



Vývoj mikrovláknenných buněčných nosičů pomocí metody Rapid Prototyping

Bakalářská práce

Studijní program: B3107 – Textil

Studijní obor: 3106R016 – Textilní technologie, materiály a nanomateriály

Autor práce: **Kryštof Horník**

Vedoucí práce: Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Textile Engineering ■

Development of microfibrinous cellular scaffolds using the methods of Rapid Prototyping

Bachelor thesis

Study programme: B3107 – Textil

Study branch: 3106R016 – Textile Technologies, Materials and Nanomaterials

Author: **Kryštof Horník**

Supervisor: Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.



Zadání bakalářské práce

Vývoj mikrovlákných buněčných nosičů pomocí metody Rapid Prototyping

Jméno a příjmení: **Kryštof Horník**
Osobní číslo: T15000246
Studijní program: B3107 Textil
Studijní obor: Textilní technologie, materiály a nanomateriály
Zadávající katedra: Katedra netkaných textilií a nanovlákných materiálů
Akademický rok: **2017/2018**

Zásady pro vypracování:

1. Rešerše na dané téma.
2. Hledání vhodného polymeru na základě požadovaných reologických vlastností.
3. Příprava 3D vlákněných struktur a buněčných nosičů.
4. Hodnocení vlastností vytvořených buněčných nosičů na základě biologických testů.
5. Zpracování výsledků a vypracování závěru.

Rozsah grafických prací: dle potřeby dokumentace
Rozsah pracovní zprávy: 30-40 dle potřeby
Forma zpracování práce: tištěná/elektronická



Seznam odborné literatury:

1. Wypych, G. Handbook of Polymers, 2011th ed.; ChemTec Publishing, 2011.
2. Aráfat, M. T.; et al. Biomimetic composite coating on rapid prototyped scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 2011, 7 (2), 809820.
3. Szojka, A.; et al. Biomimetic 3D printed scaffolds for meniscus tissue engineering. *Bioprinting* 2017, 8, 17.
4. Do, Anh-Vu et al. "3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications." *Advanced healthcare materials* 4.12 (2015): 17421762. PMC. Web. 25 Oct. 2017.

Vedoucí práce: Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů
Datum zadání práce: 20. února 2018
* *Předpokládaný termín odevzdání:* 18. dubna 2019


Ing. Jana Drašarová, Ph.D.
děkanka
V Liberci 20. února 2018




Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že texty tištěné verze práce a elektronické verze práce vložené do IS STAG se shodují.

6. 4. 2019

Kryštof Horník

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych chtěl touto cestou poděkovat vedoucímu své bakalářské práce Ing. Jiřímu Chvojkovi, Ph.D. a konzultantu Ing. Radku Jirkovcovi za poskytnutí odborného vedení a cenných rad.

Dále bych rád poděkoval katedře netkaných textilií a nanovláknenných materiálů Technické univerzity v Liberci za poskytnutí zázemí pro biologické testování, Ing. Markétě Klíčové a Ing. Šárce Hauzerové za asistenci a pomoc při samotném buněčném testování a Ing. Lukáši Bártovi za pomoc při vývoji a tisku buněčných nosičů.

Děkuji své rodině a všem svým přátelům za psychickou a morální podporu po dobu studia.

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá vývojem unikátní struktury buněčného nosiče pomocí technologie FDM/FFM 3D tisku a následným biologickým testováním s lidskými buňkami v podobě *in vitro* testů. Cílem práce je vytvoření takové struktury a jejího fyzického modelu, který se v rámci tkáňového inženýrství s úmyslem náhrady nefunkční kostní, svalové či chrupavčité tkáně bude dále vyvíjet až do stavu, kdy bude možnost takovýto scaffold otestovat *in vivo* metodami. Testovanými materiály byly poly(ϵ -kaprolakton) a kyselina polymléčná. Oba materiály jsou v oboru tkáňového inženýrství široce využívány. Výsledkem práce bylo zjištění, že z kyseliny polymléčné se jednoznačně lépe tisklo a výsledné nosiče byly jednodušší. Za nastavených podmínek biologického testování vykazovala kyselina polymléčná také vyšší míru počtu a proliferace buněk MG-63, což bylo dokázáno MTT testem.

Klíčová slova

nanovlákna, 3D tisk, tkáňové inženýrství, buněčný nosič

ABSTRACT

Bachelor thesis deals with development of a scaffold's unique structure using the FDM/FFM 3D printing as one of the methods of Rapid Prototyping and biological testing afterwards using the *in vitro* lab methods. The aim of this pursue is to develop such a structure and its physical model which is intended to replace dysfunctional bone, muscular or cartilage structures, that has certain properties and hence is suitable for advanced *in vivo* testing. Materials used within this experiment were poly(ϵ -caprolactone) and polylactid acid. Both materials are respected and widely used in the field of tissue engineering. The results of this work bring to the attention that printing the scaffolds using the polylactid acid was much easier and that such printed scaffolds manifested more of an equal physical appearance. The conditions set for biological testing also suited the polylactid acid better as these scaffolds showed higher rate of thriving MG-63 cells during the MTT testing.

Key words

nanofibers, 3D printing, tissue engineering, scaffolds

Seznam zkratek

2D	dvourozměrná struktura
3D	trojrozměrná struktura
BAG	bioaktivní sklo
CAD	Computer-aided design
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
ECM	mezibuněčná hmota
FDM	Fused Deposition Modeling
FFM	Fused Filament Fabrication
HUVEC	lidské endoteliální buňky pupeční žíly
<i>in vitro</i>	testování v laboratorních podmínkách
<i>in vivo</i>	testování prováděné na zvířatech
IPA	isopropanol
kx	1000x zvětšení
MEM	Minimum Essential Eagle Medium
MG-63	linie lidských kostních buněk
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu
M_w	molární hmotnost
NC	negativní kontrola
PBS	fosfátový pufr
PC	pozitivní kontrola
PCL	poly(ϵ -kaprolakton)
PGA	kyselina polyglykolová
pH	vodíkový exponent
PLA	kyselina polyléčná
ρ	hustota
RP	Rapid Prototyping
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
w/w	hmotnostní podíl

OBSAH

ÚVOD	11
1 TEORETICKÁ ČÁST	12
1.1 RAPID PROTOTYPING – 3D TISK	12
1.2 ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ	13
1.3 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	14
<i>1.3.1 Materiály pro tkáňové inženýrství</i>	<i>14</i>
1.3.1.1 Nepolymerní materiály	14
1.3.1.2 Polymerní materiály	16
1.3.1.2.1 Poly(ϵ -kaprolakton)	17
1.3.1.2.2 Kyselina polymléčná	17
<i>1.3.2 Scaffoldy</i>	<i>18</i>
1.3.2.1 Požadavky na scaffold	19
2 REŠERŠNÍ ČÁST	21
3 PRAKTICKÁ ČÁST	25
3.1 VÝVOJ BUNĚČNÉHO NOSIČE	25
3.2 TVAR A STRUKTURA BUNĚČNÉHO NOSIČE	25
3.3 3D TISK BUNĚČNÉHO NOSIČE	25
3.3.1 3D tiskárna <i>RebeliX</i>	26
3.4 VÝROBA BUNĚČNÝCH NOSIČŮ.....	27
3.4.1 Výroba nosiče pomocí 3D tisku	27
3.4.2 Diferenční skenovací kalorimetrie.....	29
3.5 POVLÁKNĚNÍ POVRCHU NOSIČE.....	30
3.5.1 <i>Nanospider NS IWS500U</i>	30
3.5.2 Příprava zvlákňovacího roztoku	30
3.5.3 Reologické vlastnosti zvlákňovacího roztoku	31
3.5.4 Metodika a výsledek měření.....	31
3.6 PŘÍPRAVA A VÝROBA VLÁKENNÉ PCL VRSTVY	31
3.7 BUNĚČNÉ TESTOVÁNÍ <i>IN VITRO</i>	33
3.8 TESTOVACÍ METODY	34
3.8.1 <i>Fluorescenční mikroskopie</i>	34
3.8.2 <i>Elektronová mikroskopie</i>	34

3.9 BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ BUNĚČNÝCH NOSIČŮ	35
3.9.1 Příprava a kultivace buněčné kultury	35
3.9.2 Test na cytotoxicitu extraktů	36
3.9.3 Nasazení buněk	37
3.9.4 Příprava vzorků pro fluorescenční mikroskopii	37
3.9.5 Příprava vzorků pro SEM	38
3.9.6 Příprava vzorků pro MTT test	38
3.10 HODNOCENÍ ADHEZE A PROLIFERACE OSTEOLASTŮ NA 3D VYTIŠTĚNÉ SCAFFOLDY	38
3.10.1 MTT test	39
3.10.2 Fluorescenční mikroskopie a počet buněk	39
3.10.3 Skenovací elektronová mikroskopie	40
4 ZÁVĚR	41
5 DISKUZE	43
Seznam zdrojů	46
Seznam obrázků	52
Seznam tabulek	53
Seznam příloh	54

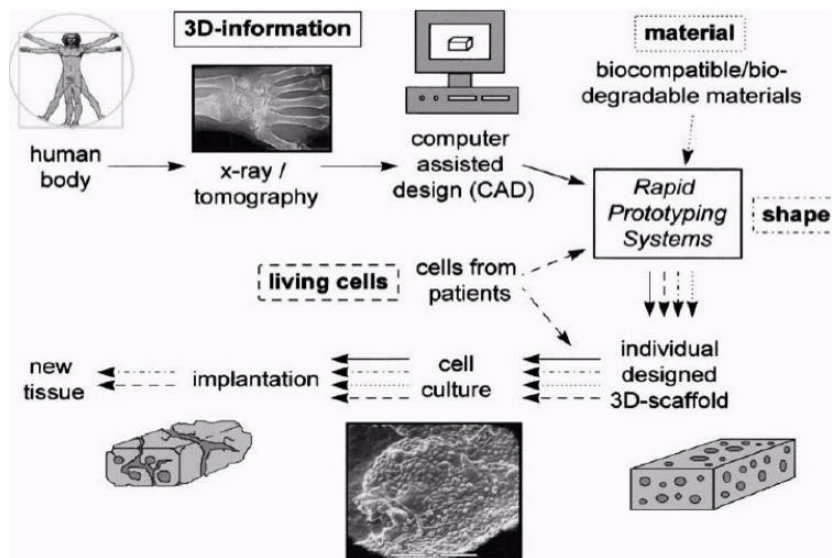
Úvod

Cílem teoretické části práce je definovat základní pojmy a podat stručný přehled o tkáňovém inženýrství jako o vědním oboru a dále o možnostech, které tento relativně nový vědecký obor nabízí. Práce je zaměřena na vývoj vlákných polymerních buněčných nosičů pomocí metody Rapid Prototyping (RP). V prvních odstavcích následujícího textu však budou představeny i jiné materiály a jiné formy nosičů. Mluvíme-li o tkáňových nosičích, není zcela nutné uvažovat pouze vlákné struktury. Nabízí se i jiná řada možností, například nanášení bioaktivních látek (coating) na neporézní či málo porézní povrchy (platí především pro kovové nosiče), nebo na keramické, případně sklokeramické kompozity. Stejně jako existují různé technologie výroby buněčných nosičů (elektrostatické zvláknování z roztoku či taveniny, melt blown, drawing, 3D tisk, vymývání, zpěňování aj.), z nichž každá má své výhody a nevýhody, existují i různé typy nosičů a různé materiály, ze kterých se nosiče vyrábějí. Jiné mechanicko-fyzikální vlastnosti vykazuje kost oproti měkkým tkáním, a proto je třeba velice přesně formulovat základní kritéria, podle kterých je zvolen vhodný materiál i struktura nosiče. Někdy je cílem poskytnout trvalou mechanickou podporu či zcela nahradit původní tkáň/orgán, jindy je implantace scaffoldu pouze dočasná a funguje jako prostředí pro regeneraci vlastních buněk tkáně.

1 Teoretická část

1.1 Rapid Prototyping – 3D tisk

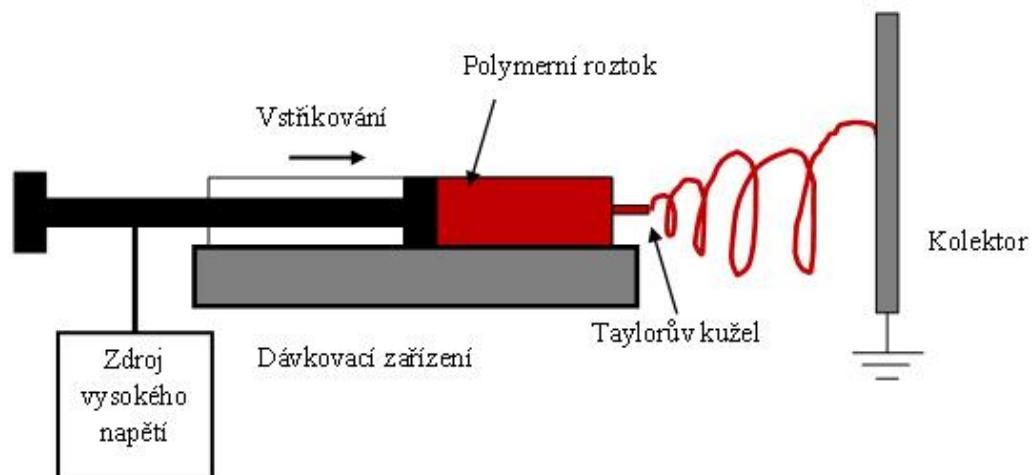
Rapid Prototyping je souhrnný název pro několik druhů výrobní technologie. Princip technologie spočívá v individuálním návrhu a v konstrukci pomocí systémů CAD (Computer-aided design) a v automatizovaném výrobním procesu. V oblasti tkáňového inženýrství se tyto technologie využívají převážně pro tvorbu 3D struktur. Tiskárně jsou data předkládána ve formě 2D a pomocí vrstvení vzniká výsledná 3D struktura. Rozdíly v technologii vycházejí z použití rozličných CAD programů nebo 3D zařízení. Výhodou 3D tisku je především vysoká míra kontroly nad výsledným stavem výrobku a možnost velice přesně definovat jeho parametry (tvar, rozměry, vzdálenost jednotlivých vláken). Další výhodou je možnost tvorby kompozitních nosičů, například pomocí kombinace 3D tisku a elektrostatického zvlákňování. Limitním faktorem technologie 3D tisku je tisková hlava s tryskou, která ovlivňuje tloušťku tisknutých vláken. Tloušťka materiálu tedy ovlivňuje celkový objem použitého materiálu ve výsledné struktuře, což může mít za následek prodlouženou dobu rozkladu nosiče v těle pacienta. [1] Na Obrázku 1 je zobrazen technologický postup výroby scaffoldu od prvotního získání informace po návrh v CAD systému, vývoj pomocí RP technologie, osazení buňkami a implantace do těla pacienta. [2]



Obrázek 1 Technologický postup výroby buněčného nosiče pomocí metody Rapid Prototyping

1.2 Elektrostatické zvlákňování

Historie elektrostatického zvlákňování (anglicky electrospinning) začíná roku 1897, kdy Rayleigh poprvé popsal podstatu jevu. Podrobnějším studiem elektrospinningu se následně zabýval až sir G. Taylor, jenž své poznatky sepsal a publikoval v práci z roku 1969. [3] Od této doby se proto vypořádanému jevu přezdívá Taylorův kužel. Taylorův kužel je zakřivení povrchu elektricky vodivé kapaliny vlivem vystavení kapaliny elektrickému poli. Podstatou jevu je samoorganizace polymerního roztoku/taveniny do formy nanovláken pouze za účinku elektrického pole. [1] Při překonání povrchových sil kapky je z Taylorova kuželu vymrštěn polymerní proud, který následně prochází stabilní a nestabilní (zde dochází k tzv. bičování) oblastí, až je nakonec zachytáván na opačně nabitý nebo uzemněný kolektor. Protože je elektrostatické zvlákňování svým principem velice jednoduché, jedná se o jednu z nejpoužívanějších metod k výrobě nanovláken. Základ zvlákňovacího zařízení tvoří zdroj vysokého napětí, dávkovač polymeru a kolektor, viz Obrázek 2. [4] Zvlákňovacím ústrojím je nejčastěji jehla, tzv. kapilára. Další možností je kupříkladu zvlákňování z válečku. Na tomto principu operuje zařízení Nanospider™ vyvinuté na Technické univerzitě v Liberci.



Obrázek 2 Schéma zvlákňovacího zařízení pro elektrostatické zvlákňování

1.3 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je mezivědní obor aplikující inženýrské a biologické postupy za účelem základního poznání vztahu mezi strukturou a funkcí zdravých a poškozených tkání savců. Snahou je vyvinout biologicky kompatibilní náhrady pro obnovu, zachování nebo vylepšení funkcí daných tkání. [5] Cílem je pak vyvinout takové technologické postupy a materiály, které budou následně sloužit při rekonstrukcích a náhradách tkání či orgánů v případech, že původní tkáň je z jakéhokoliv důvodu neschopna nadále vykonávat svou funkci – jedná se zejména o cévní náhrady, regeneraci opotřebovaných kloubů a chrupavek, kostních a zubních tkání.

1.3.1 Materiály pro tkáňové inženýrství

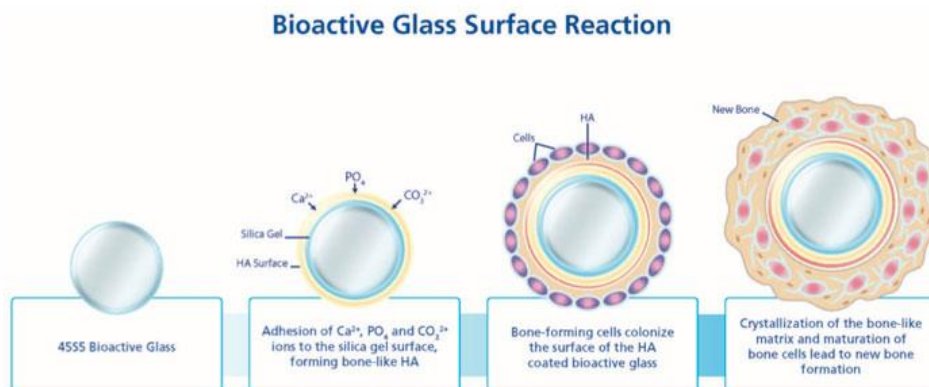
Materiály pro tkáňové inženýrství musí vykazovat vysokou míru biokompatibility, vžil se tedy zkrácený název biomateriály. První definice *biomateriálu* z roku 1976 byla později přeformulována, v současné době zní přibližně takto: „*materiál, jehož zamýšlenou funkcí je léčit, vylepšit anebo nahradit kteroukoliv tkáň, orgán nebo funkci v těle*“. [5] V současné době se za biomateriály považují syntetické a přírodní polymery, jejichž největší výhodou je možnost tvořit vlákna různých jemností, dobrá biokompatibilita v prostředí těla a relativně snadno a dobře regulovatelný rozklad polymeru v těle. Jedná se většinou o vlákna popisována jako nanovlákna ($d < 1000$ nm) či mikrovlákna ($d > 1000$ nm), pěny, hydrogely nebo jiné porézní struktury. Mimo polymerních vlákenných materiálů, kterými se bude tato práce zabývat, budou v následujícím odstavci zmíněni dva vybraní zástupci z řady nepolymerních materiálů. Jedná se však o materiály s velkým potenciálním přínosem v oblasti tkáňového inženýrství.

1.3.1.1 Nepolymerní materiály

Bioaktivní sklo¹ (BAG) je sklokeramický materiál, poprvé vyvinut v šedesátých letech 20. století. První článek popisující BAG a jeho vlastnosti jako buněčného nosiče pro regeneraci kostní tkáně byl vydán až v 80. letech a popisuje výborné vlastnosti BAG při pojení na původní kost. Mechanismus pro kultivaci buněk na povrchu bioaktivního skla spočívá v kontaktu tělních tekutin s povrchem skla, kde dochází k výměně iontů

¹ Anglický výraz Bioglass® je obchodní název konkrétně patentovaného složení, proto je důležité nezaměňovat dva relativně stejné pojmy; biosklo a bioaktivní sklo

Na^+ společně s rozpouštěním Ca^{2+} , PO_4^{3-} a Si^{4+} za vzniku silica-gelu na povrchu skla, který je podkladem pro tvorbu calcium-fosfátu, viz Obrázek 3. [6] Ten následně krystalizuje do podoby hydroxyapatitu, který odpovídá chemickému složení kosti. [7]



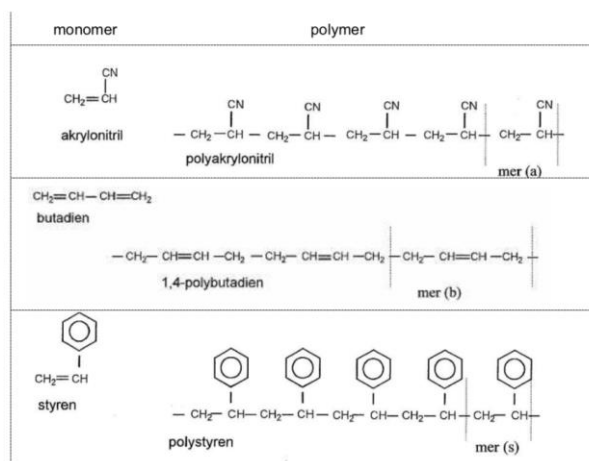
Obrázek 3 Formování kostních buněk na skleněném nosiči bioaktivního skla typu 45S5

Dalšími výzkumy bylo prokázáno, že bioaktivní sklo je protizánětlivé a v těle nepodporuje bakteriální množení. [8] Díky bohaté iontové výměně se také zjistilo, že sklo iniciuje tvorbu kostních buněk a aktivně se tak podílí na diferenciaci a proliferaci.

Nosiči kostních buněk mohou být i kovy. Aktuálně je velká pozornost věnována hořčíku a hořečnatým slitinám. Hořčík je v kostní tkáni hojně zastoupený prvek a s původní tkání dobře reaguje. Na rozdíl od titanu, který byl doteď často využívaný, je pevnost a hustota hořčíku a kostí velmi podobná ($\rho_{\text{Mg}} = 1,74 \text{ g/cm}^3$, $\rho_{\text{kosti}} = 1,8\text{--}2,1 \text{ g/cm}^3$). [9] [10] Oproti polymerním scaffoldům mají kovy větší pevnost a odolnost vůči deformacím, jsou časově stálější a při rozkladu mineralizují okolní prostředí. V testech bylo prokázáno, že hořčík proaktivně působí při aktivaci osteoblastů pro tvorbu nové kostní tkáně. [9] Pórovitost i velikost pórů mají velký vliv jak na degradaci nosiče, kdy degradace je tím rychlejší, čím větší jsou póry, tak i na kultivaci nových buněk a následnou proliferaci. [11] Hořčík s čistotou více jak 99 % koroduje relativně rychle a vlivem pórovitosti ještě rychleji, protože v těle funguje jako katoda. Zpomalit degradaci nosičů se podařilo při infúzi stopovým množstvím kovů vzácných zemin (lanthanoidy, yttrium, scandium). [12]

1.3.1.2 Polymerní materiály

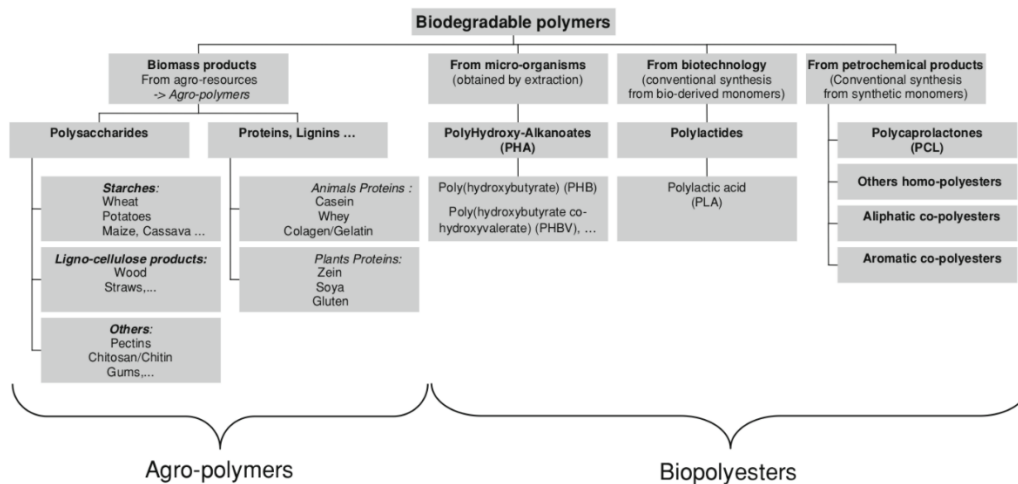
Polymery jsou makromolekulární látky, jejichž struktura se v rámci řetězce několikrát opakuje. Klíčovým prvkem řetězce je uhlík. Oproti nízkomolekulárním látkám mají násobně vyšší molární hmotnost. Díky tomu mají vysoký bod varu a než jej dosáhnou, dosahují zpravidla bodu rozkladu. Polymerní látky tedy nemají plynné skupenství, důsledkem jejich struktury se formují jiná fyzikální uspořádání – fázové stavy. Za polymerní řetězce označujeme materiály, jejichž strukturní (základní) jednotka – mer, se v řetězci opakuje více jak 1000x (není to však exaktní ani dogmaticky definovaný počet). Logicky se tedy dostáváme k samotnému názvu „polymer“, což je složenina dvou řeckých slov – „poly“, znamenající násobný a „mer“, znamenající jednotka, viz Obrázek 4. [13]



Obrázek 4 Na příkladu jsou znázorněny monomerní jednotky tří chemických látek (akrylonitril, butadien a styren) včetně jejich polymerních řetězců

Věda zabývající se studiem polymerů se nazývá makromolekulární chemie. Proč si polymery zaslouhují pozornost vědců po celém světě? Jedná se především o jejich unikátní vlastnosti a s trochou nadsázky můžeme o současné době hovořit jako o době „polymerní“, a to jednoduše proto, že polymery jsou všude kolem nás. Svými vlastnostmi dokáží nahrazovat, mnohdy i překonávat, doposud tradiční materiály, jakými jsou kovy, sklo apod. Je to právě opakující se struktura, která jim propůjčuje jejich unikátní vlastnosti, kdy základní jednotka – mer, často vykazuje zcela odlišné vlastnosti od těch, kterými disponuje polymer. V případě polymerů tak hovoříme o makroskopických vlastnostech a snahou je rozklíčovat závislost makroskopických vlastností na základě molekulární struktury.

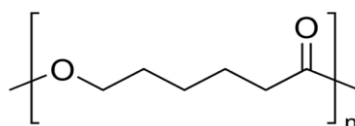
Pro použití polymerů v tkáňovém inženýrství je prvotní podmínkou biokompatibilita. Materiály splňující tuto podmínku lze rozdělit na přírodní a syntetické, jak je ilustrováno na Obrázku 5. [14]



Obrázek 5 Rozdělení biopolymerů na základě výchozích surovin

1.3.1.2.1 Poly(ϵ -kaprolakton)

Poly(ϵ -kaprolakton) (PCL) je syntetický polymer vyráběný polymerací za otevření kruhu ϵ -kaprolaktonu. Strukturální vzorec je uveden na Obrázku 6. [15] PCL je hydrofobní, semikrystalický, alifatický polyester s nízkou teplotou tání a dobrou rozpustností. Protože má PCL relativně nízkou teplotou tání, využívá se společně s jinými polymery jako kompozit, nebo se strukturálně síťuje. [16] Degradace PCL je dvoustupňová, první fází je hydrolytické štěpení esterových vazeb, po snížení molekulové hmotnosti nastává enzymatické štěpení. Doba rozkladu PCL v těle závisí na molekulové hmotnosti polymeru, je však delší než u kyseliny polyglykolové (PGA) nebo kyseliny polymléčné (PLA). I proto bylo od PCL, jakožto materiálu pro výrobu tkáňových nosičů, nosičů léčiv, chirurgických nití aj., v minulosti upuštěno. [17]

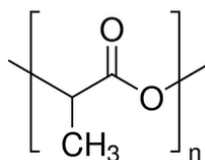


Obrázek 6 Strukturální vzorec poly(ϵ -kaprolaktonu)

1.3.1.2.2 Kyselina polymléčná

Kyselina polymléčná je biodegradabilní přírodní polyester s lineárním řetězcem, viz Obrázek 7, vyráběná nejčastěji polymerací za pomoci otevření kruhu laktidu kyseliny

mléčné. Výchozí kyselina mléčná pro výrobu PLA je získávána fermentací glukózy z běžně dostupných zemědělských plodin (kukuřice, řepy, třtiny apod.). [18] PLA je průhledný a velice odolný materiál. Z toho důvodu je čím dál častěji využívání v průmyslových odvětvích jako substitut za plasty z oblasti petrochemického průmyslu. Jedná se především o výrobu plastových obalů a lahví. PLA lze zpracovávat naprostou většinou průmyslových technologií, ať už se jedná o lisování, vstřikování, tváření apod. Díky tomu, že je PLA biodegradabilní, ale i biokompatibilní, dostává se mu pozornosti při vývoji implantátů v tkáňovém inženýrství. [19] Pro svoje výtečné mechanické vlastnosti a odolnost je zkoumáno zejména použití PLA jako podpory při růstu a regeneraci kostní tkáně. Nejdůležitějšími vlastnostmi při výběru vhodného materiálu pro tkáňové inženýrství jsou stupeň krystalinity, molekulová hmotnost a stereoizomerie daného polymeru. PLA lze považovat za vhodný materiál pro vnitrotělní implantáty, protože podléhá hydrolytickému štěpení a časem se v těle samovolně rozpadne. [20]



Obrázek 7 Strukturální vzorec kyseliny polymléčná

1.3.2 Scaffolds

Scaffolds (v překladu lešení, opora) jsou materiálové struktury, sloužící jako tkáňové nosiče buněk. Vlastnosti scaffoldů napodobují morfologické vlastnosti původní tkáně. Výchozími materiály pro výrobu tkáňových nosičů jsou povětšinou polymerní organické nebo anorganické materiály. Prostorově lze scaffolds rozdělit na dva typy – dvojrozměrné a trojrozměrné struktury. Elementární požadavek, kterým musí scaffold ve tkáňovém inženýrství disponovat, je schopnost ukotvit na své struktuře nové buňky. Tato schopnost je v těle přirozeně zajištěna pomocí mimobuněčné základní hmoty (tzv. extracelulární matrix; ECM). [21] Přirozeně tedy ECM, případně scaffold, poskytuje vhodné podmínky pro rozložení, migraci, proliferaci a následnou diferenciaci buněk. Tyto vhodné podmínky jsou v případě scaffoldu zajištěny výběrem vhodného materiálu a tvaru. Všechny pro tělo nepůvodní nosiče spojuje dostatečná pórovitost, tedy prostupnost, a to jak samotných buněk, tak i jejich výživy, která je potřebná pro následný vývoj. [22] [23]

1.3.2.1 Požadavky na scaffold

V závislosti na typu scaffoldu se odvíjí i jeho vlastnosti. Z hlediska požadavků můžeme scaffoldy dělit na aktivní (bioaktivní) a pasivní. Ačkoliv se dříve využívalo nosičů, které jsou vyrobeny z pasivních materiálů, tj. materiálů, které nejsou biodegradabilní², ale jsou biokompatibilní³, [5] je současný trend zcela opačný. Dnes je využíváno nosičů aktivních, jež svojí přítomností stimulují růst nových buněk. Pasivní nosiče jsou vyráběny z materiálů jako keramika, nerezová ocel, hořčík, titan, kobalt, nikl a různé slitiny výše uvedených kovů. Tyto materiály jsou odolné vůči rozkladným procesům v těle, jsou pevné a nedegradují za vzniku toxických metabolitů. Dané nosiče jsou využívány především jako kloubní náhrady, jejich uplatnění však najdeme i v ortodoncii.

Aktivní nosiče, jejichž vývoj je předmětem zkoumání této práce, jsou, oproti předešlým, tvořeny z biodegradabilních polymerních materiálů. Tyto materiály mohou být buď přírodního charakteru nebo syntetické. Jejich výběr závisí na použité výrobní metodě, způsobu a na použití v cílové tkáni. Výběr materiálu je kritickou záležitostí. V počátcích rozvoje tkáňového inženýrství figurovali primárně pasivní materiály, nyní je však jasné, že tyto materiály nevyvolávají požadovanou buněčnou odezvu pro stimulaci vlastní tkáňové regenerace. [24] Ve studii z roku 2000 jsou kritéria pro výběr materiálu na základě potřebných vlastností definována následovně:

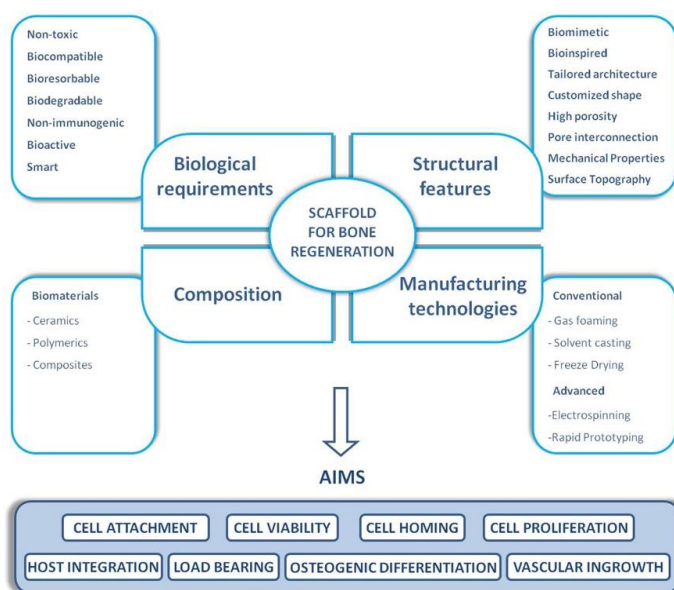
- (i) podpora růstu nové tkáně (komunikace mezi buňkami, přenos buněk a přístup buněk k živinám, léčivům a růstovým faktorům musí být v nejvyšší možné míře)
- (ii) omezení buněčné aktivity (nežádoucí růst tkáně)
- (iii) řízená buněčná odezva (zvýšení specifické buněčné aktivity při současném potlačení jiných buněčných aktivit)
- (iv) zlepšení uchycení buněk a následná buněčná aktivace (proliferace a uchycení fibroblastů, produkce ECM při rekonstrukci škóry)
- (v) inhibice/aktivace uchycení buněk (nechtěné usazování trombocytů na stěnách cévních náhrad)

² biodegradabilní materiály jsou v těle přirozeně metabolizovány, podmínkami pro jejich použití je jejich netoxičita při rozkladu a pro imunitní systém snadná detekovatelnost a vyloučení z těla

³ biokompatibilní materiály jsou pro tělo indiferentní, nevyvolávají odezvu imunitního systému, buňkám poskytují podklad pro růst, nejsou žádným způsobem metabolizovány

- (vi) omezení biologické odezvy (inhibice účinku protilátek na autologní⁴ nebo xenologní⁵ buňky při transplantacích)

Biodegradabilní polymery se používají tam, kde je potřeba vlastní obnovy tkáně, a nikoliv dlouhodobé stálosti materiálu. Je naopak žádoucí, aby se jejich mechanická pevnost snižovala s takovým gradientem, se kterým naopak roste mechanická odolnost nově regenerované tkáně. Jde tedy o rovnováhu mezi degradací vloženého scaffoldu a tvorbou nové tkáně. Nedostatečně rychlé odbourávání vloženého vlákenného nosiče může mít za následek zpomalení regeneračního procesu. Naopak příliš rychlá degradace může celý regenerační proces narušit, protože nové buňky nebudou mít dostatek času pro růst, vytvoření potřebných struktur a pro vytvoření mechanické odolnosti. Struktura scaffoldu, tvar, pružnost, pevnost a další vlastnosti pak samozřejmě musí odpovídat tkáni, do které je nosič vložen. [6] Přehled požadovaných vlastností potřebných pro vytvoření kvalitního buněčného nosiče je vyobrazen na Obrázku 8.



Obrázek 8 Vlastnosti scaffoldu, kterých by daný nosič měl dosahovat. Na obrázku konkrétní příklad scaffoldu pro regeneraci kostní tkáně.

⁴ dárce i příjemcem buněk je stejná osoba

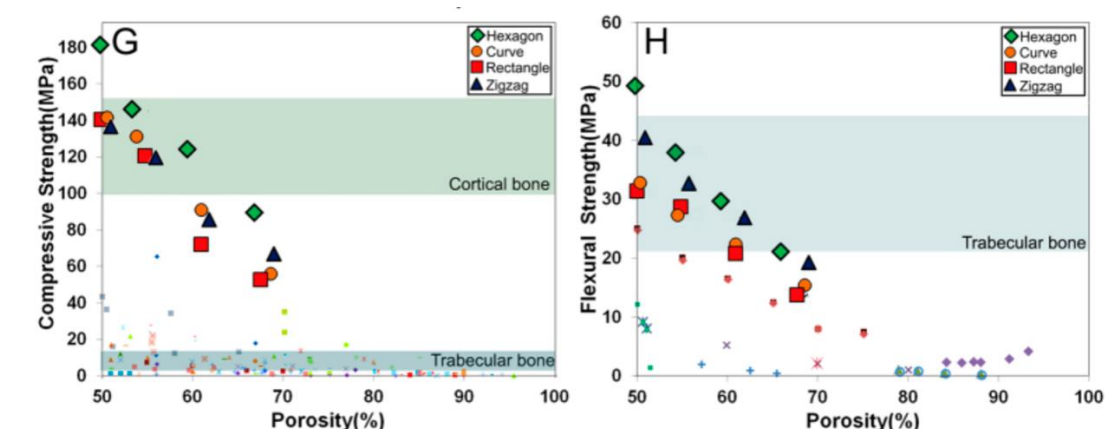
⁵ dárce buněk je zástupce jiného živočišného druhu

2 Rešeršní část

V této části budou shrnuty metody, materiály, reálné poznatky a výsledky z několika odborných prací. Témata těchto prací se alespoň částečně shodovala se zadáním této práce, a lépe tedy čtenáři přiblíží problematiku před provedením vlastního experimentu, který je popsán v následující části. Tato rešerše je zpracována za účelem zjištění, jaké jsou technologické trendy v oblasti 3D tisku, kterými se v současné době připravují buněčné nosiče. Dále jaké materiály, případně kombinace vyhovují zadaným požadavkům a jaké jsou technologické a materiálové limity. Vytvořit scaffold, který splňuje jednotlivé podmínky jako je mechanická odolnost, biokompatibilita aj. není nemožné. Výzvou je vytvoření scaffoldu, který by splňoval kombinaci těchto parametrů, a to například tak, aby pevnost nosiče odpovídala pevnosti kosti tam, kde je nosič dosazen. Případně, aby řízená degradace odpovídala času růstu nové kosti nebo aby buňky na nosiči dobře proliferovaly apod. Právě z tohoto důvodu existuje mnoho metod výroby scaffoldů, stejně tak jako materiálů. Při vývoji dochází i ke kombinaci výrobních metod a materiálů.

Roohani *et al.* [25] ve své práci popisuje výrobu kompozitního sklo-keramického nosiče s názvem Sr-HT Gahnite (patentovaný materiál) pro náhradu kostní tkáně pomocí biotisku (DIW, robocasting). Důvodem, proč se tato studie liší od ostatních, je využití hexagonální struktury k porovnání mechanické odolnosti s jinak typickými tvary využívaných ve tkáňovém inženýrství, viz Obrázek 9. Hexagonální struktura vykazuje výjimečně vysokou míru mechanické odolnosti, srovnatelnou právě s pevností kosti, a to při zachování dostatečné porozity pro potřebný buněčný vývoj. Při cyklickém namáhání byla demonstrována odolnost vůči únavě při cyklickém zatížení. Lidská kost má mechanickou pevnost kolem 100-150 MPa. Testováním se prokázalo, že podobných hodnot lze dosáhnout i s daným kompozitním nosičem. Při totožných velikostech pórů byla pevnost polymerních nosičů až 150x menší, nosiče ze skla a keramiky vykazovaly pevnost přibližně 5x menší. Pro vlastní experiment je v dané práci podstatné, že hexagonální struktura vykazuje vyšší odolnost při jednorázovém mechanickém namáhání, a také vyšší odolnost při cyklickém zatížení. Důvodem zvýšené odolnosti hexagonální struktury oproti struktuře tvořené obdélníky nebo oproti „zigzag“ struktuře je větší styčná plocha dotyku mezi jednotlivými vrstvami, ze kterých se daný nosič tiskne.

Hexagonální struktura byla vždy mechanicky odolnější než zbylé struktury při stejné porozitě. Nosiče byly testovány při porozitě cca 45 až 70 %.

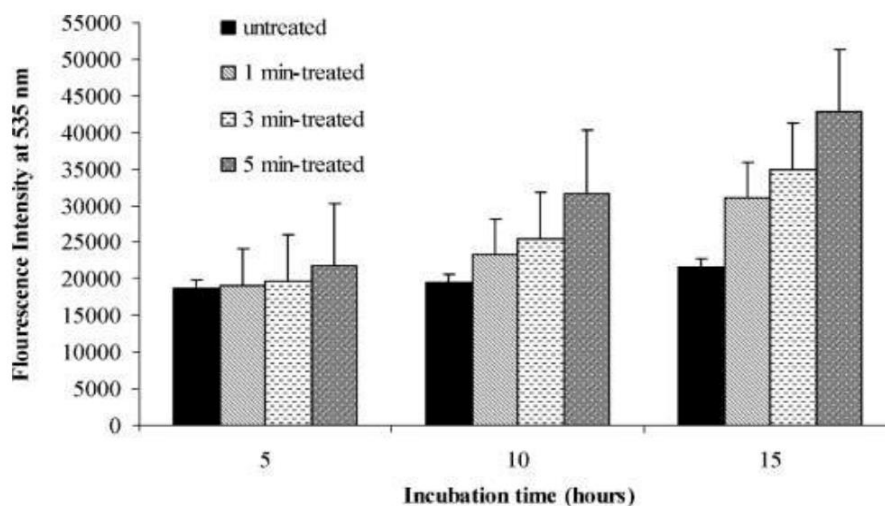


Obrázek 9 Porovnání mechanické odolnosti při podélném a příčném zatížení

V další práci se tým vědců pod vedením Sousa *et al.* [26] zabýval zlepšením adheze buněk na povrch nosiče vyrobeného z PCL pomocí kolagenového coatingu. Protože velký výskyt metylových skupin ($-CH_3$) kolem hlavního řetězce činí z PCL hydrofobní polymer, je potřeba dodatečně změnit jeho hydrofobní charakter na hydrofilní. Buněčná adheze a proliferace závisí právě na dobré afinitě buněk k podkladu nosiče. Výsledky ukazují výrazně lepší buněčnou adhezi a následnou proliferaci na povrch PCL vláken, jejichž povrch vykazuje hydrofilní charakter. [27]

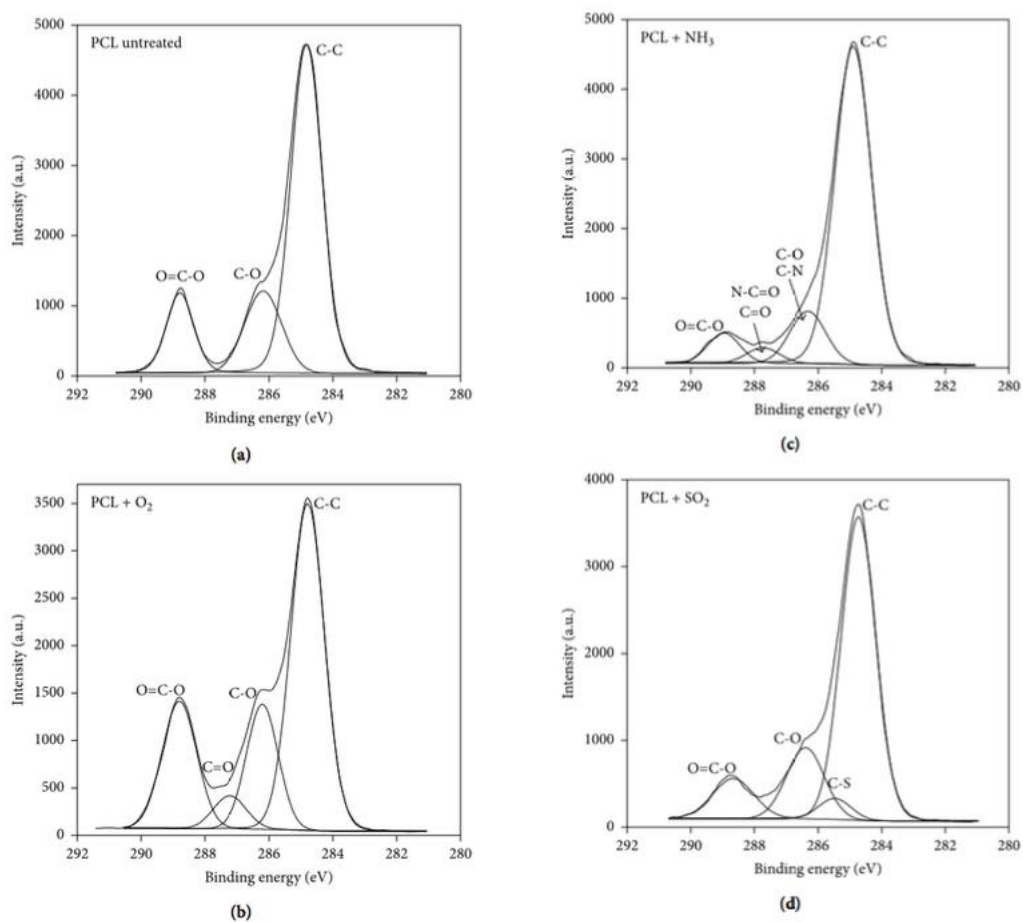
Jednou z možností změny hydrofobního charakteru na hydrofilní je ošetření vláknenného nosiče plasmou, jak bylo dokázáno prací Eda Yildirima *et al.* z Drexel univerzity ve Filadelfii. [28] Výhodou plasmatického ošetření oproti chemickým reakcím, potažení hydrofilním filmem (například kolagenem, viz výše) nebo iontovou výměnou je výběr ze široké škály plynů (O_2 , CO_2 , SO_2 , NH_3 , vzácné plyny) a tím možná manipulace funkčních skupin řetězce cíleného polymeru. Vpravením kyslíku do hlavního řetězce pomocí polárních funkčních skupin hydroxyly ($-C-OH$), carbonylu ($-C=O$) nebo carboxyly [$-(C=O)-OH$], a tím pádem rozštěpením dominantních C-C vazeb, dochází ke změně hydrofobního charakteru na hydrofilní. Se snížením hydrofobního charakteru došlo ke zvýšení povrchové napětí polymeru, což ovlivňuje rychlost adheze proteinů k povrchu. Respektive zásadně ovlivňuje úspěšnost adheze myších osteoblastů 7F2 na povrch polymeru. Při plasmatickém působení po dobu 5 minut stoupla úspěšnost adheze a následné proliferace buněk o 90 % oproti vzorkům, které plasmaticky ošetřeny nebyly, viz Obrázek 10. Měření bylo prováděno fluorescenční mikroskopií. [28] V závěru

práce je jasný důkaz, že adheze a proliferace buněk je přímo závislá na zvýšení povrchového napětí povrchu polymeru a na změně hydrofobního charakteru na hydrofilní.



Obrázek 10 Inkubační doba buněk při porovnání plasmaticky ošetřených a neošetřených PCL vzorků

Tématikou změny funkčních skupin řetězce, a tedy změnou polaritu pro optimalizaci adheze a proliferace buněk na povrch elektrostaticky zvlákněných vláken z PCL, se zabýval i tým vědců pod vedením Niny Recek *et al.* [29] ze Slovinska. Předmětem zájmu bylo ošetření elektrostaticky zvlákněných vláken PCL O_2 plasmatickým paprskem, dále NH_3 a SO_2 . Buňky nasazené pro zjištění účinnosti ošetření byly lidské endoteliální buňky pupeční žíly (HUVEC). Výsledky jsou totožné s výsledky předchozí práce. Plasmatické ošetření pomocí kyslíku výrazně zlepšilo adhezi a následnou proliferaci buněk tím, že se změnila vazebná energie vazeb C-C a došlo ke zvýšení vazebných energií C-O, C=O a O=C-O u ošetření pomocí O_2 , v případě použití NH_3 došlo i ke vzniku nových vazeb N-C=O a C-N. Ošetření pomocí SO_2 , za vzniku nové vazby C-S, vykázalo nejslabší výsledky. Přesto byly tyto výsledky lepší než výsledky u zcela neošetřených vláken, viz Obrázek 11. [29] Oproti závěru předchozí studie [28] se autoři této práce domnívají, že adheze a proliferace buněk nezáleží na hydrofobii a hydrofilii tolik, kolik se původně myslelo, ale záleží spíše na chemickém složení a morfologii. Jinými slovy, záleží na tom, jak moc se změní povrch polymeru po zásahu plasmovým paprskem, jaké nové vazby se utvoří a jak se změní jejich vazebná energie.



Obrázek 11 Elektronová spektroskopie zachycující změnu vazebných energií při použití rozdílných plasmatických paprsků. Zvýšení vazebné energie u (c) je zapříčiněno snížením obsahu atomárního kyslíku po reakci NH₃, kdy uvolněný vodík reagoval s kyslíkem v polymeru, nová vazba C-N vznikla tak, že se dusík zakomponoval do řetězce právě namísto zreagovaného kyslíku

3 Praktická část

3.1 Vývoj buněčného nosiče

Pro osazení buněčného nosiče (scaffoldu) buňkami a v konečném důsledku i pro možnost nosič úspěšně implementovat do lidského těla, je potřeba definovat vhodný tvar nosiče, metodu výroby, vybrat vhodný materiál a vzít v úvahu i finanční stránku celého vývojového procesu. Příliš vysoká cena vývoje či vývojového řešení by mohla zamezit rozšíření a rozvoji projektu.

3.2 Tvar a struktura buněčného nosiče

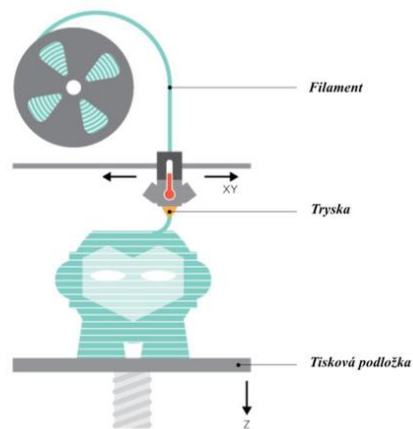
Pro účely biologického testování ve 12jamkových kultivačních destičkách byl zvolen praktický kulatý tvar s průměrem 21 mm a to proto, aby bylo možné vzorky co nejjednodušeji do jamky vložit nebo z ní vyjmout. Zároveň je průměr nosiče dostatečně velký na to, aby v jamce držel pevně a nedocházelo k nechtěnému posunu při manipulaci a tím narušení kultivace osazených buněk.

Tvar nosiče byl navržen pouze za účelem jednoduché manipulace v rámci biologického testování. Naproti tomu vnitřní struktura už může ovlivňovat buněčnou proliferaci a být vůči buňkám hostilní. Zároveň s tímto faktem je potřeba zvolit takovou strukturu, která vykazuje dobré mechanické vlastnosti. Cílem je náhrada chybějící nebo poškozené tkáně v těle kdy materiál i se svou strukturou musí poskytovat dostatečnou mechanickou odolnost. Inspirací pro vnitřní strukturu byl tvar buňky včelí plástve – honeycomb, protože tato struktura při minimálních rozměrech nabízí maximální pevnost a odolnost. [30]

3.3 3D tisk buněčného nosiče

Pro výrobu scaffoldů byl vybrán 3D tisk. Technologie 3D tisku získává na popularitě nejen mezi domácími kutily a nadšenci, ale silně se rozvíjí i ve vývoji a v konstrukcích v tkáňovém inženýrství, v medicíně, ve stavebnictví, v automotive průmyslu a jinde. Společně s tím, jak roste zájem o 3D tisk, se rychle vyvíjí nové typy a metody tisku a zároveň klesá cena výroby i samotných tiskáren. Jednou z nejrozšířenějších a zároveň ekonomicky nejvýhodnějších možností 3D tisku

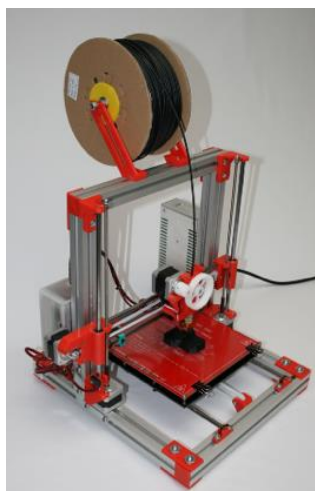
je využití metody FDM/FFM (Fused Deposition Modeling/Fused Filament Fabrication). Princip metody FDM/FFM je znázorněn na Obrázku 12. [31]



Obrázek 12 Schématický popis principu technologie FFM/FDM

3.3.1 3D tiskárna RebeliX

K tisku buněčných nosičů byla použita FDM tiskárna RebeliX, viz Obrázek 13. [32] Jedná se o tiskárnu české výroby. Nízká cena této tiskárny je důkazem, že pomocí 3D tisku (zvláště pak FDM metodou) lze relativně levně a snadno vytvářet vysoce specializované a funkční výrobky. Obecným problémem tiskáren typu FDM je přesnost tisku v oblastech desetin a setin milimetrů. Tiskárna RebeliX je ve standardní úpravě schopna tisknout vrstvy od tloušťky 0,05 mm. Hlava tiskárny s tryskou se pohybuje v osách X a Y. Lůžko/tisková podložka je v případě tiskárny RebeliX vyhřívaná, ale je nepohyblivá. Minimální retrakce při pohybu hlavy tiskárny v ose X / Y je 10 μm .



Obrázek 13 3D tiskárna RebeliX

3.4 Výroba buněčných nosičů

Prvním krokem k získání fyzického modelu nosiče je jeho 3D grafický návrh pomocí některého z CAD programů. V tomto případě byl použit program AutoDesk Inventor. Původně měl být vytisknut šestihran s hexagonální strukturou i uvnitř modelu. Z toho však sešlo, kvůli nadměrné časové zátěži při tvorbě modelu a kvůli následné optimalizaci při tisku. Optimalizace však žádným způsobem nedokáže ovlivnit průběh a výsledek samotného biologického testování. Proto byl vytvořen alternativní jednoduchý kulatý tvar s hexagonální strukturou uvnitř nosiče. Kulatý tvar byl strategicky vybrán pro snadnou manipulaci a také proto, že pasuje do testovacích jamek kultivačních destiček. Grafické návrhy nosičů jsou vloženy v Příloze číslo 5.

3.4.1 Výroba nosiče pomocí 3D tisku

Pro tisk byla zvolena tiskárna technologie FDM/FFM, což znamená, že tisk je realizován pomocí roztaveného filamentu, který je vtlačován do trysky umístěné v tiskové hlavě. Jelikož se parametry jednotlivých tiskáren mohou lišit, je v Tabulce 1 souhrnně zaznamenáno, jaké byly parametry tiskárny a jaké bylo nastavení jejího ovládacího software.

Tabulka 1 Parametry tisku buněčného nosiče

Parametry tisku	Hodnoty
3D tiskárna	RebeliX
Tloušťka trysky [mm], mosaz	0,4
Velikost tiskové podložky [mm]	195 x 195 x 185
Průměr PCL filamentu [mm]	1,75
Průměr PLA filamentu [mm]	1,75
Výška tisknuté první vrstvy/další vrstvy [mm]	0,15/0,1
Vertikální obvodové rysy	logická 1
Horizontální plošné rysy vršku/spodku	logická 0
Hustota zaplnění [%]	50

Vzorovací výplň	Honeycomb
Retrakce při změně směru nebo vrstvy [mm]	2
Přizvednutí trysky při retrakci [mm]	0,2
Rychlost tisku obvodu/výplně [mm/s]	40/60
Rychlost tisku první vrstvy	80 % rychlosti obvodu
Tisková podložka	Skleněné zrcadlo

K výrobě buněčných nosičů z PCL bylo použito filamentu Facilan™ PCL100 [33] a pro výrobu nosičů z PLA byl použit filament Wisteria. [34]

Pro tisk nosičů z PLA stačilo podložku se zrcadlem potříť lepidlem KORES pro jednodušší odstranění výtisků z podložky. K odstranění výtisků z PCL bylo potřeba tisknout na čistě vyleštěné zrcadlo.

Výsledné vzorky měly průměr 21 mm, výška vzorku byla 0,8 mm. Pro potřeby biologického testování bylo vytisknuto 85 kusů vzorků z PLA a 94 kusů vzorků z PCL.

Program pro tisk byl připraven v programu Slic3r 1.30.0.25 a modely byly do programu nahrány ve formátu stl. Procesní parametry tisku pro jednotlivé materiály jsou přehledně uvedeny v Tabulce 2. Spojení s tiskárnou proběhlo pomocí USB kabelu a programu Pronterface Printron – 2014.08.01. Doba tisku jednoho kusu vzorku se v průměru pohybovala kolem 6 minut.

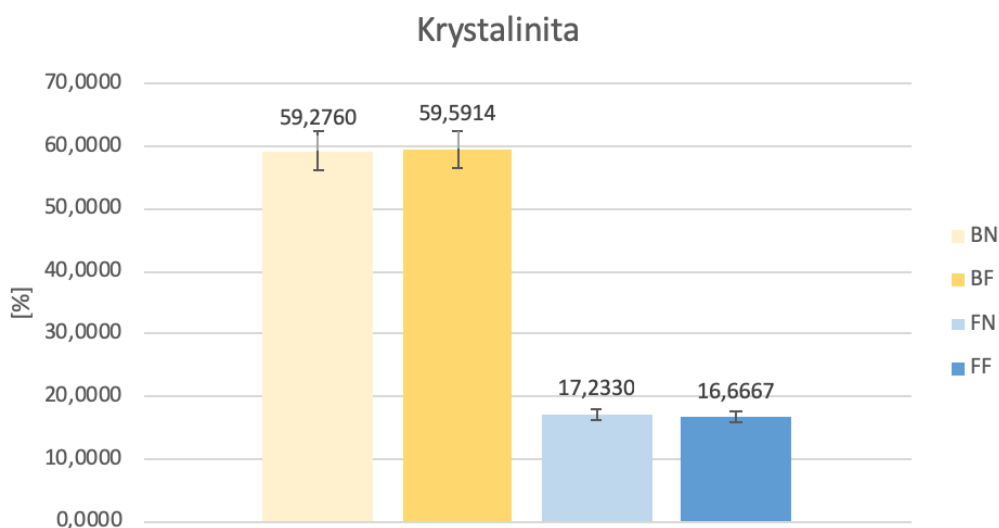
Tabulka 2 Procesní parametry materiálu

Použitý materiál	PLA
Teplota trysky/pro první vrstvu [°C]	210/210
Teplota podložky/pro první vrstvu [°C]	50/50
Chlazení výtisku	vypnuto pro první vrstvu

Použitý materiál	PCL
Teplota trysky/pro první vrstvu [°C]	110/130
Teplota podložky/pro první vrstvu [°C]	0/40
Chlazení výtisku	zapnuto pro první vrstvu

3.4.2 Diferenční skenovací kalorimetrie

Pro potřeby zjištění, jak se vlivem ohřevu mění krystalinita polymerů, a tedy jak moc případná změna může ovlivnit práci s materiálem a v konečném důsledku i samotné biologické testování, bylo provedeno měření pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). Kalorimetrie je založena na poměru entalpie po ohřevu vůči původnímu entalpickému stavu materiálu. Výsledná hodnota v přepočtu na procenta udává podíl krystalické fáze v řetězci. Z výsledků je patrné, že PCL obsahuje oproti kyselině polymléčné více krystalické fáze, viz Obrázek 14. U kyseliny polymléčné naopak převažují fáze amorfní. Grafy z průběhu měření jsou součástí Přílohy číslo 6 a Přílohy číslo 7.



Obrázek 14 Krystalinita testovaných materiálů. Graf ukazuje prakticky stejnou hodnotu před i po ohřevu materiálu, tudíž lze usuzovat na nezměněné chování polymerů (BN bílý nosič, BF bílý filament, FN fialový nosič, FF fialový filament)

3.5 Povlákňení povrchu nosiče

Polovina testovaných nosičů byla povlákňena vrstvou z PCL. Důvodem pro tento krok byla snaha rozlišit, zda se buňky budou lépe přichycovat na samotnou konstrukci nosiče, nebo jim bude více vyhovovat členitost a plocha poskytnutá prostřednictvím vlákněné vrstvy.

3.5.1 Nanospider NS 1WS500U

Nanospider je patentované výrobní zařízení/technologie vyvinutá na Technické Univerzitě v Liberci ve spolupráci se společností Elmarco. [35] Princip zvlákňování spočívá ve tvorbě vláken v poli vysokého napětí. Základní procesní parametry stroje řady 500 jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3 Provozní parametry NS 1WS500U

Technické parametry	Hodnoty
Počet zvlákňovacích elektrod	1
Délka zvlákňovací elektrody [mm]	500
Šířka nanovlákněné vrstvy [mm]	300–500
Nastavitelná výška kolektoru [mm]	120–240
Rychlost odtahu podkladového materiálu [mm/min]	5–5000
Průtok vzduchu [m ³ /h]	30–250

3.5.2 Příprava zvlákňovacího roztoku

Pro povlákňení vzorků tenkou vlákněnou vrstvou bylo nejprve potřeba připravit zvlákňující roztok. Vzhledem k dobrým vlastnostem PCL při zvlákňování pomocí Nanospider byl vytvořen 16% w/w roztok PCL (M_w 45 000 g/mol, Polysciences) v rozpouštědlovém systému chloroform/kyselina octová/etanol v poměru 8/1/1 (všechny chemikálie od výrobce Penta). Celkem bylo vytvořeno 60 gramů zásobního roztoku. Takto připravený roztok byl po dobu 24 hodin míchán do úplného rozpuštění krystalků PCL a následně ihned zvlákňěn na povrch vytisknutých scaffoldů.

3.5.3 Reologické vlastnosti zvlákňovacího roztoku

Reologie je vědní obor zabývající se deformačními vztahy mechanik v prostředí kontinua, zejména vztahy závislých na účincích sil napětí a deformačních sil. V této práci byly reologické vlastnosti změřeny pomocí určení hodnot dynamické viskozity a povrchového napětí. Účel měření sloužil k ujištění, že výsledný roztok použitý k vytvoření nano a mikrovlákněné vrstvy na povrchu nosiče dosahuje běžných, a v laboratoři KNT známých a předpokládaných vlastností.

3.5.4 Metodika a výsledek měření

Měření dynamické viskozity byl provedeno za použití rotačního viskozimetru HAAKETM RotoViscoTM 1 (Thermo Fisher Scientific). Naměřené hodnoty byly získány při konstantní smykové rychlosti 1000 s⁻¹. Dávkovací objem polymeru pro vykonání jednoho měření byl 0,15 ml roztoku, měření bylo provedeno celkem 10x. Výsledky jsou zaznamenány formou průměru ± směrodatné odchylky.

Povrchové napětí bylo zaznamenáno pomocí přístroje PocketDyne (Krüss). Měření bylo provedeno 10x, stejně jako v případě měření viskozity. Výsledná data jsou uvedena ve formě průměr ± směrodatná odchylka. Výsledky naměřených hodnot viskozity i povrchového napětí jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4 Reologické vlastnosti zvlákňovacího roztoku PCL

Polymerní roztok	Viskozita [Pa.s]	Povrchové napětí [mN/m]
PCL	0,256 ± 0,015	152,60 ± 9,87

3.6 Příprava a výroba vlákněné PCL vrstvy

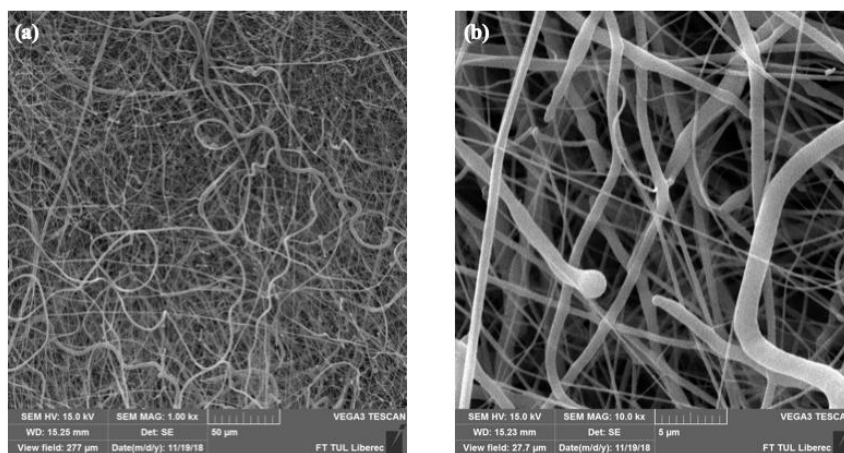
Vytisknuté vzorky byly pomocí oboustranné lepicí pásky připevněny na spunbond textilií a celý kus textilie s přilepenými vzorky byl pomocí sešívacích sponek připnut k zásobní spunbond vrstvě uvnitř Nanospider. Zvlákňování probíhalo ze zvlákňovací struny, která sloužila jako jedna ze dvou potřebných elektrod. Průměr struny je 0,6 mm. Roztok je umístěn v zásobníku, který přejíždí po délce struny a ze struny následně odlétají vzniklá nanovlákná a zachycují se na protilehlém podkladu. Tímto způsobem

bylo povlákňeno 47 kusů nosičů vyrobených z PCL a stejný počet nosičů z PLA. Zvlákňovací parametry jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5 Parametry při zvlákňování PCL roztoku na povrch scaffoldů

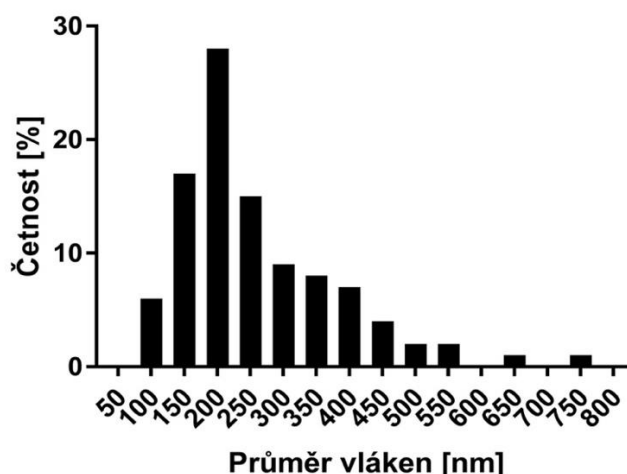
Zvlákňovací roztok	16% w/w PCL
Napětí na struně [kV]	10
Napětí na kolektoru [kV]	50
Vzdálenost elektrod [mm]	190
Odtah substrátu [mm/min]	20
Rychlost zásobníku [mm/s]	100
Teplota [°C]	22,8
Vlhkost [%]	46,6

Ze vzniklé vláknenné vrstvy byl odebrán kousek o velikosti 10 x 10 cm a vyrobená vrstva byla předložena k prohlédnutí a pořízení snímků (viz Obrázek 15 (a) a (b)) na skenovacím elektronovém mikroskopu TESCAN VEGA 3 SB Easy Probe. Pomocí programu ImageJ bylo z osmi pořízených snímků při zvětšení 10 kx bylo naměřeno 100 různých průměrů vláken. Následně byl vytvořen histogram distribuce vláknenných průměrů dané PCL vrstvy, viz Obrázek 16, a byla spočtena střední hodnota průměrů vláken a směrodatná odchylka, jak je uvedeno v Tabulce 6.



Obrázek 15 Snímek SEM vyrobené PCL vrstvy při zvětšení (a) 1 kx, (b) 10 kx

Histogram distribuce průměrů vláken PCL



Obrázek 16 Graf distribuce průměrů vláknenné PCL vrstvy

Tabulka 6 Průměrná šířka vláken vyrobené PCL vrstvy

Průměrná hodnota šířky vláken (nm)	261
Směrodatná odchylka	124

3.7 Buněčné testování *in vitro*

Buněčné testování *in vitro* se provádí pro ověření, zda jsou testované materiály a vybrané buňky schopny spolu koexistovat. Zjišťuje se, zda jsou buňky schopny na materiálu proliferovat, diferenciovat, růst a migrovat. V konečném důsledku lze zjistit i míru apoptózy. K ověření těchto skutečností se používá širokého spektra specializovaných testů. V rámci této práce bylo využito metabolického testu MTT, fluorescenční mikroskopie a elektronové skenovací mikroskopie. Pro potřeby buněčného testování byly vyrobeny následující scaffoldy:

- 3D tištěný buněčný nosič z PCL
- 3D tištěný buněčný nosič z PCL v kombinaci s nanovláknennou vrstvou PCL (PCL + nano)
- 3D tištěný buněčný nosič z PLA
- 3D tištěný buněčný nosič z PLA v kombinaci s nanovláknennou vrstvou PCL (PLA + nano)

3.8 Testovací metody

3.8.1 Fluorescenční mikroskopie

Základem fluorescenční mikroskopie je schopnost látek zvaných fluorofory absorbovat (excitační záření) světlo o určité vlnové délce a vyzařovat (emitační záření) světlo o jiné světelné délce. Díky schopnosti fluorescenčních mikroskopů zachycovat i velmi nízké koncentrace fluorescenčních barviv ve zkoumaných vzorcích se této metody využívá především v biologii a medicíně. Skupina fluorescenčních látek se naváže na pozorované buňky nebo jejich struktury, obarví je a buňky následně emitují světla o různých vlnových délkách. Ta se rozlišují pomocí optických filtrů mikroskopu. [36]

3.8.2 Elektronová mikroskopie

Elektronový mikroskop pro zobrazení pozorovaného vzorku využívá urychleného svazku elektronů ve vakuu, které jsou zrychleny přítomným elektromagnetickým polem. Oproti světelným mikroskopům mají elektronové mikroskopy násobně vyšší zobrazovací schopnost a jsou schopny zobrazit částice o velikosti stovek nanometrů (optické mikroskopy desítky mikrometrů, tzn. 1000x menší schopnost zobrazení). Díky schopnosti zvětšit pozorovaný předmět až 1 000 000x je stejně jako metoda fluorescence elektronová mikroskopie často využívána v přírodních vědách a medicíně. V rámci el. mikroskopie rozlišujeme dva typy mikroskopů, TEM – transmisní elektronové mikroskopy vhodné pro analýzu vnitřní struktury a SEM – skenovací elektronové mikroskopy, které jsou vhodnější pro analýzu povrchu zkoumaného vzorku. [37] Pro získání snímků byl použit skenovací elektronový mikroskop TESCAN VEGA 3 SB Easy Probe.

3.8.3 Test metabolické buněčné aktivity

MTT test je způsob měření viability testovaných buněk a je založen na redukci žlutého MTT barviva (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu) (MTT) na nerozpustný fialový formazan. Redukce probíhá za pomoci mitochondriálních enzymů živých buněk. Stopy formazanu je poté možno vyhodnotit pomocí spektrofotometrie, [38] kdy měření probíhá při vlnových délkách 570 nm a 640 nm. Výsledkem je absorbance, která je vypočtena jako rozdíl měření jednotlivých vlnových

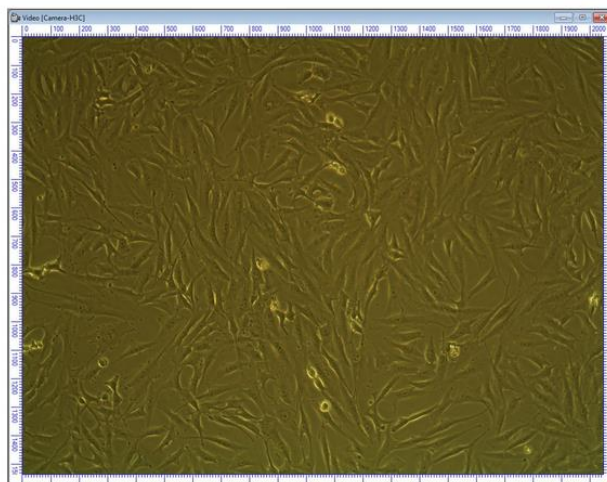
délek. Čím vyšší je míra absorpance, tím více živých buněk se v roztoku nacházelo. Měření proběhlo v prostorách laboratoře KNT na přístroji TECAN Spark® 10M.

3.9 Biologické testování buněčných nosičů

Po návrhu a úspěšném vytisknutí jednotlivých vzorků buněčných nosičů a po jejich povlákání a sterilizaci, splňovaly scaffoldy parametry pro to, aby mohly být podrobeny biologickému testování *in vitro*. Níže specifikované biologické testy jsou prováděny proto, aby se ověřila schopnost usadit se, růst, migrovat, diferenciovat se a proliferovat u lidských osteocytárních rakovinných buněk linie MG-63, a to na samotných nosičích nebo nosičích s povlákneou jednou plochou. Případně aby se ukázalo, že daný materiál pro buňky není vhodným substrátem a jejich viabilitu v čase snižuje. Testování probíhalo 1., 3., 7. a 14. den po osazení nosičů buňkami.

3.9.1 Příprava a kultivace buněčné kultury

Zmražené buňky MG-63 [39] byly temperovány ve vodní lázni o teplotě 37 °C a následně kultivovány v Minimum Essential Eagle Medium (MEM, Biosera) s přidavkem 10 % fetálního bovinního séra (FBS, Biosera) a 1 % antibiotik. Buněčná směs byla v kultivační lahvičce o objemu dna 75 cm² umístěna do inkubátoru se stálou teplotou 37 °C a 5% obsahem CO₂. Buňkám v inkubátoru bylo až do doby jejich nasazení na vzorky dle potřeby měněno médium MEM a v případě potřeby byly pasážovány. Testované buněčné nosiče byly osazeny buňkami 14. pasáže, viz Obrázek 17. Pasážování je kultivační proces, při kterém se buňky přemístí do čerstvého živného média. Díky tomu lze udržovat buněčnou koncentraci v roztoku v přijatelné míře. Před nasazením buněk na nosiče bylo z kultivační destičky odsáto médium a buňky byly opatrně opláchnuty sterilním PBS (fosfátový pufr, pH 7,4). Pro oddělení buněk ze dna kultivační destičky bylo použito 2 až 3 ml enzymu trypsinu. Následně byly buňky resuspendovány do nového živného média. Pomocí přístroje Logos Biosystems LUNA™ byl změřen počet buněk. Do jedné jamky kultivační destičky se ve výsledku nasazovaly buňky o průměrné koncentraci 2 x 10⁴.

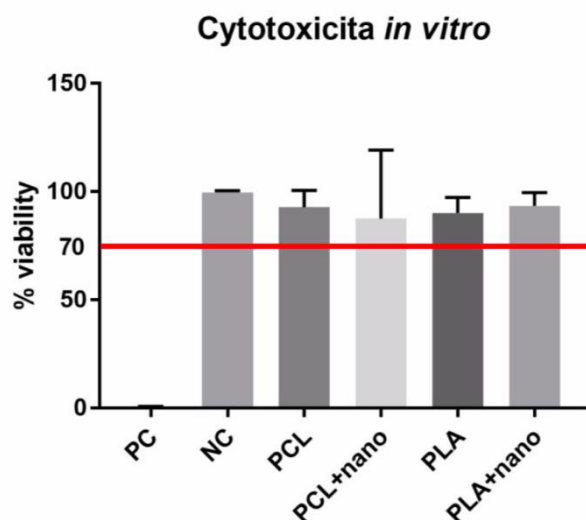


Obrázek 17 Buňky MG-63 14. pasáže těsně před výměnou média a nasazením na povrch buněčných nosičů (zvětšeno 100x)

3.9.2 Test na cytotoxicitu extraktů

Vzorky byly otestovány pomocí cytotoxicity extraktů *in vitro* dle normy ČSN EN ISO 10993-5: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu.

Extrakty byly připraveny inkubací 3D vytištěných scaffoldů (o velikosti dna 12jamkové destičky) v plném médiu po dobu 24 hodin. Tyto extrakty byly následně přidány ke konfluentní vrstvě MG-63 lidských osteoblastů (14. pasáž) v 96jamkové destičce (nasazené 1 den předtím v koncentraci 10^4 buněk na jamku). Jako kontroly byly použity: (1) negativní kontrola (NC) – médium ve stejném objemu jako testované extrakty inkubované rovněž 24 h (200 μ l), (2) pozitivní kontrola (PC) – médium s obsahem cytotoxického Tritonu X-100. Po 24 hodinách inkubace byl proveden standardní MTT test (mikroskopická kontrola buněk, inkubace buněk s 50 μ l MTT, 4 hodiny, 37 °C, rozpuštění krystalů formazanu v 1 ml okyseleného isopropanolu, měření absorbance při 570 nm, 650 nm). Výsledky byly přepočítány proti hodnotě viability kontrolních buněk ve 200 μ l média (100% viabilita). Na Obrázku 18 lze vidět výsledný graf, ze kterého je zjevné, že nedošlo ke změně metabolické aktivity buněk do kladných ani záporných hodnot. Mírné odchylky mohou být způsobeny metodikou (odsátí části konfluentní vrstvy během manipulace apod.). Předpokládalo se, že případné degradační produkty nebo látky, které by se mohly uvolňovat v průběhu experimentu, by mohly ovlivnit buněčnou viabilita. Tento předpoklad nebyl testem prokázán.



Obrázek 18 Výsledky testu metabolické aktivity MG-63 buněk po 24 h inkubaci s extrakty scaffoldů. V grafu je pozitivní kontrola označena jako PC; negativní kontrola jako NC

3.9.3 Nasazení buněk

Před samotným nasazením buněk bylo potřeba všechny scaffoldy vysterilizovat. Sterilizace probíhala pomocí etylenoxidu po dobu 12 hodin a následně týden probíhalo větrání vysterilizovaných vzorků. Takto ošetřené vzorky byly plně připraveny na osazení buňkami a celý proces biologického testování. Vzorky byly umístěny do 12jamkové kultivační destičky a zality 2 ml média s buňkami o koncentraci 2×10^4 . V případě vzorků, které byly z jedné strany povlákány, byly buňky vloženy na tuto povlákávanou stranu. Příloha číslo 1 zobrazuje progresi růstu buněk na jednotlivých nosičích, které byly testovány v průběhu dvoutýdenního cyklu.

3.9.4 Příprava vzorků pro fluorescenční mikroskopii

Vzorky z daného testovacího dne byly 2x opláchnuty v PBS a zafixovány pomocí 2,5% roztoku glutaraldehydu v PBS po dobu 10 minut. Následně byly vzorky opět opláchnuty v PBS a permeabilizovány v objemu 1000 μ l na jamku 0,1% roztokem Tritonu X-100 v PBS + 0,1% roztokem bovinního sérového albuminu po dobu 5 minut. Vzorky byly opět opláchnuty v PBS a bylo přidáno 1000 μ l na jamku roztoku phalloidin-fluorescein izokyanátu, ředěného 1 : 1000. Vzhledem k citlivosti fluorescenčního barviva na světlo byla kultivační destička po dobu louhování (30 minut) zabalena do alobalu. Vzorky byly následně znovu 2x opláchnuty v PBS a barveny roztokem DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol), ředění 1 : 1000, v objemu 1000 μ l na jamku po dobu

5 minut. Destička byla opět obalena alobalem. Po uplynutí 5 minut byly vzorky 2x propláchnuty v PBS a nakonec v PBS uchovány až do snímání na fluorescenčním mikroskopu Nikon.

3.9.5 Příprava vzorků pro SEM

Vzorky z daného testovacího dne byly 2x opláchnuty v PBS a zafixovány pomocí roztoku 2,5% glutaraldehydu v PBS po dobu 10 minut. Poté se začaly vzorky vysoušet tzv. etanolovou řadou. Etanolová řada je sada roztoků etanolu o koncentracích 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % a 100 %. Postup přípravy vzorků pro snímání na elektronovém skenovacím mikroskopu je následující: vzorek je zalit množstvím etanolu příslušné koncentrace (začíná se od nejnižší) a ponechán v jamce se vzorkem po dobu 10 minut. Následně je etanol odsát a nahrazen více koncentrovaným. Po odvodnění se vzorky nechají vyschnout na parafilmu (pro urychlení schnutí je možno vložit vzorky do exikátoru). Po vyschnutí byly vzorky nalepeny pomocí lepicí pásky na terčík a pozlaceny. Takto připravené vzorky je možné snímat pomocí elektronového skenovacího mikroskopu. Použitým mikroskopem byl TESCAN VEGA 3 SB Easy Probe.

3.9.6 Příprava vzorků pro MTT test

Sada vzorků příslušného testovacího dne se přesunula do nových kultivačních destiček a zalila se 1 ml směsí roztoku média a MTT v poměru 3 : 1, vzorky se následně inkubovaly po dobu 4 hodin při teplotě 37 °C a obsahu atmosféry 5 % CO₂. Dalším krokem bylo odsátí roztoku a přidání 1 ml okyseleného isopropanolu (IPA) ke každému vzorku. Jamka byla následně důkladně rozpipetována, aby se uvolnily vzniklé formazanové krystalky. Do 96jamkové kultivační destičky bylo přidáno 200 µl od každého vzorku, a takto připravená destička byla vložena do snímacího přístroje TECAN Spark[®] 10M. Výsledná viabilita buněk byla zobrazena na obrázku číslo 19.

3.10 Hodnocení adheze a proliferace osteoblastů na 3D vytištěné scaffoldy

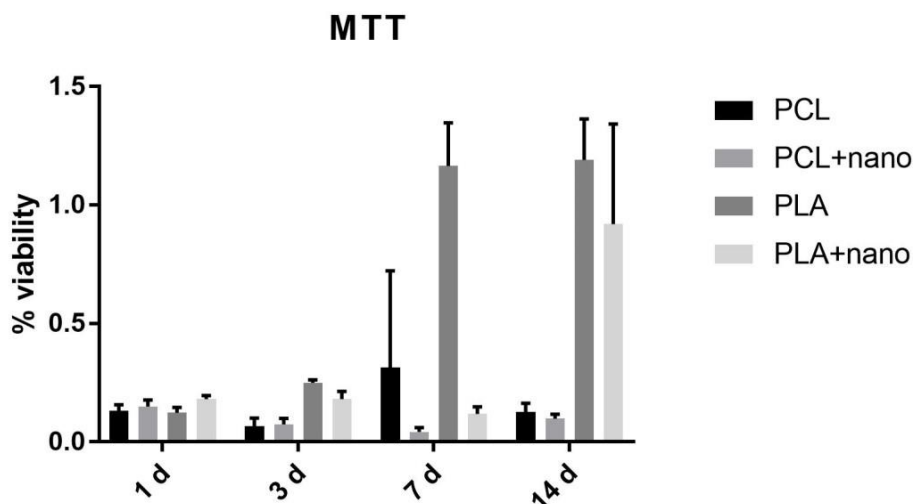
Materiály popsané výše byly osazeny lidskými kostními osteoblasty (14. pasáž) a hodnotila se interakce s buňkami po 1 dni, 3 dnech, 7 dnech a 14 dnech kultivace. Materiály byly vysterilizovány v etylenoxidu (Anprolene, 12 h) a vsazeny na dno 12jamkové destičky. Po týdenním odvětrávání při laboratorní teplotě byly materiály

zatíženy sterilními skleněnými kroužky a osazeny buňkami. Na materiály, které byly převlákněny vrstvou nanovláken, byly buňky nasazeny na stranu s nanovláknem.

Buněčné interakce byly testovány metodami MTT testu; vizualizace buněk byla provedena pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Metabolická aktivita buněk na vláknenných materiálech byla hodnocena pomocí MTT testu po 1 dni, 3 dnech, 7 dnech a 14 dnech kultivace (viz Obrázek 19).

3.10.1 MTT test

První testovací dny (první a třetí den) zůstala viabilita u všech materiálů na nízkých hodnotách. Změny nastaly až při sedmém testovacím dnu, kdy byla naměřena nejvyšší hodnota absorbance odpovídající buněčné viabilitě na nosiči z PLA. Na PLA scaffoldu byla nejvyšší hodnota absorbance naměřena rovněž 14. den testování. Po dvoutýdenní inkubaci byla rovněž naměřena výrazně zvýšená viabilita na materiálu PLA, který byl obohacený o nanovláknem.



Obrázek 19 Metabolická aktivita buněk nasazených na povrch 3D vytištěných materiálů po 1., 3., 7. a 14. dnu kultivace s MG-63.

3.10.2 Fluorescenční mikroskopie a počet buněk

Materiály, a zejména potom materiál PLA, se ukázaly jako nevhodné pro hodnocení dvojím barvením phalloidinem + FITC, který se váže na aktinová vlákna cytoskeletu a DAPI zvyrazňující buněčná jádra. Filament PLA, který byl použit pro

3D tisk, je barevný a znemožňuje provést tuto charakterizaci. Surový filament nejspíš obsahuje fluorescenční látky nebo místa, kam se takové látky vážou. Na fluorescenčním mikroskopu tak nebylo možné odlišit buňky od materiálu, a tedy ani určit počet buněk. Snímky zobrazující buňkami porostlé nosiče z PCL jsou k dispozici v Příloze číslo 2.

3.10.3 Skenovací elektronová mikroskopie

Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie jsou součástí příloh číslo 3 a 4. Příloha číslo 3 zobrazuje snímky nosičů vyrobených z PCL v průběhu jednotlivých testovacích dnů, Příloha 4 následně obsahuje snímky nosičů vyrobených z PLA. V důsledku nízkého počtu přeživších buněk, ukazují snímky spíše samotný nosič, případně vláknennou vrstvu vyrobenou pomocí zařízení Nanospider. Očekávalo se však, že snímky budou ukazovat rozmnožené a prosperující buňky.

4 Závěr

Buněčné nosiče se podařilo navrhnout a na 3D tiskárně vytisknout v takové kvalitě, aby byly soudržné, pevné, měly co nejvíce podobnou kvalitu a vydržely manipulaci a zatížení, kterému byly v rámci biologického testování vystaveny.

Primárně testovaným materiálem pro budoucí možné aplikace tohoto typu tištěného nosiče v rámci tkáňového inženýrství byl vybrán, i na základě aktuálního trendu a počtu nových studií a prací, polykaprolakton, jehož polymerní vlastnosti jsou pro tělní scaffoldy excelentní z pohledu stability, (ne)toxicity a biodegradability. Velkou neznámou ovšem byla vhodnost materiálu v rámci tisknutí na 3D tiskárně. Opačně, kyselina polyléčná je známa svými výbornými vlastnostmi vhodnými pro tisk. Tento materiál je pro tkáňové inženýrství neméně užitečný a často používaný, i když z trochu jiného důvodu. Stabilita PLA v těle je oproti PCL násobně větší, degraduje pomaleji a je také mechanicky odolnější.

V rámci vývoje a práce s tiskárnou, potažmo i v reálném prostředí při implantacích do těl pacientů je potřeba brát ohled i na finanční stránku, kdy je nutné co nejvíce minimalizovat náklady. Oba materiály jsou zajímavé už jen proto, že je jejich cena nízká (sto až tisícikoruny za cívku filamentu o hmotnosti zhruba 750 gramů). Stejně jako jsou tyto materiály levné, i metoda FDM/FFM je jednou z nejlevnějších metod výroby 3D tištěných produktů. V kombinaci finančně-medicínského aspektu tak bylo vyvinuto scaffoldů, jež jsou extrémně levné na vývoj i samotnou výrobu a v rámci budoucí optimalizace mohou skýtat zajímavý projektový potenciál.

Měřením krystalinity obou materiálů pomocí diferenční skenovací kalorimetrie bylo dokázáno, že materiály byly pro daný způsob přípravy scaffoldů vhodné. Respektive materiálové vlastnosti po teplotním přechodu zůstaly, stejně jako procentuální krystalická fáze, téměř totožné. Vhodnost materiálů z hlediska cytotoxicity vůči testovaným buňkám následně potvrdil i test na cytotoxicitu extraktů.

Testování na cytotoxicitu extraktů *in vitro* bylo provedeno dle normy ČSN EN ISO 10993-5. Míra viability neklesla pod 70 % na žádném z testovaných materiálů; materiály proto lze považovat za cytokompatibilní. Dále byla hodnocena interakce nosičů s nasazenými buňkami. Nejvyšší viabilita byla naměřena na materiálu PLA po týdenní

a dvoutýdenní inkubaci s lidskými osteoblasty linie MG-63; byly tak prokázány vhodné vlastnosti 3D vytištěného scaffoldu PLA metodou FDM pro adhezi a proliferaci osteoblastů.

5 Diskuze

Z pohledu kvality tisku a výsledného nosiče je PLA násobně lepším materiálem. Nastavení teplot potřebných k tisku je snadné a teplotní meze lehce dohledatelné, nebo experimentálně dosažitelné, jelikož PLA je levným a velice často používaným materiálem pro 3D tisk. Naopak zkušenosti s tiskem PCL jsou nedostatečné a v rámci vývoje a tisku se špatné materiálové vlastnosti skutečně projevily. Samotný materiál dosahuje vysokého indexu toku, při tisku tavenina nedrží tvar a tisk je proto obtížný a zdlouhavý, s vysokou mírou kazivosti.

Z pohledu plynulosti tisku lze taktéž přisoudit lepší vlastnosti kyselině polymléčná. Vzorky z tohoto materiálu bylo možné tisknout v objemu 25 kusů najednou, a proto lze tento materiál považovat za vhodný pro tisk. Naopak PCL výtisky bylo možné realizovat pouze v omezeném objemu 4 až 6 kusů současně. V opačném případě docházelo k vysoké kazivosti všech tisknutých vzorků. Důvodem pro velké množství zmetků při tisku z PCL je fakt, že materiál je už ve formě filamentu dost poddajný a měkký, což se v případě zahřátí filamentu a tisknutí pomocí trysky přenáší do podoby nestabilních výtisků. Tavenina na trysce hlavy často ulpívá a tisk není čistý, jelikož jemná vlákna jakožto nepřesné výtisky ulpívají jak na trysce, tak se díky trakci a pohybu hlavy zachytávají na výtiscích i na samotné tisknoucí podložce. I přes toto chování lze s PCL tisknout v dostatečné kvalitě. Oproti PLA je však proces tisku pomalejší a delší, změněny musí být i některé parametry tisku.

Po zkušenosti s tiskem daných nosičů a znalostí dané tiskárny bylo navrženo zaměnit trysku o průměru 0,4 mm za trysku s průměrem 0,2 mm.

Výroba vlákenné vrstvy na zařízení Nanospider proběhla bez sebemenších potíží, protože PCL se jako zvlákňovací roztok používá často a zvlákňovací parametry jsou dobře známé.

Kamenem úrazu bylo biologické testování, které se vlivem opakování prodloužilo. V prvotní fázi došlo k ne zcela správnému sestavení biologického experimentu a k podcenění sterility a hydrofobity materiálu. Dále došlo k nedostatku potřebného vybavení a experiment byl ukončen bez výsledku, protože buňky na PCL scaffoldech nerostly. V původním testování bylo použito i hydrogelu, který měl suplovat

prostředí ECM a poskytovat buňkám prostor pro růst a pohyb. Nicméně se tato cesta ukázala jako nevhodná, protože hydrogelové nosiče měly jednu z nejnižších hodnot viability buněk vůbec. Zda to bylo způsobeno obecně špatně nastavenými experimentálními podmínkami či nevhodným hydrogelem by vyžadovalo dodatečného testování.

Druhý experiment byl naplánován důkladněji a jeho vykonání proběhlo úspěšně. V rámci experimentu došlo ke zjištění, že ačkoliv byla na základě studií očekávána buněčná prosperita na nosičích z PCL, [40] byla to právě kyselina polymléčná, která na konci 14denního cyklu poskytla buňkám nejvhodnější prostředí pro jejich rozmnožení a růst. Před samotným experimentem byl proveden test cytotoxicity obou materiálů. Důvodem byl právě neúspěch prvotního testu. PCL filament byl bezbarvý a cytotoxický test prokázal vhodnost pro buněčné testování. Filament z PLA byl fialový a při testu panovaly obavy, že právě použité barvivo by pro buňky mohlo být toxické, nicméně i tento materiál se projevil jako vhodný k testování.

Příprava a testování proběhlo dobře, ale vyskytly se dvě potíže. Filament, ze kterého byl PLA nosič vyroben není vhodný pro testování na počet buněk pomocí fluorescenční mikroskopie. V průběhu barvení došlo k navázání fluoresceinu na chemickou strukturu materiálu, což znemožnilo vizualizaci samotných buněk v důsledku fluorescence celého materiálu. Tj. důvod, proč jsou v Příloze číslo 2 demonstrovány fluorescenční snímky pouze z nosičů vyrobených z PCL. Druhým problémem je nezjištěná neschopnost nosičů PCL vytvořit pro buňky prostředí k jejich růstu a rozmnožování. Cytotoxický test prokázal, že materiál vhodný je. Kontaminace v průběhu testování byla vyloučena skrze pozitivní a negativní kontroly prováděné v rámci každého testovacího dne.

Osobně se domnívám, že na vině byl proces sterilizace, který pozměnil chemické vazby polykaprolaktonu takovým způsobem, v jehož důsledku došlo k vychýlení buněčné afinity. [41] K podobným závěrům ve své práci došel i slovinský tým vědců. [29] První test selhal kvůli nesmáčivosti PCL a jeho vlákněné vrstvy, tentokrát pravděpodobně došlo k zásadním strukturním změnám chemických vazeb a buňky tak na povrchu nosiče neprosperovaly.

Zásadním pro úspěšné buněčné testování nosičů z PCL tak v budoucnu bude najít optimální sterilizační proces, který buď strukturální vazby nenaruší, nebo je případně naruší jiným způsobem, než jakým k tomu došlo v rámci tohoto testování po aplikaci etylenoxidu.

Výsledky ohledně nosičů z kyseliny polymléčné jsou pozitivní, buňky na povrchu prosperovaly a do budoucna je pro případné demonstrace v podobě snímků potřeba dbát na vhodné obarvení, eventuálně zvolit filament bezbarvý.

Seznam zdrojů

[1] PELCL, M. Kombinace 3D tisku a nanovláken pro tkáňové inženýrství kloubní chrupavky. Liberec, 2015. Diplomová práce. Technická Univerzita v Liberci.

[2] GENG, L., Y. S. WONG, D. W. HUTMACHER, W. FENG, H. T. LOHA a J. Y. H. FUHA. Rapid Prototyping of 3D Scaffolds for Tissue Engineering Using a Four-Axis Multiple-Dispenser Robotic System [online]. **2003**, 423–432 [cit. 2018-12-03].

Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/beef/5d8078bbc3db9199266a7482cf23e5d6f832.pdf>

[3] BHARDWAJ, N. a S. C. KUNDU. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. Biotechnology Advances [online]. **2010**, 325–347 [cit.2018-12-03]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004. ISSN 0734-9750.

Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975010000066>

[4] Schéma principu elektrostatického zvlákňování. Nanopharma [online]. [cit. 2018-12-03]. Dostupné z: <http://www.nanopharma.cz/cs/produkty-a-technologie/technologie>

[5] FERGAL, J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Materialstoday [online]. **2011**, 88–95 [cit. 2018-12-03]. DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.

Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136970211170058X>

[6] ROSETI, L.; et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. Materials Science and Engineering: C [online]. 09/2017, **2017**, 1246–1262 [cit. 2018-12-03]. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.017.

Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493117317228?via%3Dihub>

[7] SARIN, S. a A. REKHI. Bioactive glass: A potential next generation biomaterial. SRM Journal of Research in Dental Sciences [online]. **2016**, 27–32 [cit. 2018-12-03].

DOI: 10.4103/0976 433X.176482. Dostupné z: <http://www.srmjrds.in/article.asp?issn=0976-433X;year=2016;volume=7;issue=1;spage=27;epage=32;aulast=Sarin>

- [8] PELTOLA, M., J. SUONPÄÄ, K. AITASALO, A. YLI-URPO, Ö. ANDERSSON a P. LAIPPALA. Experimental In Vitro Study of the Dissolution of Bioactive Glass (S53p4) In Amounts Used In The Obliteration The Larger Bone Cavities. OHGUSHI, H., T. YOSHIKAWA a G.V. HASTINGS. Bioceramics [online]. 1999. s. 41–44 [cit. 2018-12-03]. ISBN 978-981-4579-11-7.
Dostupné z: https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/9789814291064_0010
- [9] YUSOP, A. H., A. A. BAKIR, N. A. SHAHAROM, M. R. ABDUL KADIR a H. HERMAWAN. Porous Biodegradable Metals for Hard Tissue Scaffolds: A Review. International Journal of Biomaterials [online]. 2012 [cit. 2018-12-03].
DOI: 10.1155/2012/641430.
Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/ijbm/2012/641430/>
- [10] Magnesium. ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY [online]. [cit. 2018-12-03].
Dostupné z: <http://www.rsc.org/periodic-table/element/12/magnesium>
- [11] ZHUANG, H., A. FENG a Y. HAN. Preparation, mechanical properties and in vitro biodegradation of porous magnesium scaffolds. Materials Science and Engineering: C [online]. 2008, 1462–1466 [cit. 2018-12-03]. DOI: 10.1016/j.msec.2008.04.001. ISSN 0928-4931.
Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493108000726>
- [12] WITTE, F., V. KAESE, H. HAFERKAMP, A. MEYER-LINDENBERG, C. J. WIRTH a H. WINDHAGEN. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. Biomaterials [online]. 2005, 3557–3563 [cit. 2018-12-03]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.09.049. ISSN 0142-9612.
Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961204008762>
- [13] DUCHÁČEK, V. Polymery – výroba, vlastnosti, zpracování, použití. 2. vydání. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2006, s. 26. ISBN 80-7080-617-6.
- [14] AVÉROUS, L a E POLLET. Environmental Silicate Nano-Biocomposite. Londýn: Springer, 2012, s. 13–39. ISBN 978-1-4471-4108-2.

- [15] Polycaprolactone. Sigma-Aldrich [online]. [cit. 2018-12-03].
Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440744?lang=en&ion=CZ>
- [16] SUPRAKAS, S. R. a M. BOUSMINA. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. Progress in Materials Science [online]. **2005**, 962–1079 [cit. 2018-12-03].
DOI: 10.1016/j.pmatsci.2005.05.002. ISSN 0079-6425.
Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079642505000320>
- [17] WOODRUFF, M. A. a D. W. HUTCHMAKER. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. Progress in Polymer Science [online]. **2010**, 1217–1256 [cit. 2018-12-03]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002. ISSN 0079-6700.
Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670010000419>
- [18] Kyselina polymléčná. Chempoint [online]. [cit. 2018-12-03].
Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/kyselina-polymlecna-nejen-jako-biodegradabilni-polymer>
- [19] LOPES, M. Savioli, A. L. JARDINI a R. Maciel FILHO. Poly (Lactic Acid) Production for Tissue Engineering Applications. *Procedia Engineering* [online]. 2012, **2012**, 1402–1413 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1016/j.proeng.2012.07.534. ISSN 1877-7058.
Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877705812029414>
- [20] FARAH, Shady, Daniel G. ANDERSON a Robert LANGER. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2016, **2016**, 367-392 [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1016/j.addr.2016.06.012. ISSN 0169–409X.
Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X16302058?via%3Dihub>

[21] FRANTZ, Christian, Kathleen M. STEWART a Valerie M. WEAVER. The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science* [online]. **2010**, 4195–4200 [cit. 2018-12-03]. DOI: 10.1242/jcs.023820.

Dostupné z: <http://jcs.biologists.org/content/123/24/4195>

[22] RYSOVÁ, M. Příprava podpurných tkáňových struktur z funkcionalizovaných biopolymerů. Liberec, 2012. Diplomová práce. Technická Univerzita v Liberci.

[23] DANILOVÁ, I. Vývoj a testování scaffoldů pro kolenní chrupavkové implantáty. Liberec, 2013. Diplomová práce. Technická Univerzita v Liberci.

[24] PACHENCE, J. M., M. P. BOHRER a J. KOHN. *Biodegradable Polymers*. LANZA, Robert, Joseph VACANTI a Robert LANGER. *Principles of Tissue Engineering*. 2. vydání. USA: Academic Press, 2000, s. 263–277. ISBN 9780080539676.

[25] ROOHANI-ESFAHANI, S. I., P. NEWMAN a H. ZREIQAT. Design and Fabrication of 3D printed Scaffolds with a Mechanical Strength Comparable to Cortical Bone to Repair Large Bone Defects. *Science Reports* [online]. **2016** [cit. 2018-12-03]. DOI: 10.1038/srep19468. ISSN 2045-2322.

Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/srep19468>

[26] SOUSA, I., A. MENDES a P. J. BÁRTOLO. PCL Scaffolds with Collagen Bioactivator for Applications in Tissue Engineering. *Procedia Engineering* [online]. **2013**, 279–284 [cit. 2018-12-03]. DOI: 10.1016/j.proeng.2013.05.122. ISSN 1877-7058.

Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877705813010369>

[27] ISHAUG-RILEY, S. L., L. E. OKUN, G. PRADO, M. A. APPLGATE a A. RATCLIFFE. Human articular chondrocyte adhesion and proliferation on synthetic biodegradable polymer films. *Biomaterials* [online]. **1999**, 2245–2256 [cit. 2018-12-03]. DOI: 10.1016/S0142-9612(99)00155-6. ISSN 0142-9612.

Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961299001556>

- [28] YILDIRIM-AYAN, E., V. N. VASILETS, H. AYAN a A. FRIDMAN. Effect of Dielectric Barrier Discharge Plasma on the Attachment and Proliferation of Osteoblasts Cultured over Poly(ϵ -caprolactone) Scaffolds. *Plasma Processes and Polymers* [online]. **2008**, 58–66 [cit. 2018-12-03]. DOI: 10.1002/ppap.200800047. ISSN 1612-8869.
Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/229867105_Effect_of_Dielectric_Barrier_Discharge_Plasma_on_the_Attachment_and_Proliferation_of_Osteoblasts_Cultured_over_Poly-epsilon-caprolactone_Scaffolds
- [29] RECEK, N., et al. Cell Adhesion on Polycaprolactone Modified by Plasma Treatment. *International Journal of Polymer Science* [online]. **2016** [cit. 2018-12-03]. DOI: 10.1155/2016/7354396. ISSN 1687–9422.
Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/301343055_Cell_Adhesion_on_Polycaprolactone_Modified_by_Plasma_Treatment
- [30] ZHANG, Q.C., Li PENG, Yang XIAOHU a Huang GUOYOU. Bio-Inspired Engineering of Honeycomb Structure – Using Nature to Inspire Human Innovation. *Progress in Materials Science* [online]. **2015**, 332–400 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2015.05.001. ISSN 0079-6425.
Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/280239925_BioInspired_Engineering_of_Honeycomb_StructureUsing_Nature_to_Inspire_Human_Innovation
- [31] 3D PRINTING. *Obsessively Geek* [online]. [cit. 2019-03-27].
Dostupné z: <http://www.og3dprinting.com/3d-printing/>
- [32] Tiskárna RebeliX. *RebeliX –3D tiskárna* [online]. [cit. 2019-03-27].
Dostupné z: http://reprap4u.cz/wp-content/gallery/rebelix_1/3d_tiskarna_rebelix_30.jpg
- [33] FACILAN™ PCL 100. *3d4makers* [online]. [cit. 2019-03-27].
Dostupné z: <https://www.3d4makers.com/products/facilan-pcl-100-filament?variant=9645064716335>
- [34] WISTERIA 1,75 MM SMARTFIL. *Materialpro3d* [online]. [cit. 2019-03-27].
Dostupné z: <https://www.materialpro3d.cz/pla-1-75/pla-filament-fialovy-wisteria-1-75-mm-smartfil-330g/>

- [35] Zvlákňovací zařízení. *Elmarco* | *Nanospider™ equipment* [online]. [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <http://www.elmarco.cz/produkty/ns-produkcní-linka-500/>
- [36] Fluorescence. *Mikroskop – Mikroskopy* [online]. [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <https://www.mikroskop-mikroskopy.cz/fluorescence/>
- [37] Elektronová mikroskopie. *Univerzita Palackého v Olomouci* [online]. [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: http://jointlab.upol.cz/~soubusta/OSYS/El_mikr/El_mikr.html
- [38] MTT test – Laboratoř experimentální medicíny. *Laboratoř experimentální medicíny* [online]. [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test.htm>
- [39] MG-63 ATCC. *ATCC: The Global Bioresource Center* [online]. [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1427>
- [40] MAREI, N. H., I. M. EL-SHERBINY, A. LOTFY, A. EL-BADAWY a N. EL-BADRI. Mesenchymal stem cells growth and proliferation enhancement using PLA vs PCL based nanofibrous scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **2016**(93), 9-19 [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.08.053. ISSN 0141-8130. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813016312892?via%3Dihub>
- [41] GHOBEIRA, Rouba, Charlot PHILLIPS, Heidi DECLERCQ, Pieter COOLS, Nathalie DE GEYTER, Ria CORNELISSEN a Rino MORENT. Effects of different sterilization methods on the physico-chemical and bioresponsive properties of plasma-treated polycaprolactone films. *Biomedical Materials* [online]. **2017**(12) [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1088/1748-605X/aa51d5. Dostupné z: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-605X/aa51d5/meta>

Seznam obrázků

Obrázek 1 Technologický postup pro výrobu buněčného nosiče pomocí metod Rapid Prototyping.....	12
Obrázek 2 Schéma zvlákňovacího zařízení pro elektrostatické zvlákňování	13
Obrázek 3 Formování kostních buněk na skleněném nosiči.....	15
Obrázek 4 Na příkladu jsou znázorněny monomerní jednotky tří chemických látek (akrylonitril, butadien a styren) včetně jejich polymerních řetězců	16
Obrázek 5 Rozdělení biopolymerů na základě výchozích surovin.....	17
Obrázek 6 Strukturní vzorec poly(ϵ -kaprolaktonu)	17
Obrázek 7 Strukturní vzorec kyseliny polymléčná.....	18
Obrázek 8 Vlastnosti scaffoldu, kterých by daný nosič měl dosahovat.	20
Obrázek 9 Porovnání mechanické odolnosti při podélném a příčném zatížení.....	22
Obrázek 10 Inkubační doba buněk při porovnání plasmaticky ošetřených a neošetřených PCL vzorků.....	23
Obrázek 11 Elektronová spektroskopie zachycující změnu vazebných energií	24
Obrázek 12 Schématický popis principu technologie FFM/FDM.....	26
Obrázek 13 3D tiskárna RebeliX.....	26
Obrázek 14 Krystalinita testovaných materiálů.....	29
Obrázek 15 Snímek SEM vyrobené PCL vrstvy při zvětšení (a) 1 kx, (b) 10 kx.....	32
Obrázek 16 Graf distribuce průměrů vlákně PCL vrstvy	33
Obrázek 17 Buňky MG-63 14. pasáže.....	36
Obrázek 18 Výsledky testu metabolické aktivity MG-63 buněk.....	37
Obrázek 19 Metabolická aktivita buněk nasazených na povrch 3D vytištěných materiálů po 1., 3., 7. a 14. dnu kultivace s MG-63.....	39

Seznam tabulek

Tabulka 1 Parametry tisku buněčného nosiče.....	27
Tabulka 2 Procesní parametry materiálu	28
Tabulka 3 Provozní parametry NS 1WS500U.....	30
Tabulka 4 Reologické vlastnosti zvláknovacího roztoku PCL.....	31
Tabulka 5 Parametry při zvláknování PCL roztoku na povrch scaffoldů.....	32
Tabulka 6 Průměrná šířka vláken vyrobené PCL vrstvy	33

Seznam příloh

Příloha číslo 1 – snímky buněčných nosičů v průběhu testování

Příloha číslo 2 – snímky fluorescenční mikroskopie

Příloha číslo 3 – snímky PCL nosičů ze skenovacího elektronového mikroskopu

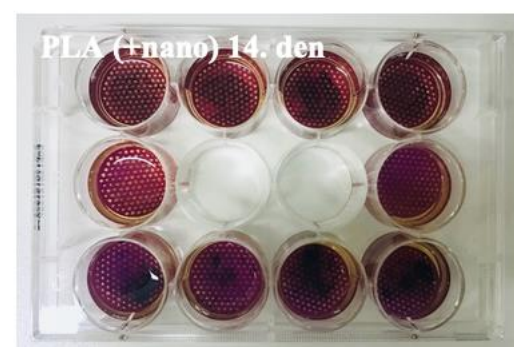
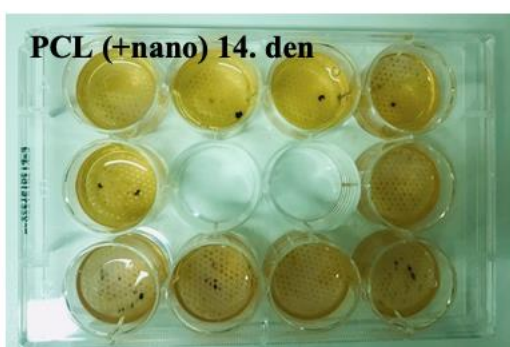
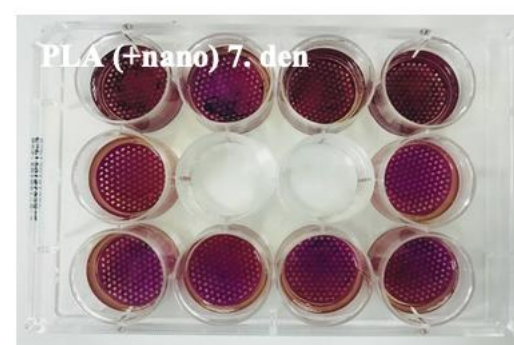
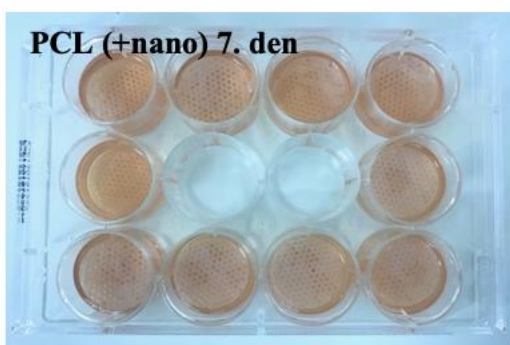
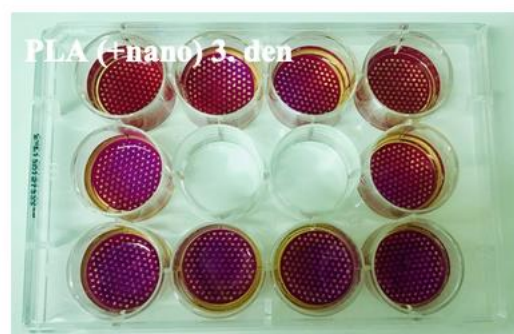
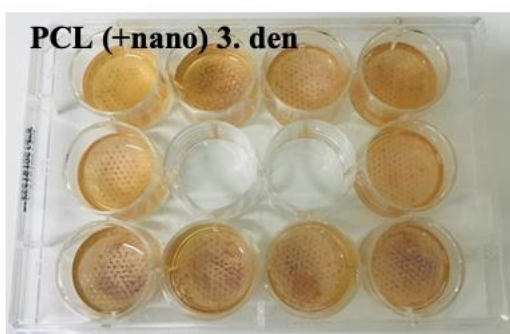
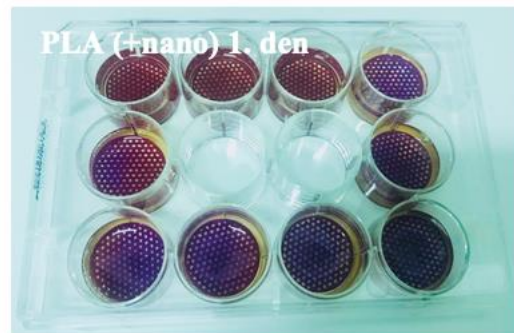
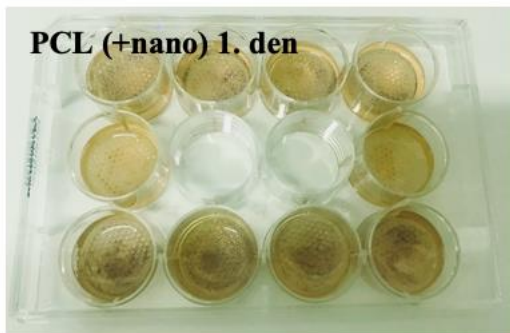
Příloha číslo 4 – snímky PLA nosičů ze skenovacího elektronového mikroskopu

Příloha číslo 5 – původní návrh buněčného nosiče pomocí CAD a pro potřeby testování zjednodušený model

Příloha číslo 6 – záznam z měření diferenciální skenovací kalorimetrie PCL filamentu a nosiče

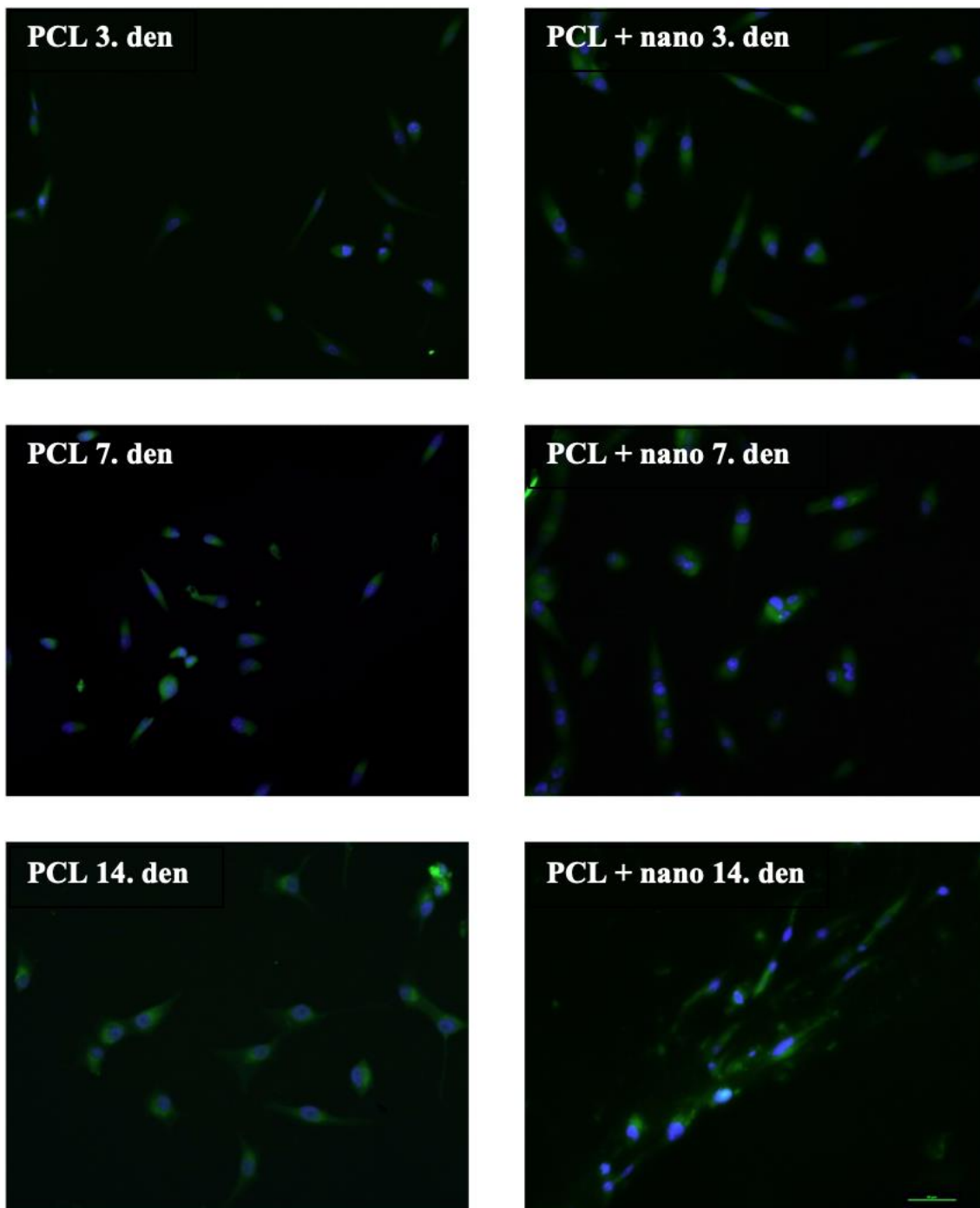
Příloha číslo 7 – záznam z měření diferenciální skenovací kalorimetrie PLA filamentu a nosiče

Příloha č. 1 – Snímky buněčných nosičů v průběhu testování



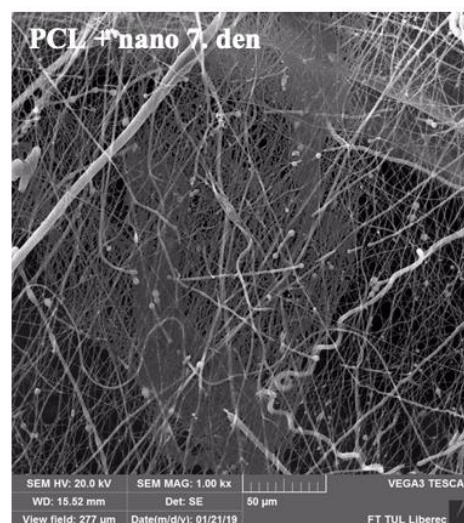
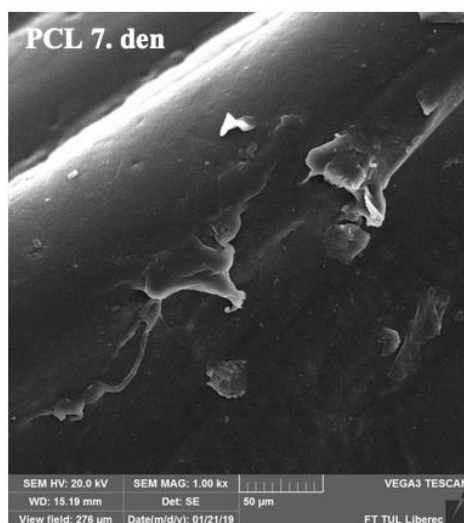
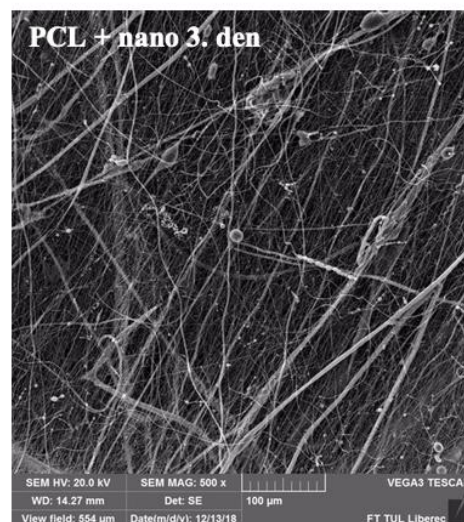
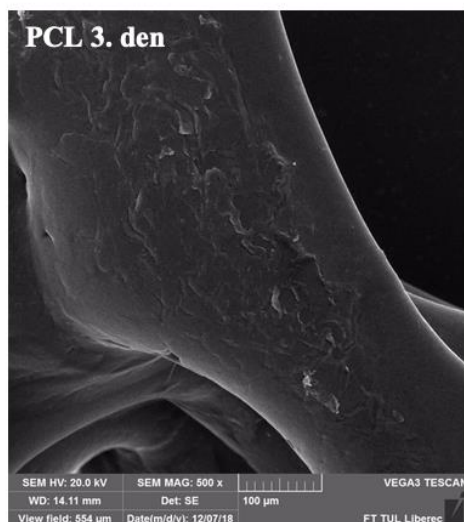
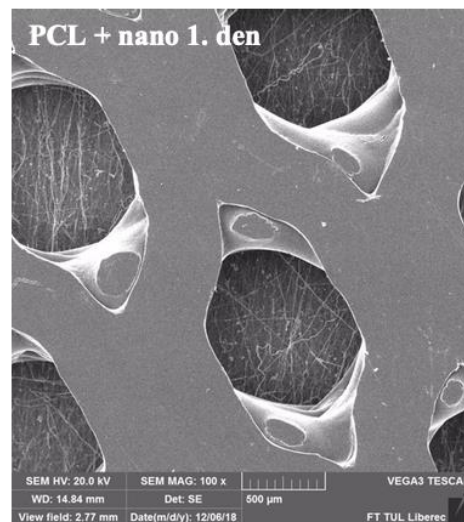
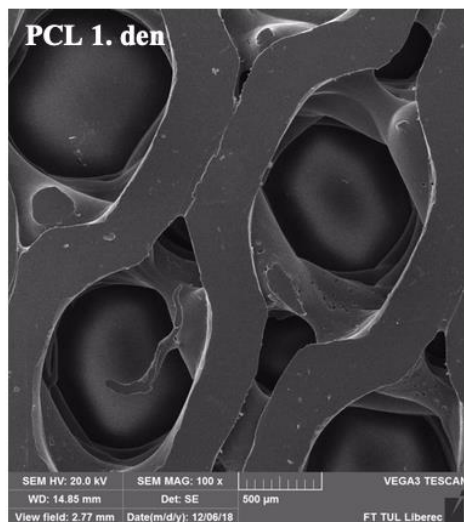
Osazené nosiče buňkami při biologickém testování v průběhu 1., 3, 7, a 14. testovacího dne, spodní 4 jamky obsahují vždy nosič s nanovláknennou vrstvou, levá jamka PC, pravá NC

Příloha č. 2 – Snímky fluorescenční mikroskopie

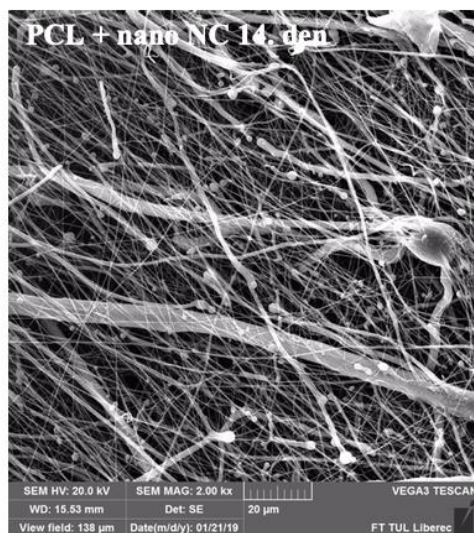
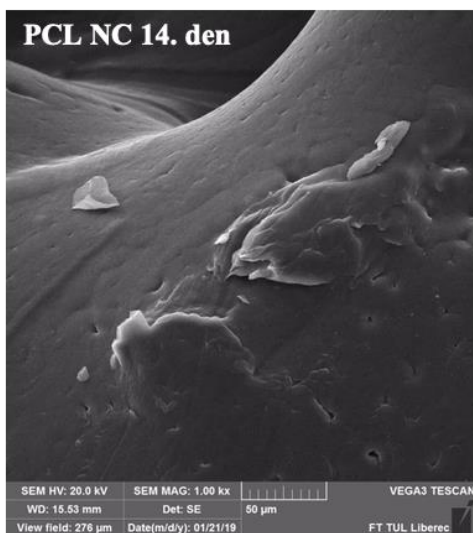
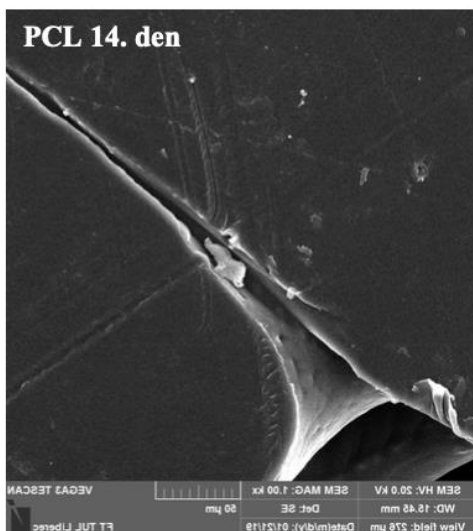


Snímky z fluorescenční mikroskopie v rámci jednotlivých testovacích dnů (zvětšeno 20 kx)

Příloha číslo 3 – snímky PCL nosičů ze skenovacího elektronového mikroskopu

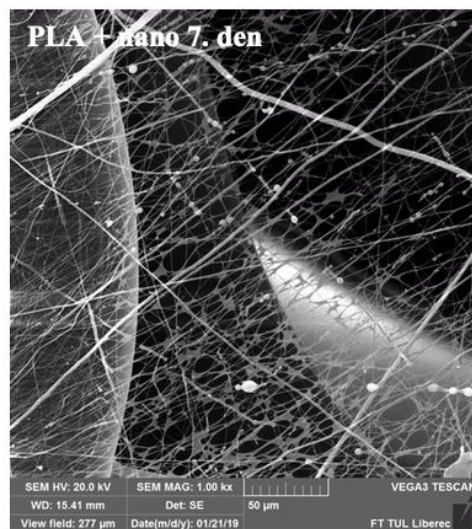
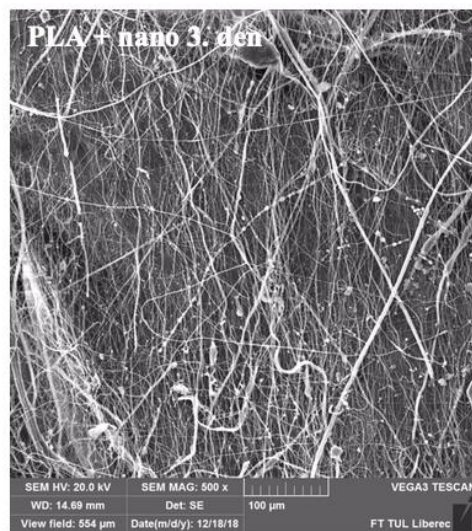
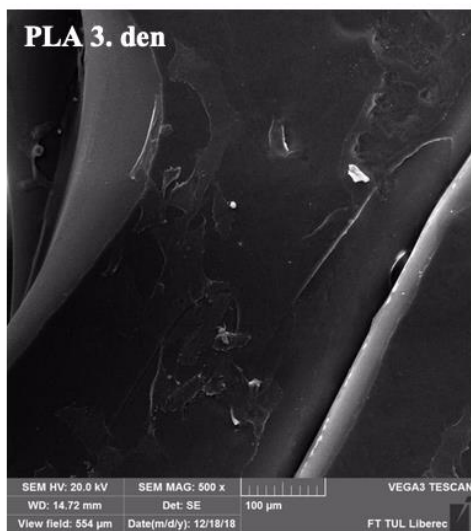
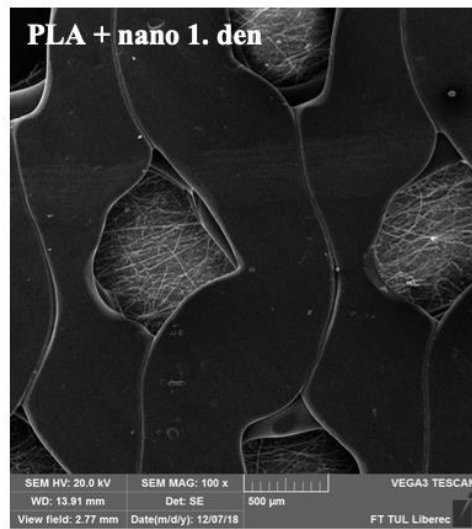
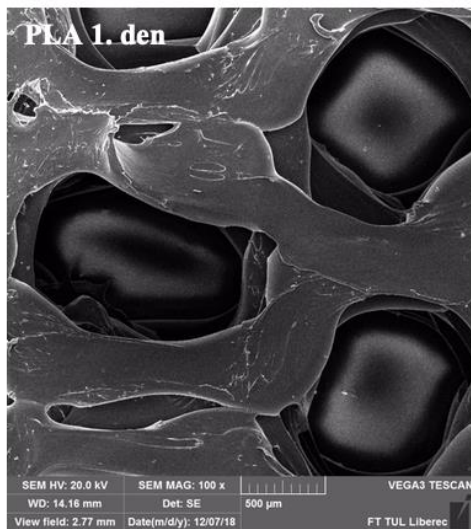


SEM snímky z jednotlivých testovacích dnů

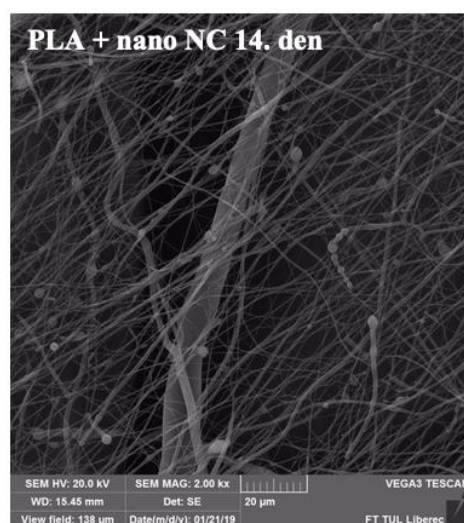
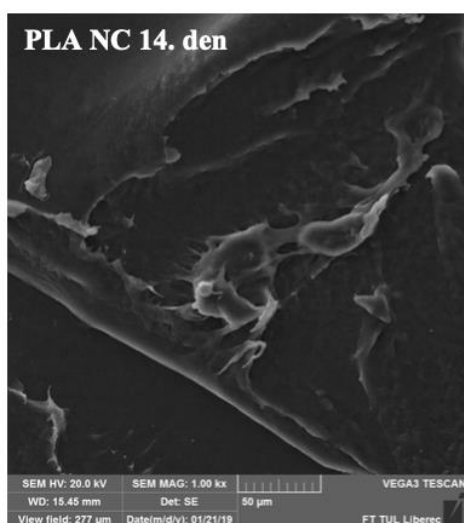
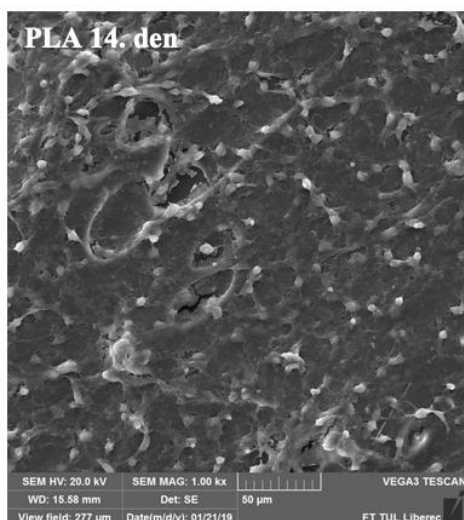


SEM snímky z jednotlivých testovacích dnů

Příloha číslo 4 – snímky PLA nosičů ze skenovacího elektronového mikroskopu



SEM snímky z jednotlivých testovacích dnů

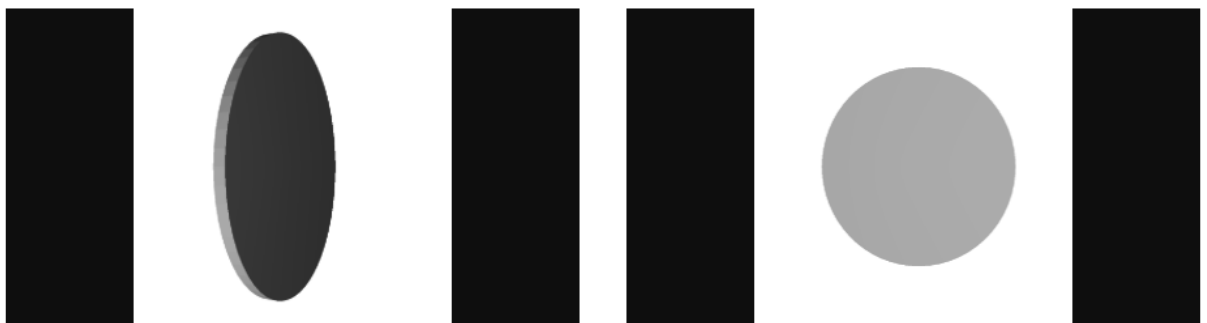


SEM snímky z jednotlivých testovacích dnů

Příloha číslo 5 – Původní návrh buněčného nosiče pomocí CAD (Obrázek (a))
a pro potřeby testování zjednodušený model (Obrázek (b))

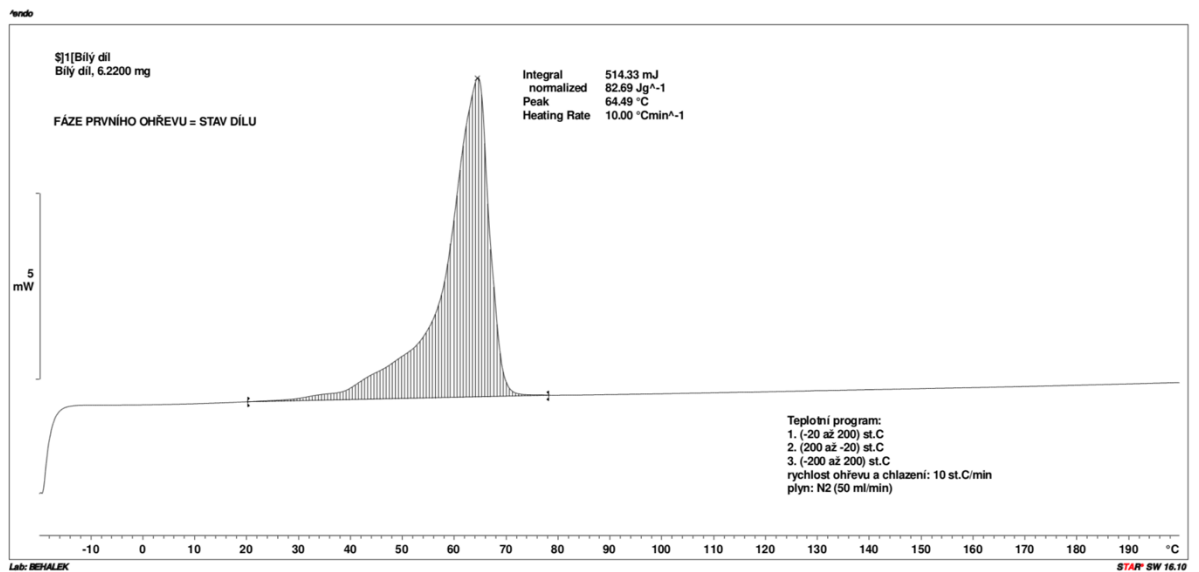
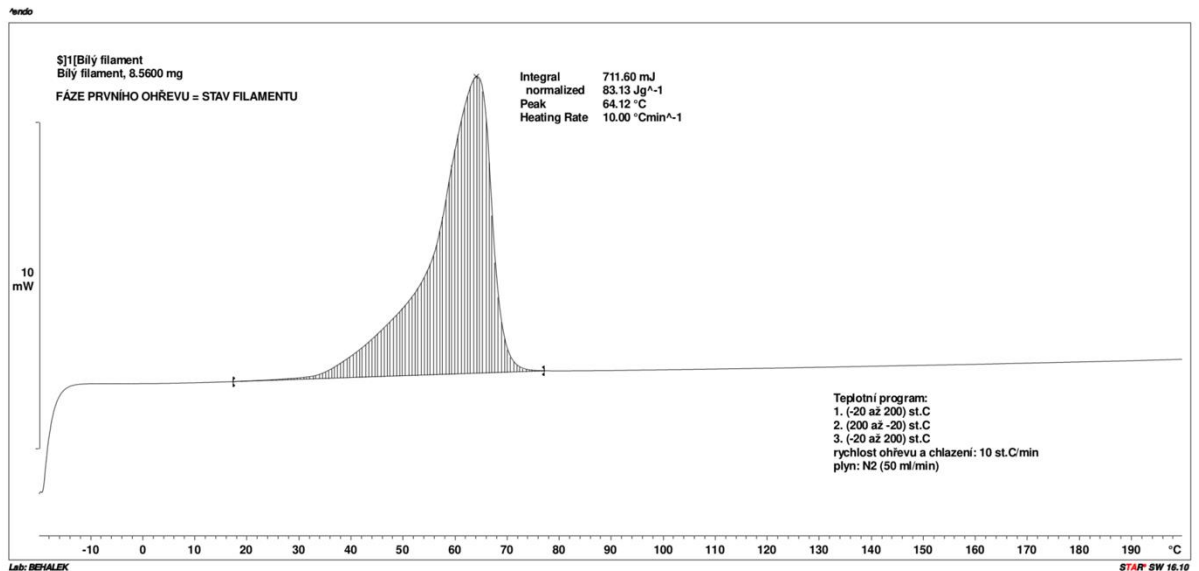


*Obrázek (a) Původní návrh nosiče s hexagonální strukturou, boční a přímý pohled
(rozměry 21 mm x 0,8 mm)*



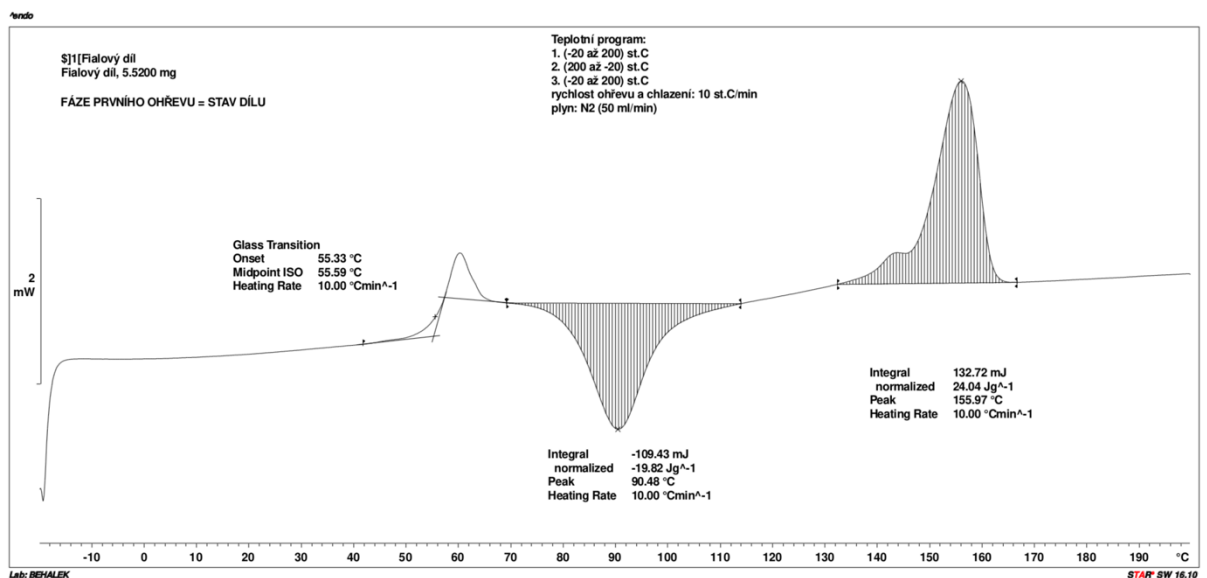
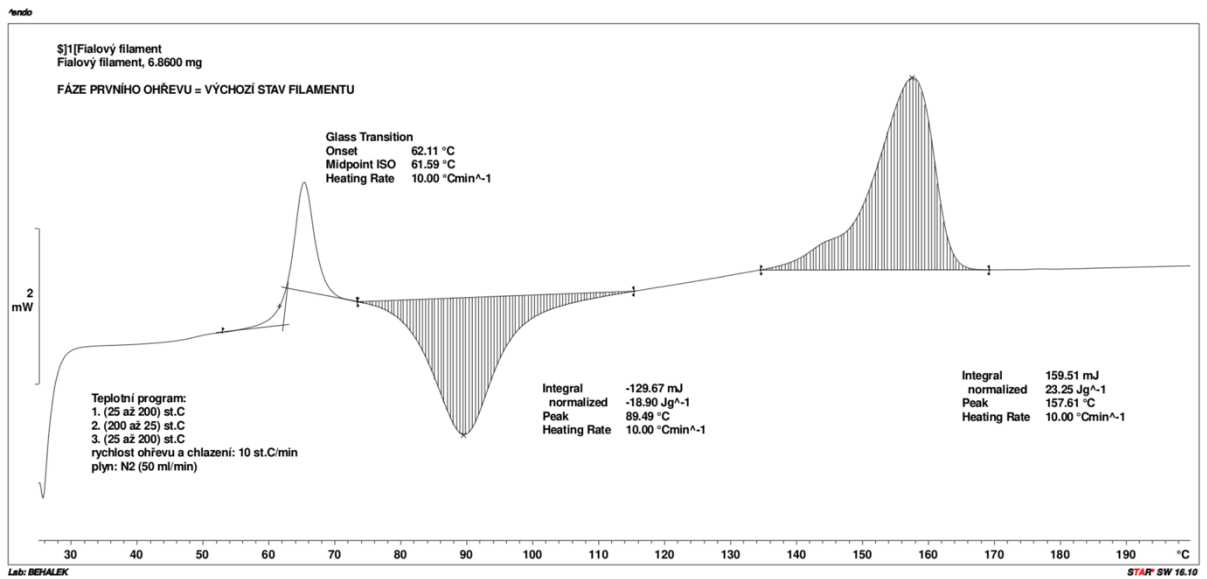
*Obrázek (b) Zjednodušený model nosiče pro potřeby buněčného testování, boční a přímý pohled
(rozměry 21 mm x 0,8 mm)*

Příloha číslo 6 – záznam z měření diferenciální skenovací kalorimetrie PCL filamentu a nosiče



DSC graf ukazující průběh ohřevu a k tomu potřebné energie. Horní obrázek surový filament, spodní obrázek již jednou zahříváný materiál v podobě nosiče. Křivka grafu podobná a tedy důkaz, že vlastnosti materiálu se ohřevem nezměnily

Příloha číslo 7 – záznam z měření diferenciální skenovací kalorimetrie PLA filamentu a nosiče



DSC graf ukazující průběh ohřevu a k tomu potřebné energie. Horní obrázek surový filament, spodní obrázek již jednou zahříváný materiál v podobě nosiče. Křivka grafu podobná a tedy důkaz, že vlastnosti materiálu se ohřevem nezměnily