

# **3D tištěné struktury na bázi polykaprolaktonu pro biologické aplikace**

Tomáš Roman

---

Bakalářská práce  
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tomáš Roman**  
Osobní číslo: **T19082**  
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**  
Specializace: **Materiálové inženýrství**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **3D tištěné struktury na bázi polykaprolaktonu pro biologické aplikace**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma využití polykaprolaktonu v oblasti regenerativní medicíny.
2. Pomocí dostupných 3D tiskáren připravte 3D struktury z polykaprolaktonu.
3. Připravené struktury charakterizujte pomocí dostupných laboratorních technik.
4. Výsledky přehledně diskutujte a uveďte hlavní závěry.

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

Seznam doporučené literatury:

1. BaoLin, G., Ma, P.X., 2014. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Sci. China. Chem.* 57, 490–500. <https://doi.org/10.1007/s11426-014-5086-y>.
2. Sabbatini, Luigia, ed. *Polymer surface characterization*. Berlin: De Gruyter, c2014, xiv, 292 s. De Gruyter graduate. ISBN 9783110275087.
3. Naraynan, Roger, ed. *Rapid prototyping of biomaterials: principles and applications*. Oxford: Woodhead Publishing, 2014, 1 online zdroj (xxi, 308 stran). Woodhead publishing series in biomaterials. ISBN 9780857097217.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Markéta Kadlečková, Ph.D.**  
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **19. května 2023**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

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

Ve Zlíně dne 20. února 2023

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

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

### **Prohlašuji,**

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Tato práce se zabývá tiskem a následným studiem polykaprolaktonových scaffoldů určených pro biologické aplikace. Struktury byly tištěny pomocí termoplastické a pneumatické extruze, kdy byly upravovány tiskové parametry (teplota tiskové hlavy, vytlačovací tlak, rychlost pohybu tiskové hlavy) pro dosažení optimálních výtisků. Byl sledován vliv dobrých rozpouštědel nebo směsi dobrého a špatného rozpouštědla na výslednou povrchovou strukturu polykaprolaktonových výtisků. Vytiskované scaffoldy byly nejprve foceny digitálním mikroskopem a analyzovány pomocí infračervené spektroskopie kvůli ověření čistoty použitého materiálu. Ze získaných hodnot bylo potvrzeno, že po určité době jsou výtisky bez přítomnosti rozpouštědel a jsou tedy vhodné pro biologické aplikace. Pro další analýzy tištěných scaffoldů byl použit skenovací elektronový mikroskop a kontaktní profilometrie. Z výsledků vyplývá, že při použití tiskové směsi obsahující polykaprolakton a směs dobrého a špatného rozpouštědla lze připravovat scaffoldy s různou povrchovou strukturou.

Klíčová slova: 3D tisk, Biomateriály, Polykaprolakton, Fázová separace

## **ABSTRACT**

This work deals with the printing and subsequent study of polycaprolactone scaffolds for biological applications. The structures were printed using thermoplastic and pneumatic extrusion, where the printing parameters (print head temperature, extrusion pressure, print head movement speed) were adjusted to achieve optimal prints. The effect of good solvents or a mixture of good and bad solvent on the resulting surface texture of the polycaprolactone prints was investigated. The printed scaffolds were first photographed with a digital microscope and analyzed by infrared spectroscopy to verify the purity of the material used. From the values obtained, it was confirmed that after a certain period of time, the prints are solvent-free and thus suitable for biological applications. Scanning electron microscopy and contact profilometry were used for further analysis of the printed scaffolds. The results show that scaffolds with different surface structures can be prepared using a printing mixture containing polycaprolactone and a mixture of good and bad solvent.

Keywords: 3D printing, Biomaterials, Polycaprolactone, Phase Separation

Tímto bych rád poděkoval Ing. Markétě Kadlečkové, Ph.D., která mou bakalářkou práci vedla s obdivuhodnou trpělivostí, příkladnou profesionalitou a s příjemným přístupem.

Dále bych chtěl poděkovat mým bývalým spolužákům z naší studijní skupiny materiálových inženýrů, se kterými jsem v posledních pár letech musel vyřešit spoustu problémů, a které jsem nikdy nemusel prosit o pomoc dvakrát.

V neposlední řadě bych rád poděkoval všem kantorům, jejichž snaha udělat naše studium co možná nejjednodušší a neklidnější vedla k úspěšnému napsání této práce.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 TKÁŇOVÉ NOSIČE</b> .....	<b>11</b>
1.1 VLASTNOSTI.....	11
1.1.1 Biokompatibilita.....	11
1.1.2 Porozita .....	11
1.1.3 Mechanické vlastnosti .....	12
1.1.4 Bioresorbovatelnost.....	12
1.2 VÝROBA.....	12
1.2.1 Textilní technologie .....	15
1.2.2 Buněčné pevné látky .....	16
1.2.3 Metody Solid Free Form Fabrication (SFF) a jeho specifické aplikace .....	16
1.2.4 Selektivní laserové slinování (SLS).....	17
1.2.5 3D tisk .....	17
<b>2 BIOMATERIÁLY</b> .....	<b>20</b>
2.1 KOVY .....	20
2.2 KERAMIKY .....	21
2.3 POLYMERY .....	22
<b>3 POLYKAPROLAKTON</b> .....	<b>26</b>
3.1 VÝROBA.....	26
3.2 VLASTNOSTI.....	28
3.2.1 Biodegradabilita a Biokompatibilita .....	28
3.3 VYUŽITÍ .....	30
3.3.1 PCL Scaffoldy .....	30
3.3.2 PCL Mikrosféry .....	31
3.3.3 Lékařské pomůcky .....	31
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>33</b>
<b>4 MATERIÁLY</b> .....	<b>34</b>
4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	34
4.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	34
<b>5 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ</b> .....	<b>36</b>
5.1 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ POLYKAPROLAKTONU S DOBRÝM ROZPOUŠTĚDLEM PRO PNEUMATICKOU EXTRUZI .....	36
5.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ POLYKAPROLAKTONU S DOBRÝM A ŠPATNÝM ROZPOUŠTĚDLEM PRO PNEUMATIKOU EXTRUZI .....	36
<b>6 CHARAKTERIZACE TIŠTĚNÝCH STRUKTUR</b> .....	<b>37</b>
6.1 STRUKTURY TIŠTĚNÉ TERMOPLASTICKOU EXTRUZÍ.....	37

6.2	STRUKTURY TIŠTĚNÉ PNEUMATICKOU EXTRUZÍ .....	37
<b>7</b>	<b>DISKUZE A VÝSLEDKY .....</b>	<b>39</b>
7.1	FTIR ANALÝZA VZORKŮ .....	39
7.2	FOCENÍ VZORKŮ MIKROSKOPEM DINO-LITE .....	40
7.3	ANALÝZA POVRCHU VZORKŮ SKENOVACÍM ELEKTRONOVÝM MIKROSKOPEM (SEM) .....	41
7.4	KONTAKTNÍ PROFILOMETRIE VYBRANÝCH VZORKŮ .....	45
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>48</b>
	<b>BIBLIOGRAFIE.....</b>	<b>49</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>55</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>57</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>58</b>



## ÚVOD

Využití různých typů materiálů v oblasti biologických aplikací se v posledních desetiletích stalo velice probíraným tématem. Tyto materiály musí splňovat celou řadu podmínek, jako je biokompatibilita, biodegradabilita, dostatečná buněčná adheze atd. Materiály, které tyto podmínky splňují, se označují jako biomateriály.

Nejslibnější způsob, jak biomateriál zpracovat a přetvořit do požadovaného tvaru, je aditivní výroba neboli 3D tisk. Struktury získané 3D tiskem mohou být využity především v oblasti tkáňového inženýrství, kde nachází své využití jako podpurné scaffoldy pro regeneraci tkání, nebo nosiče léčiv.

Tato práce se zabývá možnostmi zpracování polykaprolaktonu pomocí 3D tisku. Polykaprolakton, který patří mezi dostupné a snadno zpracovatelné syntetické polymery splňuje požadavky kladené pro biomateriály. Je tedy ideálním kandidátem na lékařské a další biologické aplikace. Pro správnou funkci implantátu (scaffoldu) v těle je jeho porozita povrchu, která má velký vliv na integraci scaffoldu do okolní tkáně a buněčné interakce.

Teoretická část práce pojednává o tématech spojených s provedeným experimentem a vysvětluje termíny v práci používané. Jsou zde podrobně popsány možnosti příprav a vlastností scaffoldů. Dále kapitola o biomateriálech, která pojednává o jejich dělení, vlastnostech a využití, a kapitolu čistě věnovanou polykaprolaktonu – jeho vlastnostem, způsobům výroby, jeho rozpouštědlech a využití.

V praktické části jsou popsány průběhy experimentů, jejichž cílem bylo připravit různě strukturované polykaprolaktonové scaffoldy. Také v ní lze nalézt popis jednotlivých použitých přístrojů a materiálů. Jsou zde diskutovány získané výsledky. Specifické parametry tisků a získaných vzorků lze nalézt v tabulkách. V praktické části se dále vyskytují grafy a fotografie, jejichž analýza a diskuze jsou rovněž přiloženy.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 TKÁŇOVÉ NOSIČE

Tkáňové inženýrství je komplexní a dynamický proces, který začíná sběrem a migrací kmenových buněk tkání u kterých následně dojde k proliferaci, diferenciaci, formování matic a přemodelování tkáně, čímž dojde k její nápravě. [1]

Největších pokroků v oblasti tkáňového inženýrství pro nápravu tkání za použití nosičů (scaffoldů) bylo dosaženo skrze faktory ovlivňující růst (vitamíny, hormony), které jsou dopraveny do těla za pomoci tablet nebo nosiči určenými pro doručení specifických genů. [2]

## 1.1 Vlastnosti

Design a tvorba různě porézních scaffoldů s ideálním složením obsahujícím cílené buňky, mechanickými vlastnostmi a správnou biovstřebatelností je obtížným krokem při dosažení jejich úspěšné implementace do tkáně zvoleného subjektu. [1]

### 1.1.1 Biokompatibilita

Biokompatibilita je hlavním požadavkem, který musí scaffold splňovat, aby mohl být použit v praxi. Biokompatibilita scaffoldů je definovaná jako schopnost nosiče podporovat běžné fungování buněk, aniž by měl jakýkoliv lokálně toxický efekt na tkáně v oblasti vložení. [3] [4]

### 1.1.2 Porozita

Další povinnou vlastností, kterou musí každý tkáňový nosič splňovat, je vzájemně propojená porozita, při které by velikost jednotlivých pórů měla dosahovat alespoň 100  $\mu\text{m}$  v průměru. Ideální porozita nosiče se liší dle typu cílené tkáně (např. průměr 200-350  $\mu\text{m}$  je při použití scaffoldu na kostní tkání považován za ideální). Přítomnost pórů o daných průměrech podporuje difuzi nezbytných živin a kyslíku pro podporu růstu a životnosti rostoucích buněk. [1] [5]

Některé studie poukázaly na fakt, že použití scaffoldů, jejichž póry se pohybují v oblasti jak mikro, tak makro velikostí, vede k lepším výsledkům, než když byly použity nosiče pouze s póry o makro průměrech. [6] Naneštěstí, čím větší má scaffold porozitu, tím se zhoršují jeho mechanické vlastnosti, jako třeba pevnost v tlaku, a komplikuje se také reprodukovatelnost scaffoldů. [1]

Postupem času byly tkáňové nosiče o specifické porozitě vyráběny z různých materiálů, jako např. polymery, keramiky, kompozity, nebo kovy. Pevnost scaffoldů vyrobených z biokeramik je podobná pevnosti houbových kostí, zatímco kompozit keramika-polymer je slabší než kost. Kovové porézní scaffoldy dosahují mechanických vlastností kostí, ale nejsou schopny poskytnout dostatečnou kompatibilitu mezi implantátem a tkání. [7]

### 1.1.3 Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti ideálního tkáňového nosiče by měly být shodné s vlastnostmi cílené tkáně, na kterou bude implantován. Zajištění vhodného rozložení váhy je rovněž důležité. Scaffoldy jsou často aplikovány při opravách poškozených kostí. Mechanické vlastnosti kostí se velice liší v závislosti na typu kosti samotné, a to od kostí spongiózních (houbových) až po kosti kortikální. Youngův modul pružnosti kortikální kosti se pohybuje v oblasti 15–20 GPa a pevnost v tlaku v rozmezí 100-200 MPa, kdežto modul pružnosti houbových kostí dosahuje jen hodnot 0,1-2 GPa a pevnost v tlaku jen 2-20 MPa. Obrovské rozdíly v mechanických vlastnostech a geometrické stavbě kostí dělají výběr designu vhodného scaffoldu velmi obtížný. [4]

### 1.1.4 Bioresorbovatelnost

Bioresorbovatelnost neboli biovstřebatelnost, je další důležitou vlastností ideálního scaffoldu. Tkáňový nosič by měl ideálně oplývat podobnými mechanickými vlastnostmi jako cílová tkáň, ale také musí být schopen se při použití *in vivo* rozložit v daném časovém termínu a zároveň tak, aby postupně uvolnil prostor pro nově dorůstající tkáň. [1]

Doba rozkladu scaffoldů se mění podle povahy jeho aplikace. Např. scaffoldy určené na spojování poškozené páteře se rozkládají zhruba 9 měsíců, kdežto scaffoldy používané na opravy v ústní dutině mají dobu rozkladu okolo 3-6 měsíců. [8]

## 1.2 Výroba

Existuje mnoho technologií aplikovaných při zpracování biodegradabilních a biovstřebatelných materiálů pro výrobu scaffoldů s vysokou porozitou a velkým povrchem. Konvenční metody výroby scaffoldů jsou textilní technologie, odlévání rozpouštědlem, vyplavování částic, laminace membrány a tvarování z taveniny. Každá z těchto metod má své výhody na nevýhody. [9]

V dnešní době jsou na výrobu tkáňových nosičů používány 4 základní typy biomateriálů:

1. Syntetické organické materiály (alifatické polyestery, polyetylen glykol...)
2. Syntetické anorganické materiály (hydroxyapatit, skleněné keramiky...)
3. Přírodní organické materiály (kolagen, kyselina hyaluronová...)
4. Přírodní anorganické materiály (korálový hydroxyapatit...) [10]

Scaffoldy by měly být vždy vyráběny z vysoce biokompatibilních materiálů, které nevyvolávají žádnou imunitní nebo jinou lékařsky měřitelnou reakci těla. Dále, materiál je vybrán tak, aby degradoval a vstřebal se přesně danou rychlostí. [11]

Dle těchto podmínek se materiály na výrobu scaffoldů dále dělí do tří různých kategorií:

1. Biodegradabilní a biovstřebatelné polymery, které již byly použity jako součásti lékařsky využívaných produktů (kolagen, hydrogely, PGA...)
2. Polymery, které jsou testovány pro možné použití a čekají na schválení (polyanhydridy, deriváty kyseliny hyaluronové...)
3. Komerční polymerní biomateriály, které selektivně vážou specifické typy buněk a vedou k jejich diferenciaci a proliferaci do cílových tkání. [9]

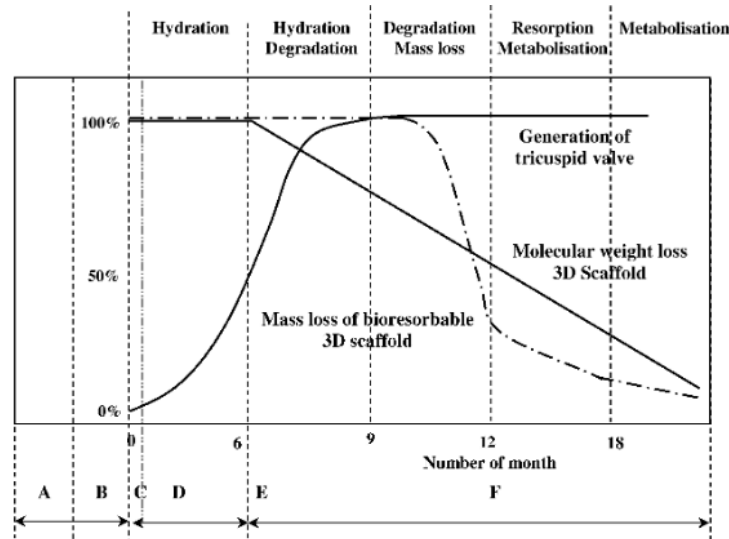
Fabrikace ideálního scaffoldu je z hlediska materiální vědy a s ohledem na celkovou použitelnost založena na dvou způsobech:

**První způsob** spočívá v tom, že fyzická struktura scaffoldu podporuje růst určité struktury na rozhraní polymer/buňky/tkáně od prvního kontaktu tkáně s nosičem až do úplné přeměny transplantátu okolní tkání. V případě, kdy je tkáň pod vlivem námahy (náhrady tepen nebo srdečních chlopní), musí matrice scaffoldu poskytnout dodatečnou dočasnou mechanickou podporu, aby daná náhrada vydržela v *in vivo* prostředí. [9]

Materiál vybíraný podle 1. způsobu je z hlediska biodegradace a doby vstřebávání zvolen tak, aby jeho pevnost zůstala zachována, dokud není daný transplantát dokonale přizpůsoben okolní tkáni a může zaujmout svou stavební roli. (obr.1) Mechanické vlastnosti biovstřebatelného scaffoldu v době implantace by měly být co nejvíce shodné s vlastnostmi cílové tkáně. Náhrada srdeční chlopně vytvořená tkáňovým inženýrstvím by tedy měla být dostatečně ohebná, aby se mohla při aplikaci otevřít za působení minimálních tlakových sil, ale také musí být dostatečně pevná a tuhá, aby dokázala pracovat, dokud dorůstající tkáň

nejdou schopny udržet integritu za postupného nahrazování rozpadající se matrice scaffoldu. [9]

Kopolymery, jako třeba PLA/PGA, PLA/PCL, nebo jen samotný PCL mají pevnost v tlaku podobnou houbovitě kosti a mohou být zpracovány 1. způsobem, protože splňují vypsane podmínky. [9]



- A - Fabrication of bioresorbable 3D scaffold.
- B - Harvest cells from patient.
- C - Cell seeding into a 3D scaffold in a static culture (petri dish).
- D - Growth of mature tissue in a physiologic environment (bioreactor).
- E - Surgical transplantation.
- F - Implant adaptation and assimilation.

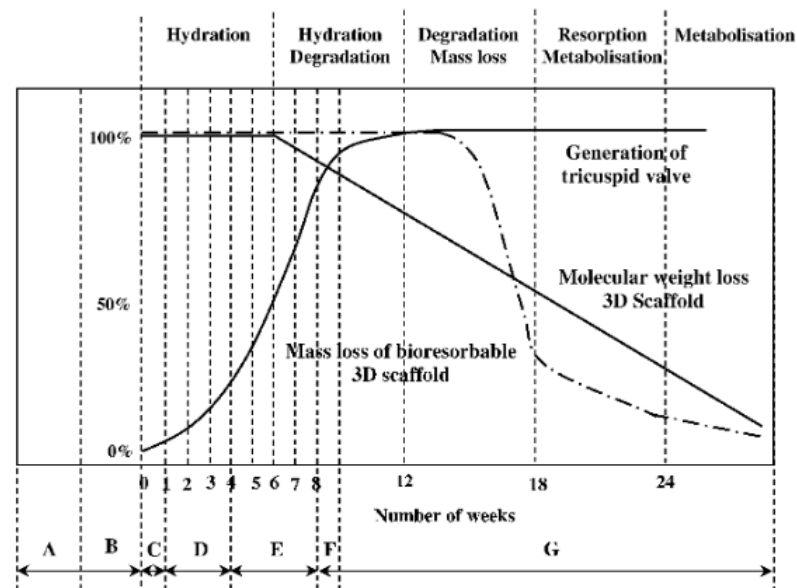
Obrázek 1 - Grafická ilustrace závislosti ztráty hmotnosti scaffoldu na době potřebné k regeneraci tkání při přípravě náhrady srdeční chlopně využitím způsobu 1 dle Hutmachera [9]

Vlastní mechanické vlastnosti scaffoldu ve **druhém způsobu** podporují rozdělování a proliferaci buněk pouze během *in vitro* fáze. Biodegradační a vstřebávací vlastnosti scaffoldu jsou navrženy tak, aby se nechaly buňky během statické, nebo dynamické fáze adherovat, proliferovat a vytvořit extracelulární matrici. Fyzická podpora poskytovaná scaffoldem je udržována, dokud buňky nevytvoří vlastní tkáňovou strukturu *in vitro*, která je dostatečně mechanicky stabilní, aby se sama udržela. Scaffold se poté postupně rozloží a vakantní prostor je vyplněn dorůstající tkání. (obr. 2) Tento koncept je omezen špatnými mechanickými vlastnostmi vznikajících tkání. [9]

Typickým příkladem jsou opět náhrady srdečních chlopní, které byly vpraveny do plicní oblasti, a tedy na ně působilo pouze minimální fyziologické zatížení oproti oblasti aorty, kde

je takové zatížení mnohonásobně vyšší. V některých výzkumech byly tyto náhrady vloženy do bioreaktorů, které dokáží simulovat fyziologické prostředí a měnit v něm podmínky dané procházející kapalinou. [12] [13]

Ma a Langer [14] prokázali, že náhrada chrupavky vystavená měnícímu se prostředí bioreaktoru po dobu sedmi měsíců dosáhla pouze 40 % mechanických vlastností běžné chrupavky. [9]



- A - Fabrication of bioresorbable 3D scaffold.
- B - Harvest cells from patient.
- C - Cell seeding into a 3D scaffold in a static culture (petri dish).
- D - Cell proliferation and differentiation in a dynamic environment (spinner flask).
- E - Growth of mature tissue in a physiologic environment (bioreactor).
- F - Surgical transplantation.
- G - Implant adaptation and assimilation.

Obrázek 2 - Grafická ilustrace závislosti ztráty hmotnosti scaffoldu na době potřebné k regeneraci tkání při přípravě náhrady srdeční chlopně využitím způsobu 2 dle Hutmachera [9]

### 1.2.1 Textilní technologie

Některé textilní technologie mohou být použity na design a fabrikaci vysoce porézních scaffoldů. Vlákná poskytují velký aktivní povrch v poměru k jejich objemu, a je proto výhodné je využít jako materiál pro tvorbu matrice scaffoldu. Dobrých výsledků v oblasti tkáňového inženýrství při tvorbě různých náhrad bylo dosaženo za použití netkaných vláken polymerů a kopolymerů jako např. Polyglykolid (PGA), a Polyglykolid/Kyselina

polymléčná (PGA/PLLA). PGA a PGA/PLA vlákna mají dostatečné chemické a fyzikální vlastnosti, aby mohly být zpracovány do scaffoldu druhým způsobem tvorby. [9] [15]

Textiliím se běžně nedostává dostatečné strukturní stability, která by jim umožnila odolat biomechanickým náporům. Proto byla vyvinuta metoda zabývající se výrobou vláken, která by vedla ke zlepšení mechanických vlastností. [16]

### 1.2.2 Buněčné pevné látky

Běžné výrobní techniky scaffoldů, jako je odlévání, zpěňování, vakuové vysoušení a termická separace fází produkují v kombinaci se solným luhováním sktruktury podobné pěně, které jsou nazývány jako buněčné pevné látky. Tyto technologie jsou běžně aplikovány při tvorbě scaffoldů o různých vlastnostech. Nicméně existuje několik nevýhod, které omezují využití těchto scaffoldů v oblasti tkáňového inženýrství. [9]

Póry těchto nosičů nejsou často plně propojené kvůli vzájemnému řazení vrstev během vypařování rozpouštědla. Tloušťka a délka scaffoldu tedy plně závisí na rychlosti vypařování rozpouštědla. Dále se liší velikosti samotných pórů, jelikož je obtížné zabránit vzniku větších částic shlukováním porogenních látek, které by při fabrikaci měly být co nejvíce rozptýleny. [9]

### 1.2.3 Metody Solid Free Form Fabrication (SFF) a jeho specifické aplikace

Použitím SFF se na rozdíl od konvenčních metod staví scaffold postupným přidáváním určitého množství materiálu, vrstvu po vrstvě, řízením pomocí počítačového programu. Každá vrstva představuje tvar průřezu scaffoldu. V dnešní době je SFF považováno za efektivní způsob, jak vyrábět velké množství identických scaffoldů s požadovanými vlastnostmi. [3] Pod SFF dále spadají další specifické aplikace, jako je např. Rapid prototyping (RP), stereolitografie, selektivní laserové slinování (SLS), tisk laminovaných objektů (LOM), depoziční modelování taveniny (FDM) a 3D tisk. RP se využívá na rychlé vytváření modelů pro nejrůznější testování, které jsou dále určeny pro sériovou výrobu. [9] SFF metody poskytují jedinečnou možnost přesně kontrolovat strukturu matrice scaffoldu (tvar, provázanost, rozvětvení, orientaci...), což vede ke vzniku biomimetických (schopných napodobit biochemii těla) struktur různě se lišících v designu a kompozici materiálů. RP metody mohou být jednoduše zautomatizovány a optimalizovány se zobrazovacími programy za účelem tvorby scaffoldů, které jsou individuálně přizpůsobovány pacientům se specifickými potřebami. [17]



#### 1.2.4 Selektivní laserové slinování (SLS)

SLS tvoří pevné trojrozměrné objekty využitím CO<sub>2</sub> laserového paprsku na slinování tenkých vrstev práškového polymeru. Interakce paprsku s práškem má za následek zvýšení teploty materiálu a ke slinování tedy dojde těsně za teplotou skelného přechodu polymeru. Jednotlivé částice prášku se spojí a vytvoří pevný objekt. Nové vrstvy jsou tvořeny přímo na dřívě slinutých vrstvách tak, že další vrstva prášku je nanесena válečkem a slinuta. [17]

Při SLS tvorbě scaffoldů pro využití v oblasti tkáňového inženýrství bylo zjištěno, že pevné a lineární tvary mohou být touto metodou fabrikovány, ale před dokončením tisku často dochází ke sražení materiálu. Sražení způsobuje degradace vzniklá vystavením materiálu laserovému paprsku. Při využití metody SLS je tedy doporučeno použití vylepšených práškových materiálů s vysokou hustotou. [17]

#### 1.2.5 3D tisk

Technologie 3D tisku byla vyvinuta na Massachusetts Institute of Technology (MIT) a jedná se o nejvíce využívanou SFF metodu v oblasti tkáňového inženýrství a aplikacích pro doručování léčiv. 3D tisk využívá principu inkoustové tiskárny na tisk a tvarování plniva (materiálu) na sobě ležících vrstev. Nejprve je tenká vrstva materiálu ve formě prášku rozprostřena na povrch, na který bude probíhat samotný tisk. Dále z počítačového modelu finálního produktu jsou za pomoci „krájecího“ algoritmu vypočítány parametry jednotlivých vrstev. Poté využitím již zmíněné techniky založené na principu inkoustové tiskárny je pojiivo tlačeno na rozprostřený prášek a začíná tisk. Tento proces se opakuje vrstvu po vrstvě, dokud není produkt dokončen. [7] [9] [17]

Nabalovací hustota prášku materiálu má přímý vliv na výslednou adhezi při vrstvení, což obratem ovlivňuje výsledné mechanické vlastnosti výsledného objektu. Když se první kapka nataveného plniva dotkne povrchu s práškem, dojde ke sférické agregaci mezi plnivem a práškem. Působící kapilární síly způsobí, že vzniklé sousedící agregáty se spojí. Tyto vrstvy lokálně vytvoří pruhy na bázi prášku, které se poté naváží a vznikne již pevný model. Vazebná energie je složena ze dvou působících částí: povrchové a kinetické energie. [9]

Výhodou 3D tisku je, že může probíhat v nezávislém prostředí (na vzduchu). Nevýhodou však je, že při tvorbě porézních scaffoldů je obtížné odstranit nenavázaný prášek uvnitř modelu. Rozlišení, v jakém pracuje 3D tisk je ovlivněno velikostí a průměrem použitého nástavce. Dále může být špatné rozlišení způsobeno nesprávnou kontrolou, kterou má

pracovník nad polohováním tiskové hlavy. Dále velikost částic udává tloušťku výsledné vrstvy. Rozlišení výsledného komponentu a případné odstraňování zaseknutých částic je také ovlivněno hrubostí povrchu a agregačními vlastnostmi daného materiálu. Z hlediska tvorby scaffoldů pro aplikace v tkáňovém inženýrství nejsou základní materiály většinou dostupné v práškové formě a je potřeba je před zpracováním upravit. [17]

### *1.2.5.1 Extruzní technologie 3D tisku*

Metody fabrikace scaffoldů využitím extruzních technologií jsou: modelování tavené depozice (FDM), 3D vykreslování, několikafázové tuhnutí materiálu po průchodu tryskou (MJS) a tvorba přesné extruze (PEM). Mnoho biomateriálů může být zpracováno extruzní technologií s ohledem na použitou metodu a přístroje. [17]

Běžný FDM přístroj se skládá z vyhřívané tavící hlavy, která je připevněná k nosiči schopnému se pohybovat jak vertikálně, tak horizontálně. Funkcí tavící hlavy je tedy tavit daný materiál a poté ho vytlačet přes zvolenou trysku přímo na tiskový povrch. Celý proces je řízen počítačovým programem. Jakmile je natisknuta první vrstva, tiskový povrch se posune vertikálně o jednu tiskovou míru, aby vznikl prostor pro tisk další vrstvy. Samotný tisk tedy probíhá vrstvu po vrstvě s tím, že tloušťka jednotlivých linií je přímo úměrná průměru trysky. Nevýhodou FDM je, že se musí používat pouze termoplastické materiály, jejichž viskozita taveniny je dostatečně nízká. Další nevýhodou je, že buňky určené k obrostení scaffoldu nemohou být implementovány v průběhu fabrikace. [17] [18]

Nejdůležitějšími kritérii pro výběr vhodného materiálu pro FDM jsou tepelná vodivost a reologie (chování v toku). Např. PVC, nylon, akrylonitril butadien styren (ABS) a některé typy vosků byly pro tuto metodu úspěšně použity. PCL je jedním z nejvíce používaných materiálů pro bioaplikace díky své nízké teplotě tání, teplotě skelného přechodu a vysoké tepelné stabilitě. PLGA je rovněž velice používaným materiálem na tvorbu scaffoldů, ale kvůli své vysoké teplotě skelného přechodu je jeho zpracování obtížné a zdlouhavé. Většina termoplastů se zahřívá na teploty 110-140 °C, což je teplota pro dosažení ideálních tokových vlastností. Někdy se pro zlepšení toku přidávají i reologické modifikátory, ale stejně jako každý biomateriál musí splňovat určitou úroveň biokompatibility. [19] [20]

FDM dokáže kontrolovat vlastnosti scaffoldu jako např. tloušťku rastru (jednotlivý tiskový bod), vzdálenost mezi rastry, rastrový úhel a tloušťku vrstev. Taková kontrola vede ke vzniku scaffoldu s předem určenou velikostí pórů, morfologií a vzájemnou provázaností.

Scaffoldů s různým rozložením pórů lze dosáhnout přísným kontrolováním vertikálního a horizontálního povrchu tiskové hlavy. Při použití extruzní technologie lze rovněž kombinovat různé materiály. Časté kombinace jsou: poly(etylglykol)tereftalát/poly(butylen)tereftalát nebo polypropylen/fosforečnan vápenatý (PP/TCP) Další kompozity, jako PCL/ kys. hyaluronová nebo PCL/TCP, jsou oblíbené díky svým biochemickým vlastnostem a jsou využívány na opravy kostí. [18]

Materiály, určené na výrobu scaffoldů extruzní technologií, jsou nejčastěji čisté PCL, bioaktivní skelné kompozity, L-laktid/ $\epsilon$ -kaprolakton, PLGA s příměsí kolagenu, PCL/TCP s příměsí gentamicinu, PCL/TCP, PLGA/TCP pokryté kyselinou hyaluronovou, PCL/PLGA/TCP, PLGA/PCL, PCL pokryté želatinou, PMMA a PLA. Všechny tyto materiály jsou využívány v tkáňovém inženýrství jako části náhrad chrupavek, nosiče léčiv a antibiotik, nápravy kraniofaciálních deformací a kostí. [18]

Hlavními výhodami FDM jsou vysoká porozita povrchu a dobré mechanické vlastnosti vzniklých objektů. Hlavní nevýhodou je nedostatek termoplastických materiálů s žádoucí viskozitou v tavenině, která musí být dostatečně vysoká, aby nedošlo k roztečení při stavění vrstev a zároveň dostatečně nízká, aby tavenina mohla být vytlačena z hlavy. Dále, vznikající objekty určené pro biologické aplikace jsou často z hlediska tvarové spletitosti omezené. [18]

Část mé experimentální práce je založena na extruzi PCL při tvorbě scaffoldů různých velikostí a tvarů použitím extruzní tiskárny Bio X™.

Tiskárna Bio X™ byla vyvinuta společností Cellink (založenou v roce 2016). Je vybavena třemi jednotlivými vytlačovacími linkami a unikátním a snadno přístupným softwarem. Na každou linku je možné připojit různé tiskové moduly, které jí mimo jiné umožňují kombinovat jednotlivé metody tisku, jako je např. FDM nebo extruze z roztoků. Mezi tyto moduly patří pneumatický modul s kontrolovatelnou teplotou (4-65 °C), termoplastický modul (do 250 °C), modul určený na fotozesíťování a modul vybavený HD kamerou. [21]

## 2 BIOMATERIÁLY

Běžně používanou definicí biomateriálu je „neživotaschopný materiál použitý jako součást lékařského zařízení, jehož cílem je interagovat s biologickým systémem, do něhož je vložen“. [22]

Při práci s biomateriály je nejprve nutné si uvědomit, že materiál, který je biodegradabilní (rozkládá se v přítomnosti biologického materiálu), nemusí být biovstřebatelný. Biovstřebatelnost poukazuje na schopnost látky být kompletně odstraněna ze systému bez žádných přetrvávajících vedlejších účinků, zatímco biodegradabilita popisuje situaci, kdy se materiál začne rozkládat a přesune se z oblasti působení *in vivo*. Nutně však nedochází ke kompletnímu odstranění materiálu z těla. [23]

Biokompatibilita je schopnost materiálu existovat v kontaktu s tkání, aniž by toto prostředí negativně ovlivňoval. Aby byl materiál shledán biokompatibilním, je u něj kontrolována řada vlastností, jako např. krystalinita a krystalografie, porozita, chemické složení povrchu, povrchová energie, elektrické vlastnosti povrchu, odolnost vůči oxidaci, toxicita, degradace, vlastnosti degradované formy atd. [3]

Biomateriály jsou podle použitého materiálu děleny na kovy, keramiky a polymery.

### 2.1 Kovy

Kovy, ačkoliv postupně nahrazovány polymery, jsou v dnešní době pořád hojně využívanými materiály v oblasti medicíny. Jejich ikonické vlastnosti, jako např. vysoká pevnost, tuhost a houževnatost, jsou důležité pro aplikace, při kterých musí materiál snést velkou zátěž. Typickým příkladem takové aplikace je výroba kloubních nebo dentálních náhrad. [24]

Mnoho kovů je před použitím v biologických oblastech upravováno buď povrchově nebo chemicky. Povrchová úprava se odvíjí od schopnosti buněk adheze ke kovům, která je ovlivněna hrubostí, texturou a porozitou povrchu. Cílem povrchových úprav je změnit jednu nebo i více těchto vlastností, aby došlo ke snadnější adhezi buněk. Cílem chemických úprav je dosažení specifických reakcí při reakci biologického materiálu s kovem. [24]

### 2.1.1 Nerezová ocel

V lékařském prostředí se nerezová ocel vyrábí jako slitina obsahující 17-20 % chromu, 12-15 % niklu, 2-3 % molybdenu a stopová množství dalších prvků. [25] Tento typ oceli díky své nízké ceně a dobrým mechanickým vlastnostem patří mezi nejpoužívanější kovy v oblasti medicíny. Často je využíván v oblasti ortopedie. Z nerezové oceli se také vyrábí velké množství nástrojů, jak v medicíně, tak pro běžné domácí použití. [26]

### 2.1.2 Titan

Titan a jeho slitiny jsou vhodné pro použití v lidském těle, protože vykazují dobrou kompatibilitu ke tkáním. Díky své vysoké odolnosti vůči korozi a vhodné pevnosti jsou často využívány jako lékařské a dentální náhrady. Titan však kvůli své slabé pevnosti v krutu není vhodný na výrobu drátů určených ke spojování kostí nebo při sternální punkci. [27]

### 2.1.3 Zlato

Zlato má historii prvního kovu používaného na „lечение“ onemocnění psychického původu a stavů myslí spojených s okultismem. [28] Záznamy jeho používání pro tyto účely jdou tisíce let do minulosti. Ve 30. letech 20. století bylo využíváno na léčení artritidy zejména ve formě Au(I) thiolátů. V moderní době zlato nachází své využití hlavně v dentální medicíně. [29]

## 2.2 Keramiky

Keramiky jsou obecně definovány jako anorganické materiály nebo jako materiály neobsahující kov, a jako biomateriály (tedy materiály vhodné pro vpravení do těla) jsou využívány již tisíce let. [30] Mohou být přírodní nebo syntetické a jsou definovány jako oxidy, nitridy, sulfidy nebo karbidy kovů. [16] První využití keramických implantátů bylo dokumentováno v 18. století v dentální oblasti, kdy porcelán byl použit na náhradu zubních korunek, nebo v 19. století v oblasti ortopedie využitím dihydrátu síranu vápenatého na vyplňování kostí. V roce 1965 byl vytvořen první keramický materiál na bázi hliníku, který byl použit k výrobě kyčelních náhrad. [30] [31]

Kosti jsou přírodní kompozitní materiály, které jsou složeny převážně z anorganického kompozitu – hydroxyapatitu. Tento kompozit tvoří 65 % hmoty kostí, zbývající hmotu tvoří organický materiál a voda. [32]

Zuby vykazují podobnou strukturu jako kosti, ale zároveň jsou pokryty povrchovou vrstvou skelného smaltu. Tento zubní smalt má vyšší obsah anorganického kompozitu, než jaký vykazují kosti (90 %) a je tvořen hranolovými krystaly. [32]

Biokeramiky mají skvělou biokompatibilitu, špatnou biodegradabilitu, vysokou teplotu tání a lepší mechanické vlastnosti v porovnání s biomateriály na bázi kovů. Zároveň nepodléhají korozi. [33] Bioskla (skelné keramiky) mohou být tvarovány dle potřeby. Syntetické biokeramiky se dělí na bioinertní, bioaktivní a biovstřebatelné. [31] [34]

## 2.3 Polymery

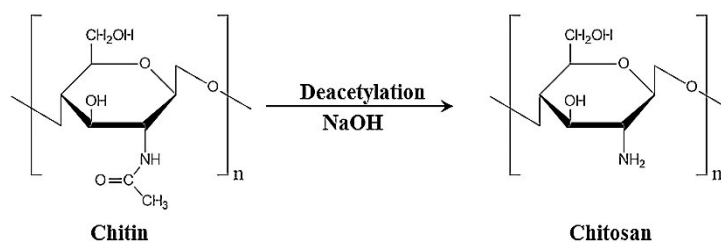
Polymery jsou buď syntetické (uměle vytvořené), nebo přírodní materiály, které mají v porovnání s kovy nebo keramikami nízkou mechanickou pevnost. [39]

### 2.3.1 Přírodní polymery

Přírodní polymery vytvořené organismy mají skvělou biokompatibilitu s buňkami a okolními tkáněmi. Dále jsou biodegradabilní a necytotoxické, čímž splňují základní podmínky látek, které mohou být použity jako biomateriály. Biomateriály z nich vytvořené vykazují velmi nízkou tendenci způsobovat zánět v místě implantace. [39] Jejich největší výhodou je velká dostupnost z obnovitelných zdrojů na rozdíl od polymerů syntetických, které se získávají z neobnovitelného zdroje – destilátů ropy. Nevýhodou je jejich nehomogenita molekulových hmotností na rozdíl od polymerů syntetických, které mají přesně dané polymerační podmínky, a tak jsou více méně homogenní v celém objemu. Přírodní polymery se dále dělí na proteiny a polysacharidy. [40]

#### 2.3.1.1 Chitosan

Chitosan je jedním z nejpoužívanějších přírodních polymerů využívaných jako genové nosiče v oblasti tkáňového inženýrství. [41] Jedná se o vysoko-viskozitní N-diacetylový derivát chitinu, což je mukopolysacharid hojně se vyskytující v přírodě zejména v tělech bezobratlých organismů jako jsou koryši nebo hmyz. [39]



Obrázek 3 - Přeměna Chitinu na Chitosan dle Kima et. al [39]

Jeho využití v oblasti medicíny je přes všechny jeho vynikající vlastnosti (skvělá biokompatibilita, biodegradabilita, nízká toxicita a anti-bakteriální účinky) problematické, protože často před zpracováním musí projít určitou úrovní rozkladu a dále extenzivně chemicky upravován. [41]

### **2.3.1.2 Kolagen**

Kolagen a jeho různé modifikace byly použity jako genové nosiče. Nejpoužívanější modifikací je atelokolagen, který vzniká odstraněním telopeptidových skupin z hlavního řetězce kolagenu. Hojně je využíván jako nosič léčiv nebo genů v oblasti tkáňového inženýrství. [41]

### **2.3.1.3 Gelatin**

Gelatin, běžně známý jako „želatina“, je přírodní polymer vznikající částečnou hydrolyzou kolagenu. Jedná se o jednu z hlavních složek kostí, kůže a spojovacích tkání v živočiších. Díky své biodegradabilitě a biokompatibilitě je hojně využíván nejen ve farmaceutických oblastech, ale také v potravinářství nebo kosmetice. [39] Některé studie také poukazují na potenciál gelatinu v oblasti tkáňového inženýrství jako látky schopné tlumit nechtěné geny a tím podpořit rychlejší regeneraci poškozených tkání. [41]

### **2.3.1.4 Kyselina hyaluronová (HA)**

HA je přírodní lineární polysacharid, který se hojně vyskytuje v lidském těle, např. v kůži, jako součást synoviální tekutiny v kloubech, nebo v očním sklivci. HA se hojně využívá jako nosič léčiv, nebo stavební materiál pro scaffoldy v tkáňovém inženýrství. [39]

## **2.3.2 Syntetické polymery**

Uměle vytvořené polymery jsou často používány v medicíně jako součásti implantátů a různých zařízení, protože je snadné je tvarovat dle potřeby. [40] Jasnou výhodou polymerních biomateriálů je dobrá adheze a následná interakce s tkání. Nevýhodou je, že jsou často velmi tuhé a u některých tepelně tvrzených polymerů je problém, že nemohou být připevněny k tkáním tak dobře jako jiné kovové implantáty. [42]

### **2.3.2.1 Polyestery**

Polyestery tvoří značnou část polymerů studovaných pro případné využití v oblasti medicíny a tkáňového inženýrství. [43]

Polyglykolid (PGA) a polylaktid kyseliny polymléčné (PLA) byly prvními syntetickými polymery, které byly díky svým dobrým mechanickým vlastnostem použity jako zařízení pro vnitřní fixace kosti. PGA je nejjednodušší lineární alifatický polyester nerozpustný v organických rozpouštědlech. Jeho nerozpustnost představuje značnou nevýhodu při použití v lékařských aplikacích. PLA je hydrofobní polymer. Jejich kopolymer PLGA vykazuje skvělou adhezi k buňkám a je velmi často využíván pro aplikace v tkáňovém inženýrství. [40] [43] [44]

Další polyestery jako polybutylen sukcinát (PBS), polydioxanon (PDO), polykaprolakton (PCL), nebo jejich kopolymery jsou také využívány v oblasti medicíny a tkáňového inženýrství. PCL má skvělou biokompatibilitu [40] [3] a nejvíce se používá jako materiál pro výrobu kapslí pro kontrolované dlouhodobé uvolňování léčiv v těle a také jako stavební materiál scaffoldů v tkáňovém inženýrství. Ze všech ostatních termoplastických polyesterů je právě PCL v oblasti tkáňového inženýrství nejvíce využíváno. [44] PBS je využíván v medicíně na opravy kostí a chrupavek. PDO bylo použito na výrobu prvních stehů z monofilních vláken, ale nejčastěji je používáno pro výrobu šroubů určených pro fixaci kostí. [40]

### **2.3.2.2 Polyanhydridy**

Polyanhydridy tvoří zajímavou oblast biodegradabilních materiálů, protože se v jejich řetězci vyskytují opakující se hydrolyzovatelné oblasti. Dobu, za jakou je polymer biodegradován, je tedy možné měnit v závislosti na jeho hlavním řetězci. Aromatické polyanhydridy budou tedy degradovat pomaleji a delší dobu než polyanhydridy alifatické, které se rozloží výrazně rychleji. Alifatické homo-polyanhydridy mají v oblasti medicíny kvůli své rychlé biodegradabilitě velmi omezené využití. V medicíně se polyanhydridy jako použitelné biomateriály vyskytují pouze ve formě kopolymerů. [40] Jsou využívány převážně na výrobu tablet určených ke kontrolovanému uvolňování léčiv v těle. [45]

### **2.3.2.3 Elastomery**

Elastomerní materiály jsou důležité specificky pro inženýrství měkkých a velmi ohebných tkání. V dnešní době ještě nebyly objeveny elastomery, které by dosáhly vhodné elasticity a biodegradability, aby je bylo možné pro tisk tkání bezpečně použít. Elastomery se tedy používají ve formě kopolymeru nejčastěji v kombinaci s polyestery. [44]



Termoplastické polyuretany (PU) jsou blokové kopolymery tvořené jak tvrdými, tak měkkými segmenty. Jejich elasticita, a tedy i způsob využití, závisí na poměru mezi těmito segmenty. PCL dioly a dioly PCL kopolymerů jsou často využívány jako měkké segmenty polyuretanů kvůli jejich pružnosti a adhezi k buňkám. V poslední době jsou využívány PU obsahující kovalentní dimethylglyoxim-uretanové vazby. Tyto PU vykazují skvělou schopnost „sebeuzdravení“, dobrou adhezi k buňkám a biodegradabilitu při aplikaci do těla. Prozatím byly použity pouze *in vivo* ve zvířatech jako zařízení zabraňující aneurysma aorty, sloužící ke kooptaci nervů, nebo k imobilizaci zlomených kostí. [44]

#### 2.3.2.4 Vinylové polymery

Většina vinylových polymerů je odolná vůči hydrolyze, a proto musí projít oxidací, aby byly schopné biodegradace. Většina biodegradabilních vinylových polymerů obsahuje právě snadno zoxidovatelnou funkční skupinu. [40]

Polyvinylalkohol je díky své rozpustnosti ve vodě nejpoužívanějším vinylovým polymerem. Jeho triviální název je Depart<sup>®</sup> a byl vyvinut společností Environmental Polymers (UK) specificky pro *in vivo* aplikace. [40]

## 3 POLYKAPROLAKTON

### 3.1 Výroba

Monomer  $\epsilon$ -kaprolakton (dále jen „ $\epsilon$ -CL“) se připravuje oxidací cyklohexanolu za vzniku kyseliny adipové pomocí mikroorganismů. Kyselina 6-hydroxyhexanová je dalším produktem tohoto procesu. Průmyslový  $\epsilon$ -CL se získává oxidací cyklohexanonu kyselinou peroctovou. [46]

Polymerace PCL může probíhat dvěma způsoby:

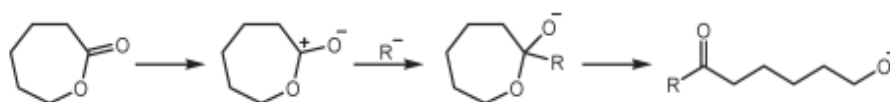
#### **Polykondenzace**

Tímto způsobem jsou alifatické polyestery získávány z hydroxykarboxylových kyselin. Braud *et al.* [47] získal PCL oligomery ve vakuu – tím je odstraněna voda vznikající při procesu. Rovnováha polykondenzace je přesunuta směrem k uspořádání vznikajícího polymeru. Při polymeraci kyseliny 6-hydroxykapronové za nízkého tlaku a použití enzymu z *Candida antarctica* vzniká PCL s průměrnou molekulovou hmotností 9000 g/mol. Při použití enzymu z *Pseudomonas* u polymerace ethyl 6-hydroxyhexanoátu došlo k zisku PCL o průměrné molekulové hmotnosti 5400 g/mol. V obou případech při polymeraci vznikal ethanol, který mohl ovlivnit rovnováhu reakce, ale byl při nízkém tlaku odstraněn. [48] [49]

Příprava PCL polykondenzací není příliš využívána. Polymerace otevřením cyklů produkuje polymer s vyšší molekulovou hmotností a nižší polydisperzitou – je tedy preferovaná. [46]

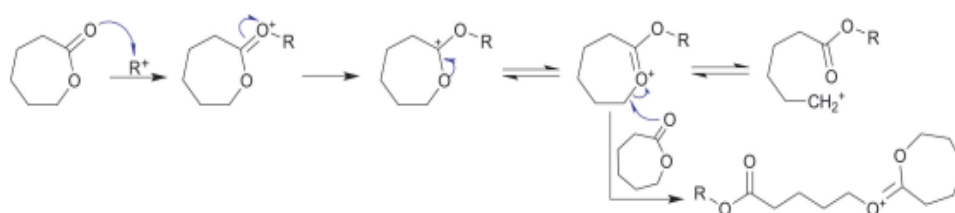
#### **Polymerace otevřením cyklu (dále jen „ROP“)**

Existují čtyři mechanismy ROP, jejichž rozdíly spočívají v použitých katalyzátorech. [46] Aniontová ROP (obrázek 4) spočívá v použití aniontových typů, které napadají karbonylovou skupinu monomeru. Tímto je  $\epsilon$ -CL otevřen na vazbě acyl-kyslík za vzniku alkoxidu. Nevýhodou aniontové metody je výskyt intramolekulární transesterifikace (výměna alkoholové nebo kyselé části za jinou) v pozdních stupních polymerace. Přerušení polymerace před dosažením bodu, ve kterém k transesterifikaci může dojít, má za následek polymer s nízkou molekulární hmotností nebo vznik cyklického polymeru. [46]



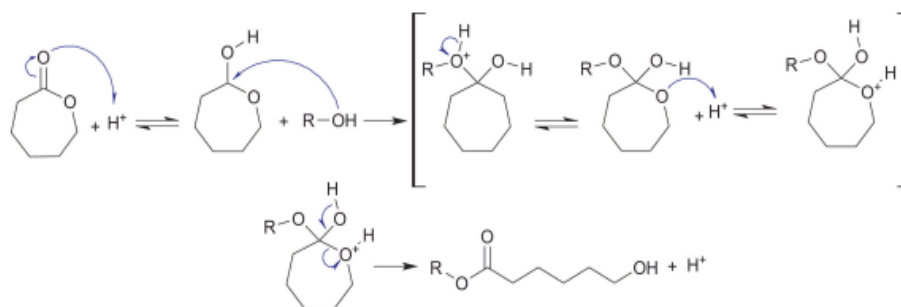
Obrázek 4 - Mechanismus aniontové ROP podle Khanna et al. [50]

Při kationtové ROP (obrázek 5) dochází k napadení kationtových typů karbonylovou skupinou monomeru. Napadení probíhá skrze bimolekulární nukleofilní substituci. [51]



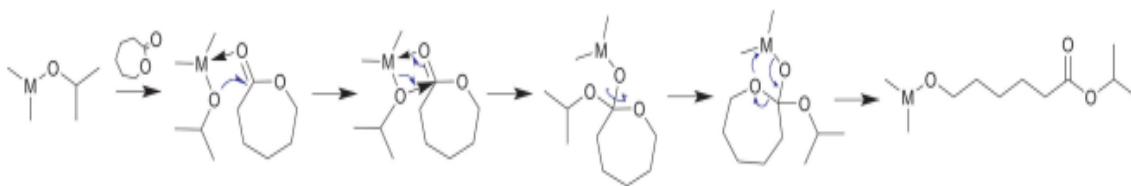
Obrázek 5 - Mechanismus kationtové ROP podle Khanna et al [50]

ROP aktivovaná monomerem (obrázek 6) probíhá aktivací molekul monomeru pomocí katalyzátoru a následným připojením aktivovaného monomeru na vznikající řetězec. [46]



Obrázek 6 - Mechanismus ROP aktivované monomerem podle Kim et al. [39]

ROP koordinacním vkladem (obrázek 7) je nejpoužívanějším typem ROP. Propagace je způsobena koordinací monomeru do katalyzátoru a následným vložím monomeru do kyslík kovové vazby katalyzátoru. Rostoucí řetězec se naváže na kov pomocí alkoxydové vazby. [51]



Obrázek 7 - Mechanismus ROP koordinacním vkladem podle Knanna et al [50]

## 3.2 Vlastnosti

PCL je semi-krystalický lineární polymer vznikající polymerací otevíráním cyklů za přítomnosti nejčastěji kovového katalyzátoru. Jeho monomerem je relativně levný  $\epsilon$ -kaprolakton. [40]

PCL lze rozpustit v mnoha různých rozpouštědlech. [40] PCL je dobře rozpustný v chloroformu, dichlormethanu, tetrachlormethanu, benzenu, toluenu, cyklohexanonu a 2-nitropropanu. Špatně se rozpouští v acetonu, 2-butanonu, ethylacetátu, dimethylformamidu a acetonitrilu. PCL je nerozpustný v alkoholech, petroletheru, diethyletheru nebo vodě. [46]

Za pokojové teploty je PCL v polotuhém stavu a jeho modul pružnosti se pohybuje mezi nízko hustotním polyethylenem (LDPE) a vysoko hustotním polyethylenem (HPDE). Teplota skelného přechodu ( $T_g$ ) PCL je nízká (okolo  $-60\text{ }^\circ\text{C}$ ) a bod tání se pohybuje mezi  $60\text{--}65\text{ }^\circ\text{C}$ . Díky své nízké  $T_g$  se PCL často využívá jako kompatibilizátor nebo jako měkká část při vytváření polyuretanů. Jeho pevnost v tahu je nízká (dosahuje 23 MPa). Před roztržením se dokáže natáhnout na 700 % původní délky. [40]

### 3.2.1 Biodegradabilita a Biokompatibilita

PCL lze biodegradovat v různých přírodních organismech (např. bakteriích, houbách), ale kvůli nedostatku potřebných enzymů jej nelze rozložit v lidském těle. O PCL ale můžeme tvrdit, že je biovstřebatelný. Proces rozkladu PCL v tkáních trvá značnou dobu v řádu měsíců až let. [23]

PCL biodegraduje dvěma způsoby: Degradací povrchovou nebo hromadnou. V obou případech jde o hydrolytickou degradaci, tedy o napadení polymeru molekulami vody. [52]

Povrchová degradace probíhá, když jsou napadeny pouze molekuly na povrchu polymeru. K tomuto typu degradace dojde, když rychlost hydrolytického štěpení a vzniku monomerů a oligomerů při něm je rychlejší než postup molekul vody do hlubších vrstev materiálu. Během

procesu dochází ke zmenšování polymeru v čase bez vlivu na molekulovou hmotnost jeho hlubších částí. Výhodou povrchové degradace je její časová předvídatelnost, které se využívá při výrobě kapslí pro léky určené na postupné uvolňování. [23]

Hromadná degradace nastává, když molekuly vody proniknou celým objemem polymeru za průběhu hydrolyzy ve všech vrstvách materiálu najednou. Při degradaci dochází k celkovému snížení molekulové hmotnosti způsobené náhodným hydrolytickým štěpením. Při difúzi vody do všech částí materiálu nastane rovnováha, při které vznikající monomery nebo oligomery difundují ven z objemu a začne docházet k postupnému rozkládání polymeru. Pokud je tato rovnováha narušena, může dojít k autokatalýze – reakce přes karboxylové nebo hydroxylové skupiny na konci řetězců. Koncentrace produktů této autokatalýzy může způsobit spád do kyselé sféry pH. Tento spád zrychlí vnitřní degradaci, čímž zanechá vnější vrstvu materiálu téměř nedotčenou, zatímco se vnitřní vrstvy rapidně rozpadají. [53]

Podle počáteční molekulové hmotnosti implantátu činí celková doba rozpadu PCL v biosystému zhruba 2-4 roky. [40] PCL degraduje ve dvou fázích: v první fázi jde o hydrolytické štěpení esterových skupin a při druhé dochází k vnitřnímu molekulárnímu rozpadu vysoce krystalického polymeru s nízkou molekulovou hmotností. [54]

Biovstřebatelné polymery jsou běžně přijatelné pro vklad do živých tkání. Jedním z nejdůležitějších kontrolovaných kritérií je tendence materiálu způsobit zánět v oblasti použití. Pitt a kol. [54] studovali tvorbu zánětu v těle krysy za použití kopolymeru PCL a kyseliny polymléčné (dále jen „PLA“). Vpravení malých částí kopolymeru do těla mělo za následek reakci bílých krvinek a vznik mírného zánětu v oblasti použití. Po čase vznikla cysta, která odstranila částice vloženého kopolymeru ven z těla. Vznik zánětu v oblasti implantace je nežádoucí. Během tohoto pokusu bylo sledováno, že imunitní reakce těla byla silná při implantaci na svalovou tkáň objektu, ale při vložení stejného materiálu na kostní tkáň k žádné reakci nedošlo. [23]

Biokompatibilitu materiálu je třeba měřit i z dlouhodobého hlediska. Meek a Jensen [55] provedli dvouletou studii, ve které sledovali dlouhodobou reakci těla krysy na vložení PCL scaffoldu v oblasti poškozeného nervu. V průběhu studie zaznamenali částečný obrůst tkání okolo scaffoldu. Po ukončení pokusu se většina scaffoldu rozpadla, ale za použití mikroskopu zjistili, že malé částice polymeru byly přítomny ve zregenerované tkáni. [55]

Hutmacher a kol. [56] [57] provedli několik pokusů zabývajících se biokompatibilitou PCL jak při dlouhodobém, tak krátkodobém vložení PCL scaffoldů do různých zvířecích modelů. U králičí lebky si po dvou letech všimli několika velkých defektů v oblasti vložení. Dále za použití von Kossova barviva, které se váže na vápník (Ca) a černá, zaznamenali několik výrůstků přímo ve středu scaffoldu. Výsledky téhle studie vedly k vývoji kompozitu skládajícího se z PCL za přídavku fosforečnanu vápenatého. Tento kompozit byl použit na výrobu scaffoldu obsahujícího 5  $\mu\text{g}$  proteinu nacházejícího se ve srůstajících kostech (rhBMP2). Po 15 týdnech po vložení scaffoldu bylo zjištěno dokonalé vyléčení již zmíněných výrůstků. Vložený scaffold měl také vliv na tvar lebky při růstu bez přítomnosti větších defektů. Tyto studie neobjevily žádné následky vkladu PCL do biosystému, které by mohly označit jako nebiokompatibilní. PCL a jeho kompozity byly tedy shledány biokompatibilními a vhodnými k použití v lékařských oblastech. [23]

### 3.3 Využití

#### 3.3.1 PCL Scaffoldy

Při porovnání s uměle vytvořenými polymery, přírodní materiály jako kolagen, elastin, hedvábí, celulóza atd., jsou více bioaktivní a biokompatibilní, čímž dosahují lepší adheze a růstu buněk. Přesto se v oblasti tkáňového inženýrství příliš nevyužívají. Jejich tendence kontaminovat zasaženou oblast a špatná pevnost z důvodu nízké molekulové hmotnosti je činí nežádoucí z hlediska aplikace v lidském těle. [58]

Pro aplikace v tkáňovém inženýrství se tedy častěji používají právě syntetické polymery. [58] Jejich mechanické vlastnosti (pevnost v tahu, tvrdost, elasticita, mez únavy atd.) jsou žádoucí z hlediska aplikace přímo na kost. [59] Ačkoliv tyto materiály mohou v místě aplikace způsobit zánět, pořád jsou hojně používány na výrobu scaffoldů pro podporu růstu buněk a oprav tkání. [60]

Díky svým unikátním vlastnostem se PCL v posledních několika desetiletích stal jedním z nejpoužívanějších materiálů využívaných pro výrobu tkáňových scaffoldů. Tyto scaffoldy jsou poté používány na léčbu přetržených vazů, zlomených kostí, a dokonce jako kožní implantáty. Způsobů, jak využít PCL scaffoldy při léčbě tkání je mnoho. V některých případech je potřeba PCL sloučit s jinými polymery, keramikami, nebo jinými látkami za vzniku více komplexních systémů. Nejčastějšími metodami přípravy PCL scaffoldů jsou 3D tisk, zvláknování, elektrospinning. Tyto metody za přítomnosti porézního činidla během

tisku (NaCl, PBS) zajišťují vysokou porozitu povrchu vzniklého materiálu. Porézní scaffoldy při aplikaci na tkáň vykazují významnou přilnavost na buňky. [61]

Modifikace povrchů PCL scaffoldů:

Účelem úpravy povrchů PCL scaffoldů je zvýšit bioaktivitu a biokompatibilitu materiálu, čímž se zajistí lepší adheze buněk a výrazně se tak zlepši interakce mezi buňkami a scaffoldem. [62] [63]

Úprava zásadou je jedna z hlavních metod chemických modifikací PCL scaffoldů. [64] Působení zásaditého porézního činidla (NaOH) má za následek výrazné zlepšení hydrofilicity povrchu a biokompatibility materiálu, a to bez jakýchkoliv negativních vlivů na chemické a fyzikální vlastnosti scaffoldu. [65]

Další metodou chemické úpravy povrchu PCL je aminolýza. Při této úpravě se nejčastěji využívají diaminy (1,2 – etylendiamin, 1,6-hexan diamin). Přítomnost aminových skupin na povrchu PCL vykazuje zlepšení adheze buněk a rychlejší růst tkání. Dále amidové skupiny vyskytující se na povrchu umožňují díky své chemické všestrannosti další úpravy povrchu, jako např. ozařování zářením gamma nebo plazmou, adsorpce proteinů (Ard-Gly-Asp peptidová sekvence), nebo mineralizace scaffoldu různými keramikami, zajišťující lepší buněčnou adhezi. [61]

### 3.3.2 PCL Mikrosféry

Biodegradabilní mikrosféry jsou díky své vysoké efektivitě jedny z nejpoužívanějších médií pro aplikaci léčiv. Mnoho různých typů léčiv je vpravováno do těla právě v mikrosférových PCL kapslích. Mikrosféry mohou být vyrobeny z čistého PCL, z jeho četných kopolymerů, nebo směsí v závislosti na požadovaných parametrech uvolňování léčiva. Mezi tyto směsi patří např. antigeny, antihypertensiva, paklitaxely a další. [66] [67]

### 3.3.3 Lékařské pomůcky

PCL a jeho kompozity nachází své využití často v různých lékařských pomůckách, jako jsou například nitě na stehy, obvazy, experimentální typy antikoncepce nebo třeba fixační zařízení. [23]

Pro výrobu nití na zašívání se PCL používá ve formě kopolymeru s 3,6-dimethyl-1,4-dioxan-2,5-dionem (známý jako DL-laktid). Tyto kopolymery jsou navrženy, aby měly o dost kratší

dobu rozpadu. Kopolymer  $\epsilon$ -CL a glykolidu je nit, vyznačující se svou houževnatostí, prodávaná pod názvem Monocryl® firmou Ethicon. [67]



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 MATERIÁLY

### 4.1 Použité chemikálie

Stěžejním materiálem používaným v této práci je polykaprolakton (PCL) ve formě granulí o průměru pohybujícím se v oblasti 3 mm a o střední molekulové hmotnosti  $M_w = 80000$  g/mol. PCL pochází od firmy Sigma Aldrich (formálně MilliporeSigma), která je jak výrobcem, tak dodavatelem tohoto materiálu.

Pro přípravu roztoků byla použita dvě dobrá a jedno špatné rozpouštědlo PCL:

- Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ); (99 %), stabilizovaný; dodavatel: VWR Chemicals
- Toluén ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ ); (>98 %), technický; dodavatel: VWR Chemicals
- Dimethylsulfoxid (DMSO); (99,99 %); dodavatel: VWR Chemicals

### 4.2 Použité přístroje

#### 4.2.1 Bio tiskárna – BIO X™ Cellink

Všechny vzorky (strukturované mřížky) byly natisknuty na 3D biotiskárně Bio X od společnosti Cellink. Hlavní výhodou tohoto typu tiskárny je možnost tisknout termoplastickou extruzí za použití speciální hlavy, nebo i vzorky připravit pneumatickou extruzí díky použití pneumatické hlavy. Parametry jednotlivých mřížek jsou do tiskárny zadávány skrze její software a přiložené STL soubory, které udávají defaultní specifikace jednotlivých mřížek. Tiskárna byla umístěna v digestoři Hera Safe 2030i 1.2 (1200×780×627 mm) od firmy Thermo Scientific.

#### 4.2.2 Spektrometr

Chemická analýza použitého materiálu byla provedena na FTIR spektrometru Nicolet iS5 infrared spectrometer od firmy Thermo Scientific. Měření proběhlo technikou ATR.

#### 4.2.3 Mikroskop Dino-lite

Orientační fotky vzorků byly získány pomocí mikroskopu Dino-lite od společnosti AnMo Electronics Corporation. Jednotlivé snímky byly pořízeny přes software DinoCapture 2.0. Každý vzorek byl focen jednou.

#### 4.2.4 Skenovací elektronový mikroskop

Pro detailní charakterizaci povrchu jednotlivých vzorků byl použit skenovací elektronový mikroskop Phenom Pro od společnosti Phenom World. Každý vzorek byl umístěn na terčík oboustrannou uhlíkovou páskou a pokoven směsí zlata a paladia v naprašovacím zařízení. Pokovení každého vzorku probíhalo v argonovém plazmatu po dobu 45 s. Vzorky byly poté po jednom umístěny do měřicí oblasti elektronového mikroskopu ve standardním držáku pro vodivé vzorky (SSH – standard sample holder). Povrch každého vzorku byl poté focen při zvětšení 2000×. Měření probíhalo v režimu zpětně odražených elektronů za urychlovacího napětí 10 kV. Každý snímek má rozlišení 2048×2176 pixelů.

#### 4.2.5 Profilometr

Topografie (profilometrie) povrchu byla měřena mechanickým profilometrem Dektak XT od firmy Bruker. Pro měření byl vybrán diamantový hrot s poloměrem křivosti 2,5  $\mu\text{m}$  a přítlakem 3 mg. Samotné měření profilu povrchu bylo zaznamenáváno po dráze 0,5 mm vždy na třech místech každého vzorku. U každého vzorku byly naměřeny hodnoty drsnosti (střední hodnota výšky píků)  $R_a$  a střední hloubky drsnosti (rozdíl mezi nejvyšším a nejnižším píkem)  $R_z$ . Každý vzorek byl měřen 3× a ze získaných hodnot byly vypočítány průměrné hodnoty a k nim příslušné směrodatné odchylky (tabulky 3,4)

## 5 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

### 5.1 Příprava roztoků polykaprolaktonu s dobrým rozpouštědlem pro pneumatickou extruzi

Při přípravě roztoku polymeru s dobrým rozpouštědlem pro 3D tisk pneumatickou extruzí byl PCL rozpuštěn v jeho dobrém rozpouštědle vybraného dle tabulky rozpustnosti PCL ( $\text{CHCl}_3$  a  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ ). Roztoky obou směsí byly připraveny v různých koncentracích daných poměrem hmotnosti PCL (g) ku objemu daného rozpouštědla (ml) v celkových poměrech PCL: rozpouštědlo 2:8 nebo 3:7. Tyto roztoky při prvotním smíchání vykazují vysokou viskozitu, a proto byly nejdříve ponechány po dobu jedné hodiny v sušárně za zvýšené teploty (50 °C). Po uplynutí dané doby byly roztoky odstraněny ze sušárny a následně promíchávány magnetickým míchadélkem do kompletního rozpuštění PCL. Takto připravené roztoky byly následně použity při tisku vzorků pomocí pneumatické extruze.

### 5.2 Příprava roztoků polykaprolaktonu s dobrým a špatným rozpouštědlem pro pneumatickou extruzi

Při přípravě roztoku polymeru jak s dobrým, tak se špatným rozpouštědlem, byl nejprve připraven roztok polymeru s příslušnými dobrými rozpouštědly, a to i ve stejném poměru 3:7. Následně bylo do roztoku přidáno i špatné rozpouštědlo (DMSO). Objem špatného rozpouštědla byl vypočítán tak, aby koncentrace výsledných roztoků byla v poměru daném množstvím PCL ku objemu dobrého rozpouštědla a ku objemu špatného rozpouštědla – 3:7:1 a 3:7:2. Směs se poté míchala 1 hodinu magnetickým míchadélkem.

## 6 CHARAKTERIZACE TIŠTĚNÝCH STRUKTUR

První částí experimentální části práce byl tisk různých PCL struktur o velikostech 10×10 mm a 20×20 mm. Tisk struktur z čistého PCL, který nebyl v roztoku s žádným typem rozpouštědla probíhal skrze termoplastickou extruzi, zatímco vzorky z PCL v roztoku s dobrým a dobrým + špatným rozpouštědlem byly tištěny prostřednictvím pneumatické extruze. Oba typy extruze je možné provést na bio tiskárně BIO X™ Cellink.

### 6.1 Struktury tištěné termoplastickou extruzí

Čistý PCL, který není rozpuštěn v roztoku, je za pokojové teploty a tlaku velice tuhá a nepoddajná látka. Tisk tedy probíhal vložením samotných PCL tabletek do termoplastické tiskové hlavy, která byla následně připojena do bio tiskárny a vyhřívána na 100 °C. Po roztavení PCL vznikla velice viskózní tavenina. Aby tedy bylo možné nanést materiál na tiskovou plochu (která byla vyhřívána na 60 °C), bylo třeba na bio tiskárně nastavit tisk za zvýšeného tlaku (700 kPa – maximální tlak, který dokáže tiskárna vyvinout). Pro tisk byla zvolena tryska s průměrem 0,4 mm. Rychlost nánosu na tiskovou plochu byla nastavena na 1 mm/s.

Struktur z čistého PCL bylo dohromady natisknuto 15. Pro další experimenty byl vybrán jeden vzorek. Parametry vybraného vzorku jsou zaznamenány v tabulce 1.

Tabulka 1 - Parametry vzorku natisknutého termoplastickou extruzí, který byl vybrán pro další měření

Vzorek	A
Rozměry [mm]	20×20×0,5
Hustota [%]	50

### 6.2 Struktury tištěné pneumatickou extruzí

Pneumatickou extruzí byly tisknuty vzorky pocházející z PCL v roztoku s dobrým, nebo dobrým + špatným rozpouštědlem. Protože materiál v roztoku není potřeba tavit, tak tisk probíhal za pokojové teploty. Roztoky dále byly v porovnání s tiskem termoplastickou extruzí o dost méně viskózní, takže hnací tlak byl nastaven na desítky kPa. Pro tisk byla zvolena pneumatická hlava o objemu 3 ml a tryska s průměrem 0,41 mm. Rychlost pohybu pneumatické hlavy byla po celou dobu tisku nastavena na 1 mm/s.

Ze všech připravených roztoků bylo natisknuto přes 90 vzorků. Pro potřeby dalšího zkoumání a experimentů jich bylo použito 8. První 4 byly vybrány z původních roztoků PCL + toluen a PCL + toluen + DMSO. Další 4 byly vybrány z roztoků PCL + chloroform a PCL + chloroform + DMSO. Parametry vybraných vzorků jsou vypsány v tabulce 2.

Tabulka 2 - Parametry vzorků natisknutých pneumatickou extruzí, které byly vybrány pro další měření

Vzorek	Složení [g:ml]	Rozměry [mm]	Hustota [%]	Tlak při tisku [kPa]
B	PCL + CHCl <sub>3</sub> (3:7)	20×20×0,5	35	50
C	PCL + CHCl <sub>3</sub> (2:8)	20×20×0,5	30	40
D	PCL + CHCl <sub>3</sub> +DMSO (3:7:1)	20×20×0,5	20	20
E	PCL + CHCl <sub>3</sub> +DMSO (3:7:2)	20×20×0,5	20	10
F	PCL + C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> (3:7)	20×20×0,5	20	10
G	PCL + C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> (2:8)	10×10×0,5	32	10
H	PCL + C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> + DMSO (3:7:1)	20×20×0,5	25	10
I	PCL + C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> + DMSO (3:7:2)	20×20×0,5	20	1

## 7 DISKUZE A VÝSLEDKY

Cílem mojí práce bylo prostudovat a zrealizovat postup, jakým by bylo možné připravit strukturované scaffoldy z daného biomateriálu. Struktura scaffoldu určeného pro bioaplikace výrazně ovlivňuje způsob chování buněk, a také jak budou na samotný nosič reagovat. Nedostatečně pórovitá struktura může vést k nežádoucímu kupení buněčného materiálu okolo nosiče, čímž může v nejhorsím případě dojít ke kompletnímu zkolabování struktury scaffoldu, a tedy nenaplnění jeho účelu. [68]

Jako materiál byl zvolen PCL, který se vyznačuje vysokou biokompatibilitou a biodegradabilitou. [23] Zisku struktury s porézním povrchem lze dosáhnout využitím metody fázové separace. Mé vzorky byly tedy tištěny jednak z čistého PCL bez přidaných rozpouštědel, ale také z roztoků PCL s jeho jak dobrými, tak špatnými rozpouštědly, čímž bylo možné využít separace fází a získat tak scaffoldy s pórovitou strukturou. [52]

### 7.1 FTIR analýza vzorků

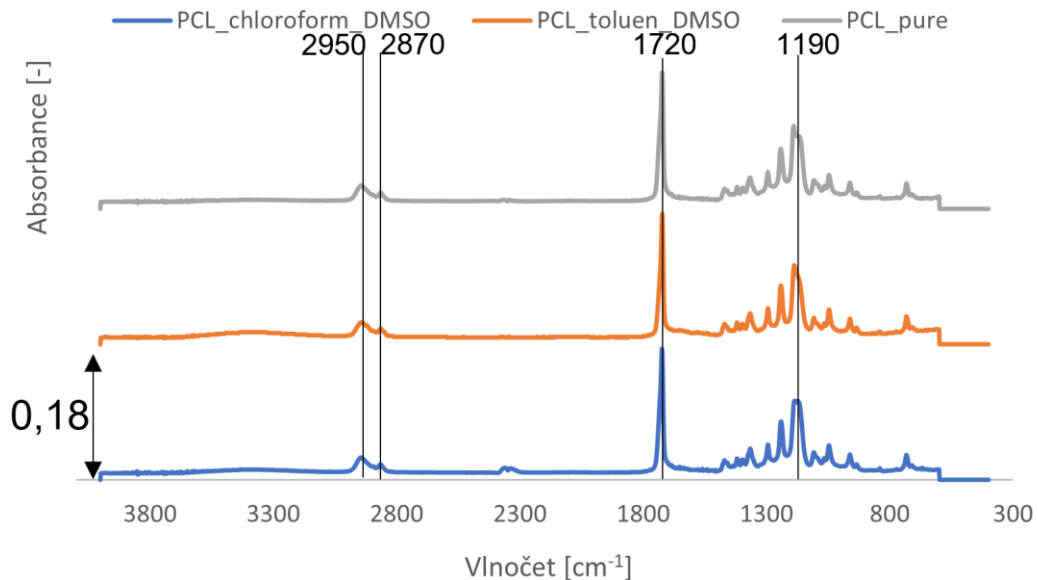
Po vytištění prvních vzorků termoplastickou extruzí byla provedena analýza pomocí zařízení FTIR, na kterém bylo zkoumáno chemické složení vytištěných struktur. Měření bylo provedeno za účelem potvrzení čistoty použitého PCL kvůli možnému využití vzorků jako materiálů určených pro biologické aplikace – biomateriálů. Pro měření byly vybrány celkem 3 vzorky – čisté PCL z termoplastické extruze, PCL rozpuštěné v kombinaci  $\text{CHCl}_3$  a DMSO, a PCL rozpuštěné v kombinaci  $\text{C}_6\text{H}_6\text{CH}_3$  a DMSO (oba vytištěné pneumatickou extruzí).

Z obrázku 8 jsou u všech vzorků nejprve částečně patrné dva píky s nízkou intenzitou absorbance, jejichž maxima dosahují hodnot  $2950\text{ cm}^{-1}$  a  $2870\text{ cm}^{-1}$ . Tyto píky odpovídají valenčním vibracím C-H vazeb (stretching). Dále je nejvíce patrný pík s největší intenzitou absorbance v grafu, jehož maximum dosahuje hodnoty  $1720\text{ cm}^{-1}$ . Ten odpovídá valenčním vibracím C=O vazeb. Pík, jehož maximum intenzity absorbance dosahuje hodnoty  $1190\text{ cm}^{-1}$  odpovídá valenčním vibracím vazby C-O.

Při snaze stanovit chemickou strukturu náhodných vzorků je nutné analyzovat nejdůležitější píky vycházející z grafu. Není však třeba stanovit všechny píky patrné z grafu. Ostatním píkům v oblasti  $1000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$  jsou často charakteristické pro specifickou látku, a tudíž

není možné přiřadit dílčí vibrace. Maximálně by bylo možné charakterizovat píky v oblasti  $1300\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$  v grafu jako deformační vibrace vazeb C-H.

Porovnáním křivky vytvořené z mnou získaných hodnot s databází obsahující oficiální FTIR hodnoty látek lze dojít k závěru, že mnou používaný materiál je opravdu polykaprolakton, který neobsahuje zbytky rozpouštědel a je tedy vhodné ho použít jako biomateriál.

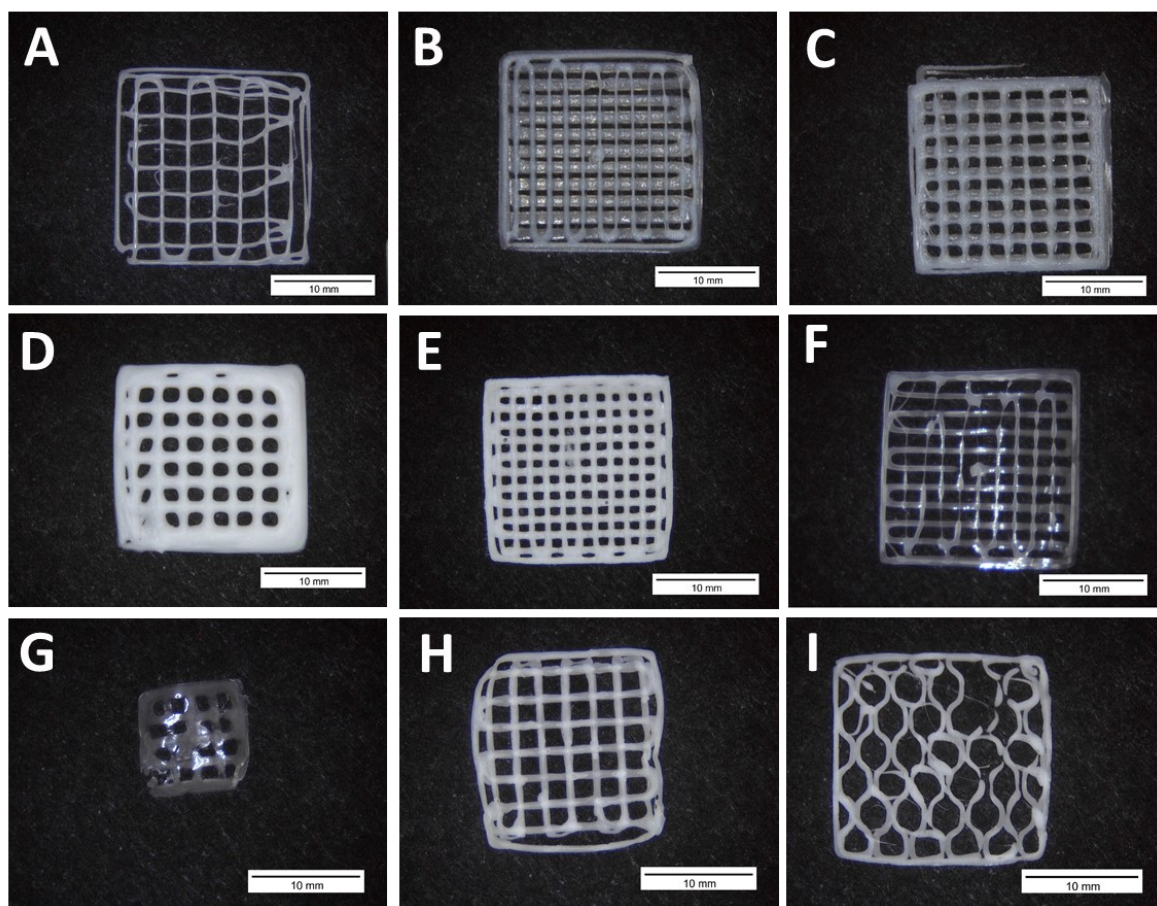


Obrázek 8 - Křivka získaná FTIR analýzou vytištěných struktur

## 7.2 Focení vzorků mikroskopem Dino-Lite

Mikroskopem dino-lite byly nafoceny vzorky vybrané pro další testování. Každý vzorek byl focen jednou a bylo k němu přidáno odpovídající měřítko. Fotky vzorků jsou řazeny dle tabulek 1 a 2.





Obrázek 9 - Snímky vzorků pořízené digitálním mikroskopem. Označení vzorků odpovídá značení uvedeném v Tab. 1 a Tab. 2.

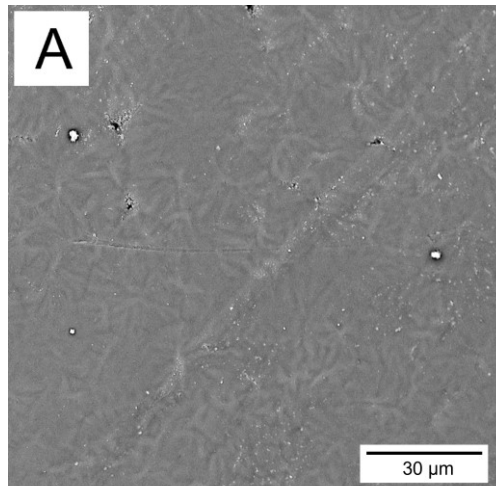
### 7.3 Analýza povrchu vzorků skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM)

Vybrané vzorky byly po jednom zkoumány pod skenovacím elektronovým mikroskopem. Cílem měření bylo potvrdit a následně porovnat rozdílnou povrchovou strukturu jednotlivých natištěných vzorků. Každá struktura byla analyzována pod zvětšením 2000 $\times$ .

Předpokladem bylo, že vzorky z čistého PCL vytištěné termoplastickou extruzí a vzorky PCL + dobré rozpouštědlo získané pneumatickou extruzí budou vykazovat malou nebo žádnou výraznou strukturu povrchu, kdežto vzorky, které obsahovaly PCL rozpuštěné v kombinaci dobrého a špatného rozpouštědla, se budou vyznačovat četnou pórovitostí povrchu.

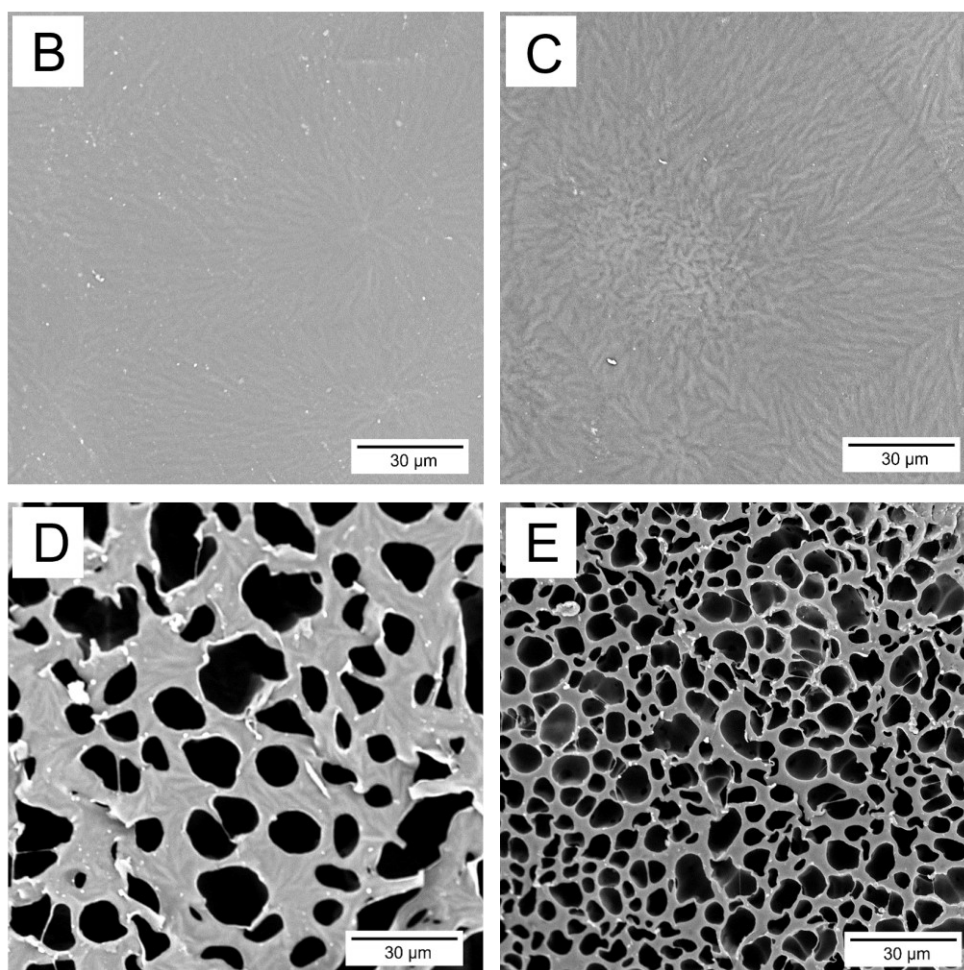
Vznik strukturovaného povrchu materiálu uvedeným v této práci je způsoben jevem zvaným „fázová separace“. Typický systém, ve kterém dojde k fázové separaci, obsahuje polymer rozpuštěný v jeho dobrém a špatném rozpouštědle, které jsou vzájemně mísitelné. Zvýšením

koncentrace špatného rozpouštědla nebo polymeru se fáze s velkou koncentrací polymeru oddělí od fáze obsahující malou koncentraci polymeru. Po odstranění (v případě této práce odpaření) rozpouštědla se rozpustnost polymeru sníží a vznikne materiál s porézní strukturou. [69] [70]



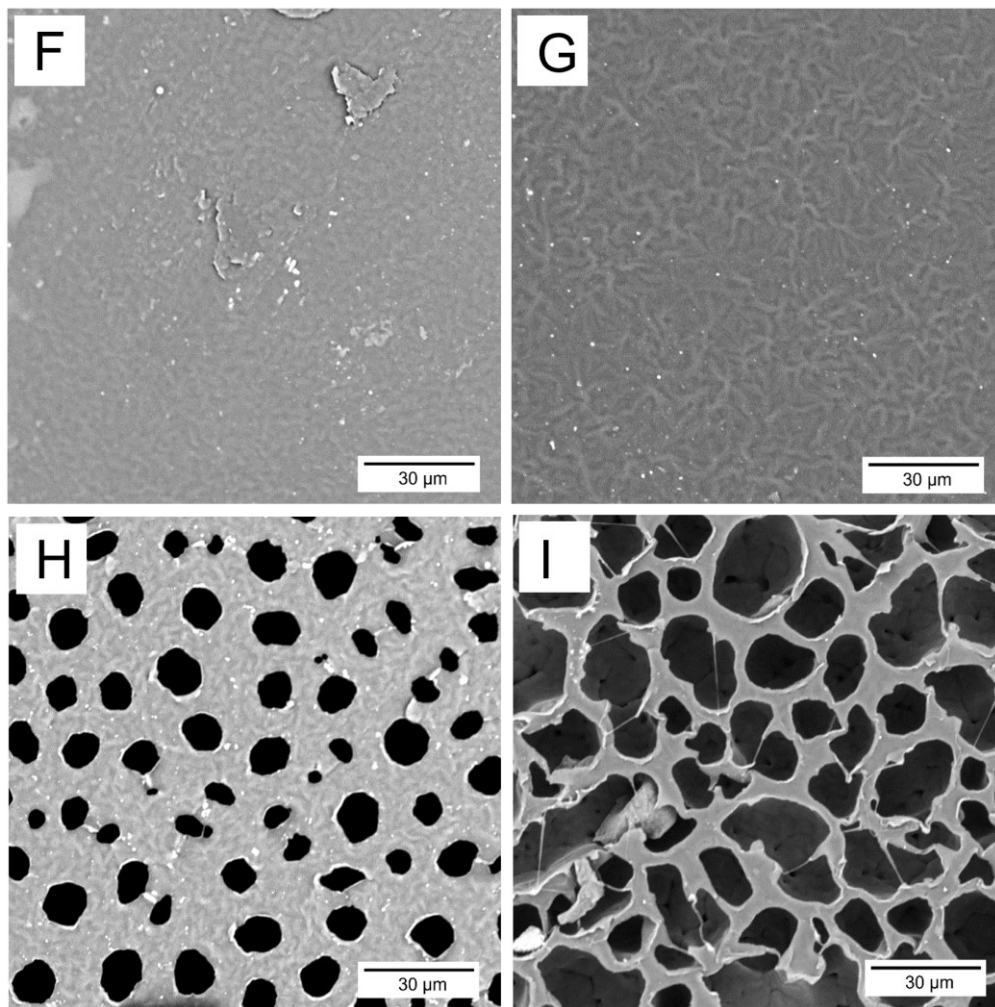
Obrázek 10 - SEM snímky vzorku A z termoplastické extruze při zvětšení 2000x

Povrch čistého PCL (obr. 10) jasně nevykazuje žádnou pórovitost a pouze malý stupeň zvrásnění a nečistot.



Obrázek 11 - - B) PCL: CHCl<sub>3</sub> (3:7), C) PCL: CHCl<sub>3</sub> (2:8), D) PCL:CHCl<sub>3</sub>:DMSO(3:7:1), E) PCL:CHCl<sub>3</sub>:DMSO(3:7:2) Snímky byly pořízeny pomocí SEM.

Vzorky získané v roztoku PCL + CHCl<sub>3</sub> o poměru koncentrací 3:7 (vzorek B) také nemají výrazně porézní povrch a je na nich patrný určitý stupeň zvrásnění a nečistot. Povrch vzorků z roztoku PCL + CHCl<sub>3</sub> o poměru koncentrací 2:8 (vzorek C) rovněž není porézní a stejně jako předchozí vzorky jsou zvrásněné. Vzorky vytištěné z roztoku PCL + CHCl<sub>3</sub> + DMSO o poměru 3:7:1 (vzorek D) mají již výrazně porézní povrch. Snímky potvrzují, že proběhla separace fází. Povrch vzorků získaných z roztoku PCL + CHCl<sub>3</sub> + DMSO o poměru 3:7:2 (vzorek E), tedy z roztoku o vyšší koncentraci špatného rozpouštědla, vykazuje vyšší porozitu.



Obrázek 12 - F) PCL:C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>3</sub> (3:7), G) PCL:C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>3</sub> (2:8) H) PCL:C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>: DMSO (3:7:1), I) PCL:C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>: DMSO (3:7:2) Snímky byly pořízeny pomocí SEM.

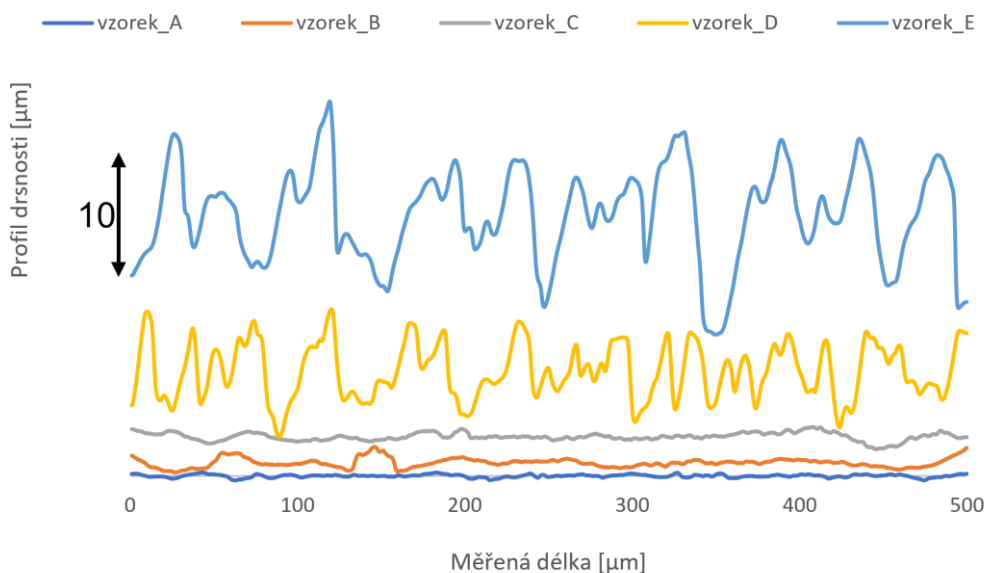
Vzorky získané z roztoku PCL + C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>3</sub> o poměru koncentrací 3:7 (vzorek F) nevykazují žádnou porozitu povrchů a stejně jako vzorky s přechozím dobrým rozpouštědlem jsou lehce zvrásněné. Povrch vzorků PCL + C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>3</sub> o poměru koncentrací 2:8 (vzorek G) není nijak porézní a je kvůli vyšší koncentraci dobrého rozpouštědla více zvrásněný než předchozí vzorky. Povrch vzorků získaných z roztoku PCL + C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>3</sub> + DMSO o poměru 3:7:1 (vzorek H) je jasně porézní, a opět je zde vidět výrazný rozdíl mezi vzorkem s obsahem menšího a většího objemu špatného rozpouštědla. Z obrázku je tedy patrné, že obsah špatného rozpouštědla v roztoku má přímý vliv na strukturu povrchu vzorků.

## 7.4 Kontaktní profilometrie vybraných vzorků

U vzorků vypsanych v tabulkách 1 a 2 bylo provedeno topografické měření drsnosti využitím kontaktního profilometru. Měřením byly získány data závislosti drsnosti povrchu na délce měření.

Na obrázku 13 je vyobrazeno porovnání profilu drsnosti vzorků A, B, C, D, E. Z vyobrazených křivek jde vidět, že povrch vzorku čistého PCL (vzorek A) vykazuje nejnižší drsnost, zatímco vzorky získané z roztoku PCL +  $\text{CHCl}_3$  (vzorky B a C) vykazují mírně vyšší hodnotu drsnosti povrchu. K drastickému zvýšení drsnosti povrchu došlo u vzorků vytištěných z roztoku PCL +  $\text{CHCl}_3$  + DMSO (vzorky D a E). Ze získaných křivek těchto vzorků je patrné, že vyšší drsnost povrchu má vzorek E, který obsahoval vyšší koncentraci špatného rozpouštědla.

V tabulce 3 jsou zaznamenány aritmetické hodnoty drsnosti (střední hodnota výšky píků)  $R_a$  a střední hloubka drsnosti (rozdíl mezi nejvyšším a nejnižším píkem)  $R_z$  vzorků vytištěných z PCL, PCL +  $\text{CHCl}_3$  a PCL +  $\text{CHCl}_3$  + DMSO.



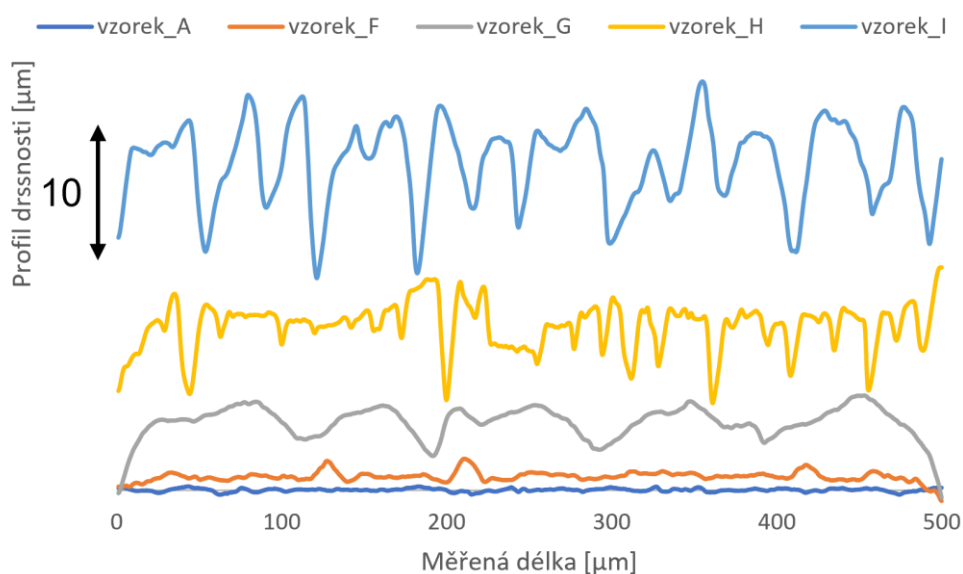
Obrázek 13 - Profilometrické porovnání vzorků A, B, C, D, E

Tabulka 3 - Střední aritmetická hodnota drsnosti (Ra) a střední hloubka drsnosti (Rz) vzorků A, B, C, D, E

Vzorek	Ra [ $\mu\text{m}$ ]	Rz [ $\mu\text{m}$ ]
A	0,15 $\pm$ 0,04	0,75 $\pm$ 0,22
B	0,48 $\pm$ 0,22	1,93 $\pm$ 0,88
C	0,46 $\pm$ 0,12	1,74 $\pm$ 0,49
D	1,44 $\pm$ 0,18	6,59 $\pm$ 0,52
E	3,1 $\pm$ 0,3	13,2 $\pm$ 1,2

Porovnání drsnosti povrchů vzorků A, F, G, H, I je vyobrazeno v obrázku 14. Stejně jako v obrázku 13 vykazuje nejnižší drsnost vzorek A vytištěný z čistého PCL. Povrchy s mírnou drsností dále mají vzorky vytištěné z roztoku PCL + toluen (vzorky F a G) s tím, že vzorek G vykazuje vyšší hodnoty parametrů drsnosti. Jako u předchozích vzorků i zde mají vzorky získané tiskem z roztoku PCL + C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>3</sub> + DMSO nejvyšší drsnost povrchu. Vzorek s vyšší koncentrací špatného rozpouštědla vykazuje vyšší drsnost povrchu než vzorek s koncentrací nižší. Aritmetické hodnoty drsnosti Ra a střední hloubka drsnosti Rz vzorků A, F, G, H, I jsou zaznamenány v tabulce 4.

Z obr. 14 je patrné, že vzorek I, který obsahoval nejvyšší obsah DMSO, dosahuje nejvyšší porozity a drsnosti povrchu. Je tedy jisté, že obsah špatného rozpouštědla ve výchozím roztoku má přímý vliv na povrch výsledných struktur.



Obrázek 14 - Profilometrické porovnání vzorků A, F, G, H, I

Tabulka 4 - Střední aritmetická hodnota drsnosti (Ra) a střední hloubka drsnosti (Rz) vzorků A, F, G, H, I

Vzorek	Ra [ $\mu\text{m}$ ]	Rz [ $\mu\text{m}$ ]
A	0,15 $\pm$ 0,04	0,75 $\pm$ 0,22
F	0,24 $\pm$ 0,04	1,2 $\pm$ 0,4
G	0,87 $\pm$ 0,03	3,4 $\pm$ 0,3
H	1,13 $\pm$ 0,09	6,08 $\pm$ 0,14
I	3,05 $\pm$ 0,34	13,38 $\pm$ 1,20

## ZÁVĚR

Cílem této práce byl 3D tisk a charakterizace struktur na bázi polykaprolaktonu, které by bylo možné využít jako scaffoldy pro biologické aplikace. Vzorky byly připraveny ve tvaru mřížek s lišící se hustotou zaplnění prostoru. Vybrané vzorky byly dále nafoceny digitálním mikroskopem a zkoumány několika metodami analýzy: infračervenou spektroskopií, elektronovou mikroskopií a kontaktní profilometrií.

První fází práce byl tisk jednotlivých vzorků. Toho bylo dosaženo pomocí tiskárny BIO X™ Cellink. Byly použity dvě metody tisku: termoplastická extruze – pro vzorky z čistého PCL, a pneumatická extruze – pro tisk vzorků z roztoků PCL a rozpouštědel. Struktury vytisknuté pneumatickou extruzí byly získány z předem připravených roztoků PCL a dobrého rozpouštědla ( $\text{CHCl}_3$ ;  $\text{C}_6\text{H}_6\text{CH}_3$ ), nebo kombinace dobrého a špatného rozpouštědla (DMSO). Oba typy extruze proběhly za specificky nastavených parametrů tisku. Mezi tyto parametry patří teplota tiskové hlavy, vytlačovací tlak a rychlost pohybu tiskové hlavy.

Dalším krokem experimentu byla samotná analýza získaných struktur. Nejprve byly vybrané vzorky analyzovány infračervenou spektroskopií. Po měření byly porovnány hodnoty tří vzorků (čistý PCL a PCL s různými rozpouštědly). Bylo zjištěno, že PCL rozpuštěné v rozpouštědlech není z hlediska čistoty nijak výrazně ovlivněno a po celkovém odpaření látek byla pomocí FTIR dokázána čistota použitého materiálu. Vzorky byly dále nafoceny digitálním mikroskopem.

Hlavním výsledkem celé práce jsou vzorky vykazující výraznou strukturu povrchu. Povrchy vzorků byly zkoumány pod elektronovým mikroskopem a kontaktním profilometrem. Bylo zjištěno, že struktury získané z roztoku PCL ve směsi s dobrým a špatným rozpouštědlem mají výrazně vyšší porozitu než ostatní vzorky.

Dosažená porozita a čistota materiálu umožňuje studium buněčných interakcí a případné využití připravených vzorků jako biomateriálů.



**BIBLIOGRAFIE**

- [1] BOSE, Susmita a Amit BANDYOPADHYAY. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology* [online]. 2012, **30**(10), 546-554 [cit. 2023-02-01]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005>
- [2] KHAN, Yusuf, Michael YASZEMSKI a Antonios MIKOS. Tissue Engineering of Bone: Material and Matrix Considerations. *The Journal of Bone & Joint Surgery* [online]. 2008, **90**(1), 36-42 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:[10.2106/JBJS.G.01260](https://doi.org/10.2106/JBJS.G.01260)
- [3] WILLIAMS, David F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* [online]. 2008, **29**(20), 2942 [cit. 2022-11-14]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023>
- [4] OLSZTA, Matthew a Sang JEE. Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering: R: Reports* [online]. 2007, **58**(3-5), 77-116 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.05.001>
- [5] MURPHY, Ciara, Matthew HAUGH a Fergal O'BRIAN. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2010, **31**(3), 461-466 [cit. 2023-04-21]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.063>
- [6] WOODARD, Joseph, Amanda HILLDORE a Sheeny LAN. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials* [online]. 2007, **28**(1), 45-54 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.021>
- [7] REZWAN, K., Q. CHEN a J. BLAKER. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2006, **27**(18), 3413-3431 [cit. 2023-02-05]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.039>
- [8] LICHTHE, P. a T. PUFER. Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence. *Injury* [online]. 2011, **42**(6), 569-473 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.033>
- [9] HUTMACHER, Dietmar W. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissue - state of the art and future perspectives. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2001, **12**(1), 107-124 [cit. 2023-02-01]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1163/156856201744489>
- [10] ATALA, Anthony, David MOONEY, Joseph VACANTI a Robert LANGER, ed. *Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds*. 1. Boston: Birkhäuser, 1997. ISBN 0-8176-3919-5.
- [11] VERT, M., S. LI a G. SPENLEHAUER. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 1992, **3**, 432-446 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1007/BF00701240>
- [12] SHINOKA, Toshiharu, Dominique SHUM-TIM a Peter. MA. Creation Of Viable Pulmonary Artery Autografts Through Tissue Engineering. *Surgery* [online]. 1998, **115**(3), 536-546 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(98\)70315-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(98)70315-0)
- [13] BADER, Augustinus, Tobias SCHILLING a Omke TEEBKEN. Tissue engineering of heart valves – human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves.

- European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* [online]. 1998, **14**(3), 279-284 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/S1010-7940\(98\)00171-7](https://doi.org/10.1016/S1010-7940(98)00171-7)
- [14] FREED, L. a G. VUNJAK-NOVAKOVIC a R. LANGER, ed., R. LANZA, W. CHICK. *Principles of Tissue Engineering*. 5. Austin, Texas: R. G. Landes Co., 1997. ISBN 978-0-12-818422-6.
- [15] FREED, L. a G. VUNJAK-NOVAKOVIC. Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. *Nat Biotechnol* [online]. 1994, **12**, 689-693 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1038/nbt0794-689>
- [16] MIKOS, Antonios, Amy THORSEN a Lisa CZERWONKA. Preparation and characterization of poly(l-lactic acid) foams. *Polymer* [online]. 1994, **35**(5), 1068-1077 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/0032-3861\(94\)90953-9](https://doi.org/10.1016/0032-3861(94)90953-9)
- [17] HUTMACHER, Dietmar, Michael SITTINGER a Makarand RISBUD. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends in Biotechnology* [online]. 2004, **22**(7), 354-362 [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.05.005>
- [18] CHIA, H. a B. WU. Recent advances in 3D printing of biomaterials. *Journal of Biological Engineering* [online]. 2015, **9**(4), 1-14 [cit. 2023-02-07]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1186/s13036-015-0001-4>
- [19] ZEIN, Iwan, Dietmar HUTMACHER a Kim TAN. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials* [online]. 2002, **23**(4), 1169-1185 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00232-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00232-0)
- [20] HUTMACHER, Dietmar, Thorsten SCHANTZ a Iwan ZEIN. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 2001, **55**(2), 203-216 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200105\)55:2<203::AID-JBM1007>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200105)55:2<203::AID-JBM1007>3.0.CO;2-7)
- [21] KE, Dongxu, Changmei NIU a Xi YANG. Evolution of 3D bioprinting-from the perspectives of bioprinting companies. *Bioprinting* [online]. 2022, **25** [cit. 2023-03-08]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.bprint.2022.e00193>
- [22] WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials. *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition* [online]. 1987, **26**(9), 414-414 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: doi:[10.1002/pol.1988.140260910](https://doi.org/10.1002/pol.1988.140260910)
- [23] WOODRUFF, Maria a Dietmar HUTMACHER. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymers Science* [online]. 2010, **35**(10), 1217-1256 [cit. 2022-12-11]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>
- [24] KOHN, David H. Metals in medical applications. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* [online]. 1998, **3**(3), 309-316 [cit. 2023-01-07]. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/S1359-0286\(98\)80107-1](https://doi.org/10.1016/S1359-0286(98)80107-1)
- [25] TALHA, Mohd, C. BEHERA a O. SINHA. A review of nickel-free nitrogen containing austenitic stainless steels for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2013, **33**(7), 3563-3575 [cit. 2023-01-08]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.06.002>
- [26] YANG, Ke a Yibin REN. Nickel-free austenitic stainless steels for medical applications. *Science and Technology of Advanced Materials* [online]. 2010, **11**(1), 12 [cit. 2023-01-08]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1088/1468-6996/11/1/014105>

- [27] HANAWA, Takao. Research and development of metals for medical devices based on clinical needs. *Science and Technology of Advanced Materials* [online]. 2012, **13**(6), 4 [cit. 2023-01-07]. Dostupné z: doi:10.1088/1468-6996/13/6/064102
- [28] HIGBY, G. J. Gold in medicine. *Gold Bulletin* [online]. 1982, **15**, 130-140 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1007/BF03214618
- [29] MEDICI, Serenella, Massimiliano PEANA a Valeria NURCHI. Noble metals in medicine: Laest advances. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2015, **284**, 329-350 [cit. 2023-01-07]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.08.002
- [30] CHEVALIER, J. a L. GREMILLARD. Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years. *Journal of the European Ceramic Society* [online]. 2009, **29**(7), 1245-1255 [cit. 2023-01-09]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2008.08.025
- [31] PUNJ, Shivani, Jashandeep SINGH a K. SINGH. Ceramic biomaterials: Properties, state of the art and future prospectives. *Ceramics International* [online]. 2021, **47**(20), 28059-28074 [cit. 2023-01-10]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.06.238
- [32] VALLET-REGÍ, María. Revisiting ceramics for medical applications. *Dalton Transactions* [online]. 2006, **44**, 2 [cit. 2023-01-10]. Dostupné z: doi:DOI https://doi.org/10.1039/B610219K
- [33] JAZAYERI, Hossein, Martin RODRIGUEZ-ROMERO a Mehdi RAZAVI. The cross-disciplinary emergence of 3D printed bioceramic scaffolds in orthopedic bioengineering. *Ceramics International* [online]. 2018, **44**(1), 1-9 [cit. 2023-03-7]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.09.095
- [34] KURINJINATHAN, P. a J. RAMYA. Cobalt Ions Doped Bioactive Ceramics for Biosensor Biomedical Applications. *International Journal of Current Research and Review* [online]. 2018, **10**(21), 49 [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: doi:http://dx.doi.org/10.31782/IJCRR.2018.4952
- [35] PICONI, Corrado. Bioinert Ceramics: State-of-the-Art. *Key Engineering Materials* [online]. 2017, **758**, 3-13 [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.758.3
- [36] HENCH, Larry, Ionnis XYNOS a Julia POLAK. Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2004, **15**(4), 543-562 [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1163/156856204323005352
- [37] KHAN, Ferdous, Masaru TANAKA a Sheikh AHMAD. Fabrication of polymeric biomaterials: a strategy for tissue engineering and medical devices. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2015, **3**(42), 8224-8249 [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: doi:0.1039/c5tb01370d
- [38] SHEIKH, Zeeshan, Shariq NAJEEB a Zohaib KHURSHID. Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications. *Materials* [online]. 2015, **8**(9), 5744-5794 [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: doi:10.3390/ma8095273
- [39] KIM, Eun-Hye, Ga-Dug HAN a Seung-Hyun NOH. Photo-reactive natural polymer derivatives for medical application. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online]. 2017, **54**, 1-13 [cit. 2023-01-12]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.05.029

- [40] VROMAN, Isabelle a Lan TIGHZERT. Biodegradable Polymers. *Materials* [online]. 2009, **2**(2), 307-344 [cit. 2022-11-28]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.3390/ma2020307>
- [41] DANG, Jiyoung a Kam LEONG. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2006, **58**(4), 487-499 [cit. 2023-01-12]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.03.001>
- [42] MAITZ, M. F. Applications of synthetic polymers in clinical medicine. *Biosurface and Biotribology* [online]. 2015, **1**(3), 161-176 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.bsbt.2015.08.002>
- [43] GUNATILLAKE, Pathiraja a Raju ADHIKARI. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials* [online]. 2023, **5**, 1-16 [cit. 2023-01-20]. Dostupné z: doi:[10.22203/eCM.v005a01](https://doi.org/10.22203/eCM.v005a01)
- [44] TERZOPOULOU, Zoi, Alexandra ZAMBOULIS a Ioanna KOUMENTAKOU. Biocompatible Synthetic Polymers for Tissue Engineering Purposes. *Biomacromolecules* [online]. 2022, **23**(5), 1841-1863 [cit. 2023-01-21]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c00047>
- [45] TAMADA, J. a R. LANGER. The development of polyanhydrides for drug delivery applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 1992, **2**(4), 315-353 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1163/156856292X00402>
- [46] LABET, Marianne a Wim THIELEMANS. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews* [online]. 2009, **38**(12), 3484-3504 [cit. 2022-11-28]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1039/B820162P>
- [47] BRAUD, Christian, Rémy DEVARIEUX a Audrey ATLAN. Capillary zone electrophoresis in normal or reverse polarity separation modes for the analysis of hydroxy acid oligomers in neutral phosphate buffer. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1998, **706**(1), 73-82 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00468-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00468-4)
- [48] MAHAPATRO, Anil, Ajay KUMAR a Richard GROSS. Mild, Solvent-Free  $\omega$ -Hydroxy Acid Polycondensations Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B. *Biomacromolecules* [online]. 2004, **5**(1), 62-68 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1021/bm0342382>
- [49] DONG, H., Hd. WANG a Sg. CAO. Lipase-catalyzed polymerization of lactones and linear hydroxyesters. *Biotechnology Letters* [online]. 1998, **20**, 905-908 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1023/A:1005441707356>
- [50] KHANNA, A., Y. SUDHA a S. PILLAI. Molecular modeling studies of poly lactic acid initiation mechanisms. *J Mol Model* [online]. 2008, **14**, 367-374 [cit. 2023-03-03]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1007/s00894-008-0278-z>
- [51] RYNER, M. a A. ALBERTSSON, ed., K. STRIDSBERG. *Degradable Aliphatic Polyesters*. 1. Berlin: Springer Berlin, Heidelberg, 2002. ISBN 978-3-540-42249-5.
- [52] GUPTA, Rakesh a Rajiv GINDE. In vitro chemical degradation of poly(glycolic acid) pellets and fibers. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 1987, **33**(7), 2411-2429 [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/app.1987.070330712>
- [53] BERGSMA, J., W. DE BRUIJN a F. ROZEMA. Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials* [online]. 1995, **16**(1), 25-31 [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)91092-D](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)91092-D)

- [54] WOODWARD, S., P. BREWER, F. MOATAMED a C. PITT. The intracellular degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone). *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 1985, **19**(4), 437-444 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/jbm.820190408>
- [55] MEEK, Marcel a Koen JANSEN. Two years after in vivo implantation of poly(DL-lactide- $\epsilon$ -caprolactone) nerve guides: Has the material finally resorbed?. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2008, **89**(3), 734-738 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/jbm.a.32024>
- [56] SCHANTZ, Jan-Thorsten, Dietmar HUTMACHER a Christopher XU FU LAM. Repair of Calvarial Defects with Customised Tissue-Engineered Bone Grafts II. Evaluation of Cellular Efficiency and Efficacy in Vivo. *Tissue Engineering Part A* [online]. 2004, **9**(1), 127-139 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1089/10763270360697030>
- [57] XU FU LAM, Christopher, Swee HIN TEOH a Dietmar HUTMACHER. Comparison of the degradation of polycaprolactone and polycaprolactone-( $\beta$ -tricalcium phosphate) scaffolds in alkaline medium. *Polymer International* [online]. 2007, **56**(6), 718-728 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/pi.2195>
- [58] RICKS, Christian, Samuel SHIN a Christopher BECKER. Extracellular matrices, artificial neural scaffolds and the promise of neural regeneration. *Neural Regen Res.* [online]. 2014, **9**(17), 1573-1577 [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: doi:10.4103/1673-5374.141778
- [59] CHEN, Fa-Ming a Xiaohua LIU. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in Polymer Science* [online]. 2016, **53**, 86-168 [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004>
- [60] REN, Xiaoyan, Victor TU a David BISCHOFF. Nanoparticulate mineralized collagen scaffolds induce in vivo bone regeneration independent of progenitor cell loading or exogenous growth factor stimulation. *Biomaterials* [online]. 2016, **89**, 67-78 [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.02.020>
- [61] ABDAL-HAY, Abdalla, Faheem SHEIKH a N. GÓMÉZ-CEREZO. A review of protein adsorption and bioactivity characteristics of poly  $\epsilon$ -caprolactone scaffolds in regenerative medicine. *European Polymer Journal* [online]. 2022, **162**, 4-7 [cit. 2022-12-15]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110892>
- [62] BARTNIKOWSKI, Michal, Abdalla ABDAL-HAY a Nicole BARTNIKOWSKI. A comprehensive study of acid and base treatment of 3D printed poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds to tailor surface characteristics. *Applied Surface Science* [online]. 2021, **555** [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.149602>
- [63] CASTNER, David a Buddy RATNER. Biomedical surface science: Foundations to frontiers. *Surface Science* [online]. 2002, **500**(1-3), 28-60 [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/S0039-6028\(01\)01587-4](https://doi.org/10.1016/S0039-6028(01)01587-4)
- [64] FUCHS, Andreas, Amoatazbellah YOUSSEF a Axel SEHER. A new multilayered membrane for tissue engineering of oral hard- and soft tissue by means of melt electrospinning writing and film casting – An in vitro study. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* [online]. 2019, **47**(4), 695-703 [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcms.2019.01.043>
- [65] ABBASI, Naghmeh, Abdalla ABDAL-HAY a Stephen HAMLET. Effects of Gradient and Offset Architectures on the Mechanical and Biological Properties of 3-D Melt Electrowritten (MEW) Scaffolds. *ACS Biomaterials Science and Engineering* [online].

- 2019, **5**(7), 3448-3461 [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01456>
- [66] V.R., Sinha, Bansal K. a Kaushik R. Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2004, **278**(1), 4-5 [cit. 2022-12-15]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.01.044>
- [67] WOEI NG, Kee, Hosur ACHUTH a Shabbir MOONCHHALA. In vivo evaluation of an ultra-thin polycaprolactone film asa wounddressing. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2007, **18**(7), 925-938 [cit. 2023-12-15]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1163/156856207781367693>
- [68] MURPHY, Ciara, Feagal O'BRIAN, David G. LITTLE a Aaron CHINDELER. CELL-SCAFFOLD INTERACTIONS IN THE BONE TISSUE ENGINEERING TRIAD. *European Cells and Materials* [online]. 2013, **26**, 120-132 [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.22203/eCM.v026a09>
- [69] YI, Hong, Gao CHANGYOU a Shi YANCHAO. Preparation of porous polylactide microspheres byemulsion-solvent evaporation based on solutioninduced phase separation. *Polymers for advanced technologies* [online]. 2005, **16**(8), 622-627 [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: doi:10.1002/pat.629
- [70] WITTE, P. a J. BERG. Phase separation processes in polymer solutions in relation to membrane formation. *Journal of Membrane Science* [online]. 1996, **117**(1-2), 1-31 [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/0376-7388\(96\)00088-9](https://doi.org/10.1016/0376-7388(96)00088-9)

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

PCL	Polykaprolakton
$\epsilon$ -CL	$\epsilon$ -kaprolakton; monomer pro výrobu PCL
PGA	Polyglykolid
PLLA/PLA	Kyselina polymléčná
PLGA/PGA	Poly(mléčná-ko-glykolová) kyselina
PVC	Polyvinylchlorid
PP	Polypropylen
PBS	Polybutylen sukcinát
PDO	Polydioxanon
LDPE	Nízko hustotní Polyethylen
HDPE	Vysoko hustotní Polyethylen
PU	Termoplastické polyuretany
TCP	Fosforečnan Vápenatý
PMMA	Polymethylmethakrylát
ABS	Akrylonitril Butadien Styren
HA	Kyselina hyaluronová
Au	Chemická značka zlata
Ca	Chemická značka vápníku
NaOH	Chemický vzorec hydroxidu sodného
NaCl	Chemický vzorek chloridu sodného
CHCl <sub>3</sub>	Chemický vzorec chloroformu
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	Chemický vzorec toluenu
DMSO	Dimiethylsulfoxid
SFF	Metoda tisku Solid Free Form Fabrication
RP	Metoda tisku Rapid Prototyping

SLS	Metoda tisku Selektivní Laserové Slinování
LOM	Metoda tisku Laminovaných Objektů
FDM	Metoda tisku Depoziční Modelování Taveniny
MJS	Metoda tisku Několikafázové Tuhnutí Materiálu po Průchodu Tryskou
PEM	Metoda tisku Tvorba Přesné Extruze
FTIR	Infračervená spektroskopie
ATR	Metoda provedení infračervené spektroskopie
SSH	Standartní držák na vzorky
Ra	Střední aritmetická hodnota drsnosti
Rz	Střední hloubka drsnosti
MIT	Massachusetts Institute of Technology
BioX™	Název použité biotiskárny
HD	High Definition
ROP	Polymerace otevíráním cyklů
pH	„potencial of Hydrogen“; kyselost roztoku/prostředí
rhBMP2	protein potřebný pro srůst kostí
STL	„Standard Triangle Language“; jazyk softwaru použité tiskárny
A, B, C, D, E, F, G, H, I	Označení vzorků zvolených pro další analýzu
kPa	„kilo Pascal“; použitá jednotka tlaku při tisku
mm/s	„milimetr za sekundu“; používaná rychlost pohybu tiskové hlavy
µm	„mikrometr“; jednotka délky
°C	„stupně Celsia“; jednotka Celsiovy teplotní stupnice
cm <sup>-1</sup>	jednotka vlnočtu
g/mol	„gram na mol“, základní jednotka atomové hmotnosti



**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 - Grafická ilustrace závislosti ztráty hmotnosti scaffoldu na době potřebné k regeneraci tkání při přípravě náhrady srdeční chlopně využitím způsobu 1 dle Hutmachera [9].....	14
Obrázek 2 - Grafická ilustrace závislosti ztráty hmotnosti scaffoldu na době potřebné k regeneraci tkání při přípravě náhrady srdeční chlopně využitím způsobu 2 dle Hutmachera [9].....	15
Obrázek 3 - Přeměna Chitinu na Chitosan dle Kima et. al [39] .....	22
Obrázek 4 - Mechanismus aniontové ROP podle Khanna et al. [50].....	27
Obrázek 5 - Mechanismus kationtové ROP podle Khanna et al [50].....	27
Obrázek 6 - Mechanismus ROP aktivované monomerem podle Kim et al. [39] .....	27
Obrázek 7 - Mechanismus ROP koordinačním vkladem podle Knanna et al [50].....	28
Obrázek 8 - Křivka získaná FTIR analýzou vytištěných struktur .....	40
Obrázek 9 - Snímky vzorků pořízené digitálním mikroskopem. Označení vzorků odpovídá značení uvedeném v Tab. 1 a Tab. 2.....	41
Obrázek 10 - SEM snímky vzorku A z termoplastické extruze při zvětšení 2000x.....	42
Obrázek 11 - – B) PCL: CHCl <sub>3</sub> (3:7), C) PCL:CHCl <sub>3</sub> (2:8), D) PCL:CHCl <sub>3</sub> :DMSO(3:7:1), E) PCL:CHCl <sub>3</sub> :DMSO(3:7:2) Snímky byly pořízeny pomocí SEM. ....	43
Obrázek 12 - F) PCL:C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> CH <sub>3</sub> (3:7), G) PCL:C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> CH <sub>3</sub> (2:8) H) PCL:C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> CH <sub>3</sub> : DMSO (3:7:1), I) PCL:C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> CH <sub>3</sub> :DMSO(3:7:2) Snímky byly pořízeny pomocí SEM. ....	44
Obrázek 13 - Profilometrické porovnání vzorků A, B, C, D, E.....	45
Obrázek 14 - Profilometrické porovnání vzorků A, F, G, H, I.....	46

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 - Parametry vzorků natisknutých termoplastickou extruzí, které byly vybrány pro další měření.....	37
Tabulka 2 - Parametry vzorků natisknutých pneumatickou extruzí, které byly vybrány pro další měření.....	38
Tabulka 3 - Střední aritmetická hodnota drsnosti (Ra) a střední hloubka drsnosti (Rz) vzorků A, B, C, D, E.....	46
Tabulka 4 - Střední aritmetická hodnota drsnosti (Ra) a střední hloubka drsnosti (Rz) vzorků A, F, G, H, I.....	47