeratawatchai, S. Kanokpanont, and S. Damrongsakkul, “Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 47, no. 4, pp. 431–438, 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.06.008>.
- [63] F. Redaelli, M. Sorbona, and F. Rossi, *Synthesis and processing of hydrogels for medical applications*. Elsevier Ltd, 2017.
- [64] S. Dumitriu, *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility, Second Edition*. CRC Press, 2004.
- [65] B. Matouš, *Základy lékařské chemie a biochemie*. 2010.
- [66] D. Horton, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Elsevier Science,

2011.

- [67] R. Li, T. Zeng, M. Wu, H. Zhang, and X. Hu, “Effects of esterification on the structural, physicochemical, and flocculation properties of dextran,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 174, pp. 1129–1137, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.07.034.
- [68] T. Heinze, T. Liebert, B. Heublein, and S. Hornig, “Functional polymers based on dextran,” *Adv. Polym. Sci.*, vol. 205, no. 1, pp. 199–291, 2006, doi: 10.1007/12_100.
- [69] A. Fallacara, E. Baldini, S. Manfredini, and S. Vertuani, “Hyaluronic acid in the third millennium,” *Polymers (Basel)*, vol. 10, no. 7, 2018, doi: 10.3390/polym10070701.
- [70] R. U. S. A. Data, “(12) United States Patent,” vol. 2, no. 12, 2013.
- [71] M. Pekař, “A note on an alternative DSC approach to study hydration of hyaluronan,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 89, no. 4, pp. 1009–1011, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.050>.
- [72] K. A. Johnson, K. R. Davis, F. S. Buonanno, T. J. Brady, T. J. Rosen, and J. H. Growdon, “Comparison of Magnetic Resonance and Roentgen Ray Computed Tomography in Dementia,” *Arch. Neurol.*, vol. 44, no. 10, pp. 1075–1080, Oct. 1987, doi: 10.1001/archneur.1987.00520220071020.
- [73] C. Leiva-Salinas, B. Jiang, and M. Wintermark, “Computed Tomography, Computed Tomography Angiography, and Perfusion Computed Tomography Evaluation of Acute Ischemic Stroke,” *Neuroimaging Clin. N. Am.*, vol. 28, no. 4, pp. 565–572, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.nic.2018.06.002>.
- [74] R. P. Feynman, R. B. Leighton, and M. Sands, *The Feynman Lectures on Physics, Vol. II: The New Millennium Edition: Mainly Electromagnetism and Matter*. Basic Books, 2011.
- [75] DANIEL STRIČEK, “Průmyslové CT řešení pro náročné aplikace.” <https://www.engineering.sk/clanky2/stroje-a-technologie/3424-prumyslove-ct-reseni-pro-narocne-aplikace>.
- [76] H. Hassander, “Electron microscopy methods for studying polymer blends—comparison of scanning electron microscopy and transmission electron microscopy,” *Polym. Test.*, vol. 5, no. 1, pp. 27–36, 1985, doi: [https://doi.org/10.1016/0142-9418\(85\)90029-7](https://doi.org/10.1016/0142-9418(85)90029-7).

- [77] J. Reichel, “Encyklopedie fyziky, Skenovací elektronový mikroskop,” 2021.
<http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/1675-skenovaci-elektronovy-mikroskop>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2D – Dvoudimenzionální

3D - Třidimenzionální

IUPAC - (International Union of Pure and Applied Chemistry)

SEM – Skenovací elektronová mikroskopie

CT – Computer tomography (počítačová tomografie)

SLA – stereolytografie

EBD – extrusion based deposition (pokládání na bázi extruze)

LAB – Laser asisted bioprinting (laserem asistovaný biotisk)

IUPAC - (International Union of Pure and Applied Chemistry)

FDM – Fused deposition modeling (modelování spojeným pokládáním)

CAD – Computer aided designe (počítačem řízený design)

SLS – Selective laser sintering (selektivní sintrování pomocí laseru)

SLM – Selective laser melting (selektivní tavení pomocí laseru)

PLA – Polylactid acid (kyseliny polymléčná)

ABS – Akrylonitrilbutadienstyren

PMMA – Polymethylmethakrylát

PEG – Polyethyleneglykol

PE – Polyethylen

DNA - Deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)

FACIT – Fibril-associated collagens with intereupted triple helix (vláknitě spojené kolagen bsahující trojitou šroubovici)

TEM – Transmisní elektronová mikroskopie

TEA – Trimethylamin

DEMI – demineralizovaný

DEX-OX – Oxidovaný dextran

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 - Grafické znázornění přístupnosti pórů dle IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry): (a) – uzavřený pór; (b, f) – póry uzavřené jen na jednom konci; (c, d, g) – otevřené póry; (e) – průběžné póry. [1].....	16
Obrázek č. 2 – Mikrostruktury produkované replikační technologií. (a) Hliníková otevřená struktura připravená pomocí polyurethanové předlohy; (b) detail výstupku keramické matrice získané z polymerní předlohy (tvar dosažen pyrolýzou organické složky v předloze); (c) vysoce orientovaná mřížka z keramického SiC připravená po kontaktu plynu s předlohou z celulózy (d) makroporézní struktura připravená z mořského korálu. [22]	17
Obrázek č. 3 – Znázornění principu metody tiskárny na bázi stereolitografie (SLA) [27] .	19
Obrázek č. 4 – Princip FDM metody na bázi extruze. [27]	21
Obrázek č. 5 – Princip tisku práškových materiálů (SLA, SLS). [27]	23
Obrázek č. 6 - Příklad laserem asistovaného biotisku [33].....	25
Obrázek č. 7 – Příklad inkoustového tisku a jeho 2 variant (Tepelný, Piezoelektrický). [34]	26
Obrázek č. 8 – Příklad extruzního tisku pro 3 typy uvažovaných tiskových hlav. [36]	27
Obrázek č. 9 – Příklad zobrazení sekundární struktury proteinů.....	30
Obrázek č. 10 – Počítačová projekce globulárního proteinu hemoglobinu. [49]	31
Obrázek č. 11 – Zobrazení keratinu počítačovou modelací. [51].....	32
Obrázek č. 12 – Schéma funkcí membránového proteinu pro cytosol. [53]	32
Obrázek č. 13 – Schéma vzniku vlákna kolagenu. [56].....	34
Obrázek č. 14 – Znázornění vzniku Shiffovi báze.....	37
Obrázek č. 15 – Praktická příprava Shiffovi báze. [63].....	38
Obrázek č. 16 – Strukturní jednotka větveného dextranu.....	40
Obrázek č. 17 – Strukturní jednotka lineárního dextrinu.....	40
Obrázek č. 18 – Strukturní jednotka kyseliny hyaluronové. [70].....	42
Obrázek č. 19– Schéma principu rentgenového tomografu [75]	44
Obrázek č. 20 – Schéma principu elektronového mikroskopu [77]	45
Obrázek č. 21 – Schéma navrženého experimentu	47
Obrázek č. 22 – Granulát hovězího (snímek B vlevo) a králíčího (snímek R vpravo) hydrolyzátu.	48
Obrázek č. 23 - Schéma přípravy oxidovaného dextranu.	48
Obrázek č. 24 – Forma oxidovaného dextranu (dex-ox) před jeho rozpuštěním.	49
Obrázek č. 25 – Schéma síťování oxidovaného dextranu a želatiny.	49
Obrázek č. 26 – Navržený model pro 3D tisk.....	51
Obrázek č. 27 - 3D tiskárna Bio X od firmy Cellink (vlevo), detail tisku (vpravo).....	52
Obrázek č. 28 – SEM Phenom G2 Pro	53

Obrázek č. 29 – Rentgenový tomograf Skyscan 1074.....	54
Obrázek č. 30 – Vytisknuté vzorky 1-B-N (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.....	56
Obrázek č. 31 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 1-B-N (pořízené pomocí SEM). Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 μm	57
Obrázek č. 32 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 1-B-N.	58
Obrázek č. 33 – Vytisknuté vzorky 1-R-N (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.....	59
Obrázek č. 34 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 1-R-N (pořízené pomocí SEM). A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 μm	59
Obrázek č. 35 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 1-R-N.	61
Obrázek č. 36 – Vytisknuté vzorky 2-B-N (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.....	62
Obrázek č. 37 - Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 2-B-N (pořízené pomocí SEM). Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 μm	62
Obrázek č. 38 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 2-B-N.	64
Obrázek č. 39 – Vytisknuté vzorky 2-R-N (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.....	65
Obrázek č. 40 - Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 2-R-N (pořízené pomocí SEM). Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 μm	65
Obrázek č. 41 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 2-R-N.	66
Obrázek č. 42 – Vytisknuté vzorky 3-B-N (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.....	67
Obrázek č. 43 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 3-B-N (pořízené pomocí SEM). Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 μm	68
Obrázek č. 44 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 3-B-N.	69
Obrázek č. 45 – Vytisknuté vzorky 3-R-N (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.....	70
Obrázek č. 46 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 3-R-N (pořízené pomocí SEM). A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 μm	70
Obrázek č. 47 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 3-R-N.	72
Obrázek č. 48 – Vytisknuté vzorky 1-B-T (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.....	73
Obrázek č. 49 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 1-B-T (pořízené pomocí SEM). Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 μm	74
Obrázek č. 50 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 1-B-T.....	75
Obrázek č. 51 – Vytisknuté vzorky 1-R-T (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.....	76
Obrázek č. 52 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 1-B-T (pořízené pomocí SEM). Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 μm	77

Obrázek č. 53 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 1-R-T.....	78
Obrázek č. 54 – Vytisknuté vzorky 2-B-T (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.....	79
Obrázek č. 55 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 2-B-T (pořízené pomocí SEM). Kde A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 μm.....	79
Obrázek č. 56 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 2-B-T.....	80
Obrázek č. 57 – Vytisknuté vzorky 2-R-T (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.....	81
Obrázek č. 58 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 2-R-T (pořízené pomocí SEM). Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 μm.....	82
Obrázek č. 59 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 2-R-T.....	83
Obrázek č. 60 – Vytisknuté vzorky 3-B-T (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.....	84
Obrázek č. 61 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 3-B-T (pořízené pomocí SEM). Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 μm.....	85
Obrázek č. 62 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 3-B-T. Kde:.....	86
Obrázek č. 63 – Vytisknuté vzorky 3-R-T (horní řada) a lyofilizované vzorky (spodní řada), kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev.....	87
Obrázek č. 64 – Příklady snímků řezů jednotlivých vzorků 3-R-T (pořízené pomocí SEM). Kde: A – 1 vrstva; B – 3 vrstvy; C – 5 vrstev. Fotografie má rozměr 537x571 μm.....	87
Obrázek č. 65 – Řezy pořízené z tomografu pro vzorek 3-B-T. Kde:.....	88
Obrázek č. 66 – Řezy pořízené z tomografu pro poměr 2-1 pro hovězí želatinu. Počet tisknutých vrstev 3. Kde: N – vzorek s NH ₃ ; T – vzorek s TEA.	89
Obrázek č. 67 – Řezy pořízené z tomografu pro poměr 2-1 pro králičí želatinu. Počet tisknutých vrstev 3. Kde: N – vzorek s NH ₃ ; T – vzorek s TEA.	90

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1- Rozdělení velikosti pórů podle různých autorů [1].	15
Tabulka 2– Souhrn všech připravených materiálových kombinací s příslušnými poměry (Pozn. B – bovine (hovězí); R – rabbit (králíčí))	50
Tabulka 3 – Analýza snímku ze SEM pomocí programu Image J.	57
Tabulka 4 – CT analýza řezů vzorku 1-B-N pomocí programů DataViewer a CTAn.	58
Tabulka 5 – Analýza snímku ze SEM pomocí programu Image J.	60
Tabulka 6 – CT analýza řezů vzorku 1-R-N pomocí programů DataViewer a CTAn.	61
Tabulka 7 – Analýza snímku ze SEM pomocí programu Image J.	63
Tabulka 8 – CT analýza řezů vzorku 2-B-N pomocí programů DataViewer a CTAn.	64
Tabulka 9 – Analýza snímku ze SEM pomocí programu Image J.	66
Tabulka 10 – CT analýza řezů vzorku 2-R-N pomocí programů DataViewer a CTAn.	67
Tabulka 11 – Analýza snímku ze Sem pomocí programu Image J.	68
Tabulka 12 - CT analýza řezů vzorku 3-B-N pomocí programů DataViewer a CTAn.	69
Tabulka 13 – Analýza snímku ze SEM pomocí programu Image J.	71
Tabulka 14 – CT analýza řezů vzorku 3-R-N pomocí programů DataViewer a CTAn.	72
Tabulka 15 – Analýza snímků sady 1-B-T ze SEM pomocí programu Image J sady.	75
Tabulka 16 - CT analýza řezů vzorku 1-B-T pomocí programů DataViewer a CTAn.	76
Tabulka 17 – Analýza snímku sady 1-R-T ze SEM pomocí programu Image J.	77
Tabulka 18 – CT analýza řezů vzorku 1-R-T pomocí programů DataViewer a CTAn.	78
Tabulka 19 – Analýza snímku sady 2-B-T ze SEM pomocí programu Image J.	80
Tabulka 20 – CT analýza řezů vzorků 2-B-T pomocí programů DataViewer a CTAn.	81
Tabulka 21 – Analýza snímku vzorku 2-R-T ze SEM pomocí programu Image J.	82
Tabulka 22 – CT analýza řezů vzorku 2-R-T pomocí programů DataViewer a CTAn.	83
Tabulka 23 – Analýza snímku vzorku 3-B-T ze SEM pomocí programu Image J.	85
Tabulka 24 - CT analýza řezů vzorku 3-B-T pomocí programů DataViewer a CTAn	86
Tabulka 25 – Analýza SEM snímků sady vzorků 3-R-T pomocí programu Image J.	88
<i>Tabulka 26 – CT analýza řezů vzorků 3-R-T pomocí programů DataViewer a CTAn.</i>	<i>89</i>
Tabulka 27 – CT analýza řezů vzorků 2-B-N-H a 2-B-T-H pomocí programů DataViewer a CTAn.	90
Tabulka 28 - CT analýza řezů vzorků 2-R-N-H a 2-R-T-H pomocí programů DataViewer a CTAn.	91

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1 – Porovnání počtu vnitřních pórů v závislosti na počtu tisknutých vrstev pro poměr želatiny a dex-ox (1ku1) síťované s činidly (Kde: N-NH ₃ ,T- TEA).	92
Graf č. 2 – Porovnání počtu vnitřních pórů v závislosti na počtu tisknutých vrstev pro poměr želatiny a dex-ox (2ku1) síťované s činidly (Kde: N-NH ₃ ,T- TEA).....	93
Graf č. 3 – Porovnání počtu vnitřních pórů v závislosti na počtu tisknutých vrstev pro poměr želatiny a dex-ox (3ku1) síťované s činidly (Kde: N-NH ₃ ,T- TEA).....	94
Graf č. 4 – Porovnání celkového objemu vnitřních pórů v závislosti na počtu tištěných vrstev pro poměr želatiny a dex-ox (1ku1) síťované s činidly (Kde: N-NH ₃ ,T- TEA).	94
Graf č. 5 – Porovnání celkového objemu vnitřních pórů v závislosti na počtu tištěných vrstev pro poměr želatiny a dex-ox (2ku1) síťované s činidly (Kde: N-NH ₃ ,T- TEA).	95
Graf č. 6 - Porovnání celkového objemu vnitřních pórů v závislosti na počtu tištěných vrstev pro poměr želatiny a dex-ox (3ku1) síťované s činidly (Kde: N-NH ₃ ,T- TEA).	95
Graf č. 7: Porovnání počtu vnitřních pórů lyofilizovaných a hydratovaných vzorků želatiny k dex-ox (poměr 2ku1)s rozdílným aktivačním činidlem (Kde: B-hovězí, R-králíčí; N-NH ₃ ,T- TEA; L-lyofilizované, H – Hydratované vzorky).	96
Graf č. 8 – Porovnání počtu vnitřních pórů lyofilizovaných a hydratovaných vzorků želatiny k dex-ox (poměr 2ku1)s rozdílným aktivačním činidlem (Kde: B-hovězí, R-králíčí; N-NH ₃ ,T- TEA; L-lyofilizované, H – Hydratované vzorky).	97