

3D tisk syntetických polymerů využitelných v tkáňovém inženýrství

Lukáš Kameník

Bakalářská práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Lukáš Kameník**
Osobní číslo: **T21627**
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**
Specializace: **Materiálové inženýrství**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **3D tisk syntetických polymerů využitelných v tkáňovém inženýrství**

Zásady pro vypracování

- Vypracujte literární rešerši na zadané téma s využitím doporučené literatury a databázových informačních zdrojů.
- Seznamte se s obsluhou multifunkční 3D tiskárny BIO X.
- Připravte tiskové směsi na bázi polykaprolaktonu a terpolymeru polyvinylidenfluoridu.
- Z připravených směsí vytiskněte na 3D tiskárně mřížky a ty poté charakterizujte pomocí dostupných mikroskopických metod.
- Získané výsledky přehledně zpracujte a diskutujte.

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

Seznam doporučené literatury:

1. THAKAR, Chetan M., Shailesh S. PARKHE, Ankit JAIN, Khongdet PHASINAM, G. MURUGESAN a Randy Joy Magno VENTAYEN. 3d Printing: Basic principles and applications. *Materials Today: Proceedings*. 2022, 51, 842-849. ISSN 22147853.
2. PAVAN KALYAN, BG a Lalit KUMAR. 3D Printing: Applications in Tissue Engineering, Medical Devices, and Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2022, 23(4). ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-022-02242-8.
3. PLACE, Elsie S., Julian H. GEORGE, Charlotte K. WILLIAMS a Molly M. STEVENS. Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. *Chemical Society Reviews*. 2009, 38(4). ISSN 0306-0012.

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

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Petr Smolka, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2024

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 bakalářská práce se zabývá optimalizací tiskových parametrů při 3D tisku mřížek z polymerních směsí poly(vinylidenfluorid-trifluoroethylen-chlorotrifluoroethylen) a polykaprolaktonu pomocí pneumatické extruze. Povrchová struktura byla analyzována pomocí skenovací elektronové mikroskopie a digitální mikroskopie, zatímco chemická analýza byla měřena pomocí infračervené spektroskopie. Z výsledků vyplývá, že zvýšená teplota tiskové směsi s rozpouštědlem způsobuje výrazné snížení tvorby pórů vlivem rychlého odpaření rozpouštědla. Vysoká porozita povrchu byla pozorována při tisku mřížek z roztoků bez zahřívání. Dále byl dokázán vliv nanočástic titaničitanu strontnatého na homogenizaci tiskového materiálu. Pomocí konfokální mikroskopie byl sledován vliv mřížek s vysokou porozitou na proliferaci myších fibroblastů. Mřížky obsahující póry vykazují dobrou míru buněčné proliferace, jež umožňuje potenciální aplikace v tkáňovém inženýrství.

Klíčová slova: 3D tisk, poly(vinylidenfluorid-trifluoroethylen-chlorotrifluoroethylen), polykaprolakton, nanočástice, porozita povrchu

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the optimization of printing parameters during 3D printing of grids from polymer mixtures of poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene-chlorotrifluoroethylene) and polycaprolactone using pneumatic extrusion. The surface structure was analyzed using scanning electron microscopy and digital microscopy, while the chemical analysis was measured using infrared spectroscopy. The results show that the increased temperature of the printing mixture with the solvent causes a significant reduction in the formation of pores due to the rapid evaporation of the solvent. High surface porosity was observed when grids were printed from solutions without heating. Furthermore, the influence of strontium titanate nanoparticles on the homogenization of the printing material was proven. Using confocal microscopy, the influence of grids with high porosity on the proliferation of mouse fibroblasts was monitored. Grids containing pores show a good rate of cell proliferation, which allows potential applications in tissue engineering.

Keywords: 3D printing, poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene-chlorotrifluoroethylene), polycaprolactone, nanoparticles, surface porosity

Tímto bych chtěl především poděkovat mé vedoucí Ing. Markétě Kadlečkové, Ph.D., jež mi napomáhala při zpracování této práce svou trpělivostí, časem a radami.

Dále bych chtěl poděkovat mojí rodině za stálou podporu při měření a psaní této práce.

Moje poslední poděkování patří všem kolegům z oboru materiálového inženýrství, kteří mi během studia byly cennou podporou umožňující bezproblémové dokončení mého studia.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	11
1.1 SCAFFOLDY	11
1.1.1 Vlastnosti.....	11
1.1.2 Biomateriály	13
1.1.3 Porozita a topografie povrchu	14
1.1.4 Výroba.....	15
2 SYNTETICKÉ POLYMERY	17
2.1 POLYKAPROLAKTON	17
2.2 ELEKTROAKTIVNÍ POLYMERY	19
2.2.1 Elektronické EAP	20
2.2.2 Iontové EAP	21
2.2.3 Poly(vinylidenfluorid).....	22
2.2.4 Poly(vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen).....	23
II PRAKTICKÁ ČÁST	25
3 MATERIÁLY A METODY	26
3.1 POUŽITÉ MATERIÁLY CHEMIKÁLIE	26
3.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	27
3.2.1 Tiskové směsi.....	27
3.2.2 Fyziologické roztoky.....	27
3.3 PŘÍPRAVA BLENĐŮ	27
3.4 BUNĚČNÉ TESTY	27
3.5 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	28
3.5.1 3D tiskárna Bio X.....	28
3.5.2 Skenovací elektronový mikroskop	28
3.5.3 Digitální mikroskop	28
3.5.4 Konfokální mikroskop	28
3.5.5 FTIR spektrometr	29
3.6 ANALÝZA VELIKOSTI PÓRŮ	29
3.6.1 ImageJ	29
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	30
4.1 TISK MŘÍŽEK Z BLENĐŮ POMOCÍ TERMOPLASTICKÉ EXTRUZE.....	30
4.1.1 Chemická analýza mřížek z blendů.....	32
4.2 TISK MŘÍŽEK Z ROZTOKŮ POMOCÍ PNEUMATICKÉ EXTRUZE.....	33
4.2.1 Vliv hmotnostních poměrů polymerů na tisk a povrch mřížek.....	34
4.2.2 Vliv teploty tiskové směsi na tisk a povrch mřížek	36

4.2.3	Analýza velikosti pórů	38
4.3	BIOKOMPATIBILITA MŘÍŽEK S VYSOKOU POROZITOU	40
4.3.1	Stabilita mřížek ve fyziologickém roztoku	40
4.3.2	Testy buněčné proliferace	41
ZÁVĚR		43
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		45
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		52
SEZNAM OBRÁZKŮ		54
SEZNAM TABULEK.....		55

ÚVOD

Se stále se zlepšující zdravotní péčí dochází k postupnému navýšení průměrné doby života, která způsobuje stále vyšší nároky na funkce již opotřebovaných tkání. Případná zranění způsobená při nehodách mohou vést k nedokonalému případně neúplnému zotavení poškozené tkáně. Tyto problémy se mohou řešit skrze náhradu poškozené tkáně pomocí zdravé nepoškozené tkáně od dárců. Transplantace je však problematická kvůli nutnosti kompatibility tkáně dárce a pacienta nebo zdlouhavému procesu vlivem seznamu čekatelů na transplantaci. V poslední době se stále více dostávají do popředí metody umožňující léčbu odlišných typů tkání pomocí scaffoldů vytvořených na míru pro poškozené nebo opotřebované tkáně. Jedním z těchto pokrokových vědních oborů je tkáňové inženýrství.

Podstatným faktorem je také možnost výroby většího množství tkáňových náhrad, jež umožňuje 3D tisk. Tvorba optimálních scaffoldů pomocí aditivní výroby je však složitým procesem zahrnující řadu faktorů. Samotný tisk navrhnutého modelu vyžaduje nalezení parametrů poskytujících reprodukovatelnost celého procesu s požadovanými kvalitami. Dále je nezbytné, aby tiskové materiály byly biokompatibilní a biodegradabilní pro dosažení účinné léčby.

Výběr materiálu pro tisk je tedy významným rozhodnutím, neboť přímo ovlivňuje řadu mechanických a fyzikálně-chemických vlastností výsledných tkáňových náhrad. Běžně využívaným syntetickým materiálem je polykaprolakton, který oproti ostatním syntetickým polymerům má zvýšenou míru biokompatibility. Avšak mezi další nadějně syntetické polymery patří polyvinylidenfluorid a jeho další varianty. Hlavním důvodem jsou významné elektroaktivní vlastnosti poskytující polymeru rozšířené možnosti aplikací.

Teoretická část se dělí na dvě podkapitoly, kdy první oddíl se věnuje popisu vlastností scaffoldů pro požadovanou funkčnost při kontaktu s živou tkání a odlišnými metodami 3D tisku s důrazem na extruzní tisk, kterým jsou v praktické části tisknuty všechny mřížky. Druhý oddíl pojednává o různých materiálech využívaných v tkáňovém inženýrství a významných vlastnostech elektroaktivních polymerů.

Praktická část se zaměřuje na popis experimentů zabývajících se vlivem poměru polymerů, teploty a způsobu přípravy tiskových směsí na výsledné povrchové vlastnosti tisknutých mřížek. Součástí praktické části je dále vyhodnocení velikosti pórů a testy popisující buněčnou proliferaci a stabilitu vybraných mřížek.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Tkáňové inženýrství (TI) je multidisciplinární vědní obor na pomezí biomedicíny zabývající se problematikou náhrad poškozených tkáních a případně orgánů. Tkáně se skládají z buněk, signálních systémů a extracelulární matrix, které tvoří tři složky triády TI. Extracelulární matrix nefunguje pouze jako mezibuněčná výplň, ale také jako místo, ve kterém se nachází signální molekuly umožňující komunikaci buněk s okolním prostředím. Triáda TI využívá těchto tří stěžejních komponentů při produkci nových tkáňových náhrad. [1–3] S ohledem na zaměření této práce budou další podkapitoly věnovány především scaffoldům, jejich požadovaným vlastnostem, materiálům a výrobě.

1.1 Scaffoldy

Scaffoldy jsou biokompatibilní 2D a 3D konstrukty, které nahrazují extracelulární matrix v poškozené oblasti tkáně. Pro buňky jsou tkáňovou náhradou a pomocnou šablonou pro jejich uchycení a růst. Důležitými faktory scaffoldů je také nízká toxicita a kontrolovatelná biodegradace. Pomocí kontrolovaného rozkládání materiálu na základě vyrobeného scaffoldu není nutno později konstrukt chirurgicky vyjmát, jelikož v průběhu začleňování do nativní tkáně dochází k jeho naprostému vymizení. Scaffoldy mají různé podoby na základě jejich aplikačního účelu. Jedná se například o běžné kožní substituty při náhradě poškozené pokožky vlivem rakoviny nebo nové kostní tkáně v ortopedii. Výhodou je také možnost vytvoření individuálních tkáňových náhrad na základě pacientových potřeb díky široce dostupným možnostem výroby. Aspekty, které ovlivňují vlastnosti výsledného scaffoldu jsou krom zvolených materiálů také jejich makro-, mikro- a nanoarchitektura. Zvolené parametry jsou upravovány podle aktuálních potřeb dané tkáně a specifického místa pacientova problému. [4,5]

1.1.1 Vlastnosti

Konstrukty v TI musí splňovat kvality, které zajišťují vhodné prostředí pro existenci buněk a jejich následný růst. Návrhy scaffoldů proto zohledňují mechanické (tuhost, modul pružnosti atd.), fyzikálně-chemické (porozita, biodegradace atd.) a biologické (adheze buněk, biokompatibilita atd.) vlastnosti. Ke zlepšení biologické aktivity, která zajišťuje interakce mezi scaffoldem a tkání na molekulární úrovni, je možné upravovat velikost, tvar a porozitu výsledných produktů. Vyvolání reakce biologického systému, buněčná proliferace a diferenciací jsou důležitými bioaktivními parametry napomáhající uchycení

scaffoldu a urychlení regenerace tkáně. V uplynulých letech výzkum v oblasti TI dosáhl výrazných pokroků z hlediska navrhování nových scaffoldů s vlastnostmi a tvarem téměř totožnými jako původní tkáň. [4]

Degradabilita

Kontrolovat kinetiku degradace materiálu v těle a možnost zpomalení tohoto procesu jsou při návrhu nových scaffoldů jedním z hlavních problémů. Kinetika degradace významně ovlivňuje mechanické vlastnosti materiálu, jelikož dochází k postupnému rozpadu tkáňové náhrady pro buňky. V ideálním případě dochází po aplikaci implantátu k neinvazivní reakci organismu. Scaffold poté naplňuje funkci šablony, která si při postupné degradaci materiálu nadále udržuje požadované mechanické vlastnosti. Dále by se tkáňová náhrada po splnění svého úkolu měla začít postupně rozpadat až do úplného vymizení z tkáně, kdy nová zregenerovaná tkáň zcela implantát nahradí. [6] V praxi dochází k reakci mezi implantátem a lidským organismem okamžitě po chirurgickém zákroku. Zahájení odezvy a její průběh je především dán reakcí mezi proteiny obsaženými v krevní plazmě, povrchem materiálu a produktů tvořících se při degradaci. [7] Proteiny obalují povrch scaffoldu, vytváří zde monovrstvu atím zároveň pozměňují povrch. Změnou povrchu nastává přeměna konformace absorbovaných proteinů jejímž výsledkem jsou různé kaskádové reakce. [8] Zároveň se při degradaci uvolňují produkty do mikroprostředí, které mohou ovlivnit reakci organismu.

Biokompatibilita

Při zavedení neznámého objektu do těla lidský organismus reaguje aktivací imunitního systému, který se po vyhodnocení možné hrozby daný objekt snaží odstranit. V případě, že se organismu tato hrozba nepodaří odstranit, dochází k izolaci, a tudíž neléčivé interakci s tkání. Je tedy stěžejní, aby tkáňové náhrady byly z vhodného materiálu, který neaktivuje imunitní reakci organismu, která by vedla k nežádoucím efektům při regeneraci tkáně. Termínem biokompatibilita lze popsat vliv biomateriálu na organismus. Oficiální definice biokompatibility byla popsána v roce 1987 a zní takto:

„Schopnost materiálu působit s odpovídající odezvou hostitele v konkrétní aplikaci.“
(Williams, 1987). [9]

Definice tedy spojuje vlastnosti a charakteristiky biomateriálu s požadovanými biologickými odezvami v rámci specifického chirurgického zákroku. Část definice popisující odpovídající odezvu hostitele se zabývá identifikací možných reakcí tkáně na cizí

těleso. Biokompatibilní materiály jsou tedy následně hodnoceny podle velikosti dopadu a délky času způsobující nežádoucí změny v homeostatickém prostředí. [10]

1.1.2 Biomateriály

Vlivem výzkumných pokroků v mnoha oblastech vědy zabývajících se tkáňovými náhradami nastala potřeba sjednocení pojmu biomateriály. První definice byla ustanovena na základě shody názorů účastníků konference Evropské společnosti pro biomateriály (ESB) a zní:

„Neživotaschopný materiál používaný v lékařských zařízeních, určený k interakci s biologickými systémy.“ (Williams, 1987).

V oblasti TI jsou rozšířené čtyři typy biomateriálů využívané pro výrobu scaffoldů. Jedná se o keramiku, kovy, syntetické polymery a přírodní polymery. Důvodem pro využívání různých zmíněných typů látek jsou jejich různorodé vlastnosti a možnosti aplikace.

Keramika je využívána při léčbách kostních tkání, jelikož se jedná o biokompatibilní materiály podporující proliferaci a diferenciaci kostních buněk. [11,12] Dále biokeramické konstrukty mají charakteristické mechanické vlastnosti jako je vysoká tuhost, nízká pružnost, tvrdost a křehkost. Mezi rozšířené keramické materiály lze zařadit hydroxyapatit a fosforečnan vápenatý.

Kovové scaffoldy se využívají především kvůli svým mechanickým vlastnostem při léčbě kostních defektů. [13] Zásadní výhodou kovů, která umožňuje aplikace v ortopedii, je nízká biodegradabilita a dobré mechanické vlastnosti oproti ostatním biomateriálům. [14] Biodegradabilita kovových tkáňových náhrad se může lišit podle využitého kovu. Zatímco implantáty vyrobené z titanu degradují velmi pomalu a mohou tvořit kostní alternativu po celý život pacienta, scaffoldy z magnezia degradují značně rychleji. [15]

Pro náhradu měkkých tkání jsou využívány syntetické a přírodní polymery. [16–18] V průběhu let byla vytvořena řada tkáňových náhrad ze syntetických polymerů. Mezi hlavní výhody náleží možnosti kontroly kinetiky degradace materiálů, jelikož rychlost rozkladu materiálu by v ideálním případě měla odpovídat tempu tvorby nové tkáně. [19] Nevýhodou konstruktů ze syntetických polymerů jsou potencionální šance imunitní reakce na implantovaný scaffold z důvodu nižší bioaktivity. [20]

Alternativou pro tvorbu vysoce bioaktivních tkáňových náhrad jsou přírodní polymery. Na rozdíl od syntetických polymerů jsou získávány z přírodních zdrojů. Bioaktivní polymery

podporují velmi dobrou adhezi a růst buněk v poškozených místech tkáně. Podobně jako syntetické polymery umožňují řízenou degradaci materiálu a tvorbu nové extracelulární matrix, tkáňové náhrady z přírodních polymerů vykazují podpořené vlastnosti degradace. Dále má velká část přírodních polymerů oproti ostatním biomateriálům nízké mechanické vlastnosti, které omezují širší využití v medicínské praxi. [21,22]

Kombinací syntetických a přírodních polymerů jsou zkoumány nové materiálové kompozice pro tkáňové náhrady. Ačkoliv tyto nové materiály vykazují zlepšení mechanických vlastností a tím umožňují širší spektrum aplikací, zároveň poukazují na problémy se snižující se bioaktivitou a biokompatibilitou. [23]

1.1.3 Porozita a topografie povrchu

Vnitřní struktura a povrch scaffoldů jsou významnými faktory ovlivňující mechanické a fyzikálně chemické vlastnosti materiálu. Ačkoliv velikost a hustota pórů mají pozitivní vliv na transport látek a buněčnou proliferaci, je nutné podotknout, že se zvyšující se porozitou dochází ke snižování mechanických vlastností. Následkem může být zničení tkáňové náhrady způsobené nepřiměřenou degradací materiálu vlivem nedostatečné tuhosti. Úpravou velikosti a tvaru pórů je možné kontrolovat rychlost degradace scaffoldu. Porozita a velikost pórů jsou tudíž nezanedbatelnými parametry pro aplikační účely tkáňové náhrady. Vzájemným propojením vnitřní struktury pórů lze ovlivnit difuzi živin, kyslíku a odpadních látek. Porozita má vliv na směr migrace a růst buněk, které regenerují poškozenou organickou strukturu. Pomocí pórů dochází také k lepší stabilizaci a omezení pohybu mezi implantovaným konstruktem a okolní tkání. [24,25]

Struktura povrchu patří ke klíčovým parametrům scaffoldů, jelikož může významně podporovat biokompatibilitu materiálu. Pomocí funkčních skupin, které lze navázat na povrch tkáňové náhrady, dochází k chemické povrchové modifikaci. Tyto funkční skupiny na povrchu scaffoldu následně usnadňují kombinaci různých typů materiálů. Tímto způsobem jsou navázány polymery, bioaktivní materiály nebo také nanočástice. Efektivní proliferace a adheze buněk probíhá na hydrofilních površích. [26] Mezi rozšířené metody úpravy povrchu patří coating želatinou, která je tvořena přírodním polymerem kolagenem využívaným kvůli výhodným biokompatibilním a biodegradabilním vlastnostem. Následné vyhodnocení hydrofility nového povrchu je měřeno technikou kontaktního úhlu. Měření bývají prováděna z několika odlišných směrů tkáňové náhrady pro určení hydrofility celého implantátu. [25]

Metod úprav scaffoldů pro získání potřebné strukturované topografie a porozity je značné množství. Mezi používané způsoby lze zařadit metodu fázové separace, která je využívána pro jednoduchost a nenáročnost celého děje. Proces se skládá z rozpouštění polymeru v rozpouštědle a následnou fázovou separací vlivem změny teploty nebo přidáním „špatného“ rozpouštědla. Polymerní směs je nestabilní a dochází k rozdělení na dvě fáze. První fáze je tvořena polymerní směsí, zatímco druhá fáze obsahuje „špatné“ rozpouštědlo. Rozpouštědla je poté možné odstranit pomocí vody nebo odpařováním a ze vzniklé fáze, která je bohatá na polymer vzniká strukturovaný produkt, který může být dále využit jako scaffold. [27]

Pro výpočet porozity a velikosti pórů existují různé softwary, metody a vybavení. K vyhodnocení propojenosti a velikosti pórů v celém objemu tkáňové náhrady lze využít rentgenovou mikrotomografii. Naměřená data lze zobrazit jako 3D model objektu, který lze také znázornit jako 2D obraz ve zvolené části objemu scaffoldu. [28] K posouzení homogenity porozity ve vybraném řezu lze aplikovat metodu analýzy skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM). Snímky ze SEM jsou následně analyzovány např. v programu ImageJ, který je v praxi využíván při zkoumání medicínských snímků. [24]

1.1.4 Výroba

Široké možnosti aplikace tkáňových náhrad vytvářejí nové požadavky a možnosti inovace pro stávající výrobní procesy. Užitím různých postupů lze dosáhnout odlišných vlastností u konstruktů, které mohou mít vliv na biokompatibilitu a mechanické vlastnosti. Mezi nadějně způsoby výroby, které umožňují dosáhnout vysoké úrovně přesnosti a důrazu na strukturu patří rozvíjející se technologie 3D tisku. [29] Při vytváření nové tkáňové náhrady pomocí technologie 3D tisku je nejprve potřeba vytvořit model objektu pomocí CAD (počítačem podporovaný design), který je poté konvertován do jednotlivých řezů. Samotný tisk je poté prováděn vrstvou po vrstvě, kdy vytvrzování tiskové směsi se liší podle využití metody tisku. Pomocí postupného přidávání vrstev pro dosažení výsledného produktu získal 3D tisk také název aditivní výroba. [30] V TI je 3D tisk široce využíván pro vytváření zejména kostních náhrad. [31]

Stereolitografie

Technika založená na principu ozařování pryskyřice pomocí UV záření. Laserem osvětlená část tekuté pryskyřice prostřednictvím mechanismu fotopolymerace postupně síťuje a přeměňuje se na pevný materiál. Výsledný objekt je tvořen vrstvou po vrstvě pohybem

platformy směry nahoru a dolů. Stereolitografie umožňuje v oblasti TI vytvářet mimořádně komplexní konstrukty s rozlišením až 10 μm u požadovaných detailů. [32] Optimalizací intenzity laseru, osvětlování pryskyřice nebo skenovací rychlosti lze dosáhnout zlepšení přesnosti výsledných produktů. [33,34]

Selektivní laserové spékání

Mezi další rozvíjející se aplikace 3D tisku biomateriálů patří selektivní laserové spékání (SLS). Proces funguje na principu slučování práškových polymerů, kovů nebo keramiky výkonným laserovým paprskem. Prášek je postupně nanášen stlačovacím pístem ze zásobní části do tisknouceho prostoru podle nastaveného množství. Následně je provedeno rovnoměrné rozprostření směsi po platformě. Předehřátím plochy je možno dosáhnout nižších požadavků na výkon laseru a tím urychlení tisknouceho procesu. Rozprostřené částice prášku jsou poté pomocí laseru natavovány v požadovaných bodech pro utvoření vrstvy. Po dokončení první vrstvy dochází ke snížení pístu na úroveň výšky vytištěné vrstvy a dochází k doplnění dalšího množství prášku pro vytvoření další vrstvy. Vytištěné produkty pomocí SLS jsou porézní a tím vhodné pro využití v TI pro sledování buněčné aktivity. [34,35]

Metody 3D tisku založené na extruzi

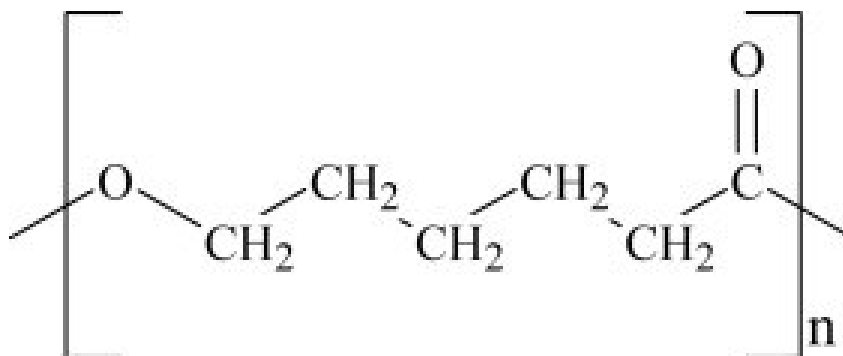
Extruzní 3D tisk je proces založený na vytlačování tiskového materiálu skrz jehly nebo trysky na podložku. Tiskový materiál je předem připraven a přenesen do nádoby, která je dále umístěna a stabilizována v tiskové hlavě. Vzhledem k technologickým pokrokům v oblasti 3D tisku existují různé typy hlav, pomocí kterých lze provést odlišné metody extruzního tisku. Hlavu pro metodu fused deposition modeling je možné zahřívat na teploty umožňující roztavení tiskové směsi. Pomocí pneumatického pístu je materiál vytlačován tryskou nebo jehlou na podložku podle vytvořeného modelu vrstvu po vrstvě a nastavených tiskových parametrů. [36] Další metodou tisku trojrozměrných objektů je direct ink writing (DIW). Hlavním faktorem při DIW jsou reologické vlastnosti tiskové směsi. Nastavení parametrů vytlačovacího tlaku, rychlosti tisku, typu modelu konstruktu, teploty hlavičky při zahřívání a výběrem trysky nebo jehly je nutné optimalizovat pro získání požadovaných výsledků tisku. Například při zvýšení tlaku dochází k vytlačování většího objemu tiskové směsi, která však zvýšením rychlosti přesunu jehly nebo trysky po tiskové ploše umožňuje ztenčení stěn vytisknutého materiálu. [37]

2 SYNTETICKÉ POLYMERY

Se stále rostoucími nároky na mechanické vlastnosti a kontrolu degradability materiálu úzce spojenou se změnou struktury tkáňových náhrad v čase se v odvětví regenerativní medicíny stále více využívají syntetické polymery. Syntetické polymery mají dobré mechanické vlastnosti, avšak často také vykazují nižší bioaktivitu, která je při přípravě tkáňových náhrad nezanedbatelná. Úpravami funkčních skupin nebo molekulové hmotnosti polymerních řetězců lze predikovat změnu charakteristik materiálu a tím dále ovlivňovat rychlost rozpadu konstruktů. Hlavním důvodem kontroly kinetiky rozkladu je degradace scaffoldů pomocí hydrolýzy, která formuje kyselé prostředí v okolí implantované části konstruktů. Výsledkem je následné odumření tkáně a potřeba chirurgického odstranění poškozeného implantátu. Pomocí modifikací syntetických polymerů a metod 3D tisku je však možné dosáhnout komplexních struktur s požadovanými bioaktivními kvalitami. [38,39]

2.1 Polykaprolakton

V oblasti TI je využíváno široké množství syntetických polymerů. Polykaprolakton (PCL) je uměle vytvořená makromolekulární látka s vysokým stupněm krystalinity. Základem pro produkci PCL je ϵ -kaprolakton, který je získáván zpracováním fosilního uhlíku. Polymerizace probíhá otevřením kruhového řetězce ϵ -kaprolaktonu, ze kterého pak vzniká alifatický polyesterový polymer (Obr. 1). [40] PCL je vhodným materiálem při produkci 3D tkáňových náhrad s vysokou mírou porozity. [41] Výhodou jsou rozšířené možnosti medicínských aplikací, kdy kombinací PCL s dalšími polymery byly vyrobeny scaffoldy pro náhradu kostní, vaskulární a nervové tkáně. [42–44] Dále je PCL krom tkáňových náhrad také využíváno při transportu léčiv.



Obr. 1 – Chemická struktura polykaprolaktonu [45]

[45] Při výrobě scaffoldů v TI je využívána řada metod. Mezi nejčastěji využívané metody pro zpracování PCL patří formování taveniny, roztokové odlévání, luhování a tvorba pěn. [46–48] Biodegradabilní alifatické polyestery, mezi které PCL patří, umožňují řízený rozpad obalového materiálu s lékem vedoucí k předvídatelnému uvolňování a rozpuštění léčivé látky v organismu. [49]

Struktury z PCL jsou poměrně ohebné a pevné díky nízké teplotě tání (59-64 °C) a teplotě skelného přechodu (-60 °C). Další významnou výhodou PCL jsou možnosti kombinací s dalšími polymery pro zlepšení celkové bioaktivity a mechanických vlastností vzniklých kompozitů. [50] Podstatným faktorem ovlivňující vlastnosti konstruktů z PCL je proces degradace, který je poměrně pomalý (2-3 roky), jelikož je ovlivněn hydrofobními a krystalickými vlastnostmi materiálu. Rozklad ve vodném prostředí je způsoben hydrolyzou esterových funkčních skupin a samotný rozklad lze dále dělit na tři typy: [51]

Povrchová eroze

Implantovaný materiál je postupně přeměňován pouze na povrchu, jelikož množství vody, která reaguje společně s esterovými skupinami, neproniká skrz celý polymer. Výsledkem je následné vnější ztenčování materiálu vlivem volného difundování odbouraných monomerů a oligomerů z obalové vrstvy implantátu. [51,52]

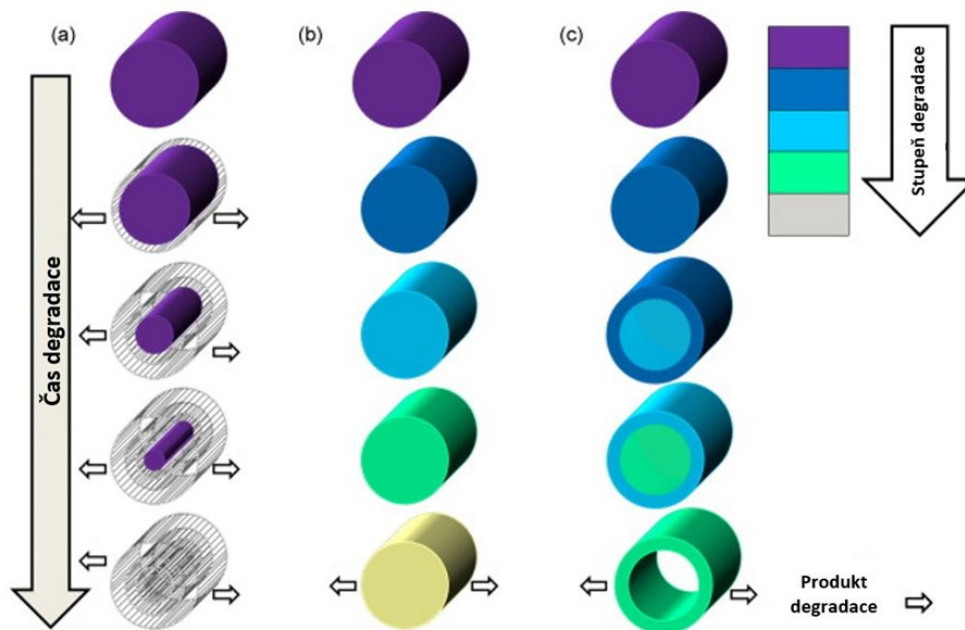
Objemová degradace

Další typ degradace nastává, pokud voda proniká do objemu celého implantátu, kdy dochází k rozkladu povrchu a také vnitřních částí struktury. Difúzí odštěpených monomerů a oligomerů z vnitřních a vnějších částí materiálu dochází k dosažení rovnováhy, která vede k rovnoměrnému rozkladu na povrchu i ve vnitřní části konstruktů. [51]

Objemová degradace s autokatalýzou

Důležitým faktorem při objemové degradaci je umožnění difundování monomerních a oligomerních skupin vnitřních částí materiálu, jelikož v případě porušení rovnováhy dochází k tvorbě interní autokatalýzy. Vnější část se stále stabilně rozpadá, avšak vnitřní část je vlivem hromadění karboxylových skupin přeměněna na kyselé prostředí, které kinetiku rozkladu urychlují. Výsledkem je vytvoření duté struktury, která může uvolněním kyselých vedlejších produktů způsobit zánětlivou reakci organismu. [51,53]

Grafické znázornění rozpadu materiálu při odlišných typech degradace lze vidět na Obr. 2.



Obr. 2 – a) Povrchová eroze, b) Objemová degradace, c) objemová degradace s autokatalýzou

2.2 Elektroaktivní polymery

Mezi syntetické polymery lze také zařadit nově zkoumané a aplikačně nadějně polymery se schopnostmi dočasně nebo permanentně měnit tvar a vlastnosti na základě reakce na vnější stimulace. Materiál může tedy ovlivňovat řada fyzikálních jevů, které na něj působí magnetickým, optickým, tepelným, chemickým nebo elektrickým polem. V důsledku zdokonalování reakce materiálu na elektrické stimulace se do popředí dostávají elektroaktivní polymery (EAP), které umožňují vlivem elektrické excitace měnit strukturu materiálu. Některé EAP také prokazují schopnost vyvolávat elektrickou odpověď na základě mechanického namáhání. Většina dosavadních sestavených přístrojů určená k posuvným akcím jsou tvořena komplexními komponenty, které by mohly být nahrazeny EAP pro zlepšení energetické náročnosti, velikosti a váhy pohybového aparátu. Vzhledem k aktivačnímu mechanismu lze EAP rozdělit na elektronické (polem aktivované) a iontové typy. [54] Před popisem samotných typů EAP je však nutné popsat jevy, které mohou nastat při aktivaci materiálu.

Přímý a vratný piezoelektrický jev

Při působení tlaku na materiál, který vytváří elektrický náboj nebo napětí se jedná o přímý piezoelektrický jev, který byl objeven v roce 1880 bratry Curie, kteří testovali křemenný krystal. Pokud při vystavení látky elektrickému poli dochází k proporcionální deformaci je tento děj označován za vratný piezoelektrický jev. Po odstranění vlivu elektrického pole je materiál navrácen do původního tvaru [55]

Pyroelektrický jev

Vlivem změny teploty dochází k tvorbě elektrického náboje u určitých materiálů, mezi které lze zařadit piezoelektrické látky s necentrosymetrickou chemickou strukturou. Výsledný náboj je ovlivněn změnou spontánní polarizace. [56,57]

Elektrostriekce

Podobně jako u piezoelektrického jevu je materiál vystaven elektrickému poli, které způsobuje deformaci předmětu. Rozdílem však je nezávislost změny tvaru na směr působícího elektrického pole, jelikož se elektrostriekční materiály vždy deformují pouze v jednom směru. Dále je změna deformace kvadratickou funkcí intenzity působícího elektrického pole, kdy u piezoelektrického jevu se jedná o lineární funkci. [58]

2.2.1 Elektronické EAP

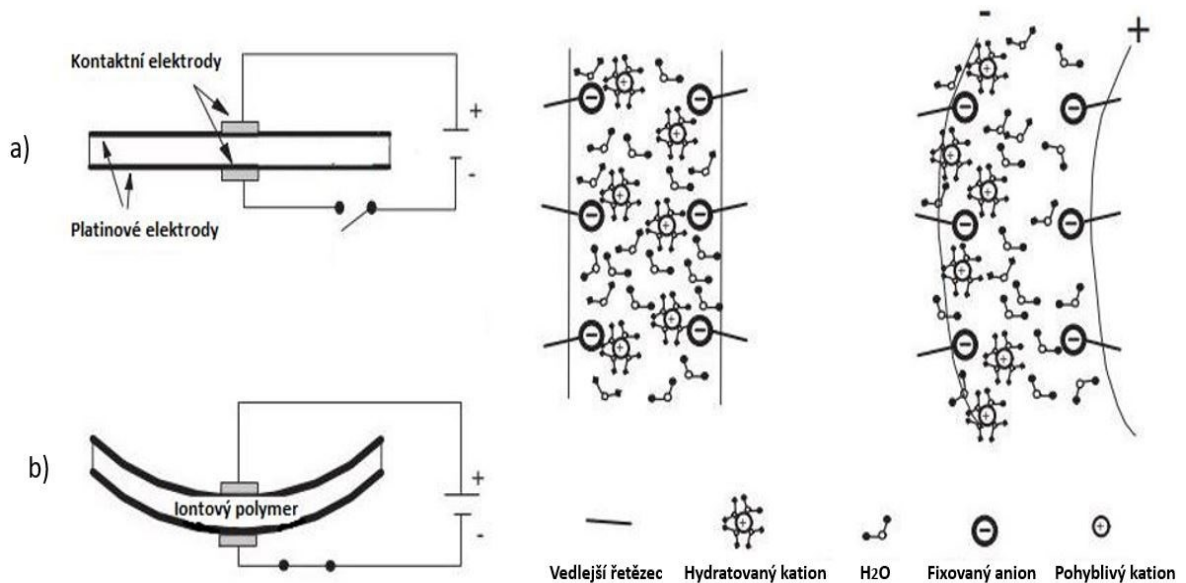
Změna tvaru je způsobena coulombickými silami, které vytvářejí elektrické pole mezi elektrodami. Při vložení polymeru ve formě tenké vrstvy mezi elektrody nastává deformace. Velikost deformace závisí na vlastnostech tenké vrstvy, kdy feroelektrické látky s piezoelektrickým jevem vykazují poměrně nízkou deformaci, zatímco látky s elektrostriekcí mohou dosahovat výrazně větších deformací. [59,60] Pro aktivaci materiálu je však nutné použití vysoké hodnoty napětí, kvůli nízkým hodnotám relativní permitivity (pod hodnotou 10). Relativní permitivita je proto zvyšována tvorbou kompozitních materiálů. Mezi takové řešení patří například vytvoření vrstvy o požadované tloušťce, která je seskládána z několika tenkých vrstev EAP materiálů. Další významnou vlastností elektronických EAP je možnost aktivace deformace ve vzdušném prostředí, která je umožněna vyšší hodnotou energetické hustoty. [55]

Feroelektrické polymery

Jev, při kterém materiály vykazují vytvoření elektrického dipólového momentu v nepřítomnosti vnějšího elektrického pole se nazývá spontánní polarizace. [61] Dipóly v případě dielektrika vznikají za podmínky využití vnějšího elektrického pole, kdy náboje, které mají přibližně stejnou hodnotu jsou přitahovány k opačně nabitým elektrodám tvořící elektrické pole. Směr polarizace feroelektrických materiálů je však při využití vnějšího elektrického pole obrácen. Spontánní polarizace také úzce souvisí s tepelnými změnami materiálu, jelikož ze zvyšující se teplotou dochází postupnému poklesu polarizace. Pro feroelektrické materiály jsou tedy charakteristické dvě fáze, které mezi sebou dělí kritická teplota nazývaná Curieova teplota. Feroelektrická fáze se vyskytuje při teplotách pohybujících se pod kritickou teplotou, zatímco vyšší teploty způsobují přechod do paraelektrické fáze, kdy feroelektrické vlastnosti zcela zanikají. [62] Feroelektrické materiály jsou současně také pyroelektrické a piezoelektrické. [63] Aplikačně se nejvíce využívá polyvinylidenfluorid (PVDF), jelikož při pokojové teplotě vykazuje ze všech feroelektrických polymerů největší elektromechanickou aktivitu. Dále je PVDF využíváno při výrobě kopolymerů poly(vinylidenfluorid-trifluorethylenu) P(VDF-TrFE), které vykazují vyšší míru deformace ovlivněnou zavedením objemné skupiny trifluorethylenu do polymerního řetězce. [64]

2.2.2 Iontové EAP

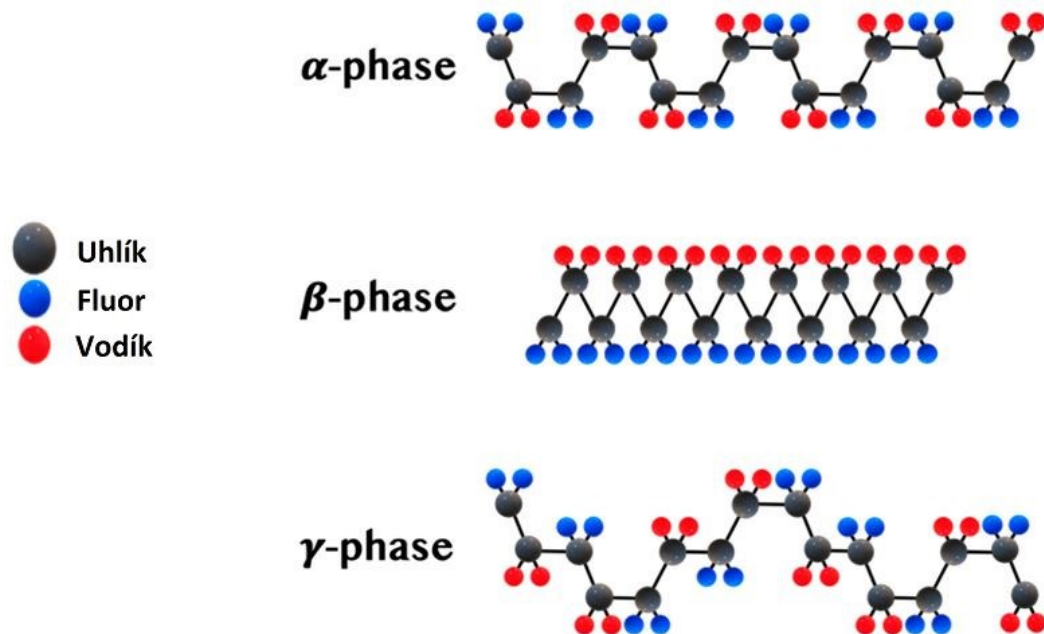
Pomocí difuze nebo pohybu iontů nastává deformace materiálů. Pro tyto polymerní látky je tedy nutné se vyskytovat ve vlhkých prostředích nebo pevných elektrolytech, které obsahují právě potřebné ionty. Při použití elektrického pole dochází k přesunu iontů k příslušným elektrodám. [65,66] Mezi aplikačně nejrozšířenější iontové EAP lze zařadit iontové polymer-kovové kompozity (Ionic Polymer-Metal Composites IPMC), které se využívají v robotickém a vesmírném průmyslu. [67,68] Tenká vrstva polymeru je potažena kovem na obou stranách a následně vystavena nízkým hodnotám napětí, které vytvářejí elektrické pole působící na IPMC (>10 V). Tím se materiál postupně ohýbá, jelikož kationty, které na sebe vážou rozpouštědlo se postupně přemisťují ke katodě, zatímco anionty setrvávají na místě. [69,70] Nevýhodou iontových polymerů je však pomalá rychlost aktivace v rozsahu desítek sekund a nestálost posunutí při použití stejnosměrného proudu. [55] Obr. 3 znázorňuje graficky proces, při kterém dochází k ohebné deformaci IPMC. [71]



Obr. 3 – Proces ohebné deformace IPMC a) Elektrické pole je vypnuté, b) elektrické pole je zapnuté

2.2.3 Poly(vinylidenfluorid)

Jednou z hlavních vlastností feroelektrických polymerů je piezoelektrický jev. Heiji Kawai objevil v roce 1969 piezoelektrické vlastnosti u filmů připravených z poly(vinylidenfluoridu) (PVDF). V porovnání s ostatními zkoumanými polymerními vzorky však byla piezoelektricitá větší. [72] PVDF je semikrystalický polymer s opakující se stavební jednotkou ($\text{CH}_2 - \text{CF}_2$), který je tvořen amorfni a krystalickou částí, která může přecházet do minimálního počtu čtyř odlišných krystalických fází. Tyto fáze se dělí na alfa, beta, gama a delta, které se chemicky uspořádávají podle vazeb do charakteristických konformací. Alfa fáze má konformaci typu trans-gauche-trans-gauche (TGTG), beta fáze typu trans-trans-trans-trans (TTTT), gama a delta fáze typu trans-trans-trans-gauche-trans-trans-trans-gauche (TTTGTTTG). [73,74] Grafické znázornění konformací popisuje Obr. 4. Elektronegativními vlastnostmi fluoru, který výrazně převyšuje hodnoty uhlíku a vodíku dochází k tvorbě dipólových momentů v řetězcích PVDF. Alfa fáze, která se skládá do TGTG konformace způsobuje nulový dipólový moment, jelikož atomy fluoru jsou naproti sobě a navzájem se vyrušují. Zatímco beta fáze se skládá do TTTT konformace a atomy fluoru jsou v paralelním uspořádání, které je odpovědné za největší hodnotu dipólového momentu. [75] PVDF je využíváno při výrobě senzorů, nanogenerátorů nebo technologií na přeměnu energie. [76]



Obr. 4 – Konformace alfa, beta a gama krystalické fáze PVDF

2.2.4 Poly(vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen)

Využitím kopolymeru poly(vinylidenfluorid-trifluorethylen) [P(VDF-TrFE)] jako prepolymeru pro kopolymeraci s monomerem chlortrifluorethylenem (CTFE) lze dosáhnout tvorby terpolymeru poly(vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen) [P(VDF-TrFE-CTFE)]. Přidáním CTFE monomeru dochází k vytváření ojedinělých nano-krystalů, které vytvářejí defekty způsobující změnu konformace z paralelní trans-trans na střídavou trans-gauche konformaci. Dlouhé rovinné řetězce jsou tak v určitých místech narušeny gauche konformací pozměňující síly, kterými na sebe krystalické struktury vzájemně působí. Výsledná struktura P(VDF-TrFE-CTFE) tedy vykazuje větší hodnoty elektrostrikce než připravené kopolymery s odlišnými objemnými skupinami v řetězci, jelikož vlivem strukturní přeměny krystalických fází dochází k nahodilejším výsledným směrům dipólových momentů. [77,78]

2.2.5 Využití PVDF v tkáňovém inženýrství

Výhodné piezoelektrické vlastnosti PVDF umožňují široké rozmezí aplikací v oblasti TI. Tyto vlastnosti mohou být dále vylepšeny zvětšením zastoupení krystalické beta fáze. Toho lze docílit při využití techniky elektrospinningu, která umožňuje natahování materiálu v elektrickém poli. Výsledný materiál následně obsahuje zvětšený podíl beta fáze vlivem většího zarovnání polymerního řetězce. Při mechanické deformaci dochází k produkci

elektrického náboje, který umožňuje stimulaci při opravě poškozené tkáně, jelikož podporuje proliferaci a adhezi buněk. Mezi rozšířené aplikace v TI s využitím PVDF a kopolymerů PVDF patří oprava kostních defektů pomocí trojrozměrných scaffoldů. [79] Dalšími nadějnými odvětvími TI zabývající se léčbou poškozených tkáních jsou srdeční, nervové a svalové inženýrství. [80,81]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 MATERIÁLY A METODY

3.1 Použité materiály chemikálie

Práce je založena na kombinaci syntetických polymerů PCL a P(VDF-TrFE-CTFE) pro dosažení takové tiskové směsi, která je reprodukovatelně tisknutelná do požadovaných tvarů. V této práci je polymer P(VDF-TrFE-CTFE) označován pod názvem tPVDF.

V této práci byl použit PCL ve formě bílých vloček od firmy Corbion pod obchodním názvem PURASORB® PC 12. Elektroaktivní polymer tPVDF je využíván ve formě bílého prášku od firmy Arkema Piezotech pod obchodním názvem PIEZOTECH® RT-TS. Výrobce dále uvádí obsah monomerních částí terpolymeru:

- VDF – 60,9 mol %
- TrFE – 30,7 mol %
- CTFE – 8,5 mol %

Pro společné rozpuštění obou syntetických polymerů při přípravě tiskových směsí bylo použito rozpouštědlo N,N-Dimethylformamid (DMF) od firmy Sigma-Aldrich. s čistotou 99,8 %.

K přípravě fyziologického roztoku, pro sledování stability vybraných tištěných mřížek, byl použit bílý prášek od společnosti Sigma-Aldrich s obchodním názvem Dulbecco's Phosphate Buffered Saline pro přípravu fosfátem pufovaného solného roztoku (PBS).

K dosažení zvýšení mísitelnosti polymerů ve formě blendů byly využity částice titaničitanu strontnatého (SrTiO_3) ve formě bílého prášku s čistotou 99 % od firmy Sigma-Aldrich.

K buněčným testům byly využity myší embryonální fibroblasty (ATCC CRL-1658 NIH/3T3, USA) a kultivační médium obsahující Dulbecco's Modified Eagle's Medium (PAA Laboratories GmbH, Rakousko), telecí sérum (BioSera, Francie). Kultivační směs dále obsahovala antibiotika Penicillin/Streptomycin (GE Healthcare HyClone, Velká Británie) s koncentrací 100 $\mu\text{g/ml}$.

3.2 Příprava roztoků

3.2.1 Tiskové směsi

Roztoky byly připraveny rozpuštěním PCL a tPVDF ve společném rozpouštědle DMF pro vytvoření 30 hm. % směsí. Při navažování jednotlivých syntetických polymerů byl upravován váhový poměr mezi polymery k dosažení hodnot 1:1, 1:4 a 4:1 tPVDF:PCL. Navážené směsi společně s přidaným rozpouštědlem byly poté rozpouštěny v lázni při 50 °C po dobu 50 minut za stálého míchání pomocí magnetického míchadla. Takto připravené tiskové směsi byly následně využity při extruzním 3D tisku.

3.2.2 Fyziologické roztoky

Za účelem zkoumání vlivu fyziologického prostředí na vybrané tištěné mřížky byl připraven fyziologický roztok pomocí rozpuštění obsahu sáčku s PBS v jednom litru vody. Mřížky po vložení do připravených roztoků byly následně přemístěny do horkovzdušných sušáren s nastavenou teplotou 37 °C po dobu 3 nebo 7 dnů.

3.3 Příprava blendů

Pomocí mikrohnětiče byly připraveny odlišné verze blendů určené pro termoplastický tisk. Při přípravě blendů byla teplota nastavena na 120 °C. Při sypání materiálů do mikrohnětiče bylo po dobu 1 minuty nastaveno 50 otáček za minutu (RPM) a po nasypání vzorků byly otáčky navýšeny na 100 RPM po dobu 4 minut. Takto byly připraveny blendy o různých hmotnostních poměrech polymerů o objemech 15 cm³:

- Čisté PCL
- tPVDF:PCL [1:4]
- tPVDF:PCL [1:4] + částice SrTiO₃ (1 hm. %)

3.4 Buněčné testy

V rámci zkoumání vlivu vzorků na buněčné linie myších fibroblastů byly mřížky napřed sterilizovány pomocí 70 % ethanolu po dobu 20 minut a následně ozařovány UV z obou stran po dobu 30 minut. Koncentrace buněčné suspenze činila 1×10^5 buněk na mililitr kultivačního média. Celková buněčná proliferace poté probíhala po dobu 3 dnů.

3.5 Použité přístroje

3.5.1 3D tiskárna Bio X

Pro tisk mřížek byla využita tiskárna Bio X od firmy Cellink, která umožňuje tisk 3D objektů různých tvarů pomocí softwaru obsahující předdefinované STL soubory. Tiskárna poskytuje možnost využití odlišných typů tiskových hlav, trysek a jehel. Dále lze pomocí nastavení tisku upravovat jednotlivé tiskové parametry: rychlost tisku, velikost tlaku, hustotu výplně, teplotu podložky a hlavy. Při práci s tiskovými směsmi připravenými z roztoků byly použity tiskové hlavy určené pro pneumatický mikroextruzní tisk. Pro potřebu zahřívání a ochlazování směsi byla využita hlava opatřená ventilátorem. Dále při práci s blendy byla využita termoplastická hlava, která umožňuje ohřev v teplotním intervalu 50 až 240 °C.

3.5.2 Skenovací elektronový mikroskop

Pro sledování povrchu vytištěných mřížek pomocí 3D tiskárny byl využit skenovací elektronový mikroskop (SEM) Phenom Pro od firmy Phenom World. Vytištěné mřížky byly před vložením do SEM připevněny na terčík pomocí uhlíkové pásky. Následně byly připravené vzorky mřížek pokovovány směsí kovů zlata a paládia za přítomnosti argonu v naprašovacím zařízení SC7620 Mini od společnosti Quorum Technologies po dobu 60 sekund při 10 až 20 mA. Pokovené vzorky byly pomocí stačeného vzduchu očištěny od nečistot a částic prachu. Následně byly vzorky vloženy do držáku pro vodivé vzorky, který byl umístěn do komory SEM. Mřížky byly poté postupně pozorovány pomocí detektoru zpětně odražených elektronů se zvětšením 500×, 1000× a 2000× při urychlovacím napětí 10 kV a režimu zobrazení Image. SEM byl také využit pro prvkovou analýzu vybraného typu blendy, kdy bylo použito urychlovací napětí 15 kV a režim zobrazení Mapping.

3.5.3 Digitální mikroskop

Pro makroskopické zobrazení vytištěných mřížek byl využit digitální mikroskop Dino – Lite AM4815ZT od společnosti Dino-Lite. Mikroskop umožňuje zobrazení se zvětšením 20× až 220×. Snímky z digitálního mikroskopu byly pořízeny pomocí softwaru DinoCapture 2.0.

3.5.4 Konfokální mikroskop

Pro sledování vlivu vybraných strukturovaných tištěných objektů na buněčné chování byl použit rastrovací konfokální mikroskop Olympus FLUOVIEW FV3000 od společnosti Olympus. Pro barevnou vizualizaci buněk byla použita fluorescenční barviva Hoechst

33258 (značení buněčných jader) a ActinRed 555 (značení buněčného cytoskeletu). Vzorokly s přítomnými buňkami byly pozorovány při zvětšení 4×, 10× a 40×.

3.5.5 FTIR spektrometr

Chemická analýza vzorků mřížek byla provedena pomocí FTIR spektrometru Nicolet iS5 od firmy Thermo Fisher Scientific. Pomocí spektrometru byla provedena měření technikou ATR s germaniovým krystalem. Při analýze každého vzorku bylo pořízeno 32 skenů v rozlišení 4 cm⁻¹ s rozsahem vlnové délky 600 až 4000 cm⁻¹.

3.6 Analýza velikosti pórů

3.6.1 ImageJ

Ke stanovení velikosti pórů u vybraných tištěných mřížek byl využit software ImageJ vyvinutý National Institutes of Health and the Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (LOCI). Pro statistické vyhodnocení byly využity snímky porézních struktur ze SEM. Pomocí funkce analýzy částic v ImageJ byla vyhodnocena velikost a četnost pórů.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Tisk mřížek z blendů pomocí termoplastické extruze

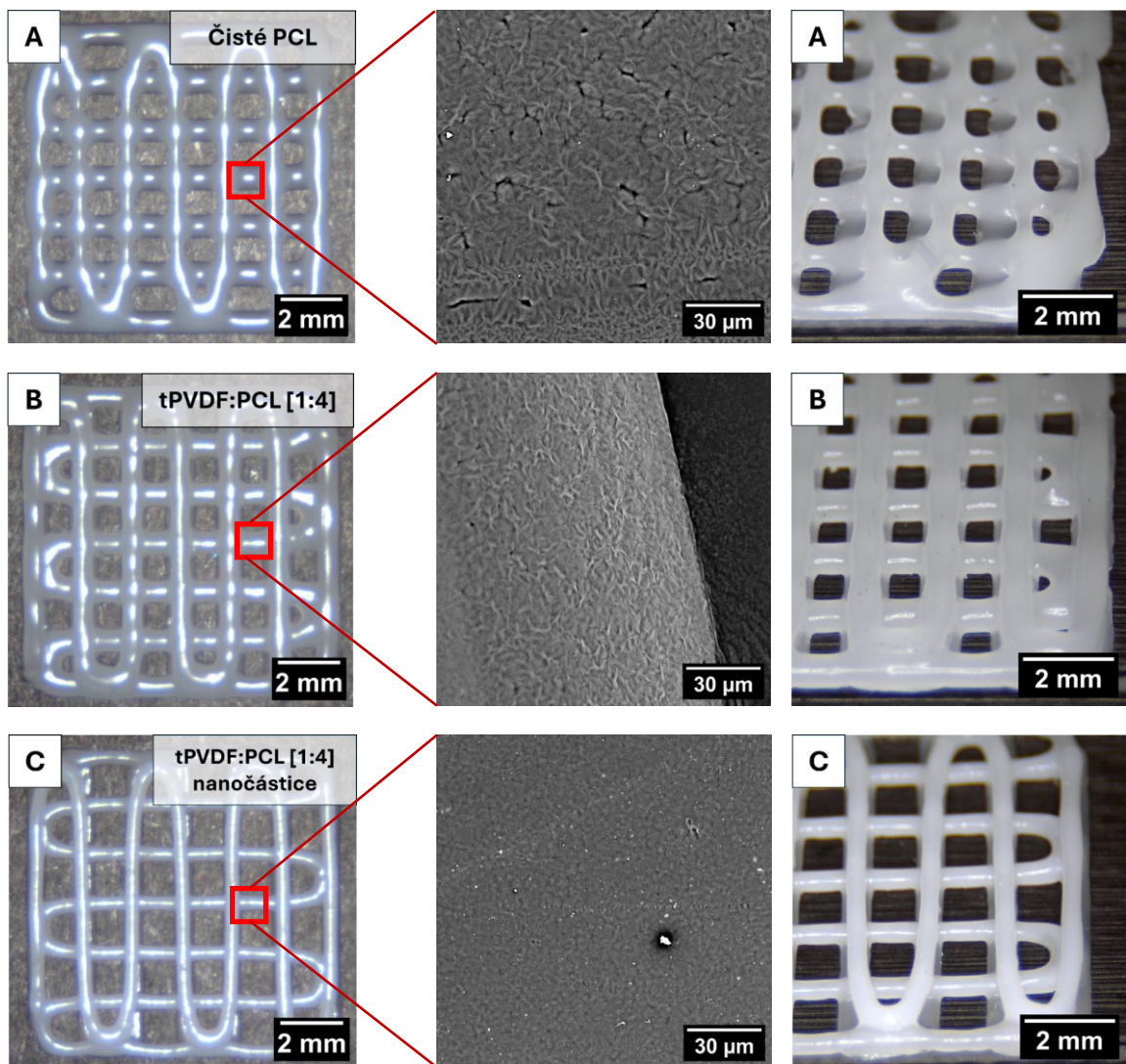
Pro přípravu tištěných mřížek byla využita termoplastická hlava umožňující zahřátí blendů na teplotu tání a tím převedení z pevného stavu do tisknutelného. Při optimalizaci tisku byly sledovány především: průměr vytlačovací trysky, teplota tiskové směsi, teplota tiskové podložky a vytlačovací tlak. Ideální tiskové parametry pro jednotlivé tiskové směsi jsou uvedeny v Tab. 1. Tisk všech mřížek byl proveden pomocí trysky umožňující přesnější nanášení materiálu. Využitý tlak pro vytlačování tiskové směsi byl nastaven na maximální hodnotu 700 kPa, jelikož viskozita směsi převedených do tavenin neumožňovala souvislou extruzi materiálu při nižších hodnotách. Viskozita materiálu byla snížena nastavením teploty tiskové hlavy na hodnotu 130 °C. Další navyšování teploty vedlo k postupné degradaci materiálu. K zajištění postupného tuhnutí materiálu pro optimalizaci adheze jednotlivých vrstev byla podložka tiskárny vyhřívána na teplotu 60 °C. Rychlost tisku byla nastavena na hodnotu 1 mm/s. Důvodem nízké rychlosti tisku bylo nedostatečné množství vytlačovaného materiálu při zvýšení rychlosti.

Výsledná struktura mřížek byla pozorována z makroskopického hlediska pomocí digitálního mikroskopu. K porovnání změny povrchu mezi rozdílnými typy blendů na mikroskopické úrovni byl využit SEM (viz. Obr. 5).

Během tisku byly využity odlišné typy blendů za účelem pozorování mísitelnosti polymerů tPVDF a PCL. Hmotnostní poměry polymerů byly stanoveny na základě zkušeností získaných při práci se směsmi určenými pro roztokový tisk. Ke zlepšení mísitelnosti byly využity nanočástice titaničitanu strontnatého. Při porovnání snímků vzorku tPVDF:PCL 1:4 (Obr. 5 B) a snímku vzorku tPVDF:PCL 1:4 (Obr. 5 C) s nanočásticemi lze pozorovat úbytek sférolitických struktur a zlepšení homogenizace materiálu u vzorků s částicemi titaničitanu strontnatého. Využití nanočástic ke zlepšení kompatibilizace polymerů také potvrzuje současná literatura. [82]

Tab. 1 – Parametry tisku mřížek z blendů

Vzorek	Typ blendu	Teplota podložky [°C]	Teplota hlavy [°C]	Průměr trysky [mm]	Tlak [kPa]	Rychlost tisku [mm/s]
A	Čisté PCL	60	130	0,4	700	1
B	tPVDF:PCL [1:4]					
C	tPVDF:PCL [1:4] nanočástice					



Obr. 5 – Snímky z digitálního mikroskopu z vrchního pohledu vlevo, profilového pohledu vpravo a snímky ze SEM uprostřed. Značení vzorků A-C odpovídá pojmenování vzorků v Tab. 1.

4.1.1 Chemická analýza mřížek z blendů

Chemická analýza tištěných vzorků blendů byla provedena pomocí FTIR spektroskopie. Měření byla nastavena v rozsahu 400 až 4000 cm^{-1} pro každý typ blendu a čistý prášek tPVDF slisovaný do tablety. Samostatná spektra naměřených čistých látek polymerů byla využita ke srovnání charakteristických peaků s ostatními blendy na Obr. 6.

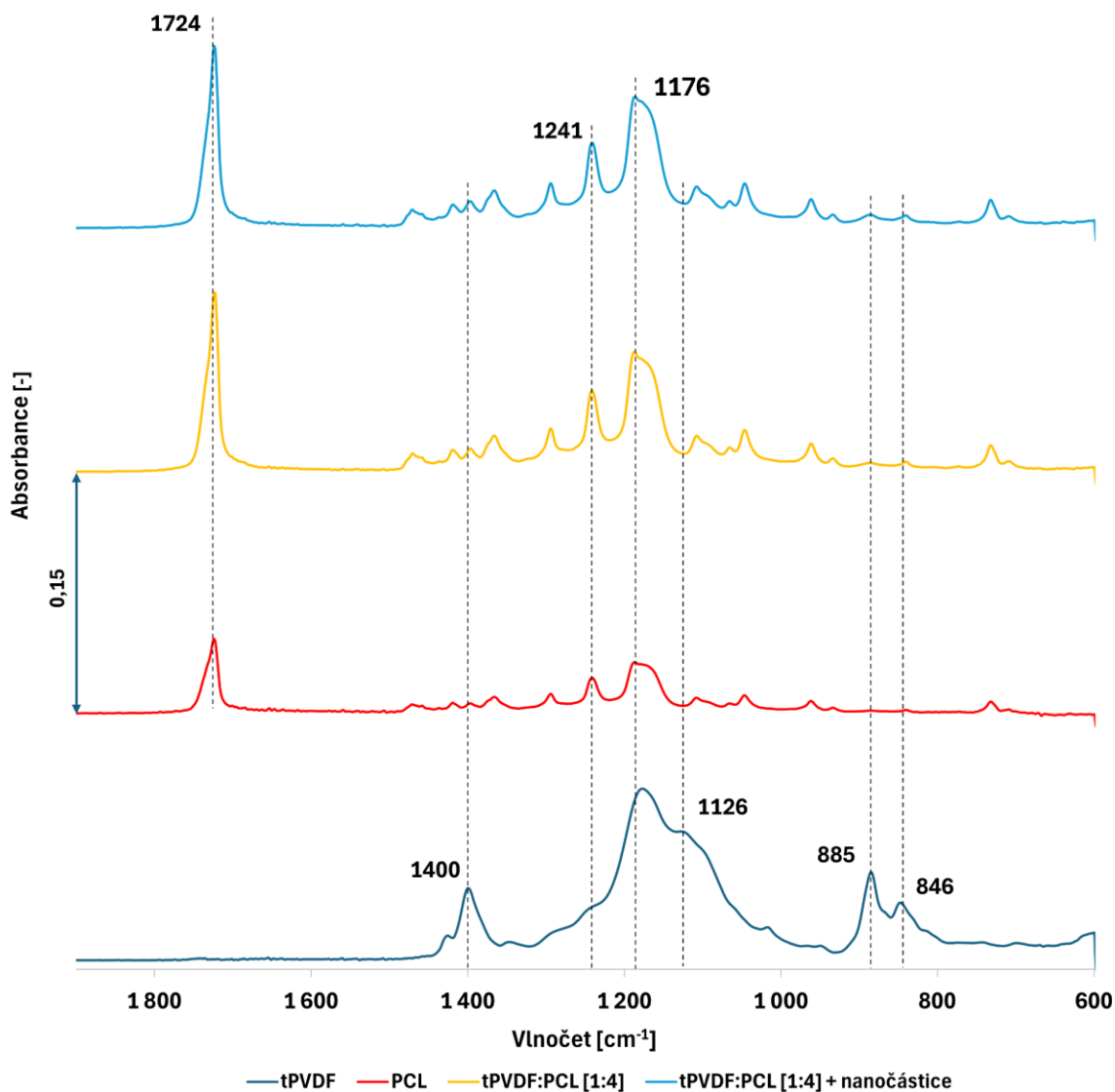
Z výsledných měření vyplývá, že s přibývajícím poměrem PCL dochází ke výraznému nárůstu peaků při vlnočtech 1724, 1241 a 1176 cm^{-1} . Nejvyšší peak u PCL a Blendů je charakteristický pro natahování skupiny C=O vlivem vibrace. Zbylé označené peaky mohou potvrzovat vibrace skupin C-O a C-C v krystalických a amorfních fázích. [83,84]

Při měření peaků tPVDF byl pozorován nízký nárůst peaků při kombinaci s PCL. Možným vysvětlením je snížený obsah tPVDF v blendech s majoritním zastoupením PCL. Peak v oblasti vlnočtu 885 cm^{-1} naznačuje kolébavý pohyb skupin CH_2 , zatímco peak při 846 cm^{-1} popisuje vibrace mimo rovinu skupiny CH. Výrazné peaky při 1400, 1176 a 1126 cm^{-1} jsou charakteristické pro vibrace skupiny CF beta a gama krystalické fáze. [85]

Z důvodů nemožnosti identifikace přítomnosti nanočástic SrTiO_3 pomocí spektroskopických metod (z důvodu velmi nízké koncentrace a možnému překrývání specifických peaků) byla využita prvková analýza povrchu vzorku pomocí SEM. Vzorky tištěných mřížek byly před vložením do komory pokoveny paládiem a zlatem. Stanovené hodnoty zastoupení prvků u mřížek s obsahem nanočástic popisuje Tab. 2. Prvková analýza potvrzuje přítomnost SrTiO_3 ve zkoumaném vzorku.

Tab. 2 – Prvková analýza mřížek z blendů s nanočásticemi

Protonové číslo prvku	Značka prvku	Název prvku	Atomová koncentrace	Hmotnostní koncentrace
6	C	Uhlík	75,241	65,566
8	O	Kyslík	18,625	21,622
9	F	Fluor	5,373	7,407
17	Cl	Chlor	0,350	0,901
22	Ti	Titan	0,058	0,200
38	Sr	Stroncium	0,094	0,601
79	Au	Zlato	0,259	3,704



Obr. 6 – Naměřená spektra látek využitých při tisku mřížek z blendů.

4.2 Tisk mřížek z roztoků pomocí pneumatické extruze

Experiment byl zahájen přípravou 30 hm % roztoků s odlišnými hmotnostními poměry 1:1, 4:1 a 1:4 tPVDF:PCL. Pro převedení práškových vzorků polymerů na tiskovou směs bylo využito společné rozpouštědlo DMF. Tiskové směsi ve formě roztoků byly poté využity při tisku mřížek pomocí pneumatické extruze. Během experimentu byla sledována závislost hmotnostních poměrů polymerů a teploty tiskových směsí na povrch a kvalitu mřížek.

4.2.1 Vliv hmotnostních poměrů polymerů na tisk a povrch mřížek

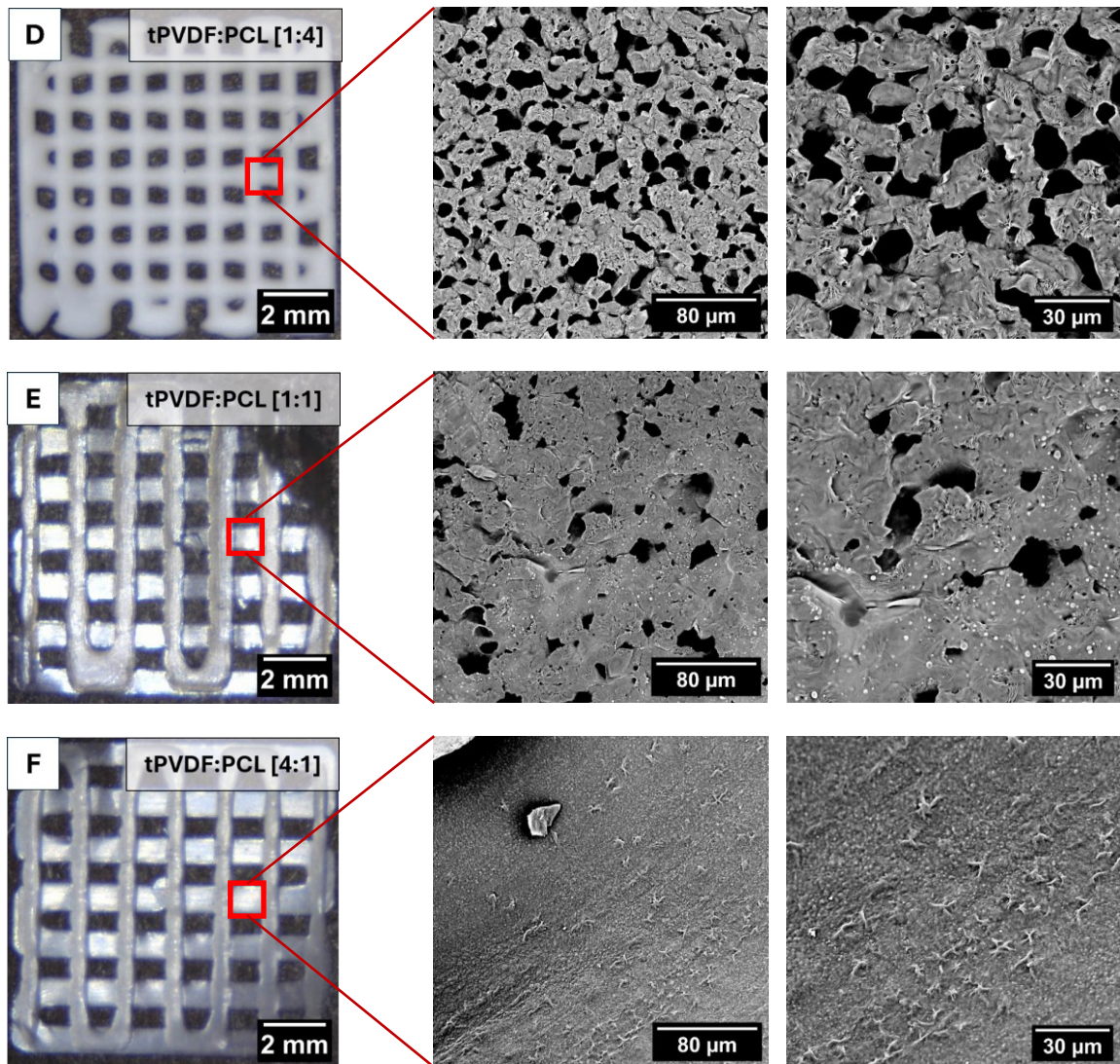
Roztoky při tisku vykazovaly rozdílné vlastnosti viskozity způsobující nutnost optimalizace parametrů tisku pro každou směs zvlášť (viz. Tab. 3). Sledované parametry tisku byly stejné jako v případě tisku mřížek z blendů. Při nejnižším hmotnostním zastoupení tPVDF měly směsi optimální viskozitu, která umožňovala vytlačování materiálu skrze jehlu. Pomocí tohoto způsobu byly získány mřížky s nepřerušovanou strukturou nanášeného materiálu. Viskozita však způsobovala nutnost využití maximální hodnoty tlaku 700 kPa pro vytlačení směsi skrze tenkou jehlu. S postupným nárůstem hmotnostního zastoupení tPVDF bylo však vlivem zvýšené viskozity náročné nadále využívat jehlu. Namísto jehly byla použita špička umožňující extruzi při výrazně nižších hodnotách tlaku. Nevýhodou špičky byla menší přesnost nanášeného materiálu. Tisková hlava byla ve všech případech využita bez zahřívání pro zajištění postupného odpaření DMF z tisknuté mřížky až po procesu tisku.

Tab. 3 - Parametry tisku mřížek s rozdílnými hmotnostními poměry polymerů

Vzorek	Poměr tPVDF:PCL	Průměr jehly/trysky [mm]	Tlak [kPa]	Rychlost tisku [mm/s]
D	1:4	0,2	700	1
E	1:1	0,26	20	
F	4:1	0,26	35	

Povrchová struktura tištěných mřížek z odlišných hmotnostních poměrů polymerů byla analyzována pomocí SEM. Hlavními sledovanými parametry povrchové struktury byly porozita a mísitelnost polymerů. Při porovnání struktur mřížek tPVDF:PCL 1:4 (Obr. 7 D) a tPVDF:PCL 4:1 (Obr. 7 F) lze pozorovat výrazný rozdíl mezi mřížkami s nejnižším (vysoce porézní) a nejvyšším hmotnostním zastoupením tPVDF (žádná porozita), zatímco v případě stejného váhového poměru látek u mřížky tPVDF:PCL 1:1 má struktura mírnou porozitu s rozdílnými velikostmi pórů (Obr. 7 E) a objevují se tu drobné kulovité částice, které mohou patřit agregátům sférolitických struktur tPVDF [86]. U vzorku tPVDF:PCL 4:1 je možné na povrchu pozorovat zvrásnění a opět drobné kulovité výstupky, které se zde vyskytují ve větší míře než v porovnání se vzorkem tPVDF:PCL 1:1, což by mohlo být způsobeno větším podílem tPVDF ve směsi. Ve všech případech lze nalézt výraznou tvorbu sférolitických struktur.

Makroskopický vzhled vytištěných mřížek byl pozorován pomocí digitálního mikroskopu. Při porovnání snímků jednotlivých mřížek lze sledovat zřetelný pokles transparentnosti u mřížky tPVDF:PCL 1:4 s nejnižším hmotnostním podílem tPVDF, kdy tento jev je možné vysvětlit výraznou porozitou materiálu, neboť póry o velikosti dosahující jednotek mikrometrů na povrchu mřížky mohou vlivem své drsnosti zvyšovat index lomu a tím způsobovat větší rozptyl světla. (viz. Obr. 7). [87]



Obr. 7 – Snímky z digitálního mikroskopu z vrchního pohledu vlevo, snímky ze SEM uprostřed a vpravo. Značení vzorků D-F odpovídá pojmenování vzorků v Tab. 3.

4.2.2 Vliv teploty tiskové směsi na tisk a povrch mřížek

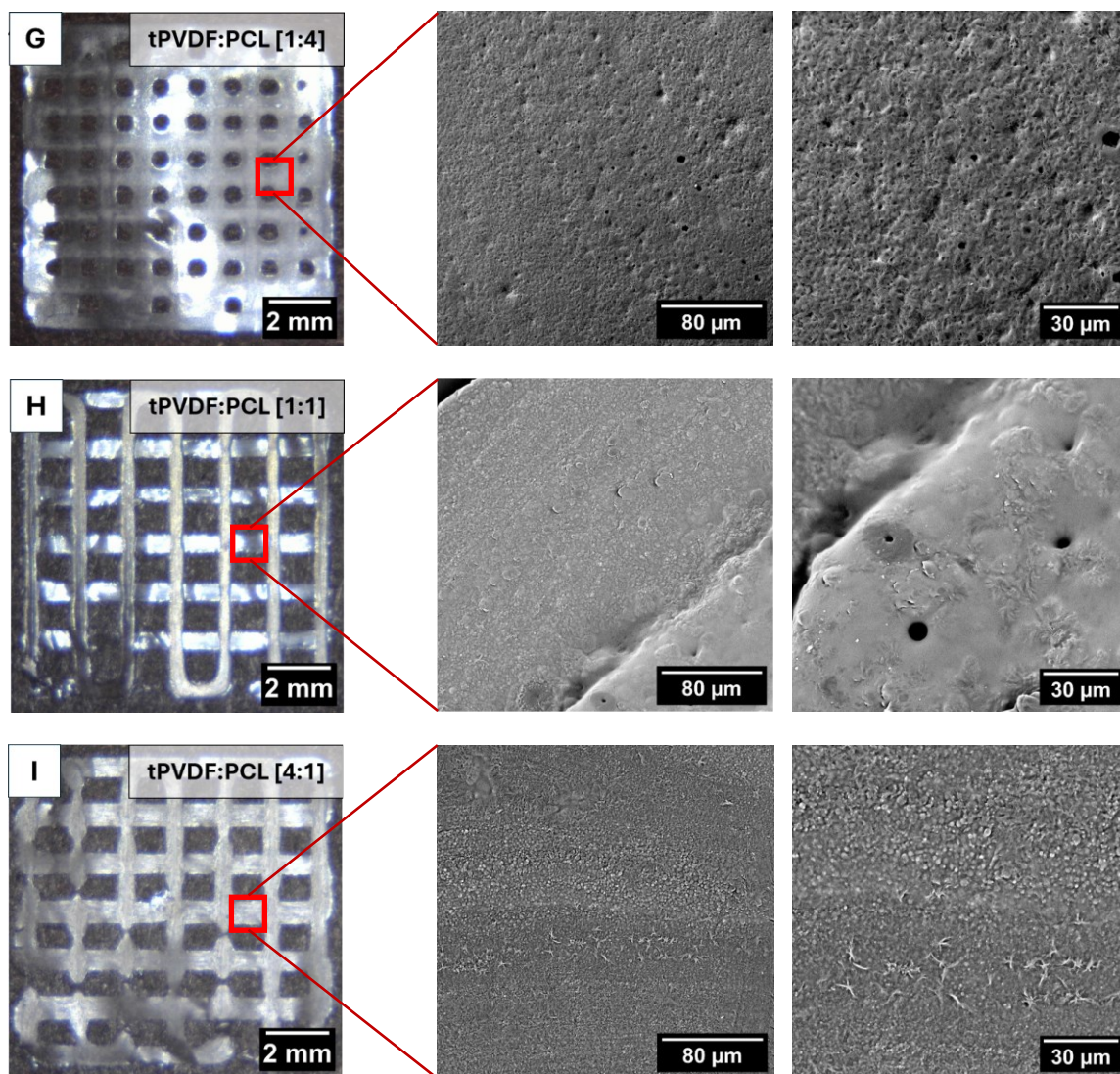
Ke snížení viskozitních vlastností byla využita tisková hlava umožňující zahřívání. Zvýšením teploty byl umožněn tisk při nižších hodnotách tlaku u roztoků s hmotnostními poměry 1:1 a 4:1 tPVDF:PCL. Směsi s nejnižším zastoupením tPVDF nadále umožňovaly tisk pomocí jehly za použití maximálního tlaku 700 kPa. Upravené parametry tisku vlivem teploty jsou zobrazeny v Tab. 4. Všechny tiskové směsi s rostoucí teplotou však vykazovaly snížené schopnosti udržovat stálou výšku a tvar vytlačovaného materiálu.

Tab. 4 – Parametry tisku mřížek s rozdílnými hmotnostními poměry polymerů při zahřívání tiskové směsi

Vzorek	Poměr tPVDF:PCL	Průměr jehly/trysky [mm]	Tlak [kPa]	Rychlost tisku [mm/s]	Teplota hlavy [°C]
G	1:4	0,2	700	1	60
H	1:1	0,26	10		
I	4:1	0,26	30		

Pomocí SEM byl zaznamenán významný vliv teploty na výslednou strukturu mřížek (viz Obr. 8). Všechny struktury vykazují nízkou míru porozity, avšak v případě vzorku tPVDF:PCL 4:1 (Obr. 8 I) měla nastavená teplota nízký vliv vzhledem k téměř totožné struktuře s tisknutým vzorkem bez zahřívání o stejném polymerním poměru (Obr. 7 F). Opět jsou zde viditelné kulovité částice patřící s největší pravděpodobností agregátům sférolitů tPVDF. Menší množství pórů je pravděpodobně způsobeno vyšší teplotou tisku, která díky nižší viskozitě směsi zvyšuje kinetiku fázové separace, což vede k termodynamicky stabilnějšímu stavu, který se však ve výsledku projeví menší porozitou. [88]

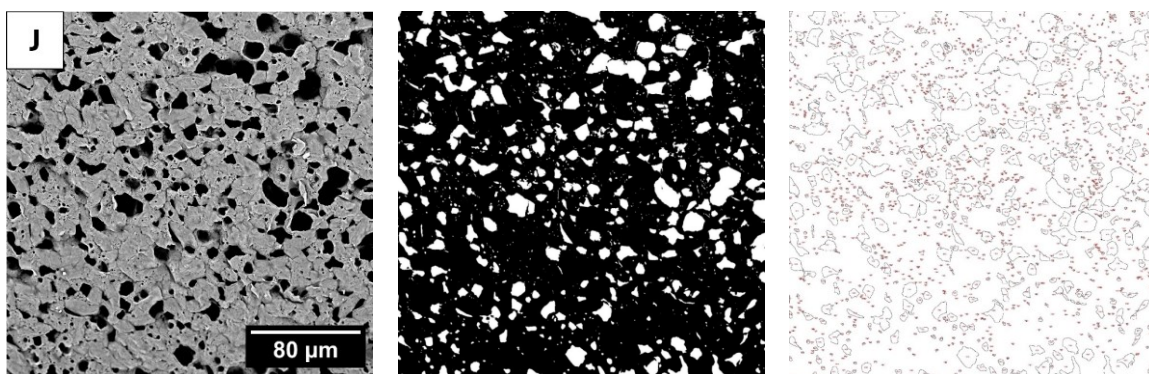
Digitálním mikroskopem byla zachycena makroskopická struktura tištěných mřížek. Vzorek tPVDF:PCL 1:4 vlivem zvýšené teploty směsi při tisku projevuje větší míru transparentnosti. Vzorky tPVDF:PCL 1:1 a 4:1 vizuálně zůstaly nezměněny (Viz. Obr. 8).



Obr. 8 – Snímky z digitálního mikroskopu z vrchního pohledu vlevo, snímky ze SEM uprostřed a vpravo. Značení vzorků G-I odpovídá pojmenování vzorků v Tab. 4.

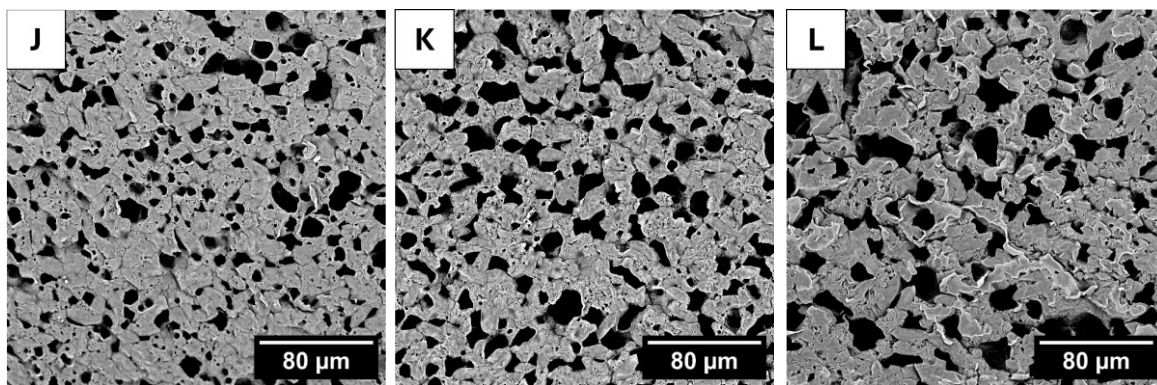
4.2.3 Analýza velikosti pórů

S ohledem na získané výsledky z měření povrchu odlišných typů roztoků na strukturu povrchu vzorku byla vybrána mřížka tvořená nejnižším hmotnostním podílem tPVDF pro analýzu distribuce pórů. Důvodem výběru tohoto polymerního poměru byla vlastnost roztoku při tisku bez zahřívání tvořit výrazný pórovitý povrch, který by mohl mít pozitivní vliv na buněčnou proliferaci. Stanovení velikosti a četnosti pórů bylo provedeno pomocí funkce programu ImageJ umožňující analýzu velikosti částic. Díky analýze četnosti a velikosti pórů z plochy $267 \times 267 \mu\text{m}$ vzorku ve třech místech bylo zjištěno, že průměrný počet pórů je 1600, průměrná plocha pokrytá póry je $16000 \mu\text{m}^2$ (22 %) a průměrná velikost pórů je $10,1 \mu\text{m}^2$ (viz Tab. 5). Principem funkce v tomto případě je změření bílé plochy zvýrazňující póry. Plocha neobsahující póry je zvýrazněna černou barvou. Pomocí nastavení úrovně prahové hodnoty lze barevně zvýraznit nebo zeslabit oblasti ve snímku jež do analýzy velikosti pórů ne/spadají. Pro docílení přesnějších výsledků byla analýza provedena ze třech snímků zobrazující odlišná místa povrchu vzorků, které byly tisknuty při shodném složení a parametrech jako vzorek tPVDF:PCL 1:4 (Obr. 7 D) z Tab. 3. Snímky jednotlivých povrchů vzorků ze SEM a grafické znázornění postupu analýzy znázorňuje Obr. 9 a Obr. 10.



Obr. 9 – Vlevo – snímek ze SEM, uprostřed – prahová hodnota zobrazení pórů (z ImageJ), vpravo – obrysy a číslování jednotlivých pórů (z ImageJ).

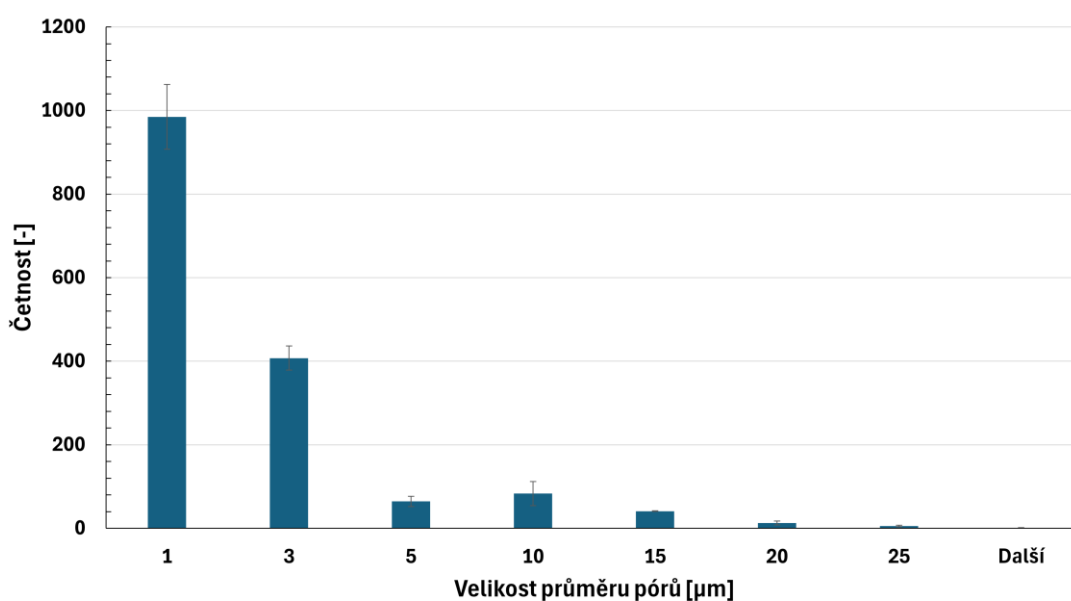
Výsledná data analýzy popisující plochu jednotlivých pórů byla následně pro zjednodušení považována za kruhové útvary. Pro každý snímek byla pomocí vztahu popisující obsah kruhu určena velikost průměru pórů. Ze stanovených hodnot průměrů byly sestaveny třídy určující rozsah velikostí. Pro každou třídu byl vypočten průměr ze všech snímků pomocí počtu pórů odpovídajících velikostnímu intervalu. Průměrné hodnoty počtu pórů v jednotlivých třídách popisuje Obr. 11.



Obr. 10 - Snímky ze SEM zobrazující homogenitu povrchu vzorku tPVDF:PCL (1:4), T_{tisku} = laboratorní teplota.

Tab. 5 – Analýza velikosti částic

Vzorek	Počet [-]	Celková plocha pokrytá póry [μm^2]	Průměrná plocha pórů [μm^2]	Plocha pokrytí pórů [%]
J	1699	13544,48	7,97	18,96
K	1497	18368,92	12,27	25,58
L	1604	16234,11	10,12	22,78
Souhrn	1600 ± 60	16000 ± 1400	$10,1 \pm 1,3$	22 ± 2



Obr. 11 – Histogram distribuce velikosti průměru pórů ze vzorku J, K a L

4.3 Biokompatibilita mřížek s vysokou porozitou

Na základě získaných dat z tisku pomocí blendů a roztoků byla pro hodnocení míry biokompatibility mřížek tištěných pneumatickou extruzí bez zahřívání vybrána tisková směs tvořená roztokem s hmotnostním poměrem 1:4 tPVDF:PCL. Hlavními důvody výběru daného poměru polymerů a způsobu tisku byla reprodukovatelnost tisku mřížek a zvýšená porozita povrchu oproti ostatním vzorkům. Převládající množství PCL oproti tPVDF ve směsi dále umožňovalo předvídat zlepšenou biokompatibilitu materiálu, jelikož se běžně v literatuře uvádí jako běžná složka přicházející do styku s odlišnými typy tkání v různých formách. [89–91] Následující části popisují vystavování mřížek prostředí simulující živé tkáně a interakcím s buněčnými kulturami.

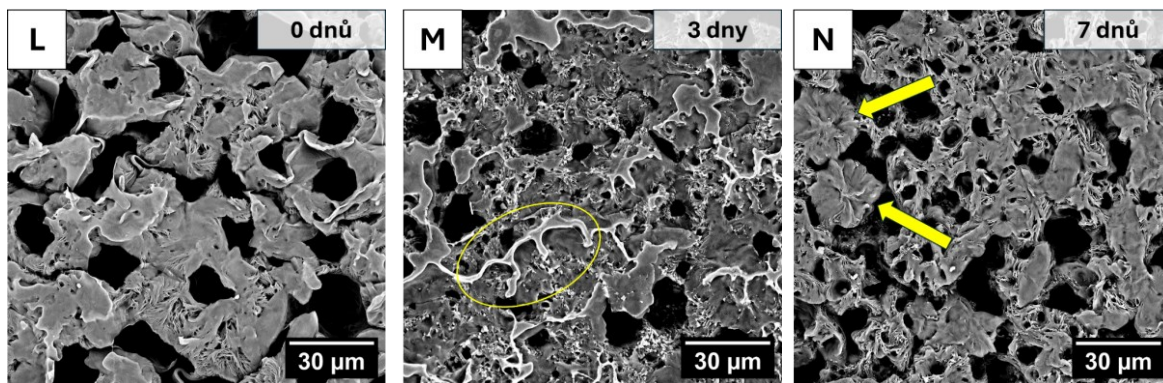
4.3.1 Stabilita mřížek ve fyziologickém roztoku

V rámci experimentu byly mřížky vystaveny působení fyziologickému roztoku v kontrolovaném prostředí. Mřížky byly společně s roztoky vloženy do horkovzdušných sušáren nastavených na teplotu 37 °C po dobu 3 a 7 dnů. Po uplynutí stanoveného času pro každý typ experimentu byly mřížky vyjmuty z roztoku a vloženy do digestoře pro kompletní vysušení na dobu 24 hodin při laboratorní teplotě. Po vysušení byly povrchy mřížek studovány pomocí SEM. Cílem experimentu bylo zkoumání vlivu simulovaného prostředí živých organismů na strukturu mřížky. Snímky povrchu vzorků ze SEM zobrazuje Obr. 12. Žluté kruhové označení u vzorku M zobrazuje zbylé části svrchní vrstvy mřížky, zatímco žluté šipky u vzorku N popisují dva výrazně viditelné sférolity.

Při porovnání mřížek na Obr. 12 lze s rostoucím časem vidět postupný úbytek materiálu ze svrchních vrstev. Dobu interakce mřížek s fyziologickým roztokem popisuje Tab. 6.

Tab. 6 – Parametry experimentu stability mřížek

Vzorek	Poměr tPVDF:PCL	Doba vystavení [d]	Teplota [°C]
K	1:4	0	24
L		3	37
M		7	

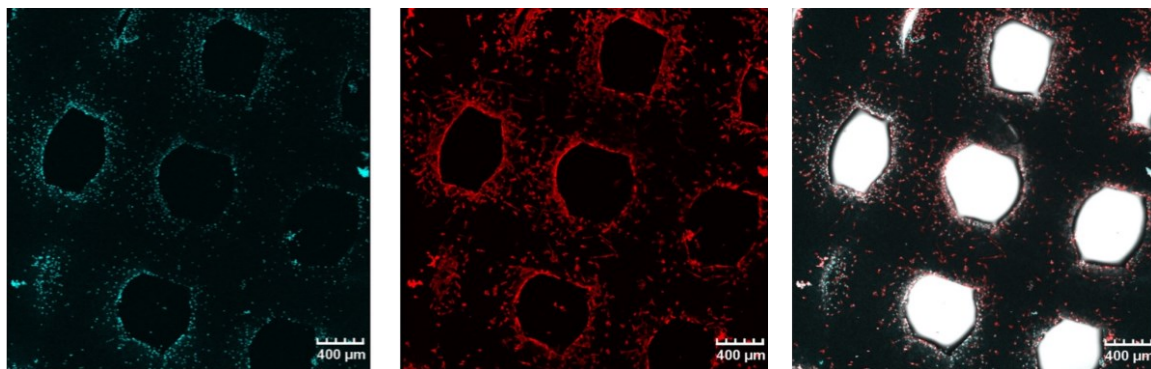


Obr. 12 – Snímky povrchů mřížek ze SEM vystavených fyziologickému roztoku při teplotě 37 °C. Značení vzorků L-N odpovídá pojmenování vzorků s dobou vystavení z Tab. 6.

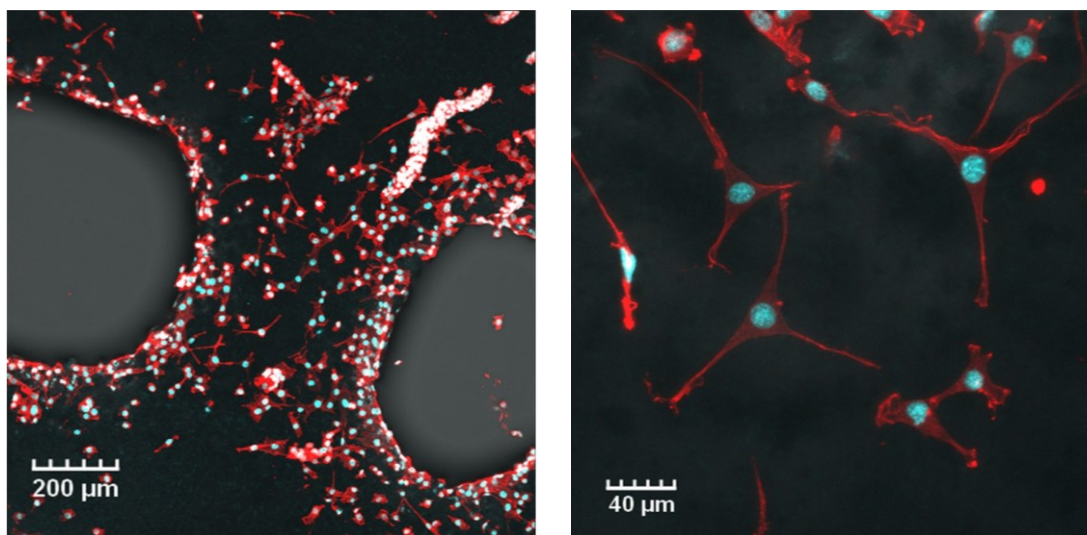
4.3.2 Testy buněčné proliferace

Interakce mřížky s buněčnými kulturami je významným faktorem při stanovení biokompatibility. K testům buněčné proliferace byly využity myší fibroblasty, které byly do vybraných mřížek umístěny a kultivovány v bioreaktorech ve spolupráci s Ing. Kateřinou Skopalovou, PhD z Centra polymerních systémů UTB Zlín. Kultivované buňky byly pozorovány za statických podmínek pomocí konfokálního mikroskopu. Vizuální zvýraznění buněk ve struktuře mřížek bylo provedeno pomocí fluorescenčního značení. K označení buněčných jader bylo využito modré fluorescenční barvivo Hoechst 33258, buněčný cytoskelet byl obarven pomocí červeného barviva ActinRed 555. Vizuální vzhled jednotlivých využitých barev prezentuje Obr. 13.

Ze snímků zachycujících rozložení značného množství buněk na povrchu je patrné, že připravené substráty nejsou cytotoxické a dochází zde k buněčné proliferaci. Při zvětšení 40× lze pozorovat měnící se tvar cytoskeletu naznačující protahování (Obr. 14). Z literatury je známo, že remodelace cytoskeletu fibroblastů ovlivňuje pozitivně buněčnou migraci [92] a potenciálně tedy můžeme očekávat vyšší účinnost v procesech, jako je regenerace tkání. [93]



Obr. 13 – Fluorescenční značení využité k obarvení buněk. Vlevo modře obarvená buněčná jádra, uprostřed červeně obarvené buněčné cytoskelety a vpravo výsledná kombinace barev.



Obr. 14 – Snímky myších fibroblastů z konfokálního mikroskopu za statických podmínek.

ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na optimalizaci tiskových parametrů, způsobu přípravy tiskové směsi a stanovení vlivu hmotnostních poměrů polymerů na kvalitu výsledných vzorků mřížek, která byla sledována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) a digitálního mikroskopu. Využitými polymery v této práci byly poly(vinylidenfluorid-trifluoroethylen-chlorotrifluoroethylen) (tPVDF) a polykaprolakton (PCL).

Pomocí mikrohňetiče byly připraveny blendy polymerů tPVDF: PCL v poměru 1:4, kdy jeden typ blendu obsahoval nanočástice titaničitanu strontnatého (SrTiO_3). Tyto směsi byly zpracovány pomocí termoplastického tisku z taveniny do vícevrstevných mřížek. Vliv nanočástic na strukturu výtisků byl pozorován pomocí SEM. Ze snímků byla patrná zvýšená homogenizace směsi oproti blendům bez nanočástic. Chemická analýza byla následně měřena pomocí FTIR spektroskopie a prvkové analýzy SEM. Z naměřených dat byla potvrzena přítomnost PCL, tPVDF a SrTiO_3 .

Dále byla provedena optimalizace tiskových parametrů u 30% roztoků polymerů s rozpouštědlem N,N-Dimethylformamid (DMF) a byl pozorován vliv hmotnostních poměrů polymerů na výslednou strukturu pro dosažení požadovaných kvalit mřížek s možností reprodukovatelnosti celého procesu. Z dosažených výsledků bylo zjištěno, že s rostoucím hmotnostním poměrem tPVDF v tiskové směsi dochází k nárůstu viskozity, jež znemožňuje využití jehly k přesnému tisku materiálu. Naopak při tisku mřížek s vyšším zastoupením PCL byla tisková směs méně viskózní a umožňovala přesnější nanášení materiálu. Dále při analýze struktury pomocí SEM vykazovaly mřížky se stejným a vyšším poměrem PCL porézní povrch. Pomocí digitálního mikroskopu byly mřížky pozorovány z makroskopického pohledu. Tiskové směsi s poměrem 1:4 tPVDF:PCL vykazovaly největší porozitu a byla prokázána reprodukovatelnost výsledného výtisku.

Dalším krokem bylo stanovení vlivu teploty na tiskové parametry a povrchovou strukturu mřížek. Při tisku bylo pozorováno snížení viskozity tiskových směsí u roztoků se shodným a vyšším poměrem tPVDF:PCL. Zvýšená teplota však způsobovala roztékání nanášené směsi. Pomocí SEM byla pozorována snížená porozita ve všech případech hmotnostních poměrů.

Analytické vyhodnocení velikostí pórů bylo provedeno u vybraných vzorků tPVDF:PCL 1:4 pomocí funkce v softwaru ImageJ. Z výsledků je patrné, že největší zastoupení na povrchu mřížek mají póry o velikostech do 1 μm .

Nakonec byla testována stabilita ve fyziologickém roztoku a schopnost buněčné proliferace myších embryonálních fibroblastů u mřížek z hmotnostními poměry tPVDF:PCL 1:4. Test stability ve fyziologických roztocích probíhal při zvýšené teplotě 37 °C po dobu 3 a 7 dnů. Důvodem vyšší teploty byla snaha simulovat prostředí při kterém se běžně *in vitro* testy provádějí. Pomocí SEM byla pozorována degradace svrchních vrstev materiálu, jež s rostoucím časem potvrzovaly změnu v povrchové struktuře materiálu. I po testu stability však testované vzorky vykazovaly vysokou porozitu. Buněčná proliferace fibroblastů na vybraných vzorcích byla zachycena pomocí konfokálního mikroskopu. Snímky potvrzují výraznou buněčnou proliferaci po celé mřížce, což potvrzuje že použitá směs polymerů není cytotoxická. Zároveň cytoskelet fibroblastů vykazoval protáhlý tvar potvrzující vhodné využití těchto materiálových směsí v tkáňovém inženýrství.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] R.M. Nerem, CHAPTER 2 - THE CHALLENGE OF IMITATING NATURE, in: R.P. Lanza, R. Langer, J. Vacanti (Eds.), *Principles of Tissue Engineering (Second Edition)*, Academic Press, San Diego, 2000: pp. 9–15. DOI:10.1016/B978-012436630-5/50006-4.
- [2] J.P. Vacanti, C.A. Vacanti, CHAPTER 1 - THE HISTORY AND SCOPE OF TISSUE ENGINEERING, in: R.P. Lanza, R. Langer, J. Vacanti (Eds.), *Principles of Tissue Engineering (Second Edition)*, Academic Press, San Diego, 2000: pp. 3–7. DOI:10.1016/B978-012436630-5/50005-2.
- [3] E. Bell, TISSUE ENGINEERING IN PERSPECTIVE, in: R.P. Lanza, R. Langer, J. Vacanti (Eds.), *Principles of Tissue Engineering (Second Edition)*, Academic Press, San Diego, 2000: pp. xxxv–xli. DOI:10.1016/B978-012436630-5/50004-0.
- [4] M.P. Nikolova, M.S. Chavali, Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review, *Bioact Mater* 4 (2019) 271–292. DOI:10.1016/j.bioactmat.2019.10.005.
- [5] Q. Yu, Y. Han, T. Tian, Q. Zhou, Z. Yi, J. Chang, C. Wu, Chinese sesame stick-inspired nano-fibrous scaffolds for tumor therapy and skin tissue reconstruction, *Biomaterials* 194 (2019) 25–35. DOI:10.1016/j.biomaterials.2018.12.012.
- [6] C. Li, C. Guo, V. Fitzpatrick, A. Ibrahim, M.J. Zwierstra, P. Hanna, A. Lechtig, A. Nazarian, S.J. Lin, D.L. Kaplan, Design of biodegradable, implantable devices towards clinical translation, *Nat Rev Mater* 5 (2020) 61–81. DOI:10.1038/s41578-019-0150-z.
- [7] K.N. Ekdahl, J.D. Lambris, H. Elwing, D. Ricklin, P.H. Nilsson, Y. Teramura, I.A. Nicholls, B. Nilsson, Innate immunity activation on biomaterial surfaces: A mechanistic model and coping strategies, *Adv Drug Deliv Rev* 63 (2011) 1042–1050. DOI:10.1016/j.addr.2011.06.012.
- [8] A.E. Engberg, J.P. Rosengren-Holmberg, H. Chen, B. Nilsson, J.D. Lambris, I.A. Nicholls, K.N. Ekdahl, Blood protein-polymer adsorption: Implications for understanding complement-mediated hemoincompatibility, *J Biomed Mater Res A* 97A (2011) 74–84. DOI:10.1002/jbm.a.33030.
- [9] B.D. Ratner, Chapter 3 - The Biocompatibility of Implant Materials, in: S.F. Badylak (Ed.), *Host Response to Biomaterials*, Academic Press, Oxford, 2015: pp. 37–51. DOI:10.1016/B978-0-12-800196-7.00003-7.
- [10] J.M. Anderson, 9.19 - Biocompatibility, in: K. Matyjaszewski, M. Möller (Eds.), *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, Elsevier, Amsterdam, 2012: pp. 363–383. DOI:10.1016/B978-0-444-53349-4.00229-6.
- [11] S.K. Parupelli, S. Saudi, N. Bhattarai, S. Desai, 3D printing of PCL-ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering applications, *Int J Bioprint X* (2023). DOI:10.36922/ijb.0196.
- [12] C. Jiao, D. Xie, Z. He, H. Liang, L. Shen, Y. Yang, Z. Tian, G. Wu, C. Wang, Additive manufacturing of Bio-inspired ceramic bone Scaffolds: Structural Design, mechanical properties and biocompatibility, *Mater Des* 217 (2022) 110610. DOI:10.1016/j.matdes.2022.110610.

- [13] Y. Yang, G. Wang, H. Liang, C. Gao, S. Peng, L. Shen, C. Shuai, Additive manufacturing of bone scaffolds, *Int J Bioprint* 5 (2018) 148. DOI:10.18063/ijb.v5i1.148.
- [14] L. Malladi, A. Mahapatro, A.S. Gomes, Fabrication of magnesium-based metallic scaffolds for bone tissue engineering, *Materials Technology* 33 (2018) 173–182. DOI:10.1080/10667857.2017.1404278.
- [15] J.L. Gilbert, 1.3.3 - Metals: Basic Principles, in: W.R. Wagner, S.E. Sakiyama-Elbert, G. Zhang, M.J. Yaszemski (Eds.), *Biomaterials Science (Fourth Edition)*, Academic Press, 2020: pp. 205–227. DOI:10.1016/B978-0-12-816137-1.00017-9.
- [16] L. Da, M. Gong, A. Chen, Y. Zhang, Y. Huang, Z. Guo, S. Li, J. Li-Ling, L. Zhang, H. Xie, Composite elastomeric polyurethane scaffolds incorporating small intestinal submucosa for soft tissue engineering, *Acta Biomater* 59 (2017) 45–57. DOI:10.1016/j.actbio.2017.05.041.
- [17] O. Janoušková, Synthetic polymer scaffolds for soft tissue engineering., *Physiol Res* 67 (2018).
- [18] P. Sawadkar, M. Nandin, K. Patel, J. Buitrago, T.-H. Kim, P. Rajasekar, F. Lali, C. Kyriakidis, B. Rahmani, J. Mohanakrishnan, R. Dua, K. Greco, J.-H. Lee, H.-W. Kim, J. Knowles, E. García-Gareta, Three dimensional porous scaffolds derived from collagen, elastin and fibrin proteins orchestrate adipose tissue regeneration, *J Tissue Eng* 12 (2021) 1–17. DOI:10.1177/20417314211019238.
- [19] M.H.R. Magno, J. Kim, A. Srinivasan, S. McBride, D. Bolikal, A. Darr, J.O. Hollinger, J. Kohn, Synthesis, degradation and biocompatibility of tyrosine-derived polycarbonate scaffolds, *J Mater Chem* 20 (2010) 8885–8893. DOI:10.1039/C0JM00868K.
- [20] E.R. Wagner, J. Parry, M. Dadsetan, D. Bravo, S.M. Riester, A.J. Van Wijnen, M.J. Yaszemski, S. Kakar, VEGF-mediated angiogenesis and vascularization of a fumarate-crosslinked polycaprolactone (PCLF) scaffold, *Connect Tissue Res* 59 (2018) 542–549. DOI:10.1080/03008207.2018.1424145.
- [21] U. Jammalamadaka, K. Tappa, Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering, *J Funct Biomater* 9 (2018). DOI:10.3390/jfb9010022.
- [22] F.J. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today* 14 (2011) 88–95. DOI:10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [23] W. Friess, M. Schlapp, Sterilization of gentamicin containing collagen/PLGA microparticle composites, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 63 (2006) 176–187. DOI:10.1016/j.ejpb.2005.11.007.
- [24] P. yadav, G. Beniwal, K.K. Saxena, A review on pore and porosity in tissue engineering, *Mater Today Proc* 44 (2021) 2623–2628. DOI:10.1016/j.matpr.2020.12.661.
- [25] M. Khajehmohammadi, R. Azizi Tafti, H. Nikukar, Effect of porosity on mechanical and biological properties of bioprinted scaffolds, *J Biomed Mater Res A* 111 (2023) 245–260. DOI:10.1002/jbm.a.37455.
- [26] R. Teimouri, K. Abnous, S.M. Taghdisi, M. Ramezani, M. Alibolandi, Surface modifications of scaffolds for bone regeneration, *Journal of Materials Research and Technology* 24 (2023) 7938–7973. DOI:10.1016/j.jmrt.2023.05.076.

- [27] A.A. Kulkarni, P.S. Rao, Synthesis of polymeric nanomaterials for biomedical applications, in: *Nanomaterials in Tissue Engineering*, Elsevier, 2013: pp. 27–63. DOI:10.1533/9780857097231.1.27.
- [28] M. Bartos, MICRO-CT IN TISSUE ENGINEERING SCAFFOLDS DESIGNED FOR BONE REGENERATION: PRINCIPLES AND APPLICATION, *Ceramics - Silikaty* (2018) 194–199. DOI:10.13168/cs.2018.0012.
- [29] M. Guvendiren, J. Molde, R.M.D. Soares, J. Kohn, Designing Biomaterials for 3D Printing, *ACS Biomater Sci Eng* 2 (2016) 1679–1693. DOI:10.1021/acsbiomaterials.6b00121.
- [30] M.V. Varma, B. Kandasubramanian, S.M. Ibrahim, 3D printed scaffolds for biomedical applications, *Mater Chem Phys* 255 (2020) 123642. DOI:10.1016/j.matchemphys.2020.123642.
- [31] Y. Yan, H. Chen, H. Zhang, C. Guo, K. Yang, K. Chen, R. Cheng, N. Qian, N. Sandler, Y.S. Zhang, H. Shen, J. Qi, W. Cui, L. Deng, Vascularized 3D printed scaffolds for promoting bone regeneration, *Biomaterials* 190–191 (2019) 97–110. DOI:10.1016/j.biomaterials.2018.10.033.
- [32] X. Wang, M. Jiang, Z. Zhou, J. Gou, D. Hui, 3D printing of polymer matrix composites: A review and prospective, *Compos B Eng* 110 (2017) 442–458. DOI:10.1016/j.compositesb.2016.11.034.
- [33] Y.H. Cho, I.H. Lee, D.-W. Cho, Laser scanning path generation considering photopolymer solidification in micro-stereolithography, *Microsystem Technologies* 11 (2005) 158–167. DOI:10.1007/s00542-004-0468-2.
- [34] M. Hassan, K. Dave, R. Chandrawati, F. Dehghani, V.G. Gomes, 3D printing of biopolymer nanocomposites for tissue engineering: Nanomaterials, processing and structure-function relation, *Eur Polym J* 121 (2019) 109340. DOI:10.1016/j.eurpolymj.2019.109340.
- [35] J. Natarajan, *Advances in Additive Manufacturing Processes*, Bentham Science Publishers, 2021.
- [36] J.K. Placone, A.J. Engler, Recent Advances in Extrusion-Based 3D Printing for Biomedical Applications, *Adv Healthc Mater* 7 (2018). DOI:10.1002/adhm.201701161.
- [37] M.A.S.R. Saadi, A. Maguire, N.T. Pottackal, M.S.H. Thakur, M.Md. Ikram, A.J. Hart, P.M. Ajayan, M.M. Rahman, Direct Ink Writing: A 3D Printing Technology for Diverse Materials, *Advanced Materials* 34 (2022). DOI:10.1002/adma.202108855.
- [38] J.R.H. Sta. Agueda, Q. Chen, R.D. Maalihan, J. Ren, Í.G.M. da Silva, N.P. Dugos, E.B. Caldoná, R.C. Advincula, 3D printing of biomedically relevant polymer materials and biocompatibility, *MRS Commun* 11 (2021) 197–212. DOI:10.1557/s43579-021-00038-8.
- [39] F. Donnalaja, E. Jacchetti, M. Soncini, M.T. Raimondi, Natural and Synthetic Polymers for Bone Scaffolds Optimization, *Polymers (Basel)* 12 (2020) 905. DOI:10.3390/polym12040905.
- [40] A.R. Mclauchlin, N.L. Thomas, Biodegradable polymer nanocomposites, in: *Advances in Polymer Nanocomposites*, Elsevier, 2012: pp. 398–430. DOI:10.1533/9780857096241.2.398.

- [41] M. Dziadek, E. Menaszek, B. Zagrajczuk, J. Pawlik, K. Cholewa-Kowalska, New generation poly(ϵ -caprolactone)/gel-derived bioactive glass composites for bone tissue engineering: Part I. Material properties, *Materials Science and Engineering: C* 56 (2015) 9–21. DOI:10.1016/j.msec.2015.06.020.
- [42] A.K. Ekaputra, Y. Zhou, S.M. Cool, D.W. Hutmacher, Composite Electrospun Scaffolds for Engineering Tubular Bone Grafts, *Tissue Eng Part A* 15 (2009) 3779–3788. DOI:10.1089/ten.tea.2009.0186.
- [43] J. Han, P. Lazarovici, C. Pomerantz, X. Chen, Y. Wei, P.I. Lelkes, Co-Electrospun Blends of PLGA, Gelatin, and Elastin as Potential Nonthrombogenic Scaffolds for Vascular Tissue Engineering, *Biomacromolecules* 12 (2011) 399–408. DOI:10.1021/bm101149r.
- [44] A. Subramanian, U.M. Krishnan, S. Sethuraman, Fabrication, Characterization and In Vitro Evaluation of Aligned PLGA–PCL Nanofibers for Neural Regeneration, *Ann Biomed Eng* 40 (2012) 2098–2110. DOI:10.1007/s10439-012-0592-6.
- [45] L. McKeen, The effect of heat aging on the properties of sustainable polymers, in: *The Effect of Long Term Thermal Exposure on Plastics and Elastomers*, Elsevier, 2021: pp. 313–332. DOI:10.1016/B978-0-323-85436-8.00001-1.
- [46] D. Mao, Q. Li, D. Li, Y. Tan, Q. Che, 3D porous poly(ϵ -caprolactone)/58S bioactive glass–sodium alginate/gelatin hybrid scaffolds prepared by a modified melt molding method for bone tissue engineering, *Mater Des* 160 (2018) 1–8. DOI:10.1016/j.matdes.2018.08.062.
- [47] N. Thadavirul, P. Pavasant, P. Supaphol, Development of polycaprolactone porous scaffolds by combining solvent casting, particulate leaching, and polymer leaching techniques for bone tissue engineering, *J Biomed Mater Res A* 102 (2014) 3379–3392. DOI:10.1002/jbm.a.35010.
- [48] X. Jing, H.-Y. Mi, L.-S. Turng, Comparison between PCL/hydroxyapatite (HA) and PCL/halloysite nanotube (HNT) composite scaffolds prepared by co-extrusion and gas foaming, *Materials Science and Engineering: C* 72 (2017) 53–61. DOI:10.1016/j.msec.2016.11.049.
- [49] H. Danafar, MPEG–PCL copolymeric nanoparticles in drug delivery systems, *Cogent Med* 3 (2016) 1142411. DOI:10.1080/2331205X.2016.1142411.
- [50] L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biodegradable polymers as biomaterials, *Prog Polym Sci* 32 (2007) 762–798. DOI:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.
- [51] M.A. Woodruff, D.W. Hutmacher, The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century, *Prog Polym Sci* 35 (2010) 1217–1256. DOI:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.
- [52] R.M. Ginde, R.K. Gupta, In vitro chemical degradation of poly(glycolic acid) pellets and fibers, *J Appl Polym Sci* 33 (1987) 2411–2429. DOI:10.1002/app.1987.070330712.
- [53] J. Bergsma, Late degradation tissue response to poly(ϵ -lactide) bone plates and screws, *Biomaterials* 16 (1995) 25–31. DOI:10.1016/0142-9612(95)91092-D.
- [54] Y. Bar-cohen, Electroactive polymers as artificial muscles - Reality and challenges, in: *19th AIAA Applied Aerodynamics Conference*, American Institute of Aeronautics and Astronautics, Reston, Virginia, 2001. DOI:10.2514/6.2001-1492.

- [55] Y. Bar-Cohen, V.F. Cardoso, C. Ribeiro, S. Lanceros-Méndez, Electroactive Polymers as Actuators, in: *Advanced Piezoelectric Materials*, Elsevier, 2017: pp. 319–352. DOI:10.1016/B978-0-08-102135-4.00008-4.
- [56] D. Zhang, H. Wu, C.R. Bowen, Y. Yang, Recent Advances in Pyroelectric Materials and Applications, *Small* 17 (2021). DOI:10.1002/smll.202103960.
- [57] K. Zhang, Y. Wang, Z.L. Wang, Y. Yang, Standard and figure-of-merit for quantifying the performance of pyroelectric nanogenerators, *Nano Energy* 55 (2019) 534–540. DOI:10.1016/j.nanoen.2018.11.020.
- [58] J. Wyrwał, A. Marynowicz, J. Świrska-Perkowska, Variational formulations for boundary problems of electrostriction, *Mechanics of Advanced Materials and Structures* 27 (2020) 1783–1787. DOI:10.1080/15376494.2020.1741748.
- [59] S. Bauer, F. Bauer, Piezoelectric Polymers and Their Applications, in: 2008: pp. 157–177. DOI:10.1007/978-3-540-68683-5_6.
- [60] R. Pelrine, R. Kornbluh, Q. Pei, J. Joseph, High-Speed Electrically Actuated Elastomers with Strain Greater Than 100%, *Science* (1979) 287 (2000) 836–839. DOI:10.1126/science.287.5454.836.
- [61] D. Damjanovic, Ferroelectric, dielectric and piezoelectric properties of ferroelectric thin films and ceramics, *Reports on Progress in Physics* 61 (1998) 1267–1324. DOI:10.1088/0034-4885/61/9/002.
- [62] J.F. Webb, On the Physics of Ferroelectrics, *Sci Prog* 86 (2003) 203–234. DOI:10.3184/003685003783238653.
- [63] X. Qiu, Patterned piezo-, pyro-, and ferroelectricity of poled polymer electrets, *J Appl Phys* 108 (2010). DOI:10.1063/1.3457141.
- [64] Z. Cheng, Q. Zhang, Field-Activated Electroactive Polymers, *MRS Bull* 33 (2008) 183–187. DOI:10.1557/mrs2008.43.
- [65] M. Shahinpoor, Y. Bar-Cohen, J.O. Simpson, J. Smith, Ionic polymer-metal composites (IPMCs) as biomimetic sensors, actuators and artificial muscles - a review, *Smart Mater Struct* 7 (1998) R15–R30. DOI:10.1088/0964-1726/7/6/001.
- [66] I.-S. Park, K. Jung, D. Kim, S.-M. Kim, K.J. Kim, Physical Principles of Ionic Polymer–Metal Composites as Electroactive Actuators and Sensors, *MRS Bull* 33 (2008) 190–195. DOI:10.1557/mrs2008.44.
- [67] X. Yi, A. Chakarvarthy, Z. Chen, Cooperative Collision Avoidance Control of Servo/IPMC Driven Robotic Fish With Back-Relaxation Effect, *IEEE Robot Autom Lett* 6 (2021) 1816–1823. DOI:10.1109/LRA.2021.3060717.
- [68] A. Punning, K.J. Kim, V. Palmre, F. Vidal, C. Plesse, N. Festin, A. Maziz, K. Asaka, T. Sugino, G. Alici, G. Spinks, G. Wallace, I. Must, I. Põldsalu, V. Vunder, R. Temmer, K. Kruusamäe, J. Torop, F. Kaasik, P. Rinne, U. Johanson, A.-L. Peikolainen, T. Tamm, A. Aabloo, Ionic electroactive polymer artificial muscles in space applications, *Sci Rep* 4 (2014) 6913. DOI:10.1038/srep06913.
- [69] M. Yu, H. Shen, Z. Dai, Manufacture and performance of ionic polymer-metal composites, *J Bionic Eng* 4 (2007) 143–149. DOI:10.1016/S1672-6529(07)60026-2.
- [70] L. Chang, Y. Liu, Q. Yang, L. Yu, J. Liu, Z. Zhu, P. Lu, Y. Wu, Y. Hu, Ionic Electroactive Polymers Used in Bionic Robots: A Review, *J Bionic Eng* 15 (2018) 765–782. DOI:10.1007/s42235-018-0065-1.

- [71] M. Shahinpoor, K.J. Kim, Ionic polymer-metal composites: I. Fundamentals, *Smart Mater Struct* 10 (2001) 819–833. DOI:10.1088/0964-1726/10/4/327.
- [72] H. Kawai, The Piezoelectricity of Poly (vinylidene Fluoride), *Jpn J Appl Phys* 8 (1969) 975. DOI:10.1143/JJAP.8.975.
- [73] S.K. Pradhan, A. Kumar, P. Kour, R. Pandey, P. Kumar, M. Kar, A.N. Sinha, Piezoelectric and mechanical properties of PVDF-PZT composite, *Ferroelectrics* 558 (2020) 59–66. DOI:10.1080/00150193.2020.1735889.
- [74] X. Fan, M. Sun, Z. Li, Z. Chen, X. Zhou, Q. Lu, Z. Zhang, Tuning piezoelectric properties of P(VDF-TrFE) films for sensor application, *React Funct Polym* 180 (2022) 105391. DOI:10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105391.
- [75] A. Salimi, A.A. Yousefi, Analysis Method, *Polym Test* 22 (2003) 699–704. DOI:10.1016/S0142-9418(03)00003-5.
- [76] G. Kalimuldina, N. Turdakyn, I. Abay, A. Medeubayev, A. Nurpeissova, D. Adair, Z. Bakenov, A Review of Piezoelectric PVDF Film by Electrospinning and Its Applications, *Sensors* 20 (2020) 5214. DOI:10.3390/s20185214.
- [77] Q. Liu, C. Richard, J.-F. Capsal, Control of crystal morphology and its effect on electromechanical performances of electrostrictive P(VDF-TrFE-CTFE) terpolymer, *Eur Polym J* 91 (2017) 46–60. DOI:10.1016/j.eurpolymj.2017.03.046.
- [78] T.-N. Lam, C.-Y. Ma, P.-H. Hsiao, W.-C. Ko, Y.-J. Huang, S.-Y. Lee, J. Jain, E.-W. Huang, Tunable Mechanical and Electrical Properties of Coaxial Electrospun Composite Nanofibers of P(VDF-TrFE) and P(VDF-TrFE-CTFE), *Int J Mol Sci* 22 (2021) 4639. DOI:10.3390/ijms22094639.
- [79] M.M. Fernandes, D.M. Correia, C. Ribeiro, N. Castro, V. Correia, S. Lanceros-Mendez, Bioinspired Three-Dimensional Magnetoactive Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *ACS Appl Mater Interfaces* 11 (2019) 45265–45275. DOI:10.1021/acsami.9b14001.
- [80] N. Adadi, M. Yadid, I. Gal, M. Asulin, R. Feiner, R. Edri, T. Dvir, Electrospun Fibrous PVDF-TrFe Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering, Differentiation, and Maturation, *Adv Mater Technol* 5 (2020). DOI:10.1002/admt.201900820.
- [81] A.S. Motamedi, H. Mirzadeh, F. Hajiesmaeilbaigi, S. Bagheri-Khoulenjani, M.A. Shokrgozar, Piezoelectric electrospun nanocomposite comprising Au NPs/PVDF for nerve tissue engineering, *J Biomed Mater Res A* 105 (2017) 1984–1993. DOI:10.1002/jbm.a.36050.
- [82] A. Neuman, S. Zhang, D. Lee, R.A. Riggleman, Increases in Miscibility of a Binary Polymer Blend Confined within a Nanoparticle Packing, *Macromolecules* 56 (2023) 954–963. DOI:10.1021/acs.macromol.2c01918.
- [83] E.M. Abdelrazek, A.M. Hezma, A. El-khodary, A.M. Elzayat, Spectroscopic studies and thermal properties of PCL/PMMA biopolymer blend, *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* 3 (2016) 10–15. DOI:10.1016/j.ejbas.2015.06.001.
- [84] A. Elzubair, C.N. Elias, J.C.M. Suarez, H.P. Lopes, M.V.B. Vieira, The physical characterization of a thermoplastic polymer for endodontic obturation, *J Dent* 34 (2006) 784–789. DOI:10.1016/j.jdent.2006.03.002.

- [85] Ye. Bormashenko, R. Pogreb, O. Stanevsky, Ed. Bormashenko, Vibrational spectrum of PVDF and its interpretation, *Polym Test* 23 (2004) 791–796. DOI:10.1016/j.polymertesting.2004.04.001.
- [86] S. Dash, R.N.P. Choudhary, M.N. Goswami, Enhanced dielectric and ferroelectric properties of PVDF-BiFeO₃ composites in 0–3 connectivity, *J Alloys Compd* 715 (2017) 29–36. DOI:10.1016/j.jallcom.2017.04.310.
- [87] N. Wang, D. Xiong, Comparison of micro-/nano-hierarchical and nano-scale roughness of silica membranes in terms of wetting behavior and transparency, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 446 (2014) 8–14. DOI:10.1016/j.colsurfa.2014.01.029.
- [88] D.-T. Tran, J.-P. Méricq, J. Mendret, S. Brosillon, C. Faur, Influence of Preparation Temperature on the Properties and Performance of Composite PVDF-TiO₂ Membranes, *Membranes (Basel)* 11 (2021) 876. DOI:10.3390/membranes11110876.
- [89] S. Behtaj, F. Karamali, E. Masaeli, Y. G. Anissimov, M. Rybachuk, Electrospun PGS/PCL, PLLA/PCL, PLGA/PCL and pure PCL scaffolds for retinal progenitor cell cultivation, *Biochem Eng J* 166 (2021) 107846. DOI:10.1016/j.bej.2020.107846.
- [90] G. El Fawal, H. Hong, X. Mo, H. Wang, Fabrication of scaffold based on gelatin and polycaprolactone (PCL) for wound dressing application, *J Drug Deliv Sci Technol* 63 (2021) 102501. DOI:10.1016/j.jddst.2021.102501.
- [91] M. Petretta, A. Gambardella, M. Boi, M. Berni, C. Cavallo, G. Marchiori, M.C. Maltarello, D. Bellucci, M. Fini, N. Baldini, B. Grigolo, V. Cannillo, Composite Scaffolds for Bone Tissue Regeneration Based on PCL and Mg-Containing Bioactive Glasses, *Biology (Basel)* 10 (2021) 398. DOI:10.3390/biology10050398.
- [92] M.A. Schwartz, A.R. Horwitz, Integrating Adhesion, Protrusion, and Contraction during Cell Migration, *Cell* 125 (2006) 1223–1225. DOI:10.1016/j.cell.2006.06.015.
- [93] B. Majhy, P. Priyadarshini, A.K. Sen, Effect of surface energy and roughness on cell adhesion and growth – facile surface modification for enhanced cell culture, *RSC Adv* 11 (2021) 15467–15476. DOI:10.1039/D1RA02402G.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

TI	Tkáňové inženýrství
ESB	Evropské společnosti pro biomateriály
CAD	Počítačem podporovaný design
UV	Ultrafialové
SLS	Selektivní laserové spékání
DIW	Direct ink writing
PCL	Polykaprolakton
EAP	Elektroaktivní polymery
PVDF	Polyvinylidenfluorid
P(VDF-TrFE)	Poly(vinylidenfluorid-trifluorethylenu)
IPMC	Iontové polymer-kovové kompozity
TGTG	Trans-gauche-trans-gauche
TTTT	Trans-trans-trans-trans
TTTGTTTG	Trans-trans-trans-gauche-trans-trans-trans-gauche
CTFE	Chlortrifluorethylenem
P(VDF-TrFE-CTFE)	Poly(vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen)
tPVDF	Poly(vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen)
VDF	Vinylidenfluorid
TrFE	Trifluorethylen
mol %	Molární procento
DMF	N,N-Dimethylformamid
PBS	Fosfátový pufr s fyziologickým roztokem
SrTiO ₃	Titaničitan strontnatý
hm. %	Hmotnostní procento
RPM	Otáčky za minutu

SEM	Skenovací elektronový mikroskop
FTIR	Fourierova transformační infračervená spektroskopie
ATR	Attenuated Total Reflectance
LOCI	Laboratory for Optical and Computational Instrumentation

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 – Chemická struktura polykaprolaktonu [45]</i>	17
<i>Obr. 2 – a) Povrchová eroze, b) Objemová degradace, c) objemová degradace s autokatalýzou</i>	19
<i>Obr. 3 – Proces ohebné deformace IPMC a) Elektrické pole je vypnuté, b) elektrické pole je zapnuté</i>	22
<i>Obr. 4 – Konformace alfa, beta a gama krystalické fáze PVDF</i>	23
<i>Obr. 5 – Snímky z digitálního mikroskopu z vrchního pohledu vlevo, profilového pohledu vpravo a snímky ze SEM uprostřed. Značení vzorků A-C odpovídá pojmenování vzorků v Tab. 1.</i>	31
<i>Obr. 6 – Naměřená spektra látek využitých při tisku mřížek z blendů</i>	33
<i>Obr. 7 – Snímky z digitálního mikroskopu z vrchního pohledu vlevo, snímky ze SEM uprostřed a vpravo. Značení vzorků D-F odpovídá pojmenování vzorků v Tab. 3.</i>	35
<i>Obr. 8 – Snímky z digitálního mikroskopu z vrchního pohledu vlevo, snímky ze SEM uprostřed a vpravo. Značení vzorků G-I odpovídá pojmenování vzorků v Tab. 4.</i>	37
<i>Obr. 9 – Vlevo – snímek ze SEM, uprostřed – prahová hodnota zobrazení pórů (z ImageJ), vpravo – obrysy a číslování jednotlivých pórů (z ImageJ).</i>	38
<i>Obr. 10 - Snímky ze SEM zobrazující homogenitu povrchu vzorku tPVDF:PCL (1:4), $T_{tisku} = \text{laboratorní teplota}$.</i>	39
<i>Obr. 11 – Histogram distribuce velikosti průměru pórů ze vzorku J, K a L</i>	39
<i>Obr. 12 – Snímky povrchů mřížek ze SEM vystavených fyziologickému roztoku při teplotě 37 °C. Značení vzorků L-N odpovídá pojmenování vzorků s dobou vystavení z Tab. 6.</i>	41
<i>Obr. 13 – Fluorescenční značení využité k obarvení buněk. Vlevo modře obarvená buněčná jádra, uprostřed červeně obarvené buněčné cytoskelety a vpravo výsledná kombinace barev.</i>	42
<i>Obr. 14 – Snímky myších fibroblastů z konfokálního mikroskopu za statických podmínek.</i>	42

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 – Parametry tisku mřížek z blendů	31
Tab. 2 – Prvková analýza mřížek z blendů s nanočásticemi	32
Tab. 3 - Parametry tisku mřížek s rozdílnými hmotnostními poměry polymerů.....	34
Tab. 4 – Parametry tisku mřížek s rozdílnými hmotnostními poměry polymerů při zahřívání tiskové směsi.....	36
Tab. 5 – Analýza velikosti částic	39
Tab. 6 – Parametry experimentu stability mřížek.....	40