

Disertační práce

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

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

Autor: Ing. Markéta Kadlečková

Studijní program: P2808 Chemie a technologie materiálů

Studijní obor: 2808V006 Technologie makromolekulárních látek

Školitel: doc. Ing. Antonín Minařík, Ph.D.  
Konzultant: prof. Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.

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

Zlín, duben 2022

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

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

Práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

Ráda bych poděkovala mému školiteli doc. Ing. Antonínu Minaříkovi, Ph.D. nejen za odborné vedení, konzultace a cenné rady, ale také za čas a podporu jež mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat za podnětné a odborné rady konzultantovi mé práce prof. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D. Můj velký dík patří také celému Ústavu fyziky a materiálového inženýrství za přátelské a pohodové prostředí, které mi zde bylo poskytnuto.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu a pochopení během celého mého studia.

## Abstrakt

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

## Abstract

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

# Obsah

1. Úvod.....	7
2. Současný stav řešené problematiky .....	8
3. Cíle práce .....	10
4. Teoretický rámec.....	11
4.1 Požadované vlastnosti scaffoldů.....	11
4.1.1 Biokompatibilita .....	12
4.1.2 Biodegradabilita .....	13
4.1.3 Mechanické vlastnosti .....	14
4.1.4 Porozita.....	14
4.2 Výrobní technologie scaffoldů.....	15
4.2.1 Odlévání a luhování.....	15
4.2.1 Zpěňování .....	15
4.2.2 Lyofilizace .....	16
4.2.3 Aditivní výroba.....	17
4.2.4 Electrospinning.....	19
4.2.5 Elektrickým polem asistovaný tisk polymerní taveniny (Melt electrowriting) ..	20
4.2.6 Elektrickým polem asistovaný tisk polymerních roztoků (3D jet writing) .....	21
4.3 Biomateriály pro výrobu scaffoldů .....	21
4.3.1 Syntetické polymerní biomateriály.....	22
4.3.2 Přírodní biomateriály.....	25
4.3.3 Smart materiály .....	27
4.4 Vliv povrchu scaffoldu na chování buněk .....	28
5. Experimentální část.....	31
5.1 Materiály.....	31
5.1.1 Polystyren (PS).....	31
5.1.2 Polykaprolakton (PCL).....	32
5.1.3 Poly(vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen) .....	32
5.1.4 Materiály pro SLA, DLP a FDM 3D tisk .....	32
5.1.5 Hedvábný protein – fibroin .....	34
5.1.6 Hliník.....	34
5.2 Charakterizace vzorků, použité přístroje a software.....	34
6. Výsledky a diskuze .....	37

6.1	Příprava 3D scaffoldů pro biologické aplikace .....	37
6.1.1	Srovnání přesnosti standardních tiskových přístupů SLA, DLP, FDM.....	37
6.1.2	Vlákněné scaffoldy na bázi polykaprolaktonu.....	40
6.1.2.1	Příprava hierarchicky strukturovaných PCL scaffoldů pomocí 3D tisku .....	41
6.1.2.2	Příprava hierarchicky strukturovaných PCL vláken pomocí electrospinningu .	46
6.1.1	Poly (vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen).....	49
6.1.1.1	Příprava PiezoRT vlákněných struktur pomocí extruzního tisku .....	49
6.1.1.2	Příprava PiezoRT vláken pomocí electrospinningu.....	54
6.1.1.3	Zpracování PiezoRT pomocí elektrickým polem asistovaného 3D tisku .....	55
6.2	Návrh bioreaktoru pro simulování tokových <i>in vivo</i> podmínek.....	59
6.2.1	Vliv toků na stabilitu polymerních povrchů .....	62
6.3	Strukturované povrchy a jejich vliv na buňky.....	69
6.3.1	Strukturované povrchy na bázi hedvábného proteinu.....	69
6.3.1.1	Příprava fibroinových vrstev pro povrchovou úpravu .....	70
6.3.2	Strukturalizace fibroinových vrstev pomocí fázové separace.....	72
6.3.3	Strukturované povrchy na bázi polystyrenu.....	75
6.4	Příprava strukturovaných povrchů na bázi hliníku.....	87
7.	Přínos pro vědu a praxi.....	93
8.	Závěr .....	94
	Reference .....	96
	Seznam obrázků .....	125
	Seznam tabulek .....	129
	Seznam použitých zkratk .....	130

# 1. Úvod

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

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

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

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

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

použitými materiály, postprocesními povrchovými úpravami (fyzikální, chemické) a v případě 3D tisku<sup>1</sup> může být povrchová topografie definována již při modelování scaffoldu v softwaru (výstupky, prohlubně).

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

## 2. Současný stav řešené problematiky

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

Biomateriály pro výrobu scaffoldů lze dělit na polymery (přírodní a syntetické), keramiky a kovy. Keramické a kovové scaffoldy se v současnosti používají zejména v oblasti kostního inženýrství [13–18] a také jako nosiče léků [19–22]. Aktuálně mezi běžné zástupce syntetických polymerů používaných v TE patří kyselina polymléčná [23–26], kyselina polyglykolová [27–29], jejich kopolymery [30,31] a polykaprolakton [32–34]. Přírodní polymery jsou pak zastoupeny kyselinou hyaluronovou, chitosanem, fibrinem, kolagenem a nejčastěji jejich kombinací. [35–39]

V nedávné době dosáhly technologie klasického [40–42] a elektrickým polem asistovaného 3D tisku (EPA 3D tisk) [43,44] velkého pokroku na poli malosériové výroby tkáňových náhrad.

### **3D tisk**

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

---

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



k výraznému usnadnění tisku komplexních multibuněčných tkání či orgánů. [45–47] Cui a kol. použil techniku 3D bioprintingu k výrobě funkčních kostních štěpů s organizovanou cévní sítí. [48] Nový přístup Want et al. popisuje 3D tisk komplexních scaffoldů pro tvorbu regenerativních orgánů jako je například jaterní tkáň. [49] Jinými přístupy za použití různých biomateriálů bylo umožněno vytvoření dalších tkání včetně kůže [50], srdečních chlopní [51], kostí a chrupavek [52] a vaječníků [53].

### ***Stereolitografie***

Nedávný aplikační pokrok stereolitografie (SLA) je dán rozšířením dostupnosti rozdílných typů fotosíťovatelných polymerů a také možností použití více materiálů pro jeden konečný výtisk [54–56]. V posledních letech také dochází k vývoji nových polymerů na bázi alifatických polyesterů s biodegradními vlastnostmi. [40] Rozvoj této metody dále výrazně ovlivnilo zlepšení rozlišení tisku na úroveň jednotek mikrometrů, a to ve všech třech osách x, y, z. [57] Právě dostupnost vysokého rozlišení je velkou výhodou, jež je často využívána při přípravě scaffoldů pro TE. [58–60] Velký potenciál má SLA technologie v kostním inženýrství [61,62], dále pro přípravu vaskularizovaných scaffoldů pro léčbu periferních nervů [63] a také při tisku scaffoldů pro regeneraci chrupavky [64].

### ***Electrospinning***

V poslední době se při přípravě scaffoldů stále častěji využívá technik založených na elektrostatickém zvlákňování. Jia a kol. [65] vytvořili pomocí electrospinningu biokompatibilní scaffold pro vnitřní stěnu vaskulárních tkání tvořený kyselinou hyaluronovou a kolagenem. Některé studie se zaměřily na tvorbu chitosan/želatinových scaffoldů pro kožní tkáň. [66,67] Další výzkumy řešily tvorbu tubulárních scaffoldů pro vaskulární tkáň za použití směsi polykaprolaktonu (PCL), kopolymeru kyseliny glykolové a kyseliny mléčné (PLA) a želatiny. [68] Scaffoldy tvořené pomocí electrospinningu byly nedávno použity pro regeneraci rohovky [69], nervové [70] či kostní tkáň [71] a náhradu vazů [72].

### ***Elektrickým polem asistovaný 3D tisk***

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

a podporuje růst buněk lidského vaskulárního hladkého svalstva, které jsou schopny produkovat ECM. [73] V jiné studii Paxton a kol. [74] zmiňuje přípravu kaprolaktonových auxetických<sup>2</sup> tubulárních scaffoldů pomocí melt electrowritingu (MEW) v kombinaci s rotujícím sběračem vláken. Tyto scaffoldy ve tvaru trubiček se při protažení projevují zvětšením průměru, což lze využít u kardiovaskulárních aplikací [75], kde by bylo zabráněno možnému kolapsu cév. Jiné využití lze nalézt u TE pro rekonstrukce jícnu. [76]

Dalším aktuálním uplatněním MEW je tvorba scaffoldu v podobě folie, na který jsou nasazeny multibuněčné sféroidy z tukové vazivové tkáně. Scaffold je utvářen z polykaprolaktonu do porézní struktury uzpůsobené velikosti sféroidů (350-380  $\mu\text{m}$ ), kdy se průměr jednotlivých vláken pohybuje okolo 13–15  $\mu\text{m}$ . Takto připravené scaffoldy jsou dále využitelné při regeneraci tukové tkáně a velkou výhodou je jejich snadná přenositelnost. [77]

### 3. Cíle práce

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

---

<sup>2</sup> Auxetikum je materiál, jenž se při tahovém zatížení rozpíná v příčném směru.

## 4. Teoretický rámec

Scaffolds jsou síťovité, porézní struktury, které nahrazují funkci ECM a zastávají nespočet důležitých funkcí. [78,79] ECM je jedinečný komplex složený z proteinů a sacharidů vytvářející trojrozměrnou vláknitou síť, která poskytuje mechanickou pevnost, ale slouží také jako prostředí pro přenos informací mezi buňkou a okolím a také mezi buňkami navzájem. [80,81] Je tedy nezbytné, aby v případě nutnosti byla ECM nahrazena takovým materiálem, který je schopen zcela či alespoň částečně plnit její funkce. [79,81,82]

Hlavní úloha scaffoldů spočívá v zajištění nosné funkce pro uspořádání buněk uvnitř pojivové tkáně. Kromě statické úlohy může scaffold zastávat i roli dynamickou, kdy může definovat buněčné chování a následně funkce tkání. [83,84] Dále zabezpečuje chemické a fyziologické prostředí pro buněčnou proliferaci a diferenciaci. [85]

### 4.1 Požadované vlastnosti scaffoldů

Scaffolds musí splňovat veškeré nároky kladené na nahrazovanou tkáň. Svým uspořádáním pak určují její rozměry a tvar. [86] Po implantaci do živého organismu scaffold vyplňuje 3D defekty a napomáhá tvarování tkáně tak, aby odpovídala původní 3D anatomii. Dočasně musí plnit veškeré funkční požadavky (obvykle mechanické), dokud není vytvořena nová tkáň, která tyto funkce převezme. V ideálním případě zlepšuje regeneraci tkáně tím, že zajišťuje vhodné prostředí pro hromadný transport živin a odpadních látek. [87] Tab. 1 zobrazuje přehled základních vlastností scaffoldu, které by měl splňovat pro zajištění ideálního implantátu.

Tab. 1 – přehled vybraných požadovaných vlastností scaffoldu. [26]

Vlastnost	Požadavek
Biokompatibilita	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Netoxické produkty degradace scaffoldu.</li> <li>• Materiál nezpůsobující zánět při kontaktu s okolní tkání.</li> </ul>
Biodegradabilita	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kontrolovaná degradace, která podporuje růst tkání při současném zachování mechanické podpory.</li> <li>• Rozložitelný biologickými nebo enzymatickými procesy.</li> </ul>
Bioaktivita	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Materiál scaffoldu může interagovat s hostitelskou tkání a vázat se na ni.</li> <li>• Stimulace pomocí růstových faktorů a diferenciací buněk.</li> </ul>
Morfologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Propojené póry umožňující migraci buněk, difuzi, přívod živin a odvod odpadních látek.</li> <li>• Mikroporozita zajišťující vysokou hodnotu specifického povrchu pro umožnění interakcí mezi buňkami a scaffoldem.</li> <li>• Makropóry umožňující migraci buněk.</li> <li>• Velikost pórů uzpůsobená na míru cílové tkáni.</li> <li>• Dostatečně vysoká porozita se současným zachováním mechanických vlastností.</li> </ul>
Mechanické vlastnosti	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mechanické vlastnosti scaffoldu srovnatelné s vlastnostmi hostitelské tkáně.</li> </ul>

#### 4.1.1 Biokompatibilita

Jednou z klíčových vlastností, kterou scaffold musí splňovat je biokompatibilita. Biokompatibilita scaffoldu je schopnost podpořit normální buněčnou aktivitu bez vyvolání jakýchkoli patologických změn v okolních tkáních. Postupem času byla tato definice doplněna o informaci, že biomateriál

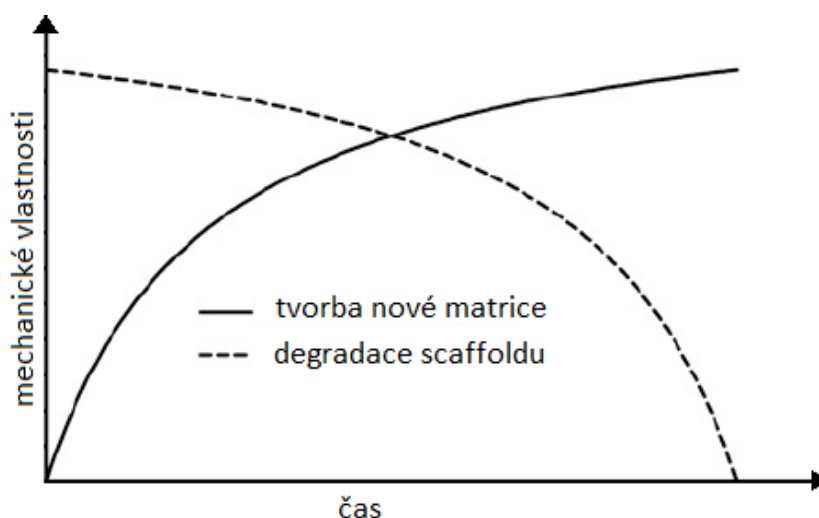
by měl fungovat s odpovídající reakcí hostitele a zároveň by v hostitelském prostředí neměl vyvolávat nežádoucí lokální či systémové reakce. [88]

Dalším významným poznatkem je, že současný pojem biokompatibility nepředpokládá absolutně inertní materiál, jelikož bylo zjištěno, že vysoká bioinertnost indukuje špatnou vaskularizaci, zpomalení regenerace, a dokonce může vést až k enkapsulaci scaffoldu. Mírná zánětlivá reakce tedy může mít stimulační dopad na regenerační procesy (usazování buněk a vaskularizaci). [89–91]

Zásadní pro posouzení biokompatibility je norma ČSN EN ISO 10993-1 (Biologické hodnocení prostředků zdravotnické techniky). Dle této normy se biologická aktivita zdravotnických prostředků posuzuje metodou *in vitro* i *in vivo*. Kompatibilita implantátu s buněčnými kulturami může být testována *in vitro* definováním adhezivních, cytotoxických a dalších vlastností. Avšak *in vitro* testy mají velkou nevýhodu – nelze u nich odhadnout systémové reakce, např. reakci imunitního systému celého těla. Proto finální hodnocení biokompatibility scaffoldů zahrnuje implantační testy na zvířatech. [92,93]

#### 4.1.2 Biodegradabilita

Cílem tkáňového inženýrství je možnost nahrazení implantovaného scaffoldu vlastní ECM a buňkami v průběhu času. [84] Scaffoldy bývají pouze dočasnou podporou pro buňky, které postupem času infiltrují do pórů scaffoldu a současně s jeho degradací se buňky reorganizují do funkční tkáně. [94–97] Ideální časový průběh degradace scaffoldu a tvorby nové matrice je znázorněn na Obr. 1. Vedlejší produkty biodegradace musí být netoxické a měly by opustit tělo bez jakékoliv interakce s orgány. [81]



Obr. 1 – schéma optimálního vývoje mechanických vlastností scaffoldu v čase. [98]

### 4.1.3 Mechanické vlastnosti

V ideálním případě by scaffold měl mít shodné mechanické vlastnosti s místem, do kterého je implantován. Z praktického hlediska dále musí být dostatečně pevný, aby s ním mohlo být během implantace snadno manipulováno. Je potřeba dbát na poměr mechanické pevnosti a porozity scaffoldu. Materiál může mít výbornou mechanickou pevnost, avšak na úkor vysoké porozity, kdy může docházet k nedostatečné vaskularizaci. [84]

Dalším důležitým aspektem je sterilita implantovaného scaffoldu. Je potřeba, aby byl scaffold snadno sterilizovatelný, aby nedocházelo k infekcím uvnitř hostitele. [99]

### 4.1.4 Porozita

Význam velikosti a propojení pórů v scaffoldu jsou jedním z klíčových faktorů pro většinu aplikací tkáňového inženýrství. [100–104]

Póry mohou být dvojího druhu propojené = otevřené a nepropojené = uzavřené.

Ideálním případem je struktura s vysokou pórovitostí s propojenými (otevřenými) póry, které umožňují difuzi živin do buněk ve scaffoldu a také do ECM vytvořené těmito buňkami. Kromě živin je potřeba také odvádět odpadní látky a degradační produkty. Jedním z hlavních problémů bývá degradace jádra scaffoldu, kde kvůli nízkému stupni vaskularizace dochází k nedostatečnému odvodu odpadních látek. [105,106] Některé studie uvádějí, že přítomnost makro ( $>100\ \mu\text{m}$ ) a zároveň mikro ( $<20\ \mu\text{m}$ ) pórů je přínosnější než pouze makroporézní scaffold, avšak tento typ porozity není snadno reprodukovatelný. [107,108]

Dalším důležitým faktorem je průměrná velikost pórů. Buňky s povrchem scaffoldu primárně interagují prostřednictvím chemických skupin (ligandů). Scaffoldy syntetizovány z přírodních extracelulárních materiálů (např. kolagen) tyto ligandy přirozeně obsahují, zatímco scaffoldy ze syntetických materiálů je nutno ošetřit a začlenit do nich tyto ligandy například pomocí adsorpce proteinu. Hustota ligandů je ovlivněna specifickým povrchem – dostupným povrchem v póru, ke kterému mohou buňky přilnout. Z toho vyplývá, že póry musí být dostatečně velké, aby umožnily buňkám migraci do struktury scaffoldu, ale zároveň dostatečně malé, aby tvořily velký specifický povrch, který zajistí minimální množství ligandů pro účinné navázání buněk na scaffold. [109,110]

Příkladem velikosti pórů je studie zaměřená na implantáty pro kostní aplikace, kde autoři uvádí, že pro významný růst kostí je optimální rozsah velikosti pórů

100-135  $\mu\text{m}$ . [111] Pro regeneraci chrupavky je pak vhodná průměrná velikost pórů v rozmezí 100-500  $\mu\text{m}$ . [112]

Z výše uvedeného vyplývá, že jedním z hlavních faktorů, který určuje jakou pórovitost scaffoldu zvolit, je typ použitých buněk.

Příprava porézních scaffoldů je poměrně rozmanitá a zahrnuje mnoho různých postupů. Mezi běžné postupy patří zejména luhování porogenu, lyofilizace. Jedním ze zajímavých přístupů řešení k tvorbě strukturovaných povrchů patří fázová separace.

## 4.2 Výrobní technologie scaffoldů

Metoda použitá pro výrobu scaffoldů podmiňuje jejich klíčové vlastnosti – porozitu, velikost pórů, mechanické vlastnosti a také jejich výsledný tvar. [113] Velmi důležitým faktorem je také materiál, ze kterého bude scaffold vyráběn, protože ne každá technologie je vhodná pro všechny typy materiálů. Před výrobou scaffoldu je nezbytné vyhodnotit jaké vlastnosti by měl konečný výrobek mít a z jakého materiálu bude vyráběn a dle těchto zjištění lze následně vybrat vhodnou technologii zpracování. Na Obr. 2 jsou zobrazeny snímky scaffoldů vytvořených různými výrobními technologiemi a postupy.

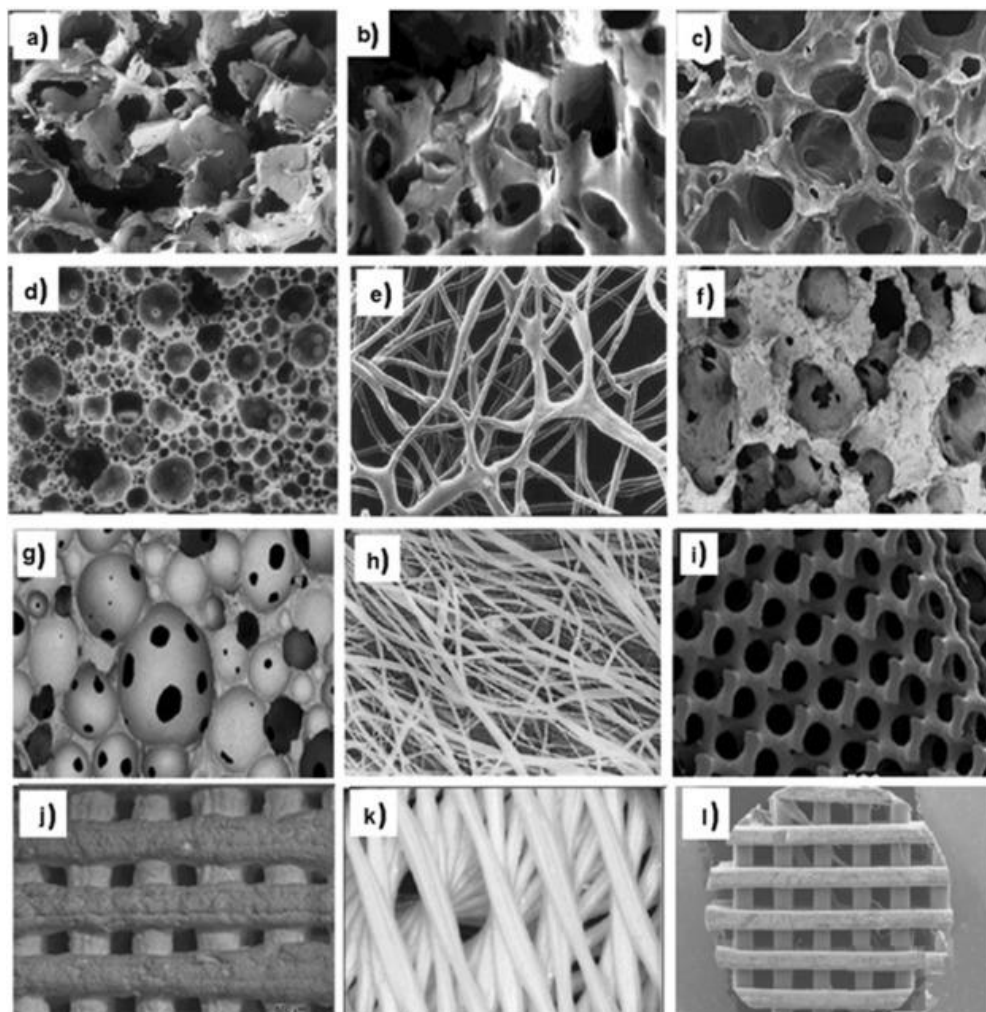
### 4.2.1 Odlévání a luhování

Jednou z metod přípravy scaffoldu je odlévání s následným luhováním. Prvním krokem této techniky je odlití roztoku polymeru (např. kyselina polymléčná v chloroformu) na porogen. [114] Porogeny mohou být například částice solí, glukózy, želatiny, které jsou vhodné především díky biokompatibilitě a snadnému odstranění, kdy je lze rozpustit ve vodě za vzniku porézní struktury. [115] Nevýhodou bývá nerovnoměrná distribuce pórů způsobená rozdílnými hustotami polymeru a porogenu. Pro získání homogenních porézních struktur je vhodné použít například ultrazvukovou disperzi či centrifugaci polymeru. [116]

### 4.2.1 Zpěňování

Pomocí metody zpěňování (gas-foaming) je možné připravit syntetické porézní matrice bez použití rozpouštědla. Absence rozpouštědel je velkou výhodou, jelikož tak mohou být do matrice polymeru začleněny biologicky aktivní molekuly, aniž by došlo k ovlivnění jejich biologických vlastností. Jedním z možných postupů přípravy je lisování polymeru za vysoké teploty do tvaru disku. Takto připravený polymerní disk je několik dní umístěn ve vysokotlaké

komoře za přítomnosti oxidu uhličitého. Během této doby oxid uhličitý infiltruje do polymeru a vytváří tak póry. [117,118]



Obr. 2 – SEM snímky scaffoldů vyrobených různými technologiemi. a) PLGA scaffold připravený částicovým luhováním, b) hedvábný scaffold vyrobený luhováním v soli a napěňováním, c) PLA scaffold vyroben za podmínek superkritického  $\text{CO}_2$ , tlaku 240 barů a teplotě 35 °C, d) 15% PLA pěna připravena termicky indukovanou fázovou separací, e) PGA scaffold připraven spojováním vláken, f) scaffold připravený vložením spongiózní matrice, g) zpěňovaný scaffold, h) 7,3% PLA scaffold vyrobený elektrostatickým zvlákňováním, i) scaffold připravený stereolitografií, j)  $\text{CaSiO}_3$  scaffold vyroben 3D tiskem, k) scaffold připravený fused deposition modelling (FDM) technologií, l) scaffold vyrobený metodou Bioplotter. [119]

#### 4.2.2 Lyofilizace

Freeze-drying neboli sušení mrazem je technologie, díky které je možné poměrně jednoduše získat porézní struktury. Polymer je rozpuštěn ve vhodném



rozpouštědla (např. kyselina polymléčná v dichlormethanu) a následně je směs ochlazena pod bod mrazu, kdy je rozpouštědlo zmrazeno. Následně je odpařeno procesem sublimace a výsledkem je struktura s propojenými póry. Ve fázi, kdy je směs ochlazena na bod tuhnutí může docházet k oddělení rozpouštědel a získáme tak strukturu s póry, které jsou ohraničeny polymerní složkou kolem krystalů rozpouštědla. [120] Výhodou této techniky je vyhnutí se použití vysokých teplot a možnost regulace velikosti pórů pomocí změny parametrů zmrazení. [121]

### **4.2.3 Aditivní výroba**

Aditivní výroba je obecný název pro techniky, které čtou v datech z výkresů podporovaných počítačem (computer-aided design – CAD) převedených do formátu STL (zkratka pro „Stereolithography“, další uváděné pojmy této zkratky jsou „Standard Triangle Language“ nebo „Standard Tessellation Language“). [122] Použití aditivní výroby v tkáňovém inženýrství umožňuje vytváření 3D scaffoldů v podobě složitých geometrií s velmi jemnými strukturami. Díky použití počítače při navrhování lze jednoduše korigovat výslednou makro i mikro strukturu což ovlivňuje mechanické vlastnosti scaffoldu. Díky těmto skutečnostem lze návrh upravit dle dostupných údajů z lékařských skenů tak, aby výsledný scaffold vyhovoval individuálním potřebám každého pacienta. [123]

#### ***Vytlačování (extrusion-based)***

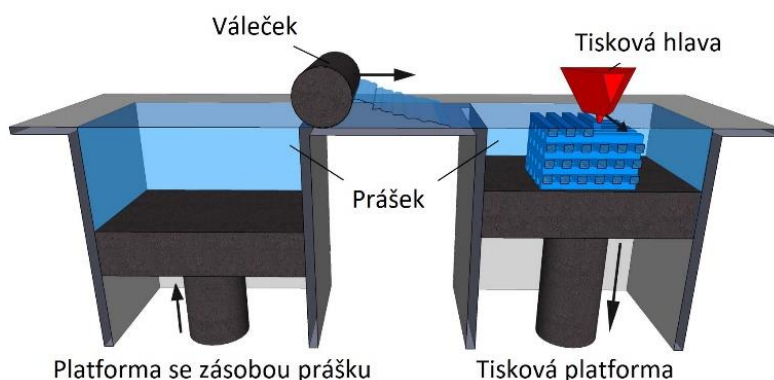
Tato technika je známá také jako „fused deposition modelling“ nebo „fused filament fabrication“ a je založena na tavení a pokládání termoplastických filament po jednotlivých vrstvách do požadovaných tvarů pomocí počítačem řízeného extruderu. Materiál vychází z extruderu ve formě taveniny a téměř okamžitě tuhne. Pro zajištění dobré adheze mezivrstev je vhodné udržovat předchozí vrstvu těsně pod teplotou tuhnutí daného materiálu. [124]

Rozlišení se u této technologie pohybuje v rozmezí 50-200  $\mu\text{m}$ . [40] Modely pro tuto technologii lze získat pomocí tomografie, magnetické rezonance či 3D modelováním na počítači. [125] Nevýhodou této metody je limitace výběru materiálů, které musí být dostupné ve formě filament a také vysoké teploty, kterým je materiál vystaven. Některé z těchto nevýhod mohou být eliminovány použitím alternativních extruzních technik mezi které patří například 3D Fiber Deposition [102], 3D plotting [126] nebo Precision Extruding Deposition [127].

#### ***3-D tisk (three dimensional printing)***

Tato technologie je poměrně dlouho známá [128] a byla vůbec první aplikována v oblasti RP pro účely tkáňového inženýrství. [129,130] Schéma

procesu je znázorněno na Obr. 3. Prvním krokem je rozprostření tenké vrstvy prášku na platformu pomocí válečku. Následuje tisk inkoustu, který prášek na selektovaných místech spojí. Tisková podložka při této technologii začíná v nejvyšší poloze a postupně sjíždí směrem dolů. Prášek, který není inkoustem pojen, dočasně přebírá úlohu podpěr a poté je buď mechanicky odstraněn pomocí kartáče nebo je ofukován. Proces bývá zakončen vypálením pojiva a sintrováním. [124] Příkladem materiálů mohou být biokompatibilní keramiky, například hydroxyapatit, fosforečnan vápenatý [131–138], kovy či polymery [139]. Typickými pojivy pak mohou být polymerní emulze nebo pojiva na vodní bázi. [139,140]



Obr. 3 – schéma procesu 3-D tisku. [141]

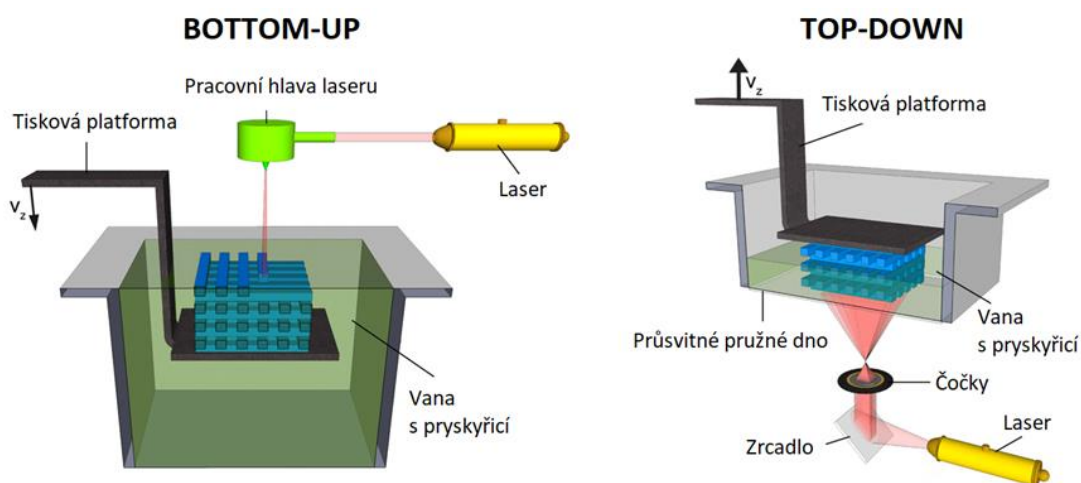
#### **4D tisk**

Pojem 4D tisk nelze definovat jako samostatnou technologii. Avšak vzhledem k současnému stavu poznání, kdy se s tímto pojmem setkáváme stále častěji, je vhodné věnovat tomuto pojmu pozornost. 4D printing byl poprvé představen v roce 2013. [142] Tento koncept tisku se prolíná přes řadu technologií rapid prototypingu. Principem je 3D tisk objektů s geometrií, topologií, vlastnostmi či funkcemi schopnými vyvíjet se v čase (čtvrtá dimenze) v reakci na různé podněty prostředí jako je teplo, světlo, pH a jiné. [143,144] Hlavním představitelem produktů, které jsou spojeny s pojmem 4D printing jsou zejména výrobky s tvarovou pamětí. [145–147]

#### **3D tisk za použití fotosenzitivních pryskyřic**

Technologie 3D tisku, jež využívá vytvrzování fotosenzitivní pryskyřice lze rozdělit na dvě samostatné metody lišící se pouze v typu vytvrzování. První metodou je stereolitografie (SLA), jež využívá laser, který vytvrzuje jednotlivé body modelu. Druhá metoda – digital light processing (DLP) je založena na vytvrzování celé vrstvy modelu za použití LCD displeje.

Stereolitografie byla vyvinuta jako první z komerčních RP metod společností 3D Systems. Tato aditivní výrobní metoda spočívá v polymeraci jednotlivých vrstev fotosenzitivní pryskyřice pomocí UV záření. Veškeré výtisky vznikají postupně vrstvu po vrstvě. Tisk je možné provádět tzv. „bottom-up“, kdy je výtisk postupně odspoda nahoru tisknut a laser je umístěn na vrchní straně tiskové platformy. Druhým způsobem je metoda „top-down“, tedy shora dolů, kdy vana, ve které je pryskyřice je ze spodní strany průsvitná a tisková podložka je přitisknuta tak, že se dotýká dna viz Obr. 4. Dále jsou možné dva typy vytvrzování. První způsob je vytvrzování laserem, který postupně nasvítí každý bod aktuální vrstvy, která má být vytvrzena. Druhým způsobem je vysvícení celé vrstvy modelu najednou pomocí projektoru (digital light processing - DLP). [148,149] Pomocí stereolitografie je možné tisknout složité tvary vyznačující se vysokou pevností a povrchovými detaily v řádech nižších desítek  $\mu\text{m}$ . [57]



Obr. 4 – schéma procesu dvou typů stereolitografického tisku. [141]

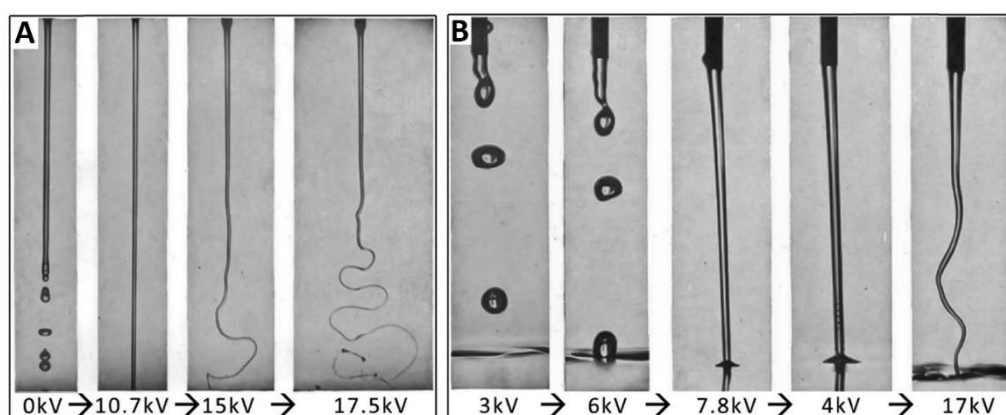
#### 4.2.4 Electrospinning

Electrospinning neboli elektrostatické zvlákňování je technologie, která využívá elektrostatické síly k výrobě vlákných scaffoldů z roztoků polymerů. [150] Základní aparatura se skládá z injekční stříkačky s čerpadlem, vysokonapěťového napájecího zdroje a uzemněného sběrače vláken – kolektoru, kterým obvykle bývá kovová deska. [151] Technologie je založena na tažení proudu viskózní tekutiny (roztok nebo tavenina) ke kolektoru, který má elektrický potenciál. Pokud jsou molekuly polymeru dostatečně zapletené, tak nedochází k rozdělování proudu tekutiny na kapky, které vznikají v důsledku Rayleighovy nestability [152], ale je tažena ve formě vláken. [153] Výsledkem je tak chaotická síť vláken o průměru od desítek nanometrů po desítky mikronů. [151,154–156]

#### 4.2.5 Elektrickým polem asistovaný tisk polymerní taveniny (Melt electrowriting)

Pro pochopení melt electrowritingu (MEW) je nutné znát chování kapalin při toku. Proud nenabitě kapaliny, tekoucí shora dolů se rozpadá na kapky (např. tekoucí voda nebo med). Tento jev, známý také jako Plateau-Rayleigh nestabilita, je závislý na rychlosti, s jakou tekutina teče a také na výšce, z které padá. Tekoucí med, který simuluje tok polymeru, má před projevem Plateau-Rayleigh nestability výrazně nižší rychlost toku a v této chvíli lze tekutinou „psát“ právě proto, že ještě nezačala tvořit kapky. [157] Aplikací napětí mezi trysku a kolektor dochází k eliminaci Plateau-Rayleigh nestability, jež by se za normálních okolností projevila. Tok se tak stává stabilním a nepřetržitým. Pokud je však napětí příliš vysoké, elektrické nestability způsobují tok chaotickým, jak je známo z electrospinningu viz Obr. 5A. [43]

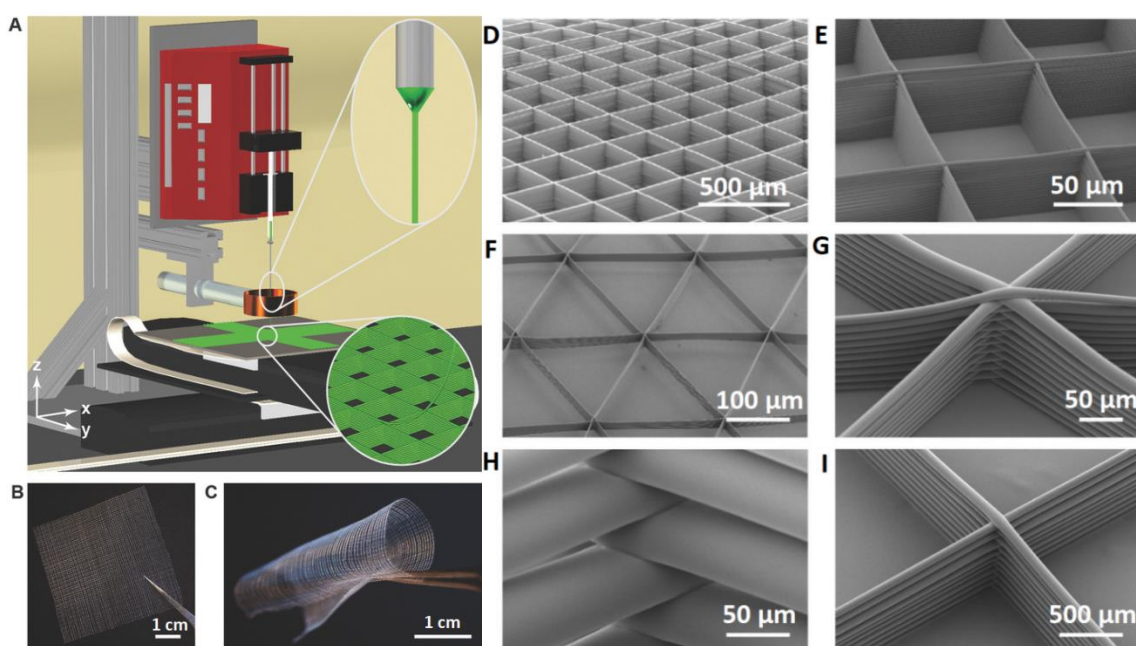
Electrospinning tedy využívá k vytváření polymerních vláknenných struktur právě tokové nestability, kdežto pro MEW je napětí aplikováno tak, aby bylo možné tekutinu při nízkém průtoku kontinuálně a řízeně pokládat. V závislosti na konfiguraci a vlastnostech tekutiny lze tok omezit na extrémně nízkou rychlost a je možné získat vlákna o rozměrech okolo 2–50  $\mu\text{m}$  [44]. Hodnotou aplikovaného napětí tedy ovlivňujeme, zda budou vznikat vlákna díky chaotickému pohybu nebo zda je budeme moci kontinuálně a řízeně klást na kolektor. Zajímavostí je, že při překročení určité hranice napětí (7,8 kV), která již vykazuje stabilní nepřetržitý tok a následném snížení pod tuto hranici (na 4 kV) proud tekutiny nadále zůstává stabilním viz Obr. 5B. [43]



Obr. 5 – příklady tekutin bez a s působením elektrického napětí. A) znázorňuje tok vody při různých hodnotách aplikovaného napětí. B) zobrazuje tok vody při překročení hraničního napětí, kdy se stává stabilním. [152]

#### 4.2.6 Elektrickým polem asistovaný tisk polymerních roztoků (3D jet writing)

Technologie 3D jet writing je schopna tisknout z roztoků běžných biodegradabilních a biokompatibilních polymerů (např. PLGA) s extrémní přesností a rozlišením. Oproti chaotickému uspořádání vláken při electrospinningu, stabilita roztoku při 3D jet writingu je zajištěna implementací sekundární elektrody, která společně s pohyblivou platformou dokáže řízeně stohovat a ukládat kontinuálně vytvářená mikroválka do struktur s otevřenými póry, viz Obr. 6. Tento proces umožňuje výrobu 3D struktur s definovanou geometrií a přesností. [159]



Obr. 6 – 3D jet writing. A) Schéma aparatury pro 3D jet writing s patrnou elektrodou, zajišťující stabilitu toku tekutiny. B, C) Příklady tištěné struktury pomocí technologie 3D jet writingu. D, E, F) Tištěné geometrie typu teselovaných polí do výšky  $400\ \mu\text{m}$ . G) Svazky tištěných navrstvených vláken s viditelnou přesností tisku. H, I) Ukázka průměru vláken od  $50\ \mu\text{m}$  (H) po  $6\ \mu\text{m}$  (I). [159]

### 4.3 Biomateriály pro výrobu scaffoldů

Jako biomateriály označujeme skupinu materiálů, která přichází do kontaktu s biologickým systémem. [160] Z literatury je známo dvojí dělení biomateriálů. Prvním je členění na přírodní a syntetické [161], druhým je pak rozdělení na keramiky, kovy a polymery [98,162].

Každá ze skupin biomateriálů má své výhody a nevýhody, proto jsou často k dosažení požadovaných výsledků používány kompozitní materiály (např. hydroxyapatit a kolagen). [163]

Protože se tato práce zabývá převážně polymery, preferováno je rozdělení na syntetické a přírodní. Kovy a keramiky budou pouze stručně zmíněny.

### **Keramiky**

Biomateriály na bázi keramik (např. hydroxyapatit, fosforečnan vápenatý, biosklo) jsou používány zejména pro náhrady kostí – pro měkké tkáně nejsou vhodné. Keramiky vykazují nízkou elasticitu a tvrdý, křehký povrch. Jsou však vhodnými adepty pro kostní implantáty, jelikož se svou strukturou podobají minerálnímu složení kostí a vykazují skvělou biokompatibilitu, diferenciaci a proliferaci kostních buněk. [163]

### **Kovy**

Kovové biomateriály jsou navrženy tak, aby poskytovaly vnitřní podporu biologickým tkáním. Jejich využití tak lze nalézt především v kloubních náhradách, zubních implantátech a ortopedii. [164] Typickým zástupcem kovu používaným jako implantát je titan. Je snadno dostupný a v klinických aplikacích je již dobře znám, navíc se dá zpracovávat do nejrůznějších forem včetně kovových pěn. [163]

Jednou z hlavních nevýhod většiny keramik a kovů je však neschopnost biodegradace. [163]

#### **4.3.1 Syntetické polymerní biomateriály**

Syntetické polymery jsou velmi často využívány v tkáňovém inženýrství. Jsou levnější a lze je snadno funkcionalizovat oproti přírodním polymerům. Výhodou syntetických polymerů je výroba velkého množství za kontrolovaných podmínek, díky čemuž je možné ovlivnit výsledné vlastnosti materiálu jako je pórovitost, degradace či mechanické vlastnosti. Další výhodou je vysoká míra univerzálnosti a snadné zpracování, na druhou stranu však bývají syntetizovány za poměrně drsných polymeračních podmínek a také bývá problém s jejich bioaktivitou. Tyto nevýhody jsou však převáženy jejich strukturními a chemickými vlastnostmi, které lze často modifikovat a je tak možné vytvářet scaffoldy, které věrně napodobují základní rysy ECM. [165,166]

Mezi běžně používané syntetické polymery patří kyselina glykolová (PGA), kyselina polymléčná (PLA), kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA), polykaprolakton (PCL), polyethylenglykol (PEG) nebo polyvinylalkohol (PVA).

[165,167,168] Syntetické polymerní scaffolds jsou často kombinovány s přírodními polymery, které modifikují konečné vlastnosti, jako jsou buněčná adheze, hydrofobita či biologická rozložitelnost. [166]

### ***Materiály pro stereolitografii***

Pryskyřice používané ve stereolitografii se skládají z několika komponent: fotoiniciátor, oligomery schopné polymerizace, látky pro úpravu viskozity a aditiva.

Mezi běžně používané pryskyřice patří systémy založené na volných radikálech, konkrétně na akrylátu a methakrylátu. Tyto monomery lze rychle vytvrzovat a díky přítomným esterovým skupinám je také lze snadno modifikovat. [169] Avšak nevýhodou těchto pryskyřic je vysoká těkavost, nepříjemný zápach a také představují potenciální nebezpečí, kdy nezreagované pozůstatky polymerace jsou cytotoxické a mohou způsobit alergické reakce. [170–173]

Dalším používaným systémem jsou pryskyřice, jejichž polymerace je založena na kationtovém mechanismu. Mezi tyto patří epoxidy a vinylethery, u kterých dochází pouze k malé smrštelnosti a vykazují lepší mechanické vlastnosti než akryláty. Nevýhodou je však malá reaktivita. Pro možné použití biopolymerů ve stereolitografii je nutná jejich modifikace fotoreaktivními a síťovatelnými skupinami. [174]

Jedním s nejrozšířenějších materiálů užívaných ve stereolitografii je poly(propylen fumarát) (PPF) [175–177]. PPF je lineární polyester s nenasyceným hlavním řetězcem. Velkou výhodou PPF je jeho biokompatibilita a schopnost biodegradace, kdy se rozkládá na propylenglykol a kyselinu fumarovou. Oba tyto produkty jsou netoxické; kyselina fumarová totiž přirozeně vzniká při metabolismu glukózy. [148,169]

Scaffolds vytvořené pomocí stereolitografie nabízí širokou škálu mechanických vlastností vhodné pro aplikaci jak v inženýrství měkkých, tak i tvrdých tkání. Na rozdíl od PPF pryskyřice, která se po vytvrzení vyznačuje mechanickou tuhostí, trimethylen karbonát a trimethylolpropan jsou více flexibilní.

### ***Polyethylenglykol***

Polyethylenglykol (PEG) je vysoce biokompatibilní polyether, který je chemicky podobný polyoxyethylenu a polyethylen oxidu, od kterých se liší pouze nižší molekulovou hmotností (<10,000). [178,179] Vzniká polykondenzací ethylenglykolu v přítomnosti kyselých nebo zásaditých katalyzátorů. PEG je

amfifilní a velmi dobře se rozpouští ve vodném i nepolárním prostředí. [180] Právě díky jeho extrémní hydrofilnosti, která je důležitá pro přepravu živin a odpadních látek a biokompatibilitě patří PEG mezi jeden z nejrozšířenějších syntetických polymerů. Pro jeho neimunogenicitu, odolnost adsorpci proteinů a dalším výhodám zmíněných výše byl schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drugs Administration) pro použití v biomedicínských aplikacích. [178,181] Jeho využití tak lze nalézt v tkáňovém a kostním inženýrství, hojení ran a mnoho dalších.

Velmi často používanou formou PEGu jsou hydrogely, jejichž využití je popsáno v mnoha studiích, které se týkají tkáňového inženýrství a také jako systémy s řízeným uvolňováním aktivních látek. [182–185] Jednou z nevýhod je však špatná buněčná adheze. Scaffolds tvořené PEG hydrogelem jsou často fyzikálně i chemicky modifikovány, aby byly zajištěny vhodné podmínky pro buněčnou proliferaci a diferenciaci. Jednou z těchto modifikací je kombinace PEGu s jinými polymery. [186–188] Další modifikací je použití linkerů, které mohou být funkcionalizovány například proteiny ECM či růstovými faktory. [189] Jelikož PEG není biodegradabilní je často začleněn do blokových kopolymerů s biologicky rozložitelnými polymery (kyselina polyglykolová, kyselina polymléčná). [190]

### ***Polyvinylalkohol***

Polyvinylalkohol (PVA) je polymer s krystalickou strukturou, jenž je biologicky snadno odbouratelný a rozpustný ve vodě. [191] Vyrábí se hydrolyzou polyvinylacetátu a již v první polovině 20. století se stal velmi využívaným materiálem v průmyslu a také v lékařském (chirurgické nitě) a potravinářském odvětví (obaly). [192] PVA je často používán v kombinaci s dalšími polymery, konkrétně biopolymery a polymery s hydrofilními vlastnostmi.

V tkáňovém inženýrství se PVA nejčastěji objevuje ve formě hydrogelů, které lze připravit různými metodami fyzikálního a chemického síťování. [193] Nejčastější biomedicínské aplikace PVA v oblasti tkáňového inženýrství jsou kontaktní čočky [194], oftalmické materiály [195], šlachy [196] a nosiče léčiv [197].

### ***Polykaprolakton***

Polykaprolakton (PCL) je lineární semikrystalický alifatický polyester, který se vyznačuje biokompatibilitou a také relativně pomalou degradabilitou. [198] PCL patří mezi termoplastické polymery s dobrou stabilitou a snadnou zpracovatelností. U některých produktů byl schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drugs Administration). [199,200] Dále je



PCL znám jako implantovatelný biomateriál pro lékařské aplikace, včetně sešívání a obvazování ran, regenerace nervů a aplikace v kostním tkáňovém inženýrství. [198]

### 4.3.2 Přírodní biomateriály

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

Hlavními složkami ECM, jak již bylo popsáno dříve v textu, jsou zejména polysacharidy a proteiny, které představují optimální biologické prostředí pro buňky. Jelikož lidské tělo není schopno regenerovat rozsáhlé defekty právě kvůli nedostatku ECM, která by tyto defekty vyplnila, stávají se tak přírodní biomateriály ideálními kandidáty pro aplikace v tkáňovém inženýrství, kde jsou schopny ECM plně nahradit.

#### *Kolagen*

Přítomnost kolagenu ve všech pojivových tkáních ho činí jednou z nejstudovanějších biomolekul přítomných v ECM. Tento fibrilární protein je hlavní složkou kostí a kůže a v dehydrovaném stavu zaujímá přibližně 25 % celkové hmotnosti savců. [201,202] Skládá se ze tří polypeptidových řetězců, bohatých na hydroxyprolinové aminokyseliny stočených do trojšroubovice. Jeho molekulární struktura hraje důležitou roli při udržení biologické a strukturální integrity ECM. [203] Kolagen se vyznačuje mnoha užitečnými vlastnostmi – nízkou imunogenicitou, dobrou biokompatibilitou a biologickou rozložitelností a také zastává funkce pro regulaci morfologie, diferenciaci, adheze a migrace buněk. [204,205] Nevýhodami pak může být poměrně rychlá degradace a slabé mechanické vlastnosti.

Kolageny typu I, II a III se vyznačují chemotaktickým chováním. Chemotaxe se projevuje migrací buněk směrem k chemickému stimulu. [206] U kolagenu se chemotaktické chování vyznačuje přitahováním fibroblastů, keratinocytů a monocytů. [207–210] Proto je kolagen využíván při procesu hojení ran, kdy se předpokládá, že degradace kolagenu, která způsobuje chemotaxi, podporuje obnovu funkčnosti a struktury okolní tkáně. [211,212]

### ***Hedvábný fibroin***

Hedvábí je vláknitý protein, který je syntetizován epiteliálními buňkami žláz organismů třídy *Arachnida* a larvami *Lepidoptera* zahrnujícího motýly a můry. [213] Mezi nejvýznamnější typy hedvábí patří hedvábí produkované bourcem morušovým (*bombyx mori*).

Hedvábné vlákno je složeno ze dvou proteinů – fibroinu a sericinu, kdy fibroinová vlákna jsou obklopena sericinovým obalem. Sericin byl však shledán jako nevhodný materiál pro biomedicínské aplikace, a to především kvůli jeho antigenicitě. [214] Dalšímu využití se tak dostalo pouze fibroinu. Fibroin se vyznačuje dobrou biokompatibilitou, biodegradabilitou, snadnou modifikací chemickými skupinami a vynikajícími mechanickými vlastnostmi. [215]

Fibroin se skládá z lehkého a těžkého polypeptidového řetězce. Těžké vlákno je pak tvořeno hydrofobními a hydrofilními doménami, kdy hydrofobní domény jsou tvořeny repetitivními aminokyselinovými sekvencemi Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser (Gly – glycin, Ala – alanin, Ser – serin). Struktura fibroinu lze rozlišit na stav SILK I, která se vyznačuje obsahem náhodných klubek a amorfních oblastí se strukturou  $\alpha$ -šroubovic. Semi-krystalický stav SILK II je pak charakterizován konformací složené z antiparalelních  $\beta$ -skládaných listů. [215]

Hedvábný fibroin (SF) bývá zpracován v několika formách včetně vláken [216–219], filmů [220–223] či hydrogelů [224–226]. Pro své výborné mechanické vlastnosti je ideálním materiálem pro výrobu scaffoldů. Průměr vlákna (cca 10  $\mu\text{m}$  [227]) zaručuje vysoký specifický povrch.

### ***Kyselina Hyaluronová***

Kyselina hyaluronová (HA) je lineární polysacharid, který se nachází v ECM v mnoha částech těla. Díky své biokompatibilitě, biodegradabilitě a možnostem chemické modifikace je HA vhodným materiálem pro tkáňové inženýrství. HA také pozitivně ovlivňuje buněčné interakce jako je proliferace a diferenciací. Získává tak stále na popularitě a nachází uplatnění v různých oblastech, od scaffoldů pro TE po kosmetické materiály. [228,229]

Zvolením výrobní technologie je možné z HA připravit scaffoldy ve formě hydrogelů, kryogelů a také injektabilních hydrogelů. Nejčastější použití HA je pro scaffoldy měkkých tkání a v kombinaci s dalšími materiály pak lze použít i pro kostní tkáň, chrupavky, cévy, nosiče léků a hojení povrchových ran. [228]

### 4.3.3 Smart materiály

Smart (SM) nebo také chytré materiály jsou specifické svou schopností reverzibilně modifikovat jednu či více svých funkčních nebo strukturálních vlastností v důsledku reakce na vnější podnět. Mezi tyto vnější vlivy zahrnujeme fyzikální (teplota, světlo, elektrické a magnetické pole), chemické (pH) a mechanické podněty (tah a tlak).

#### *Piezoelektrické materiály*

Piezoelektrické materiály (PM) řadíme mezi SM vzhledem ke skutečnosti, že vykazují piezoelektrický jev. Tento lze rozlišovat na přímý, kdy při působení mechanického napětí dochází ke generování elektrického náboje a nepřímý, který se vyznačuje deformací pod vlivem elektrického napětí. [230]

V tkáňovém inženýrství lze PM využít pro elektroaktivní scaffoldy, které mohou produkovat bioelektrické signály, jež hrají zásadní roli při stimulaci buněčného chování, které vede k regeneraci tkáně. [231,232] PM dělíme na piezoelektrické keramiky a polymery. [230] Mezi přírodní PM patří některé krystaly a keramiky a také makromolekuly, jako jsou proteiny nebo nukleové kyseliny. [233]

Význačnými piezoelektrickými syntetickými polymery jsou pak poly(vinyliden fluorid) (PVDF) a kopolymer vinyliden fluoridu a trifluor ethylenu (PVDF-TrFE). Oba tyto materiály byly použity při regeneraci neurální tkáně. [234] PVDF je termoplastický polymer, který se vyznačuje vysokou fyzikální i chemickou odolností. Jeho nevýhodou je však neschopnost biodegradace, což jeho využití v tkáňovém inženýrství poněkud znehodnocuje. [235] Kopolymer PVDF-TrFE je významný tím, že má ze všech polymerů nejvyšší piezoelektrický koeficient [236], je cytokompatibilní a vykazuje pozitivní vliv na buněčnou proliferaci a adhezi [237].

#### *Materiály s tvarovou pamětí*

Polymery s tvarovou pamětí již svým názvem napovídají o schopnosti navrácení se z deformovaného stavu do původního vlivem vnějšího podnětu jako je změna teploty [238], elektrického či magnetického pole [239,240] nebo světla [241]. Výhodou tvarové paměti je to, že scaffold lze deformovat tak, aby mohl být jednoduše implantován na postižené místo pomocí minimálně invazivního chirurgického zákroku a po aplikaci vnějšího vlivu je scaffold vytvarován do potřebného tvaru. [242,243] Mezi materiály s tvarovou pamětí patří například směs chemicky síťovaného poly( $\epsilon$ -kaprolaktonu) a hydroxyapatitu [244]; dále

směsi na bázi polyurethanu [245], poly(propylen fumarátu) [246] a kyselině polymléčné [247].

### ***Samo-hojící materiály (Self-healing)***

Self-healing, v překladu samo-hojící materiály (SHM), jsou schopny po poškození opět obnovit svou funkčnost. [248] Obvykle bývá self-healing charakteristika vztahována na zotavení mechanických vlastností po mechanickém poškození. [249] SHM materiály dělíme dle procesu spuštění samoléčení do dvou skupin: autonomní a neautonomní. Autonomní SHM k začátku samoléčení nevyžadují žádné externí spouštěče; samotné poškození je dostatečným stimulem. Naproti tomu neautonomní SHM potřebují k iniciaci léčení vnější podnět, kterým obvykle bývá světlo nebo teplota. [248]

Jeden z prvních výzkumů samoléčivých polymerů byl zaměřen na zabudovaná tekutá léčiva. Tato léčiva se sestávala z mikrokapslí naplněných monomerem, jenž se při mechanickém poškození uvolnil a v místě poškození došlo k polymeraci čímž se místo stalo opět funkčním. Nevýhodou této metody je, že na jednom místě může dojít pouze k jednomu „vyléčení“. [250,251] Jiné studie uvádějí umístění hojivého materiálu do dutých skleněných vláken umožňujících transport léčivého činidla ve větším rozsahu. U tohoto typu však může docházet k negativnímu vlivu na makroskopické vlastnosti materiálu. [252]

Slibným přístupem se zdají být materiály s dostatečně hustou sítí slabých vazebných interakcí (vodíkové můstky). Mezi tyto látky patří termoplastický elastomer sestávající se z mastných kyselin a diethylen triaminu funkcionalizovaného močovinou. U tohoto materiálu dojde při poškození převážně k přerušení vodíkových vazeb, které jsou schopny obnovy, jakmile jsou poškozené povrchy k sobě přitlačeny. [253,254]

## **4.4 Vliv povrchu scaffoldu na chování buněk**

Jednou z kritických částí v oblasti tkáňového inženýrství je nastolení fyziologického fenotypu buněk. V této oblasti mají zásadní vliv dvě proměnné, a to chemie povrchu a topografie implantátu. [255,256]

V lidské tkáni jsou buňky zabudovány do ECM, která je složena z řady proteinů (kolagen, elastin, aj.) a polysacharidů (glykosaminy, aj.). Konkrétně kolagen je protein poskytující odolnost ECM a také se stává vazebným místem pro receptory buněčné adheze. ECM obsahuje také další molekuly zajišťující adhezi buněk (fibronektin, vitronektin, laminin), které propojují komponenty matrix s buňkami. [255]

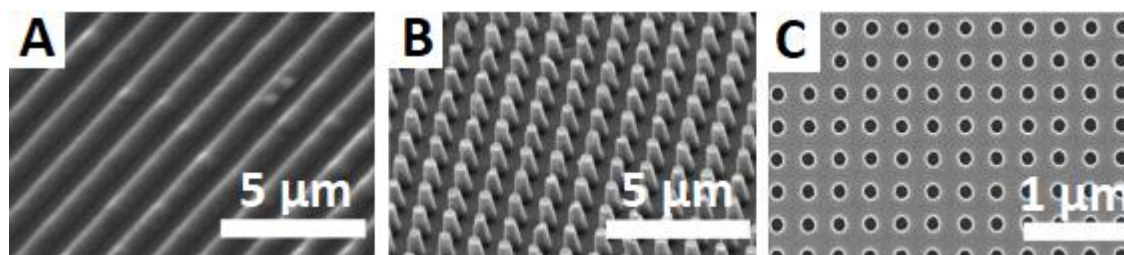
Interakce mezi povrchem nosiče a buňkami ovlivňují jejich další vývoj a funkci. [257] Aby docházelo k vývoji buněk do formy funkční tkáně je třeba, aby makroskopická geometrie, mikroskopická topografie a chemické vlastnosti povrchu kooperovaly se stimuly extracelulárních signálních látek. [258]

Při tvorbě scaffoldu je také nutná snaha o napodobení složité mikrostruktury živé tkáně, která bude přispívat k tkáňové funkci prostřednictvím interakcí mezi buňkami navzájem a buňkami s ECM. Použití mikrotechnologií je tak ideální pro získání potřebných strukturovaných povrchů scaffoldů. Technologie mikropatterningu pak může řídit velikost, tvar a konečné ukotvení buněk k povrchu nosiče. [255]

Buněčnou adhezi můžeme považovat za dynamický proces vyznačující se několika fázemi. [259] Prvotní adheze začíná vazbami transmembránových receptorů (integrinů) buněk na extracelulární ligandy. Integriny tedy zajišťují propojení buňky s povrchem a také spojení mezi cytoskeletem a ECM. [260] Tyto komplexy však mohou vznikat pouze jsou-li pevně ukotveny k povrchu, pak jsou navázány další intracelulární proteiny a vznikají tak makromolekulární komplexy zvané fokální adheze (FA) s délkou okolo 1-5  $\mu\text{m}$ . [261]

Buněčné interakce s mikro a nano strukturovanými povrchy materiálu byly studovány v řadě publikacích. [255,262,263] Z dostupných studií plyne, že nanotopografie hraje rozhodující roli pro adhezi, přežití, proliferaci a diferenciaci různých typů kmenových buněk. [264–268] Topografie povrchu pak může modifikovat vlastnosti FA a to tak, že dojde k vytvoření zón, které podporují shlukování integrinů (např. vyvýšeniny na povrchu viz Obr. 7B) a naopak topografické prvky, které zabraňují tvorbě komplexů integrin-ligand (drážky, zahloubení) viz Obr. 7A a C. [269]

Nanotopografie si získává čím dál větší pozornost zejména pro její podobnost s *in vivo* prostředím. Buňky totiž v přirozeném prostředí interagují s komponenty ECM v nano rozměrech. [264] Kontrolou struktury povrchu je tedy možné definovat chování kmenových buněk. [270]



Obr. 7 - příklady textur povrchu scaffoldu. A) hřebenový patern, B) výstupky, C) prohlubně. [271]

Jelikož jsou povrchové vlastnosti scaffoldu kritickým faktorem, který ovlivňuje další interakce v živém systému, jsou tyto vlastnosti často modifikovány. Úpravami povrchu je možné na něj navázat funkční skupiny, které ovlivňují řadu vlastností, jako jsou smáčivost, náboj, adheze k jiným materiálům a tím i interakce s biologickým prostředím. Typy modifikací povrchu lze rozdělit do několika skupin: fyzikální a chemické modifikace nebo překrytí stávajícího povrchu scaffoldu povlakem z materiálu, jenž má požadované vlastnosti. [272]

## 5. Experimentální část

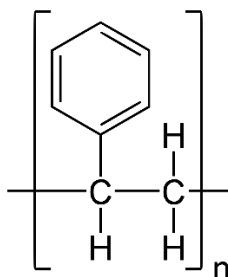
V rámci výsledků experimentální práce budou představeny materiálové soustavy na syntetické a přírodní bázi zpracovávané do podoby scaffoldů. Budou řešeny postupy jejich možné povrchové strukturalizace pomocí fázové separace a chemického leptání. U vybraných materiálových soustav budou diskutovány možnosti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

### 5.1 Materiály

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

#### 5.1.1 Polystyren (PS)

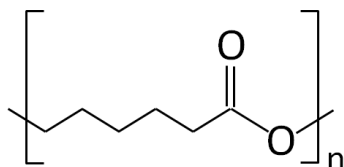
Pro tvorbu hierarchicky strukturovaných syntetických povrchů byl zvolen polystyren (PS), Obr. 8, ve formě sterilizovaných Petriho misek o průměru 3,4 cm, zbavených pyrogenů DNA/RNA určených primárně pro kultivaci buněk od společnosti Techno Plastic Products AG (Švýcarsko).



Obr. 8 – strukturní vzorec polystyrenu.

### 5.1.2 Polykaprolakton (PCL)

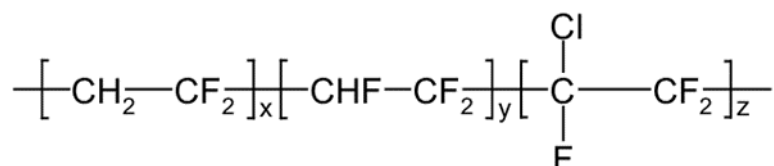
Pro 3D tištěné scaffoldy byl zvolen jako zástupce syntetických polymerů polykaprolakton, Obr. 9, o střední molární hmotnosti 80 000 g/mol od společnosti Sigma Aldrich. Výhodou polykaprolaktonu je schopnost biodegradace a nízká teplota tání, která se pohybuje okolo 60 °C.



Obr. 9 – strukturní vzorec polykaprolaktonu.

### 5.1.3 Poly(vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen)

Dalším polymerem použitým pro přípravu scaffoldů je syntetický piezoelektrický polymer poly (vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen) (PVDF-TrFE-CTFE), Obr. 10, ve formě bílého prášku dodávaný společností Arkema pod obchodním označením Piezotech® RT. Tento elektroaktivní terpolymer, jenž bude dále v textu označován jako „PiezoRT“, se řadí mezi relaxační feroelektrika, která vykazují elektrostrikcí (jev, při kterém vlivem vnějšího elektrického pole dochází k deformaci dielektrika).



Obr. 10 – strukturní vzorec PVDF-TrFE-CTFE.

### 5.1.4 Materiály pro SLA, DLP a FDM 3D tisk

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

Pro SLA tiskárny Form2 a Form3 od společnosti Formlabs byly použity čiré pryskyřice na bázi methakrylátu s obchodním označením „Clear“ a „Dental LT



Clear“ (Formlabs), obě pryskyřice byly po provedení testů cytotoxicity označeny jako necytotoxické a tedy vhodné pro použití s buňkami.

Složení pryskyřic pro SLA udávané výrobcem (Formlabs) bylo následující:

Pryskyřice s označením „Clear“ je na bázi methakrylátu. Detailní složení je uvedeno v Tab. 2.

*Tab. 2 – složení pryskyřice pro SLA tisk s označením „Clear“.*

Název	Hmotnostní podíl [%]
Uretan dimethylmethakrylát	55-75
Monomery methakrylátu	15-25
Difenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl) fosfinoxid	< 0,9

Pryskyřice s označením „Dental LT Clear“ je na bázi methakrylátu. Detailní složení je uvedeno v Tab. 3.

*Tab. 3 – složení pryskyřice pro SLA tisk s označením „Dental LT Clear“.*

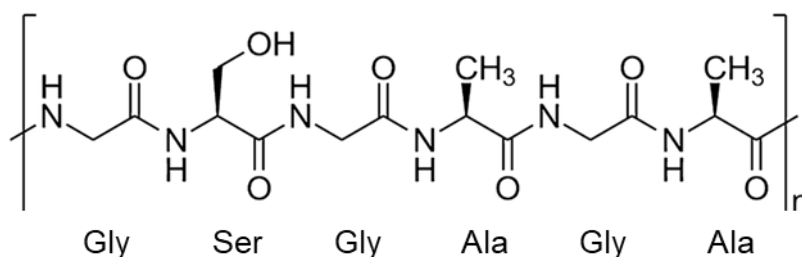
Název	Hmotnostní podíl [%]
7,7,9-trimethyl-4,13-dioxo-3,14-dioxo-5,12-diazahexadekan-1,16-diyl bismethakrylát	50-75
2-hydroxyethylmethakrylát	10-20
Bis(1,2,2,6,6-pentamethyl-4-piperidyl)	< 5
Methyl 1,2,2,6,6-pentamethyl-4-piperidyl)	< 5
Difenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)fosfin oxid	1-5
Kyselina akrylová	0,1-1
Ethylen-dimethyl akrylát	< 10
2-hydroxyethyl akrylát	0,1-1

Pro DLP tiskárnu Micro HD+ od společnosti EnvisionTEC byla použita necytotoxická pryskyřice s obchodním názvem 3DeltaHear (DeltaMed) jejíž složení není dostupné, podléhá obchodnímu tajemství výrobce. Veškeré SLA a DLP výtisky byly promyty v lázni isopropylalkoholu a následně vytvrzeny v UV vytvrzovacích stanicích Form Cure (pro SLA tisk) a Otofash G171 (pro DLP tisk).

Pro 3D tisk technologií fused deposition modeling (FDM) na tiskárně Ultimaker S5 byl použit filament kyseliny polymléčné od společnosti Ultimaker.

### 5.1.5 Hedvábný protein – fibroin

Mezi použité přírodní polymery se řadí hedvábný protein získaný z kokonů bource morušového (*bombyx mori*), Obr. 11. Příprava fibroinu spočívá v povaření kokonů *bombyx mori* v roztoku uhličitanu sodného, následným promytím, vysušením, rozpuštěním v roztoku bromidu lithného, dialýzou a lyofilizací (postup dle protokolu D. N. Rockwooda [273]). Výsledným produktem je regenerovaný hedvábný protein ve formě bílé houbovité struktury.



Obr. 11 - strukturní vzorec fibroinu.

### 5.1.6 Hliník

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

## 5.2 Charakterizace vzorků, použité přístroje a software

Povrchy, eventuálně řezy vzorků byly analyzovány pomocí:

**Digitálního mikroskopu** – DinoLite AM4815ZT - se zvětšením 20× – 220×.

**Optické mikroskopie** – mikroskopy Nikon Eclipse 50i a Olympus IX51 – se zvětšením 10× – 400×.

**Konfokální mikroskopie** – Olympus FluoView FV 3000 - se zvětšením 4× – 600×.

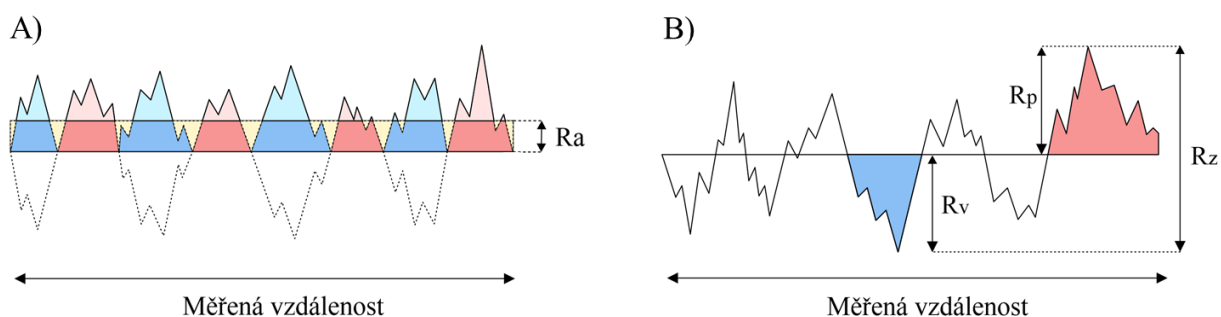
**Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)** – přístroj Phenom Pro. Vzorky byly před vložením do mikroskopu pokoveny pomocí naprašovačky kovů Quorum SC 7620 směsí zlata a paladia při proudu 18 mA po dobu 30 sekund

a samotné pozorování vzorku bylo prováděno při urychlovacím napětí 10 kV v režimu zpětně odražených elektronů.

**Mikroskopie atomárních sil (AFM)** – přístroj Dimension ICON, Bruker. Rychlost skenování povrchu vzorku byla 0,5 - 1 Hz s rozlišením 512×512 pixelů v poklepovém režimu. Pro měření byla použita silikon nitridová sonda s rezonanční frekvencí 70 kHz a konstantou tuhosti 0,4 N/m (ScanAsyst-Air od společnosti Bruker). Měření byly prováděny při laboratorní teplotě a vlhkosti.

Měření **piezoelektrické odezvy (PFM)** bylo provedeno pomocí AFM (Dimension ICON, Bruker), vybaveného piezoelektrickým modulem za použití sondy s hrotem potaženým slitinou Pt-Ir s odporem 0,01-0,025  $\Omega\cdot\text{cm}$ , konstantou tuhosti 3 N/m, poloměrem zakřivení 25 nm a rezonanční frekvencí 75 kHz. Pro měření hysterezních smyček bylo aplikováno napětí v rozsahu -12 až +12 V.

**Povrchové nerovnosti** vzorků byly analyzovány pomocí kontaktního profilometru (DektakXT, Bruker) s diamantovým hrotem o poloměru křivosti 2  $\mu\text{m}$ . Měřená dráha byla 3 až 5 mm dle typu vzorku a byly stanoveny hodnoty parametrů  $R_a$  a  $R_z$  (Obr. 12), kde parametr  $R_a$  udává střední aritmetickou odchylku všech částí hodnot profilu drsnosti. Parametr  $R_z$  pak reprezentuje součet maximální výšky výstupku ( $R_p$ ) a maximální hloubky prohlubně ( $R_v$ ) v rámci měřené délky profilu vzorku. Na každém vzorku bylo provedeno nejméně 5 měření.



Obr. 12 – znázornění parametrů  $R_a$  (A) a  $R_z$  (B) na měřené vzdálenosti profilu daného vzorku. [274]

**Povrchová topografie** byla dále analyzována pomocí bezkontaktního profilometru (Contour GT-K, Bruker) s použitím bílého světla a čočky se zvětšením 20×.

Pro rekonstrukci vnitřní struktury 3D tištěných scaffoldů byla použita **rentgenová tomografie**, Skyscan 1074 od společnosti Bruker. K dalšímu zpracování získaných dat byl použit software DataViewer, CTVox a CTAn od společnosti Bruker.

Další použitou charakterizační technikou byla **infračervená spektroskopie** za použití spektroskopu Nicolet iS5 od společnosti Thermo Scientific. Byla použita technika ATR s Ge krystalem. Při analýze bylo provedeno 32 skenů s rozlišením  $4 \text{ cm}^{-1}$  v rozsahu  $400$  až  $4000 \text{ cm}^{-1}$ .

Pro charakterizaci statických **kontaktních úhlů smáčení** byl použit goniometr Drop Shape Analyzer DSA30 se softwarem Advance od společnosti KRÜSS GmbH. Na každý vzorek bylo deponováno nejméně 5 kapek ultračisté vody o objemu  $3 \mu\text{l}$ .

**UV-VIS spektra** vodných extraktů PE-fólie byla zaznamenána pomocí CARY 300 Conc UV-Visible spektrofotometru (Varian). Byly použity standardní obdélníkové květy z křemenného skla s délkou dráhy  $10 \text{ mm}$ . Naměřený rozsah absorpance byl od  $190$  do  $800 \text{ nm}$ .

**Prvková analýza** extraktů z PE fólie byla provedena pomocí analyzátoru uhlíku a dusíku TOC-L (Shimadzu).

Časová závislost **povrchového napětí** kapalin byla měřena pomocí Wilhelmyho destičkové metody s Krüss K12 Processor Tensiometer (KRÜSS GmbH). Měření probíhala při  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu  $180 \text{ s}$ .

### **3D tisk**

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

## 6. Výsledky a diskuze

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

### 6.1 Příprava 3D scaffoldů pro biologické aplikace

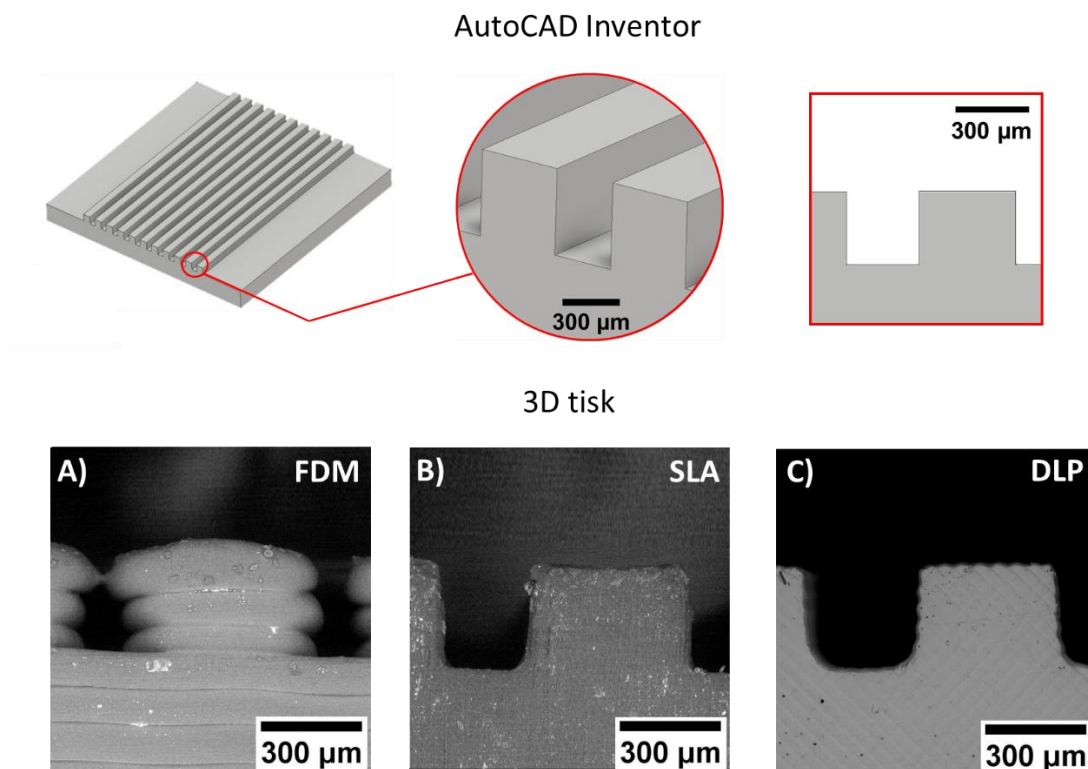
Jedním z přístupů, jak připravit scaffold pro kultivaci buněk je aditivní výroba. V závislosti na typu tištěného materiálu je nezbytné zvolit nejvhodnější techniku jeho zpracování a následně optimalizovat procesní parametry 3D tisku nebo zvláknování. V následujících podkapitolách budou diskutovány rozdílné tiskové přístupy (SLA, DLP, FDM, EPA 3D tisk, electrospinning) umožňující zpracovávat polymerní materiály aplikovatelné v oblasti regenerativní medicíny.

#### 6.1.1 Srovnání přesnosti standardních tiskových přístupů SLA, DLP, FDM

Z konstrukční a fyzikální podstaty jednotlivých tiskových přístupů (viz teoretická část práce) plyne, že nelze u všech technik dosáhnout stejné přesnosti tisku a kvality vytvářeného povrchu. S ohledem na tento fakt byla provedena studie popisující možnosti jednotlivých tiskových technik s ohledem na tvarovou a strukturní reprodukovatelnost tištěného modelu. V rámci této studie nebyla řešena pouze přesnost jednotlivých tiskových přístupů a jejich limity, které jsou do jisté míry dány konstrukčními prvky použitých tiskáren. Byla zde rovněž řešena otázka, jak pomocí změny procesních parametrů tisku ovlivňovat povrchovou strukturu vytvářených mřížkových a drážkových struktur. Parametr povrchové struktury má zásadní vliv na chování buněk, které s ním přichází do kontaktu. Rozdílná povrchová topografie může zásadně podmiňovat buněčné funkce, jak je známo z literatury. [255,262,263]

Jako modelový systém byla zvolena destička o rozměrech 12×12 mm s drážkami o výšce 300 μm a šířce 400 μm. Jednotlivé drážky jsou od sebe vzdáleny 300 μm, Obr. 13 (nahore). Nastavený rozměr drážkové struktury byl zvolen záměrně s ohledem na rozměrové požadavky kladené na buněčné scaffoldy. [275]

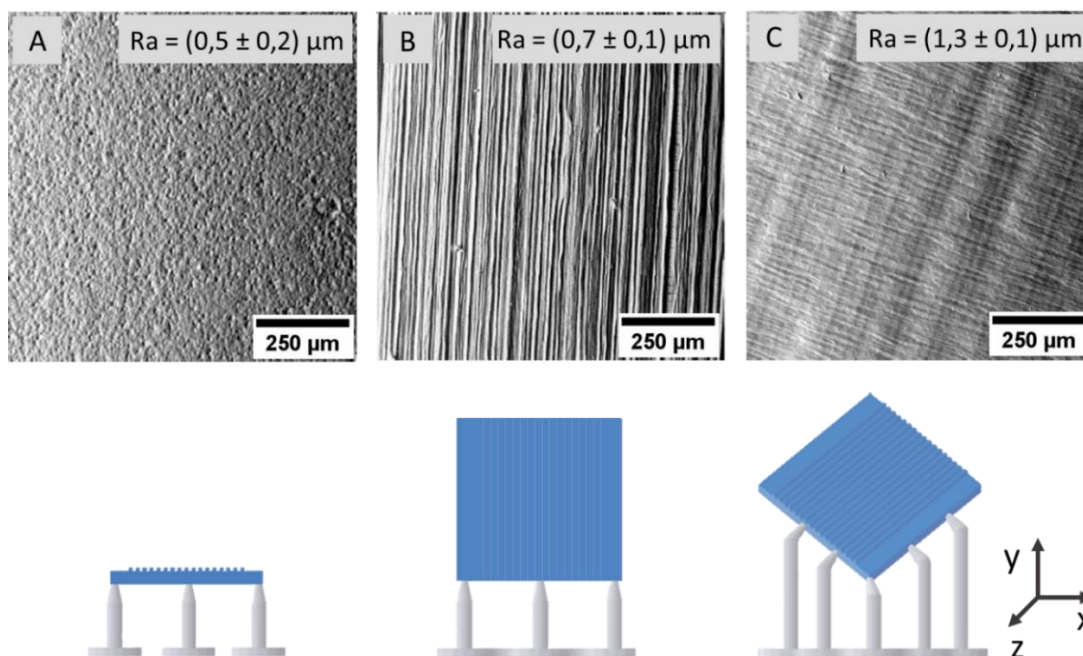
Pro metodu FDM 3D tisku byla použita tiskárna Ultimaker S5, materiál PLA s tryskou o průměru 400  $\mu\text{m}$ . SLA tisk probíhal na tiskárně Form2 od společnosti Formlabs a jako tiskový materiál byla zvolena pryskyřice s označením „Clear“. Průměr vytvrzovaného bodu v případě SLA byl 140  $\mu\text{m}$ . Pro DLP tisk byla použita tiskárna Micro HD od společnosti EnvisionTEC s tiskovým materiálem „3DeltaHear“ a průměrem vytvrzovaného bodu 30  $\mu\text{m}$ . V případě FDM tisku byla nastavena výška tiskové vrstvy na 100  $\mu\text{m}$ . U SLA a DLP byla nastavena nejnižší možná tloušťka tiskové vrstvy na úrovni 25  $\mu\text{m}$ . Vezmeme-li v potaz výšku tiskových vrstev, šířku vytvrzovaných bodů a průměr trysky u FDM není ničím překvapující, že nejlepšího rozlišení dosahujeme v případě DLP tisku. Tato skutečnost je patrná z Obr. 13. Nahoře na Obr. 13 je zobrazen tiskový model destičky vytvořený v softwaru AutoCAD Inventor. Pod tímto modelem je uveden boční pohled na vytvářené drážky získaný pomocí elektronového mikroskopu. Na výtisku vytvořeném 3D tiskárnou typu FDM (Obr. 13A), jsou zřetelně pozorovatelné jednotlivé vrstvy tisku. Po srovnání s navrhovaným modelem lze konstatovat, že nebyla dodržena požadovaná šířka výstupků a ani jejich odstup. Diametrálně odlišné výsledky vzhledem k FDM lze pozorovat v případě použití SLA a DLP tisku, Obr. 13B, C. Nejlepší reprodukovatelnost požadovaného modelu lze dosáhnout za použití DLP tiskárny. Rozměry výtisku se nejvíce blíží požadovanému modelu.



Obr. 13 – porovnání návrhu modelu získaného ze softwaru AutoCAD Inventor a reálných výtisků připravených pomocí metod 3D tisku A) FDM, B) SLA, C) DLP. Obrázky A), B) a C) ze SEM.

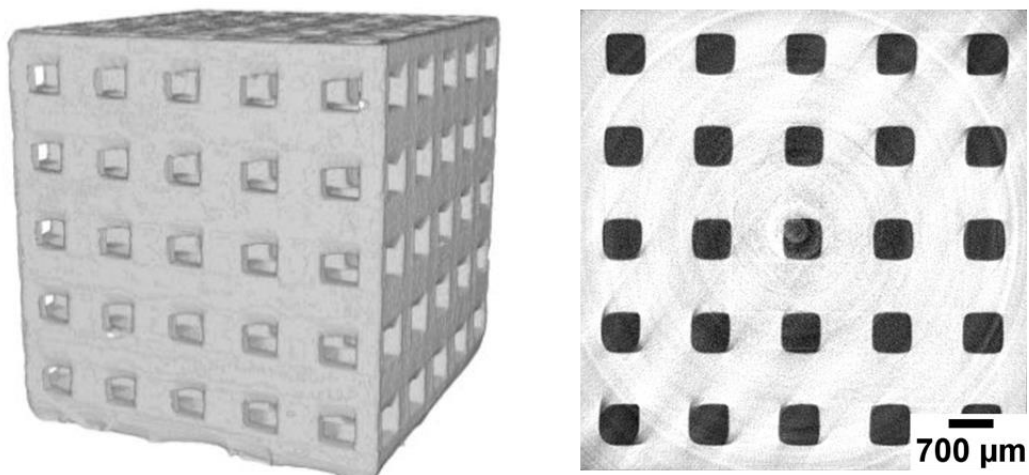
Z provedených experimentů dále vyplynulo, že v případě SLA a DLP tisku lze pomocí rozdílné orientace tiskového modelu vzhledem k tiskové podložce ovlivňovat typ povrchové struktury. Vliv této proměnné je demonstrován na výtiscích připravených pomocí SLA tiskárny Form2 od společnosti Formlabs. Na Obr. 14 jsou zobrazeny SEM snímky povrchů vzorků, jež byly při tisku odlišně orientovány vzhledem k tiskové podložce. Pro tisk v rámci tohoto experimentu byla použita pryskyřice s označením „Clear“, výška tiskové vrstvy byla nastavena na 25  $\mu\text{m}$ . Obr. 14 nahoře zobrazuje snímky z elektronového mikroskopu, na kterých je dobře viditelný rozdíl strukturování povrchu v závislosti na orientaci modelu při samotném 3D tisku, Obr. 14 (dole). Strukturu povrchu při horizontálním tisku Obr. 14A lze přirovnat ke vzhledu pomerančové slupky. Jakmile však dojde k přetočení modelu do svislé polohy, je možné pozorovat povrchovou texturu orientovaných drážek Obr. 14B. Při orientaci modelu pod úhlem 45° v ose Y a 30° v ose Z Obr. 14C taktéž dochází k povrchové strukturalizaci vzorku.

Tyto skutečnosti se odvíjejí od postupu jakým SLA tiskárna pracuje. Konkrétně se jedná o moment, kdy po každé natisknuté vrstvě je platforma odtržena ode dna tiskové vany, aby mohlo dojít k promíchání pryskyřicové lázně. Dalším klíčovým faktorem je také úhel dopadu laseru, který vytvrzuje pryskyřici. Z výsledného porovnání plyne, že orientace tisku má nezanedbatelný vliv na kvalitu povrchu výtisku a je potřeba pečlivě zvážit úhel natočení jednotlivých modelů, respektive funkčních ploch přicházejících do styku s kultivovanými buňkami.



Obr. 14 – SEM snímky povrchů výtisků (horní řada) získaných pomocí metody SLA 3D tisku a ukázka jejich orientace v programu PreForm (spodní řada). A) horizontální tisk, B) svislý tisk, C) tisk pod úhlem.

Mnohem složitější situace nastává v okamžiku, kdy chceme vytvořit prostorový 3D mřížkový model. Z porovnání uvedených na Obr. 14 se jeví jako nejvhodnější použití SLA a DLP technologie. Nicméně, jak ukázaly provedené experimenty v oblasti tvorby prostorových modelů mají tyto tiskové přístupy své limity zejména s ohledem na následnou nezbytnost odstranění nevytvrzené pryskyřice z objemu dané prostorové mřížky. To znamená, že je nutné nastavit dostatečně velké průchozí otvory, z nichž bude možné odstranit nevytvrzenou pryskyřici. Tento poznatek ukazuje na skutečnost, že v případě tisku prostorových mřížek pomocí SLA nelze reálně dosáhnout maximálního možného rozlišení definovaného výrobcem daného tiskového zařízení. Z experimentů provedených na tiskárně Form2 od firmy Formlabs vyplynulo, že pro vytvoření průchozí mřížky je nezbytné nastavit v tiskovém modelu průchozí otvory o rozměru minimálně  $500 \times 500 \mu\text{m}$  a výšku tiskové vrstvy v rozmezí 25 až  $50 \mu\text{m}$ . Příklad vytvořené prostorové mřížky pomocí této tiskárny je uveden na Obr. 15. Tiskovým materiálem byla pryskyřice s označením „Clear“ a výška tiskové vrstvy byla stanovena na  $50 \mu\text{m}$ . Modelem se stala kubická mřížka s otvory o rozměrech  $700 \times 700 \times 700 \mu\text{m}$ . Výsledný výtisk uvedený na Obr. 15 byl zobrazen pomocí rentgenové tomografie.



Obr. 15 – rekonstrukce vytištěného scaffoldu pomocí SLA tiskárny Form2 (vlevo). Řez středem vytištěné prostorové mřížky (vpravo). Data z rentgenové tomografie.

Poznatky z experimentů spojených s tvorbou prostorových mřížek byly využity při návrhu a výrobě průtokových bioreaktorů diskutovaných v rámci výsledků této práce.

### 6.1.2 Vlákenné scaffoldy na bázi polykaprolaktonu

Následující část výsledků práce bude věnována originálním přístupům přípravy vláknenných scaffoldů na bázi biokompatibilního syntetického polymeru –

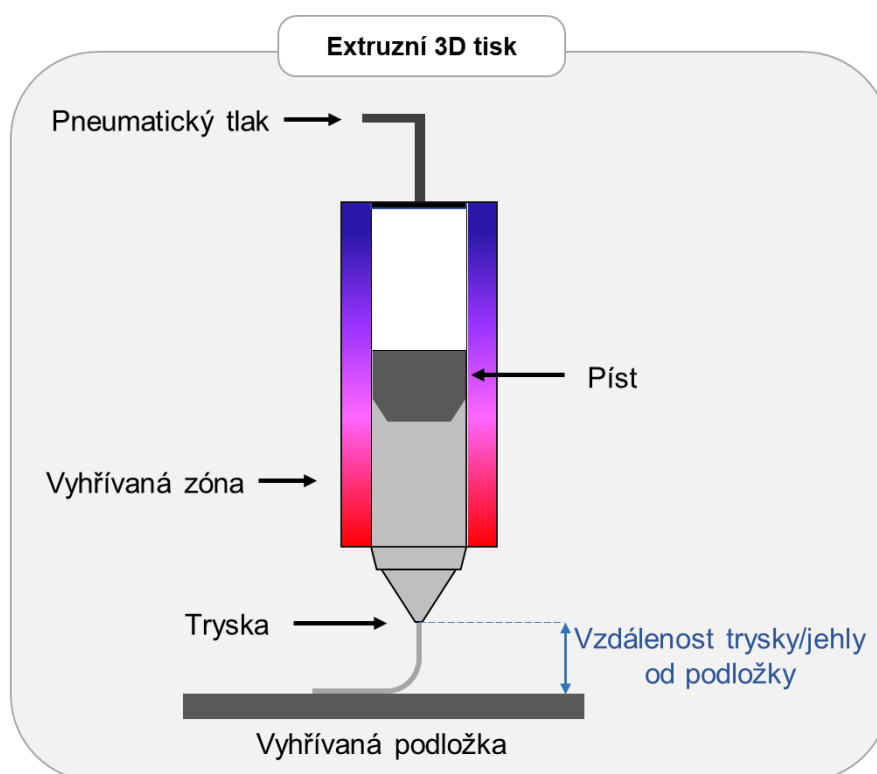


polykaprolaktonu (PCL). Zpracování tohoto typu materiálu do podoby scaffoldů je v literatuře široce diskutováno. [32–34,276–281] Oproti literatuře zde bude prezentován originální přístup zpracování tohoto typu materiálu založený na použití roztoků tohoto polymeru. Mnoho literárních prací [26,282–284] se zabývá zpracováním taveniny tohoto termoplastického materiálu, jenž začíná téct při překročení 60 °C.

### 6.1.2.1 Příprava hierarchicky strukturovaných PCL scaffoldů pomocí 3D tisku

Nejjednodušším typem scaffoldu, který lze vytvářet pomocí 3D tisku je prostorová mřížka. Většina literárních postupů popisuje přípravu rozdílných typů 3D tištěných mřížkových scaffoldů tvořených hladkými vlákny bez významnějších povrchových nerovností. [285,286] Hladký povrch vytlačovaných vláken spolu s jejich relativně velkým průměrem limituje možné interakce buněčných receptorů s materiálovým povrchem.

Jedním z možných způsobů přípravy scaffoldu s hladkým povrchem vláken je extruzní tisk termoplastického materiálu, jehož schéma je zobrazeno na Obr. 16. Tento typ tisku je v rámci této práce používán jako srovnávací, viz Obr. 17 vlevo.



Obr. 16 – schéma extruzního tisku termoplastického materiálu či polymerních roztoků.

Tisk vlákných mřížek probíhal na tiskárně BIO X s použitím pneumatických tiskových hlav. Mezi kritické parametry tisku, které byly optimalizovány při použití BIO X tiskárny patří nastavení vylačovacího tlaku, teploty tiskové hlavy a tiskové podložky, rychlost tisku a v neposlední řadě volba vhodné tiskové hlavy. Mimo to byla používána tisková hlava s možností chlazení až na 4 °C. Pomocí pneumatických tiskových hlav byly připravovány hladké i hierarchicky strukturované scaffoldy jak z taveniny, tak z roztoků, které obsahovaly těkavá rozpouštědla nebo rozpouštědla s teplotou tuhnutí v rozmezí 4 až 20 °C.

Hladké vlákné PCL struktury, Obr. 17A, byly tištěny pomocí termoplastické extruzní tiskové hlavy, která se skládá z ocelové vyhřívané vložky a tlačného pístu. Pro tisk PCL z taveniny byla teplota tiskové hlavy nastavena na 110 °C. Tisková podložka byla pro lepší adhezi PCL k podkladovému materiálu zahřívána na 50 °C. Povrch takto vytištěných vláken je hladký bez náznaků výrazného zvrásnění, Obr. 17A.

V souladu s hlavním cílem této části práce, tj. příprava hierarchicky strukturovaných vláken bylo nezbytné přejít k roztokovému způsobu tisku. Za tímto účelem byla vyhledávána nejvhodnější dobrá rozpouštědla pro PCL, která lze zároveň mísit s další kapalinou, špatným rozpouštědlem, které se po částečném odpaření dobrého rozpouštědla fázově separuje za tvorby povrchových prohlubní. Proces tvorby porézních struktur pomocí fázové separace vyvolané působením směsi dobrého a špatného rozpouštědla v polymerním roztoku je teoreticky rozpracován v práci E. Wrzecionka [287] a bude dále rozveden v závěrečných kapitolách výsledků této práce.

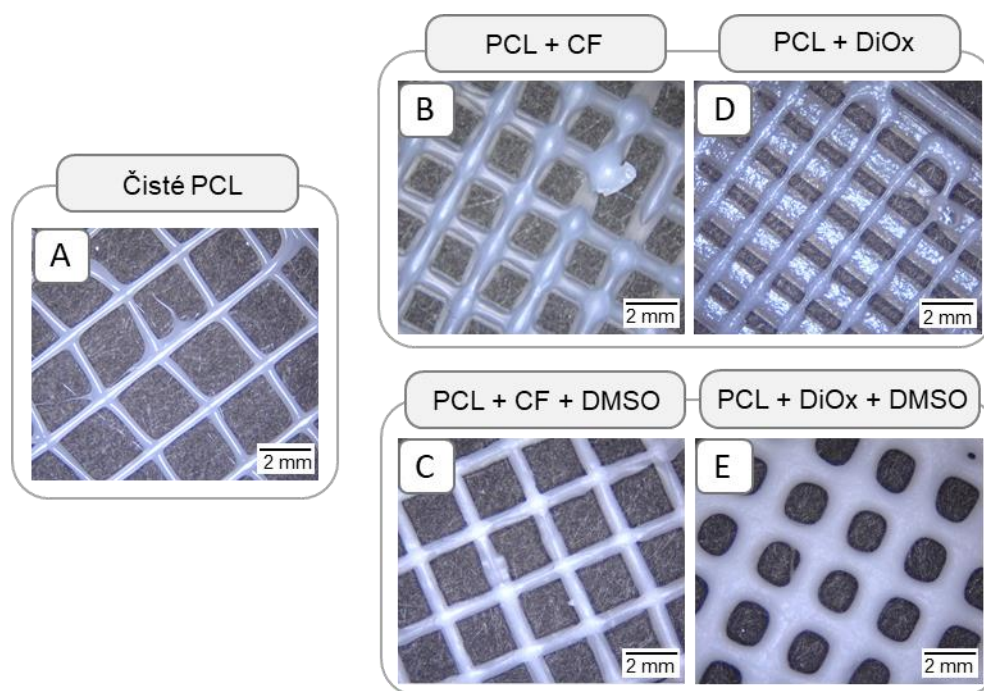
Dalšími faktory při výběru vhodných rozpouštědel pro PCL byly rozdílné rychlosti odpařování a pokud možno co nejnižší toxicita. S ohledem na tyto podmínky byla zvolena dvě dobrá rozpouštědla – chloroform (CF) a 1,4-dioxan (DiOx). Jako špatné rozpouštědlo byl vybrán dimethylsulfoxid (DMSO). Výsledné povrchy tištěných mřížek ze směsi PCL a dobrého rozpouštědla jsou zobrazeny na Obr. 18B a D. Povrchy tištěných vláken z roztoků PCL vykazují známky povrchového zvrásnění. Při bližším ohledání je patrné, že zde dochází k zvýraznění textur jednotlivých sférolitů PCL, což dokazují ostré přechody mezi jednotlivými strukturami. Při použití dioxanu jako dobrého rozpouštědla se navíc na povrchu vyskytují praskliny oddělující jednotlivé sférolity.

V rámci experimentů byly vyhledávány vhodné poměry mezi polymerem, dobrým a špatným rozpouštědlem, které povedou k vytvoření porézní struktury na povrchu tištěných PCL vláken pomocí pneumatické extruze při 24 °C. Jako nejvhodnější systém se jeví směs PCL + CF + DMSO připravený v poměru

1:9:0,1, viz Obr. 17C a Tab. 4. Vzhledem k odlišným viskozitám připravených směsí bylo nutné nastavit rozdílné tiskové parametry, viz Tab. 4.

Tab. 4 – shrnutí připravených tiskových směsí a parametrů 3D extruzního tisku. Množství jednotlivých složek uvedeno v hmotnostním podílu.

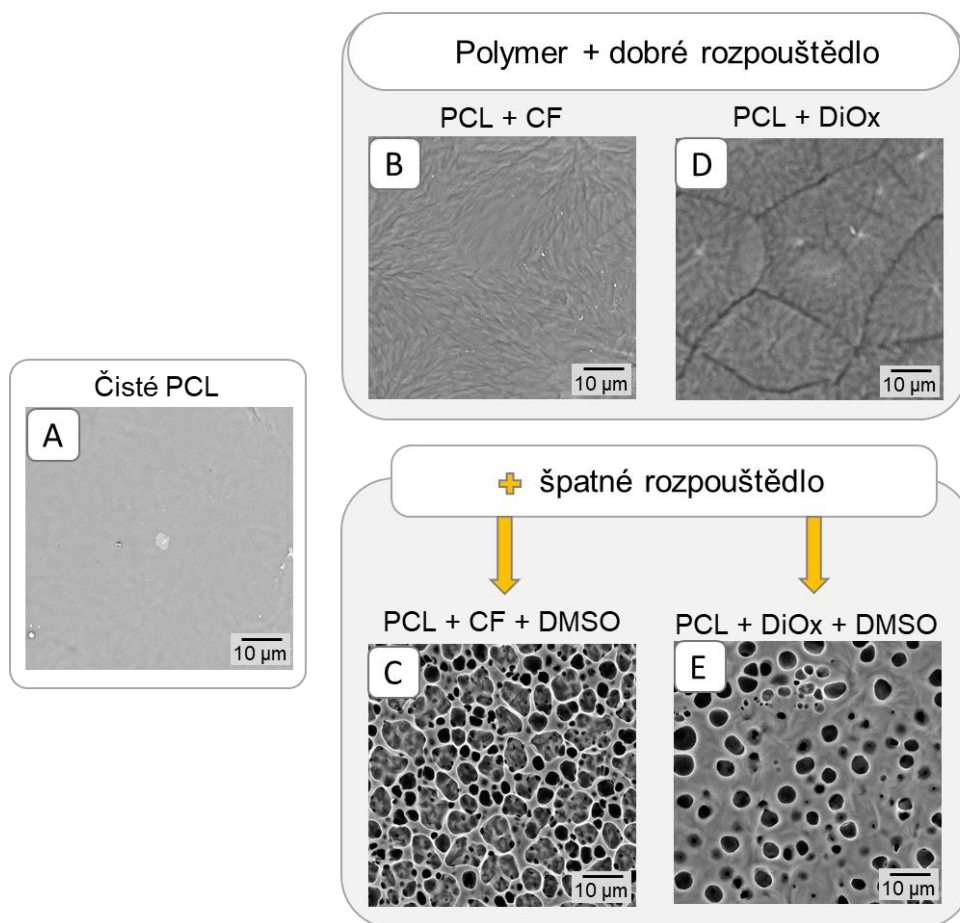
	Složení směsi	d jehly [mm]	T tisku [°C]	T podložky [°C]	v tisku [mm/s]	Tlak [kPa]
Čisté PCL	1	1	110	60	1	700
PCL+CF	1:9	0,108	15/24	15/24	1	200
PCL+CF+DMSO	1:9:0,1	0,108	15/24	15/24	1	180
PCL+CF+DMSO +H <sub>2</sub> O	1:9:0,1:0,1	0,108	15/24	15/24	1	180
PCL+DiOx	1:9	0,108	15/24	15/24	1	150
PCL+DiOx+DMSO	1:9:0,1	0,108	15/24	15/24	1	120



Obr. 17 – snímky reálných 3D tištěných PCL vláknenných scaffoldů pořízených pomocí digitálního mikroskopu.

Výsledné povrchy vytištěných vláken tvořících mřížky na Obr. 17 jsou v detailu zobrazeny na Obr. 18. Z obrázku je patrné, že po přidavku špatného rozpouštědla do tiskové směsi došlo vlivem fázové separace k výrazné změně

a oba polymerní povrchy, jak při použití CF či DiOx jako dobrého rozpouštědla, vykazují změnu povrchového reliéfu a lze je označit jako hierarchicky strukturované.



Obr. 18 – detailní pohled na povrch vlákněných PCL scaffoldů uvedených na Obr. 17. Povrchy zobrazeny pomocí SEM.

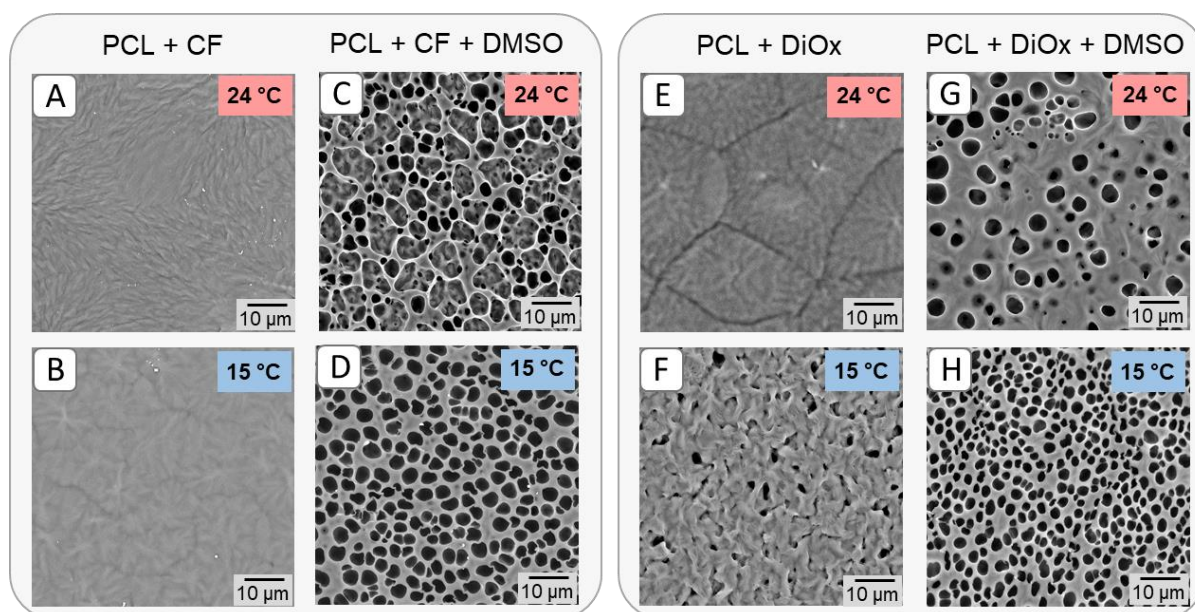
Jak plyne ze závěrů prezentovaných v práci E. Wrzecionka [287] proces tvorby povrchového zvrásnění pomocí fázové separace je ovlivňován celou řadou proměnných, mezi které patří změny v rychlosti odpařování rozpouštědel v důsledku změn teploty. Výše prezentované experimentální výsledky byly získány při pokojové teplotě (teplota tisku i tiskové podložky byla nastavena na 24 °C). Pro vystižení vlivu teploty byly v dalším kroku provedeny experimenty při 15 °C. Experimenty zahrnovaly tisk směsi polymeru a dobrého rozpouštědla a také směsi polymeru s dobrým i špatným rozpouštědlem. Výsledné povrchy jsou zobrazeny na Obr. 19.

První sledovanou tiskovou směsí je PCL + CF. Při porovnání obou teplot tisku je patrné, že tisk při 15 °C zapříčinil mírnou změnu vzhledu povrchu, která se vyznačuje viditelnou přítomností sférolitů PCL, které jsou menší oproti tisku při 24 °C, viz srovnání na Obr. 19A a B. Mnohem výraznější změnu povrchového reliéfu lze pozorovat v případě směsi PCL + DiOx kdy při nižší teplotě tisku

vzniká výraznější povrchové zvrásnění, u kterého není tak patrný sférolitický charakter.

Zajímavější situace nastává u směsi polymeru s dobrým i špatným rozpouštědlem, kde dochází k poměrně velkým změnám ve struktuře na povrchu vláknenného scaffoldu. Směs PCL + CF + DMSO tištěná při 24 °C se vyznačuje širšími povrchovými prohlubněmi se sekundární vnitřní porozitou. Při snížení teploty tisku na 15 °C dochází ke zmenšení šířky povrchových prohlubní, které jsou odděleny širšími rozhraními, viz Obr. 19C, D. Při srovnání povrchu směsi PCL + DiOx + DMSO tištěné při 24 °C a 15 °C je patrné, že při nižší teplotě tisku dochází k výraznému nárůstu počtu prohlubní s menší šířkou, Obr. 19G, H.

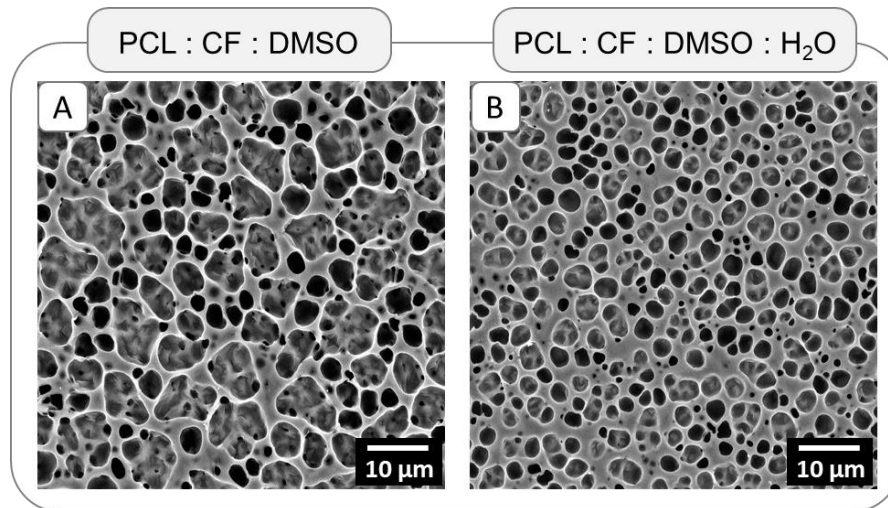
Zmenšování průměrné šířky povrchových prohlubní při nižší teplotě tisku je dána zvyšující se viskozitou polymerní směsi, která brání koalescenci separovaných kapek špatného rozpouštědla (DMSO) do větších celků. Tuto skutečnost dále podporuje fakt, že se pohybujeme pod teplotou tání DMSO, která je okolo 19 °C.



Obr. 19 – detail povrchu vláken PCL tvořících scaffold vytištěných ze směsi polymeru s dobrým či dobrým i špatným rozpouštědlem tištěných při různých teplotách. Obrázky ze SEM.

V průběhu formování povrchových prohlubní na povrchu tištěných vláken nelze zanedbat vliv vzdušné vlhkosti vzhledem ke skutečnosti, že tisk probíhal v laboratoři při 24 °C nebo 15 °C. Bez ohledu na teplotu tisku, samotné rychlé odpařování dobrého rozpouštědla má za následek ochlazování povrchu, na kterém může kondenzovat vzdušná vlhkost, viz princip metody „Breath figures“ [288,289]. Ve snaze o posouzení vlivu vzdušné vlhkosti nebo spíše vody jako

takové na typ vznikajícího povrchového zvrásnění byla do směsi PCL + CF + DMSO přidána voda. Výsledky tohoto tiskového experimentu, který byl realizován při 24 °C je uveden na Obr. 20. Přídavek vody do směsi polymeru s rozpouštědly způsobuje vznik menších pórů oddělených širším rozhraním, podobně jako v případě nižší teploty tisku, Obr. 19D. Nicméně povrchové prohlubně uvedené na Obr. 20B nejsou tak výrazné z hlediska své šířky a hloubky jako v případě Obr. 19D, z čehož plyne, že teplota tisku patří mezi zásadní proměnné mající vliv na typ vznikajícího povrchového reliéfu.



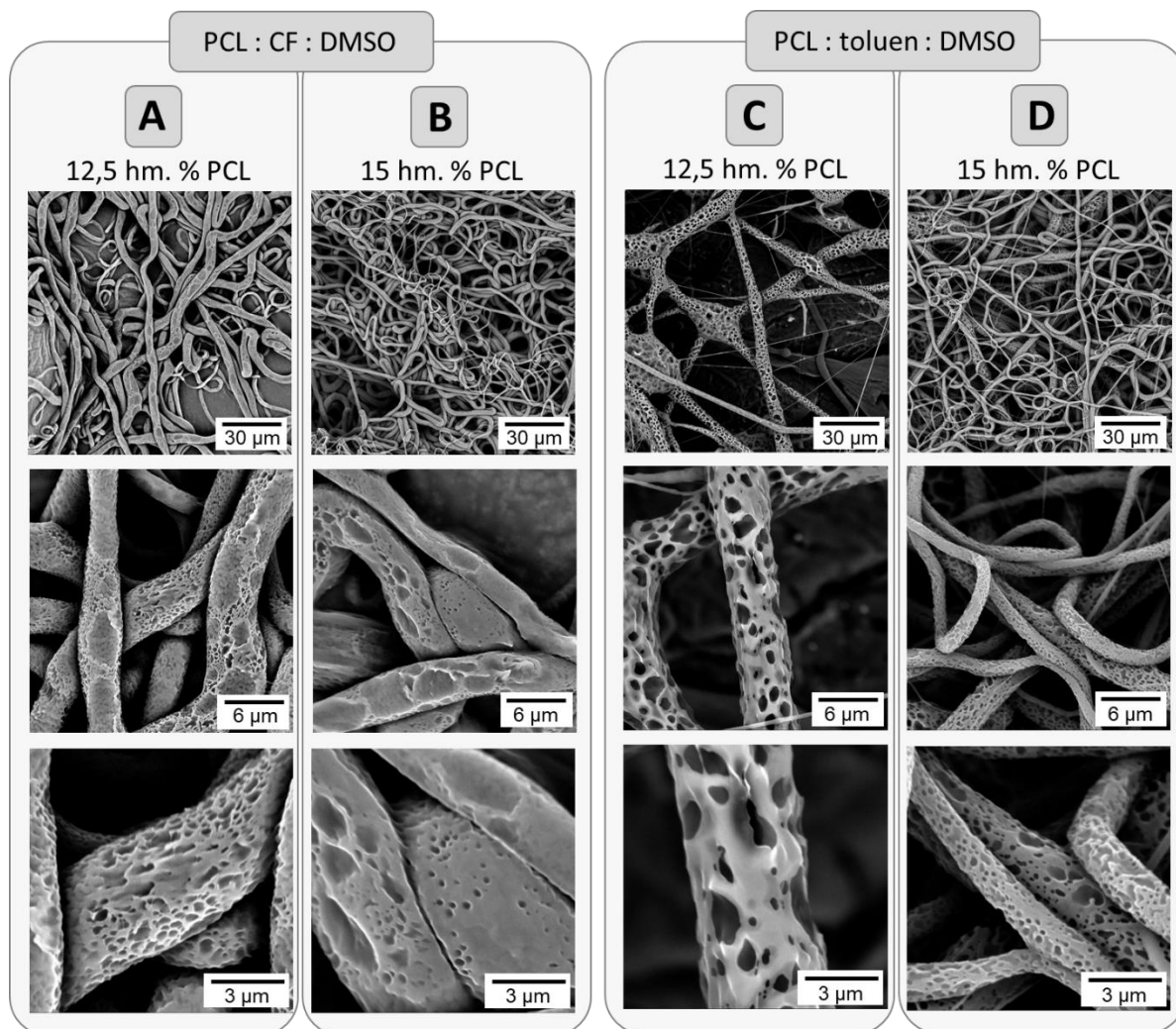
Obr. 20 – detail povrchu vlákna tištěného PCL scaffoldu bez a s přídavkem vody do tiskové směsi. Obrázky ze SEM.

### 6.1.2.2 Příprava hierarchicky strukturovaných PCL vláken pomocí electrospinningu

Jedním z možných přístupů vytváření podpůrných vláknenných struktur pro buňky je elektrostatické zvlákňování (electrospinning). [151,290] Tato metoda umožňuje urychlení nabitého proudu polymerního roztoku ve formě vláken o průměru jednotek nanometrů až desítek mikrometrů směrem k uzemněnému kolektoru. Výsledná vlákna vykazují extrémně vysoký specifický povrch právě díky poměru plochy vlákna vzhledem k jeho objemu. [291] Jak již bylo diskutováno dříve v textu – buňky jsou vysoce citlivé na povrchovou topografii [255,262,263] a proto zde bylo sledovány možnosti tvorby strukturovaných vláken.

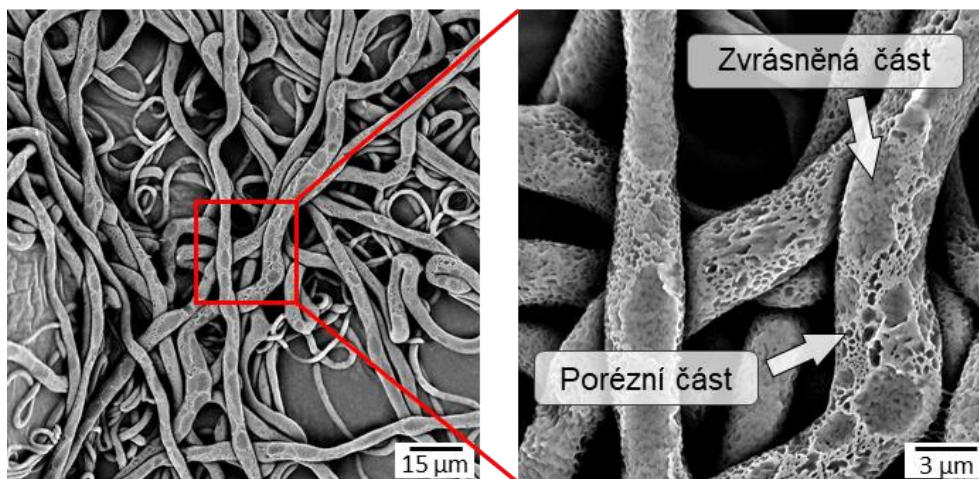
Poznatky získané při tisku vláknenných struktur ze směsi PCL s dobrými a špatnými rozpouštědly prezentované v předešlé části výsledků byly využity pro elektrostatické zvlákňování při 15 kV. Prvními testovanými roztoky byla směs PCL + CF + DMSO s rozdílným hmotnostním podílem PCL, Obr. 21A, B.

Druhou směsí byl PCL + toluen + DMSO, Obr. 21C, D. Z výsledných SEM snímků na Obr. 21 plyne, že i v případě electrospinnovaných vláken dochází vlivem fázové separace ke vzniku hierarchicky strukturovaných mikro vláken.



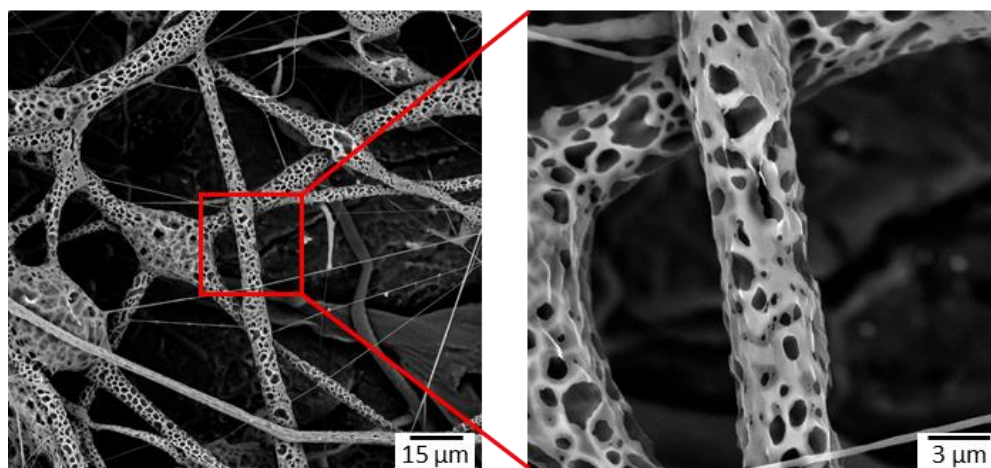
*Obr. 21 – hierarchicky strukturovaná mikrovlákná připravená pomocí electrospinningu ze směsí obsahujících PCL s CF/toluenem a DMSO. Obrázky ze SEM.*

Na Obr. 22 a Obr. 23 jsou uvedeny detailní pohledy na vybraná hierarchicky strukturovaná vlákna prezentovaná na Obr. 21. Vlákna připravená ze směsi PCL + CF + DMSO s koncentrací 12,5 hm.% PCL v roztoku vykazují průměrnou šířku v řádech jednotek mikrometrů s nerovnoměrným povrchovým zvrásněním v podobě prohlubní.



Obr. 22 – detail strukturovaného PCL vlákna připraveného pomocí electrospinningu ze směsi PCL + CF + DMSO. Koncentrace polymeru v roztoku 12,5 hm. %. Obrázky ze SEM.

Změna typu rozpouštědla s vyšší hustotou (chloroform,  $\rho = 1,49 \text{ g/cm}^3$ ) za rozpouštědlo s nižší hustotou (toluen,  $\rho = 0,87 \text{ g/cm}^3$ ) má za následek výraznější fázovou separaci DMSO ( $\rho = 1,1 \text{ g/cm}^3$ ) vzhledem k PCL. Vznikají vlákna „houbovitého“ charakteru s prohlubněmi v řádech stovek nanometrů až jednotek mikrometrů, Obr. 23. Průměr vznikajících vláken se pohybuje v řádech jednotek mikrometrů.



Obr. 23 – detail strukturovaného PCL vlákna připraveného pomocí electrospinningu ze směsi PCL + toluen + DMSO. Koncentrace polymeru v roztoku 12,5 hm. %. Obrázky ze SEM.

Originální postupy přípravy hierarchicky strukturovaných scaffoldů na bázi PCL jsou předmětem připravované publikace.



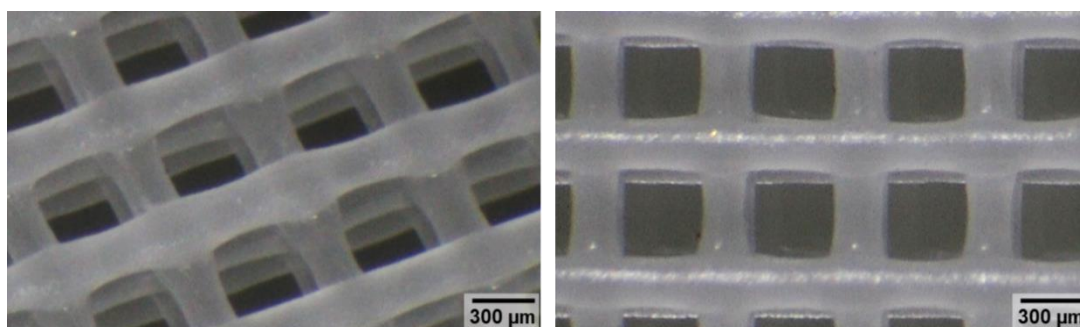
### 6.1.1 Poly (vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen)

Piezelektrické vlastnosti syntetického polymeru polyvinylidenfluoridu (PVDF) byly popsány již před více než 50ti lety. [292] Od té chvíle byl potenciál tohoto polymeru využit pro širokou škálu průmyslových i medicínských aplikací [293–296] nejen díky jeho piezelektrickému charakteru, ale také díky chemické odolnosti [235]. Následný objev možnosti vylepšení piezelektrických vlastností v podobě přípravy kopolymerů na bázi PVDF, kdy jsou využívány různé komonomerní jednotky jako je např. trifluorethylen nebo chlortrifluorethylen, ještě rozšířil jejich aplikační potenciál i v oblasti tkáňového inženýrství [297,298]. Kopolymer PVDF-TrFE je cytocompatibilní a nemá negativní vliv na buněčnou proliferaci. [237]

#### 6.1.1.1 Příprava PiezoRT vlákněných struktur pomocí extruzního tisku

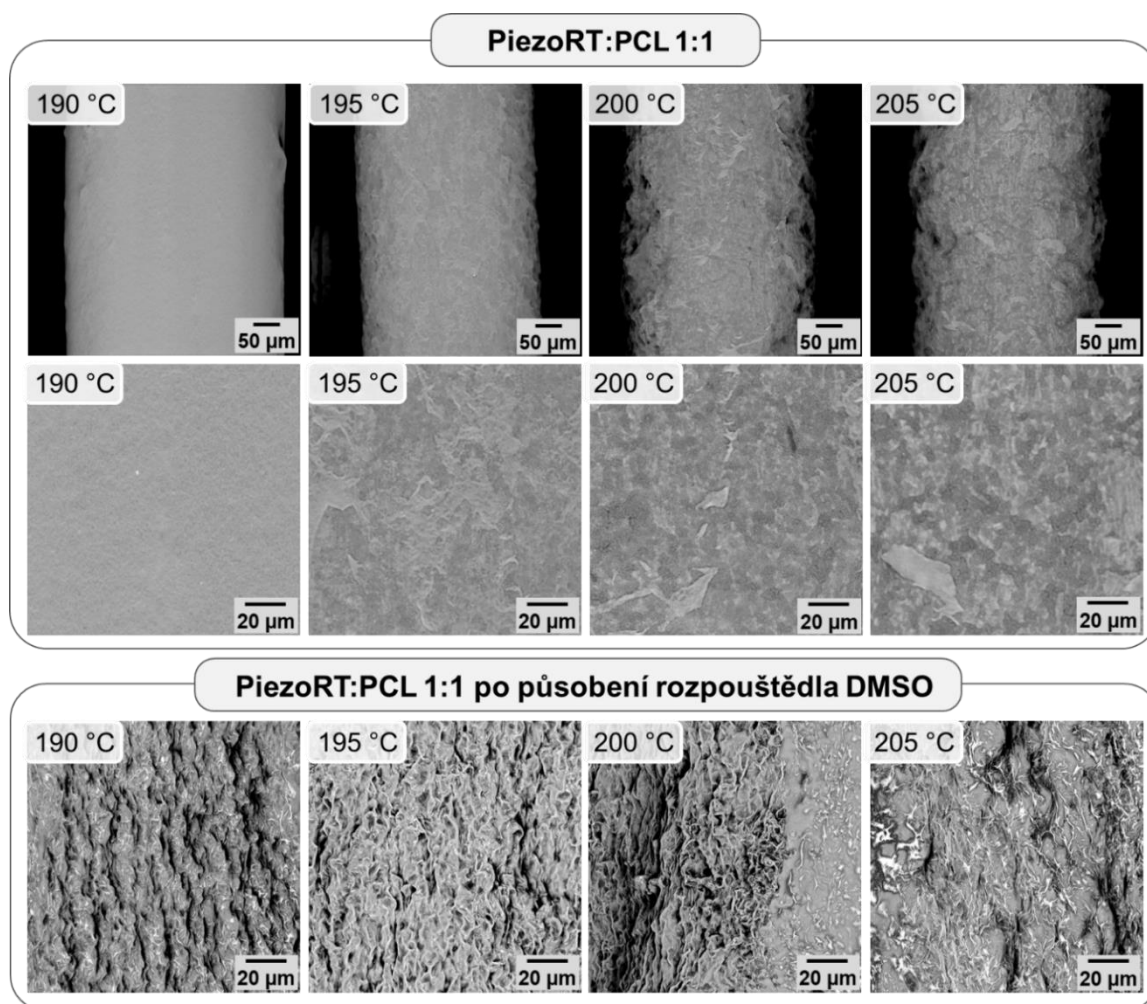
Obdobně jako u polykaprolaktonu i u poly (vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen) (PVDF-TrFE-CTFE) dále značeno „PiezoRT“ byla pro přípravu scaffoldů použita technologie extruzního 3D tisku, jejíž schéma je zobrazeno na Obr. 16. Polymer byl zpracováván z roztoku DMSO (či acetonu, triacetinu) nebo ze směsi s dalším polymerním systémem (PCL).

Pomocí extruzního tisku byla zpracována směs PiezoRT a dimethylsulfoxidu o hmotnostním poměru 1:1. DMSO je jedním z rozpouštědel doporučených výrobcem, v nízkých koncentracích není cytotoxické a vykazuje vysokou teplotu vzplanutí (90 °C). Optimalizací tiskových parametrů se podařilo připravit více vrstvou mřížku na bázi PiezoRT, Obr. 24. Tisk probíhal při teplotě 80 °C. Šířka trysky byla 200  $\mu\text{m}$  a vzdálenost trysky od podložky 1 mm. Tisková podložka byla vyhřívána na teplotu 65 °C pro snadnější přilnutí materiálu. Vytlačovací tlak byl nastaven na 700 kPa a rychlost posuvu hlavy byla 1 mm/s.



Obr. 24 – snímek reálně vytištěného scaffoldu ze směsi PiezoRT:DMSO (1:1). Vlevo mřížka snímaná pod úhlem, vpravo mřížka svrchu. Obrázky z optického mikroskopu.

Pomocí extruzního tisku byla dále zpracovávána směs PiezoRT:PCL (1:1) při teplotách 190 - 205 °C s rychlostí tisku 1 mm/s a vytlačovacím tlakem 500 kPa. Průměr trysky byl zvolen 300 μm. Podložka byla vyhřívána na 65 °C pro dosažení potřebné přilnavosti materiálu k tiskové podložce. Povrchy takto tištěných strun jsou zobrazeny na Obr. 25 (horní dva řádky). Z těchto snímků plyne, že při zvyšující se teplotě tisku dochází ke strukturním změnám povrchu, což může být způsobeno degradací některých složek směsi. Tištěné struny byly dále podrobeny testu stability v dimethylsulfoxidu (DMSO) po dobu 5 minut. DMSO bylo vybráno záměrně s ohledem na skutečnost, že pro PiezoRT polymer se řadí mezi dobrá rozpouštědla a pro PCL se jeví jako špatné rozpouštědlo. Výsledné snímky povrchů strun po působení DMSO jsou zobrazeny na Obr. 25 (dole).

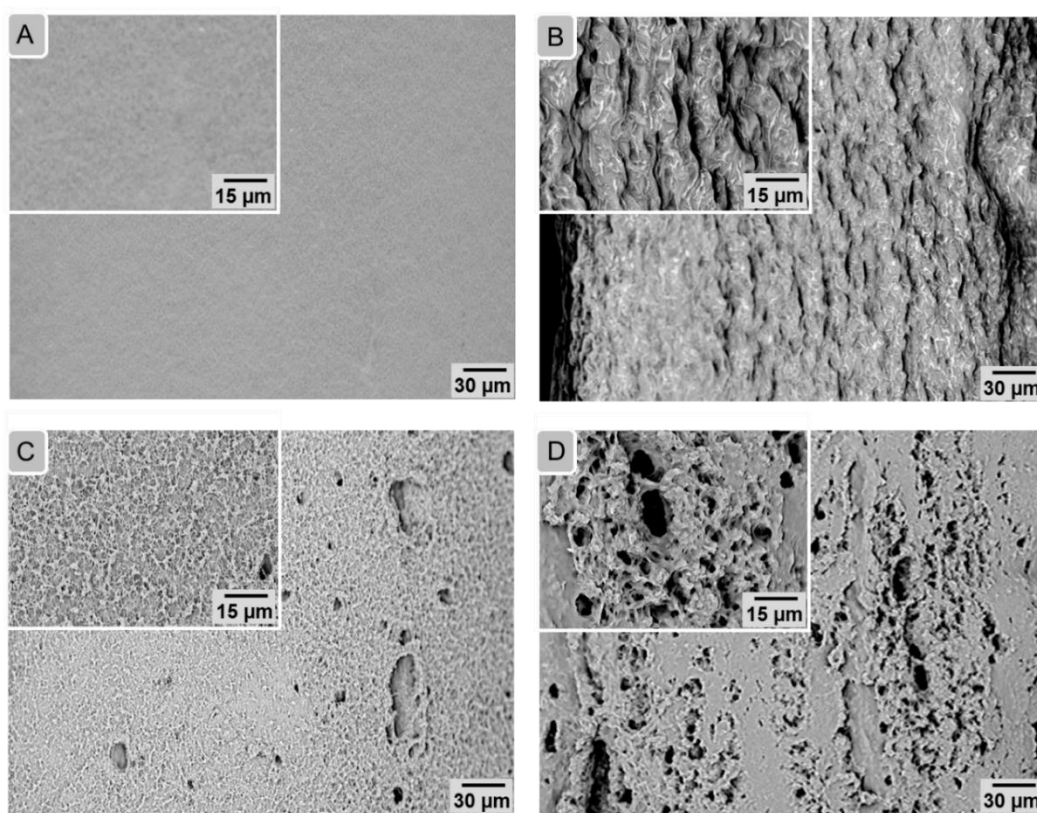


Obr. 25 – porovnání působení dobrého rozpouštědla DMSO po dobu 5 minut na povrch PCL strun tištěných při různých teplotách. Obrázky ze SEM.

Z Obr. 25 je patrné, že struktura povrchu po působení DMSO je závislá na teplotě, při níž byla struna tištěna. Tato skutečnost může být zapříčiněna částečnou separací nebo degradací jednotlivých složek směsi. Zde pak může

docházet k rozpouštění části PiezoRT, pro které je DMSO dobrým rozpouštědlem, zatímco PCL rozpouštění nepodléhá.

Pro ověření míry působení dobrého rozpouštědla PiezoRT byl proveden experiment s dalšími dvěma rozpouštědly (triacetin a aceton). Pro tyto účely byla použita struna tištěná při 190 °C vyznačující se nejhladším povrchem. Na Obr. 26 je možné pozorovat vliv rozpouštědel na povrch tištěné struny. Na Obr. 26A je zobrazena výchozí vytisknutá struna, která nebyla vystavena působení rozpouštědel. Na Obr. 26B pak lze pozorovat vliv působení DMSO po dobu 5 minut na povrch struny. Obr. 26C znázorňuje povrch po aplikaci acetonu po dobu 15 sekund a na Obr. 26D je vyobrazen povrch po působení triacetinu po dobu 5 minut.

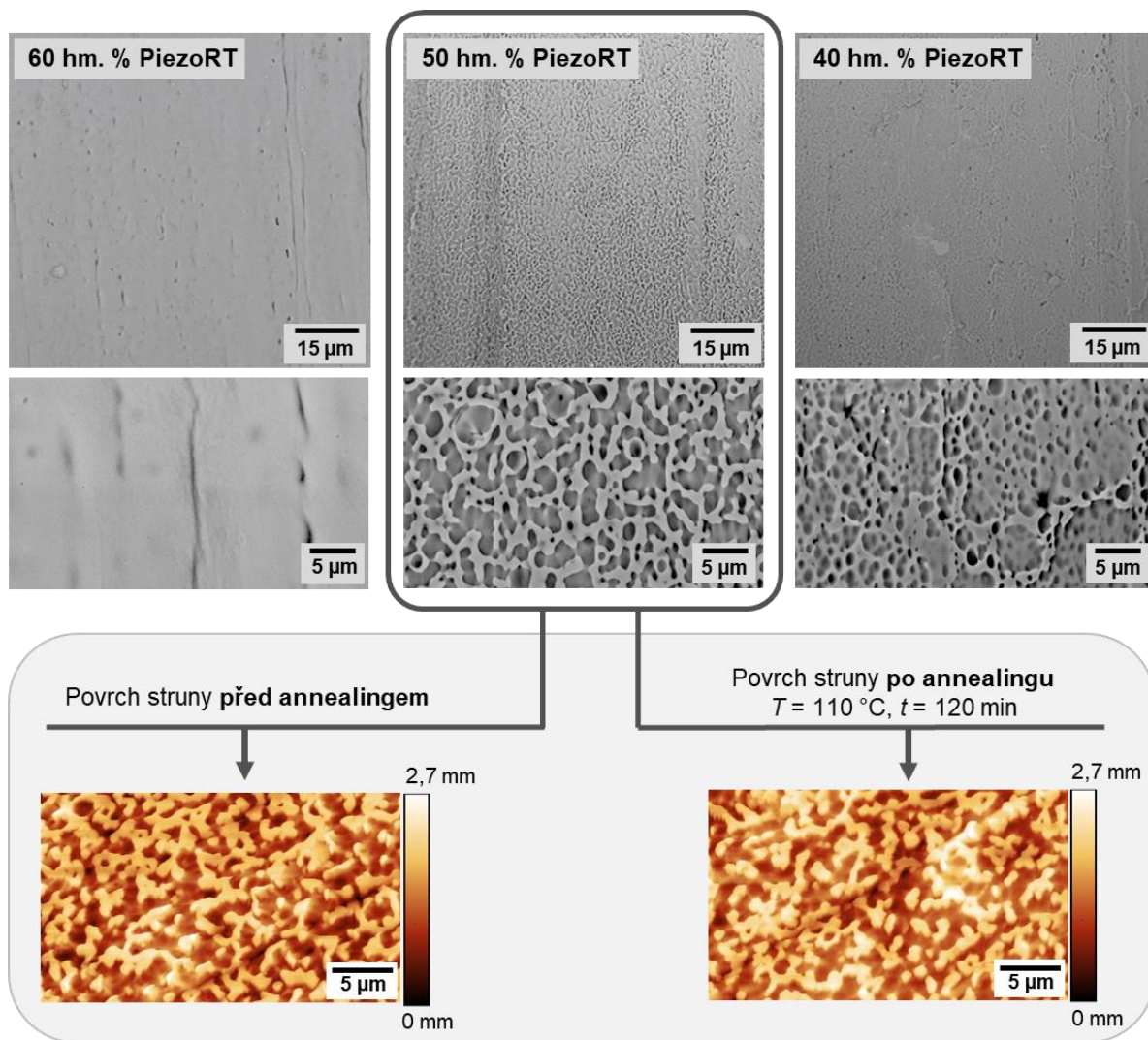


*Obr. 26 – porovnání vlivu rozpouštědel na texturu vytisknuté struny. A) struna bez působení rozpouštědla, B) struna po působení rozpouštědla DMSO po dobu 5 minut, C) povrch struny po vystavení účinkům acetonu po dobu 15 s, D) struna po aplikaci rozpouštědla triacetinu po dobu 5 minut. Snímky ze SEM.*

Na rozdíl od aplikace triacetinu (Obr. 26D), který způsobil narušení povrchu a vznik porézních struktur v řádu mikrometrů – při působení DMSO (Obr. 26B) lze konstatovat, že dochází ke specifickému zvrášení povrchu, avšak nevzniká žádná porézní struktura, která by zasahovala do hlubších vrstev materiálu. Přítomnost acetonu i přes velmi krátkou dobu působení (v porovnání s ostatními rozpouštědly) způsobila vznik povrchové textury v jednotkách mikrometrů.

Srovnání výsledků znázorněných na Obr. 26 ukazuje, že jedním z možných přístupů přípravy strukturovaných vláken je aplikace rozpouštědel s rozdílnou afinitou vzhledem k jednotlivým složkám polymerní směsi.

Podobně jako v případě směsi PiezoRT s PCL byly u roztokového způsobu tisku (PiezoRT v DMSO) zkoumány možnosti přípravy strukturovaných vláken. Z experimentálních výsledků uvedených na Obr. 27 plyne, že hmotnostní poměr polymeru v DMSO má zásadní vliv na povrchovou strukturu struny.



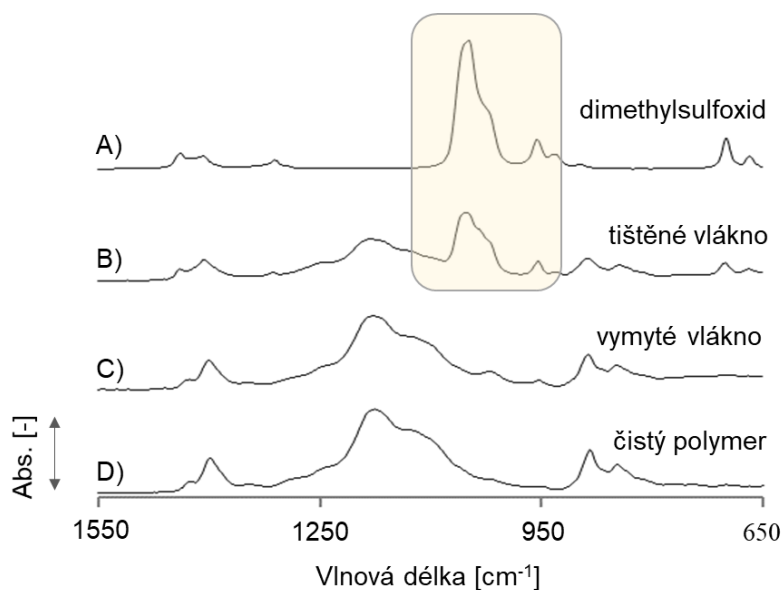
Obr. 27 - vliv hmotnostního podílu polymeru PiezoRT v DMSO na změnu povrchového zvrásnění tištěných vláken. Nahoře snímky ze SEM, dole z AFM.

Tisk probíhal při teplotě 80 °C s rychlostí tisku 1 mm/s a vytláčovací tlakem 700 kPa. Byla zvolena tryska o průměru 200 μm. Tisková podložka byla vyhřívána na 65 °C.

Piezoelektrické vlastnosti PiezoRT jsou silně ovlivněny krystalinitou polymeru. Z tohoto důvodu nebyly podrobně rozpracovávány polymerní směsi PiezoRT s PCL, kde druhá polymerní složka (PCL) může bránit přeskupení

makromolekulárních řetězců PiezoRT do požadované prostorové mřížky. Krystalinitu PiezoRT lze zvýšit procesem annealingu (žihání) při teplotě v rozmezí Curieho teploty a teploty tání polymeru [299]. Výrobce polymeru PiezoRT (Arkema) doporučuje teplotu annealingu při 110 °C po dobu 2 hodin. Na tištěné struně ze směsi PiezoRT a DMSO při koncentraci polymeru 50 hm. % v DMSO byla testována stálost povrchové struktury po vystavení tištěné struny procesu annealingu. Stálost textury byla ověřována pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM). Při porovnání výsledných AFM snímků, Obr. 27, lze říci, že při procesu annealingu nedochází k dramatickým změnám v povrchové textuře.

S ohledem na možnost budoucího testování materiálu pro možné biologické aplikace je nutné ověřit, že tištěný scaffold je tvořen pouze čistou polymerní maticí, aby nedocházelo k nežádoucímu ovlivnění buněk použitým rozpouštědlem. Jelikož tisknoucí materiál se skládal z polymeru (PiezoRT) a nezanedbatelného množství rozpouštědla (DMSO) (poměr polymeru k rozpouštědлу 1:1), byla v tištěném vlákne pomocí infračervené spektroskopie kontrolována přítomnost rozpouštědla, Obr. 28.

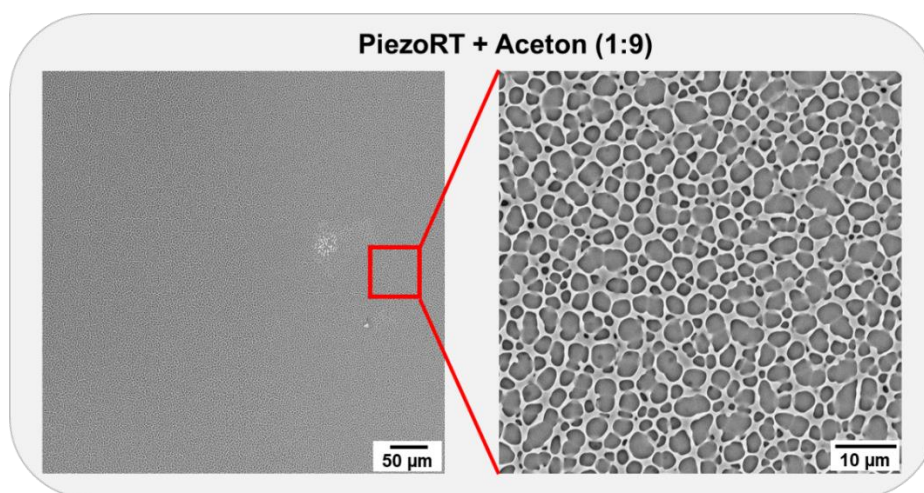


Obr. 28 – porovnání IR spekter čistého rozpouštědla (DMSO), polymeru (PiezoRT) a tištěných vláken (PiezoRT:DMSO) před a po vymývání.

Vzhledem k velmi nízké těkavosti DMSO, bylo možné pozorovat zbytky rozpouštědla ve výtisku i několik hodin po dokončení tisku. Na Obr. 28 je žlutě zvýrazněná část spektra čistého DMSO (Obr. 28A) a tištěného vlákna (Obr. 28B), jenž vykazuje stopy rozpouštědla. Z tohoto důvodu byly testovány možnosti odstranění zbytkového množství DMSO ve výtiscích. Účinnou metodou se ukázalo luhování výtisku v ultračisté vodě zahřáté na 60 °C po dobu 5 hodin.

Výsledné FTIR spektrum takto luhaného výtisku je zobrazeno na Obr. 28C) a vykazuje zanedbatelné rozdíly v porovnání s čistým PiezoRT.

Za zmínku stojí, že při hledání nejvhodnějších typů rozpouštědel pro PiezoRT bylo zjištěno, že pro přípravu strukturovaných povrchů lze použít aceton, viz Obr. 29. Roztok se v tomto případě skládal z PiezoRT a acetonu v poměru 1:9. Výsledkem je homogenní strukturovaný povrch s šířkou prohlubní v řádu jednotek mikrometrů. Vznik těchto povrchových prohlubní je v tomto případě zapříčiněn kondenzující vzdušnou vlhkostí do podob mikro kapek, které se vtlačí do nabotnalého polymerního povrchu podobně jako v případě metody „Breath Figures“ [289].



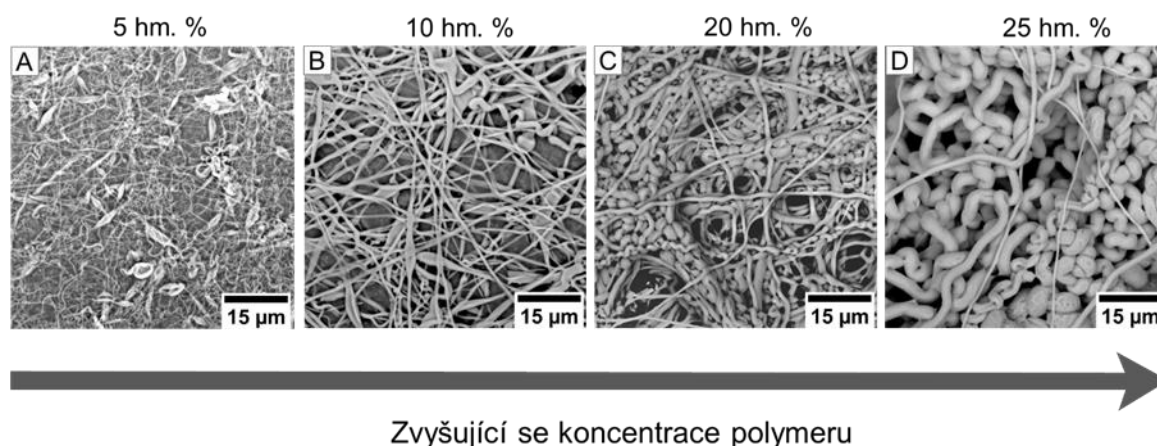
Obr. 29 – snímky strukturovaného povrchu PiezoRT připraveného z roztoku s acetonem. Obrázky pořízeny pomocí SEM.

### 6.1.1.2 Příprava PiezoRT vláken pomocí electrospinningu

Jak bylo diskutováno výše, electrospinning je jednou z častých metod používaných pro vytváření vlákných struktur aplikovatelných v oblasti regenerativní medicíny [290]. Stejně jako v případě extruzního tisku byl v případě electrospinningu používán roztok PiezoRT s DMSO o různých koncentracích. Vlákná byla spinována při 30 kV a vzdálenosti elektrody od kolektoru 7,6 cm. Na Obr. 30 jsou porovnány výsledky electrospinningu roztoků o různých koncentracích.

Ze srovnání vzniklých vláken při electrospinningu roztoků různých koncentrací je zřejmé, že koncentrace polymeru má výrazný vliv na projevy nestabilit vyskytujících se při tomto procesu, Obr. 30. S rostoucí koncentrací polymeru lze sledovat přítomnost nestabilit vyšších řádů. Dalším projevem rozdílných koncentrací je tloušťka výsledných vláken, jejichž průměr se s vyšší koncentrací zvětšuje. Porovnáním uvedených koncentrací lze tedy říci, že v případě materiálu

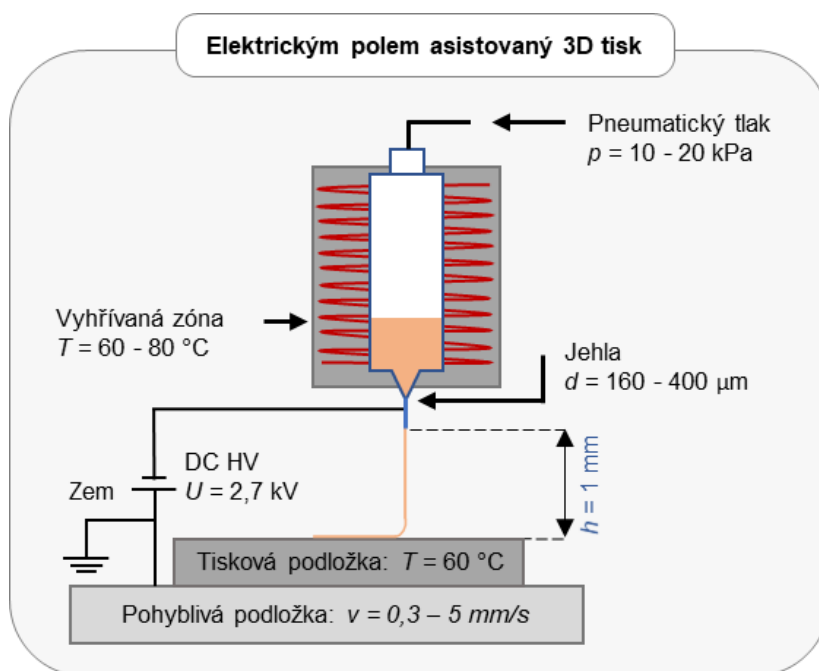
PiezoRT je při vyšších koncentracích polymeru v roztoku velmi obtížné získat vlákna homogenní tloušťky, tvaru a délky. Lze předpokládat, že tato skutečnost je spojena s vysokou hodnotou piezoelektrického koeficientu [236]. Další proměnnou také zůstává viskozita roztoku (související s koncentrací polymeru), kdy s vyšší koncentrací polymeru v roztoku dochází k výraznějšímu propletení polymerních klubek.



Obr. 30 - vliv koncentrace polymeru v rozpouštědle na vlákna vytvářená pomocí electrospinningu. Materiálem pro electrospinning byl roztok polymeru PiezoRT v DMSO. Obrázky ze SEM.

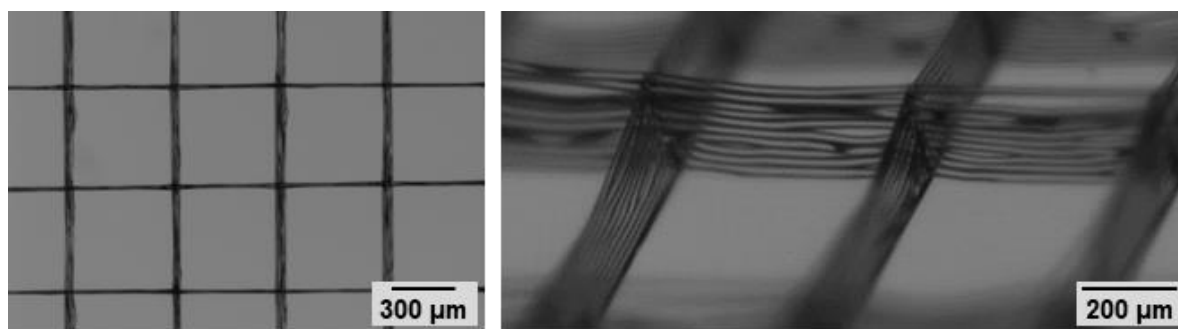
### 6.1.1.3 Zpracování PiezoRT pomocí elektrickým polem asistovaného 3D tisku

Jedním z poměrně nových zpracovatelských postupů pro přípravu vlákněných struktur pomocí aditivní výroby je elektrickým polem asistovaný 3D tisk (EPA 3D tisk) [43]. Schéma tohoto procesu je znázorněno na Obr. 31. Jak bylo již dříve diskutováno, electrospinning je charakteristický tvorbou chaoticky orientovaných vláken. EPA 3D tisk však na rozdíl od electrospinningu probíhá při nižších napěťových potenciálech za kontinuálního pohybu podložky, na kterou se definovaně ukládají vytvářená mikrovlákna. Dá se tedy říct, že se tato metoda nachází na pomezí extruzního tisku a electrospinningu. Oproti klasickému tisku lze pomocí tohoto přístupu vytvářet velmi tenká vlákna řádově tenčí než lidský vlas. Průměr vláken tištěných pomocí EPA 3D tisku je menší nebo srovnatelný s velikostí eukaryotických buněk (rozsah velikosti 10 -100 µm), což předurčuje využití této metody pro tvorbu scaffoldů aplikovatelných v oblasti tkáňového inženýrství [77,279].



Obr. 31 – schéma elektrickým polem asistovaného 3D tisku (EPA 3D).

Z provedených experimentů vyplynulo, že nejvhodnější zpracování PiezoRT do podoby mikro vláken pomocí EPA 3D je z roztoku PiezoRT s DMSO v hmotnostním poměru 3,6:6,4. Připravená směs pak byla nadávkována do stříkačky s pneumatickým pístem a jehlou o průměru 260 μm. Stříkačka s roztokem pak byla vyhřívána na teplotu 70 °C a teplota tiskové podložky byla nastavena na 60 °C pro lepší přilnavost tištěného materiálu k podložce. Vytlačovací tlak byl regulován na 15 kPa a velikost napětí byla nastavena na hodnotu 2,7 kV. Rychlost pohybu podložky byla 1 mm/s a vzdálenost jehly od podložky 1 mm. Výsledné struktury získané pomocí EPA 3D tisku jsou zobrazeny na Obr. 32. Bylo tištěno celkem 10 tiskových vrstev do podoby mřížky složené z vláken o průměru cca 10 μm.

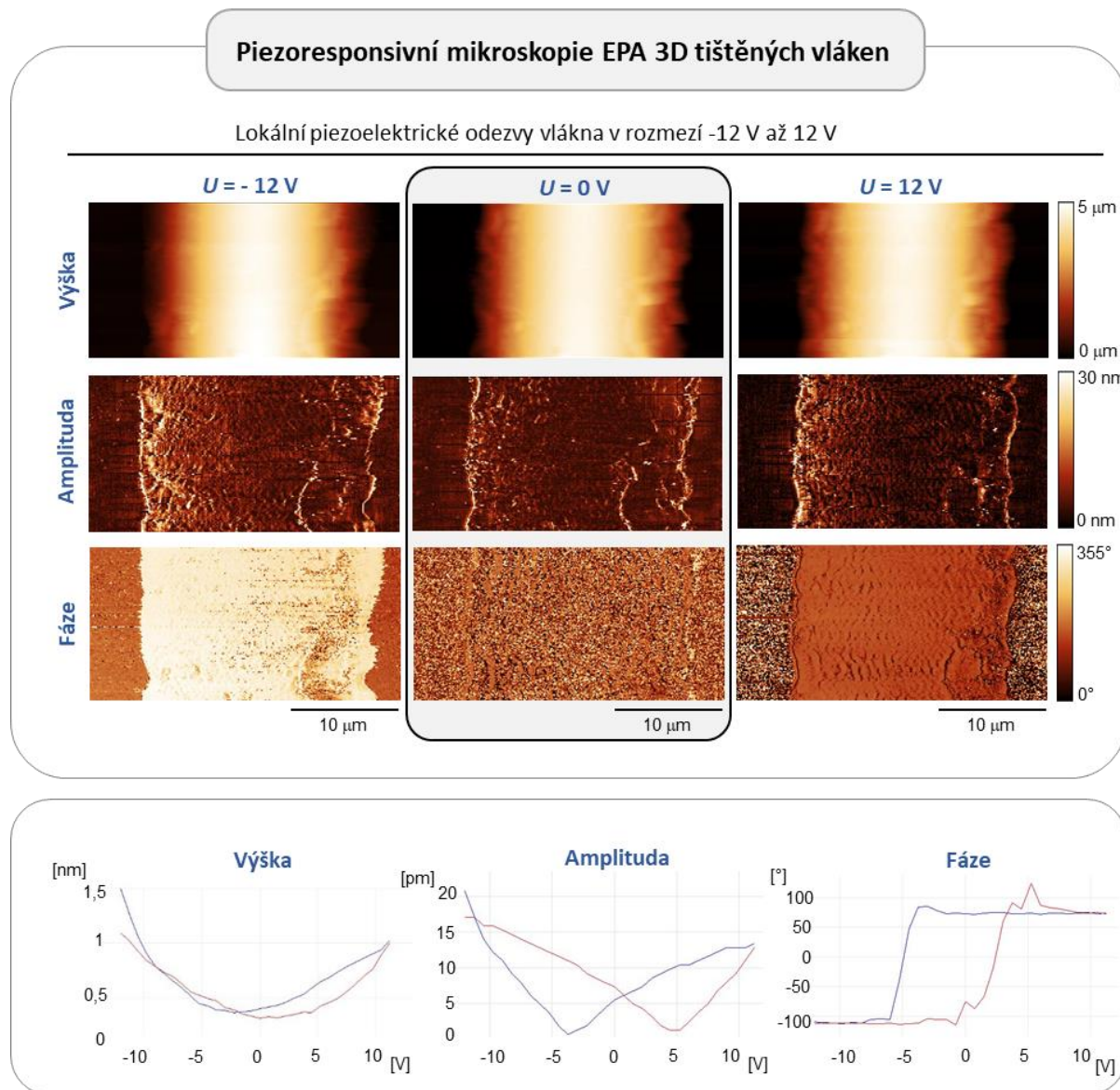


Obr. 32 – snímky mřížek tištěných pomocí EPA 3D tisku.

Piezoelektrické vlastnosti materiálu PiezoRT byly charakterizovány pomocí piezoresponsivní silové mikroskopie (PFM). Byla měřena piezoelektrická odezva vlákna PiezoRT připraveného podle postupu uvedeného v předcházejícím



odstavci. Před charakterizací pomocí PFM byla vlákna vystavena procesu annealingu při teplotě 110 °C po dobu 2 hodin pro stabilizaci piezoelektrických vlastností polymeru. Na Obr. 33 dole je možné vidět lokální piezoelektrické odezvy tištěného vlákna po procesu annealingu. Měřená plocha byla 30×30 μm a aplikované napětí se pohybovalo v rozmezí -12 V až +12 V.



Obr. 33 – charakteristika PiezoRT pomocí piezoresponsivní silové mikroskopie.

První řada obrázků zobrazuje výškový profil vlákna. Druhá řada je pak tvořena výslednými obrázky měřené amplitudy, kde je možné pozorovat silný piezoelektrický kontrast. Třetí řada zobrazuje obraz vlákna ve fázi, kde je možné zřetelně vidět fázové rozdíly v kladných a záporných hodnotách aplikovaného napětí, jež indikují přítomnost antiparalelních feroelektrických domén v polymerním vláknu. Na Obr. 33 dole jsou pak zobrazeny lokální hysterezní

smyčky. Výšková smyčka naznačuje změnu tloušťky vlákna v průběhu napěťových změn. Pro amplitudu je zde patrný charakteristický obraz hysterezní smyčky ve tvaru motýla. Fázová smyčka je pak tvořena klasickým tvarem hysterezní křivky v podobě čtverce.

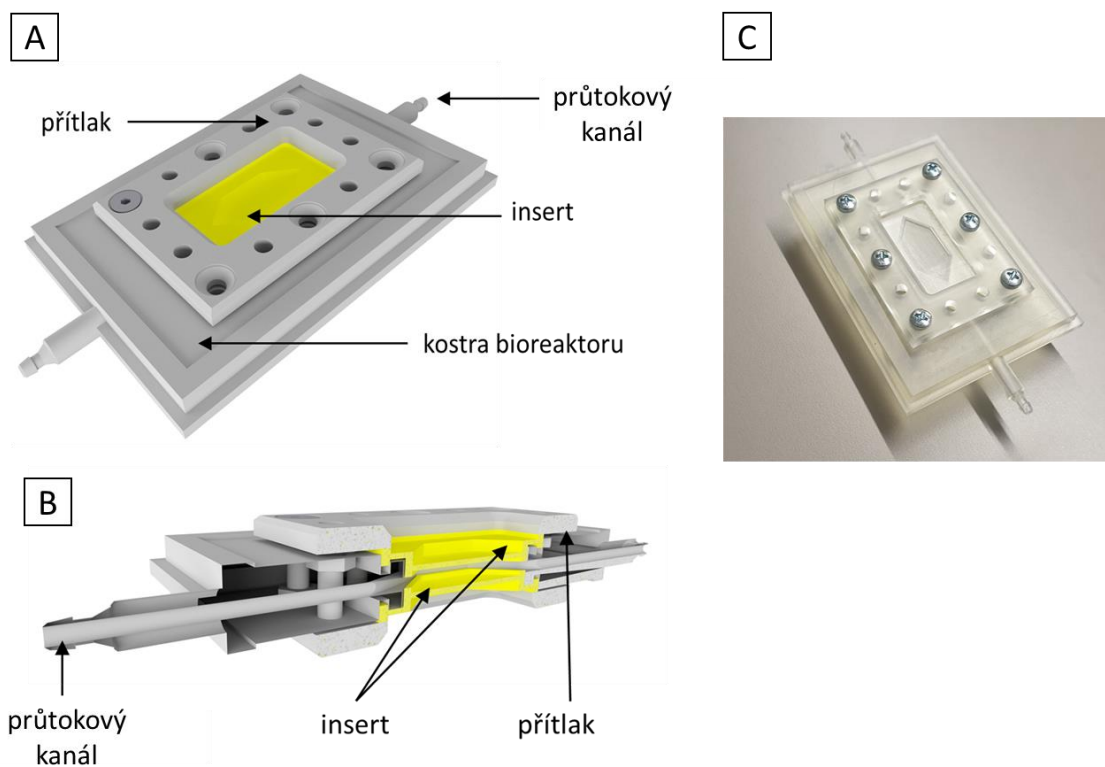
Z grafu hysterezní křivky pro amplitudu je patrné, že nejvyšší hodnota piezoelektrického signálu při aplikaci napětí -12 V dosahuje až k 20 pm. Fázová hysterezní křivka zobrazuje přepnutí dipólových momentů okolo řetězce polymeru při změnách kladného a záporného napětí.

Prezentované výsledky v rámci této podkapitoly jsou předmětem připravované publikace.

## 6.2 Návrh bioreaktoru pro simulování tokových *in vivo* podmínek

S ohledem na zaměření práce byla část experimentů věnována vývoji 3D tištěných bioreaktorů pro simulaci tokových *in vivo* podmínek. V prvním kroku byly vybírány nejvhodnější tiskové materiály, které nebudou cytotoxické. Následně byla řešena vlastní konstrukce průtokových cel a možné způsoby jejich výroby pomocí dostupných SLA a DLP tiskáren.

Byl navržen a následně vyroben bioreaktor, jehož schéma je zobrazeno na Obr. 34. Skládá se ze tří samostatných částí: **kostry** bioreaktoru, do které jsou vkládány **inserty**, které jsou zafixovány pomocí **přítlaků**. Kostra bioreaktoru je opatřena vstupním a výstupním kanálem, jež jsou určeny k proudění kultivačního média.

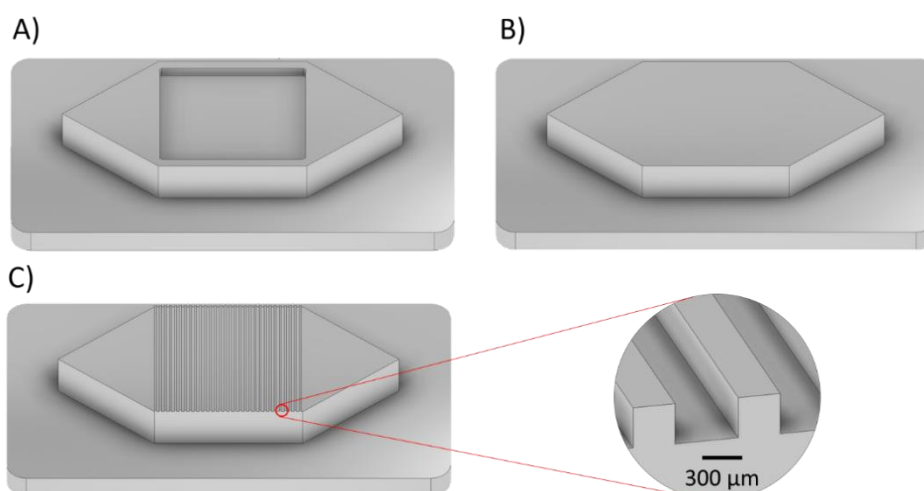


Obr. 34 – model složeného bioreaktoru první generace vytvořený v softwaru Autodesk Inventor A) pohled na celou komoru, B) řez středem bioreaktoru, C) sestavený reaktor vyrobený pomocí 3D tisku.

Pro konstrukční modely jednotlivých částí bioreaktoru byl použit software Autodesk Inventor. Samotná výroba pak probíhala pomocí 3D tiskáren od společností Formlabs (typ tisku - SLA, přístroje - Form2, Form3) a EnvisionTEC

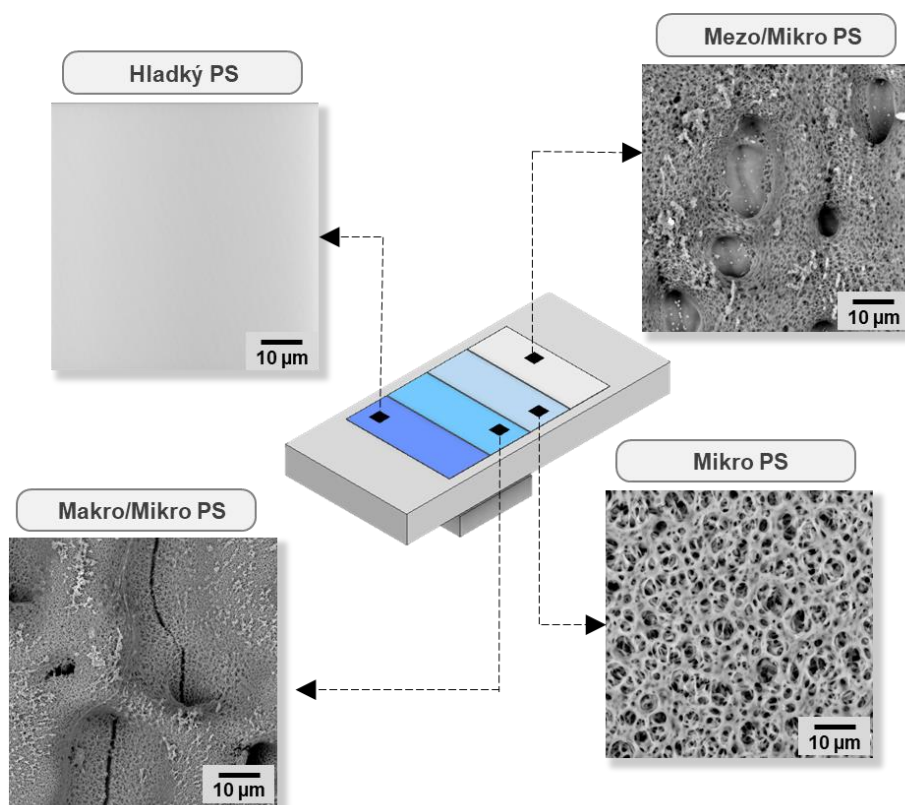
(typ tisku - DLP, přístroj - Micro Plus HD). Kostra i přítlaky bioreaktoru byly vytištěny na tiskárně Form3 z technické pryskyřice s označením „Clear“. Pro výrobu insertů, které přicházejí do přímého kontaktu s buňkami a kultivačním médiem, byly použity pryskyřice s deklarovanou třídou biokompatibility IIa. Pro SLA tiskárnu Form2 je to pryskyřice s označením „Dental LG Clear“ a pro DLP tiskárnu od společnosti EnvisionTEC byl použit materiál značený „E-shell 600“.

Na Obr. 35A je znázorněn model insertu s místem pro vložení strukturovaného scaffoldu s buňkami. Obr. 35B pak znázorňuje krycí insert plnící roli „víčka“. Na Obr. 35C je zobrazen model insertu s patrnou strukturou drážek. Tuto základní strukturu lze modifikovat z hlediska výšky, šířky drážek, šířky mezer mezi drážkami atd.



*Obr. 35 – příklady insertů vkládaných do bioreaktoru vytvořené v programu AutoCAD Inventor.*

Relativně velký vnitřní prostor bioreaktoru (1×1 cm) byl zvolen záměrně tak, aby do něj bylo možné vložit více rozdílných typů scaffoldů nebo povrchově texturovaných substrátů. Cílem tohoto řešení bylo zajištění srovnatelných testovacích podmínek pro srovnávané materiálové kompozice, viz příklad strukturovaných polystyrenových povrchů na Obr. 36 jejichž příprava je diskutována v jedné z kapitol výsledků.

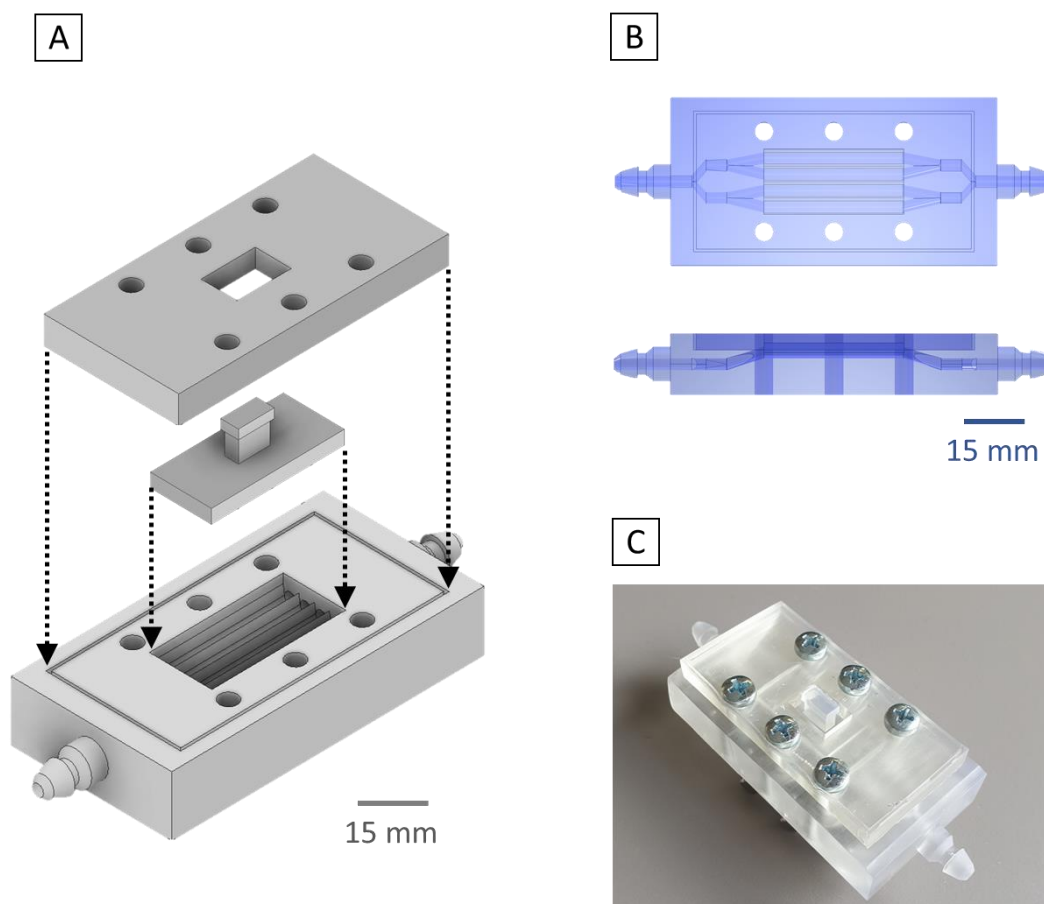


Obr. 36 – modelace insertu s rozdílně strukturovanými povrchy na bázi polystyrenu.

Samotné testování buněčného chování za dynamických podmínek probíhalo následovně. Inerty i ostatní součásti reaktoru byly sterilizovány pomocí UV záření po dobu 30 min. V dalším kroku byly inerty potaženy tenkou vrstvou želatiny pro zlepšení prvotní adheze buněk. Před vložením insertu, Obr. 35, do průtokového bioreaktoru byly připravené povrchy osazeny buňkami a prekulturnovány v inkubátoru po dobu 24 hodin. V tuto chvíli médium nad povrchem neproudilo. Po tomto kroku následovalo přemístění insertu do bioreaktoru, jeho zajištění přítlakem a do průtokové komory bylo dávkováno médium rychlostí 10  $\mu\text{l/h}$  po dobu 12 hodin. Z prvotních experimentů vyplynulo, že buňky adherované k povrchu insertu byly odplaveny společně s protékajícím médiem. Jedním z možných důvodů této skutečnosti je vznik tokových nestabilit nad povrchem insertu. Tyto nestability mohou vznikat na rozhraní insertu a vtokového kanálu. Dále mohou být dány obdélníkovým průřezem vnitřního průtokového prostoru bioreaktoru nad zkoumanými povrchy, do/z kterého ústí kruhové kanály o řádově menší šířce, než má prostor s vloženým scaffoldem.

Z výše uvedených důvodů byl vytvořen návrh bioreaktoru druhé generace (Obr. 37), který se od původního liší uspořádáním vtoků k insertu, který měl zabránit vzniku výrazných turbulentních toků nad povrchem scaffoldu. Reaktor druhé generace má jednu vtokovou část, která se v místě umístění insertu dělí na čtyři jednotlivé kanály. Při vložení insertu a připevnění pomocí přítlaku jsou

hranice jednotlivých kanálů vzdáleny od insertu cca 200  $\mu\text{m}$ . Za účelem zjištění, zda úpravou bioreaktoru došlo ke stabilizaci toku byl proveden následující experiment. Do reaktoru bylo připevněno místo insertu mikroskopické sklíčko, přes které bylo možné pomocí optického mikroskopu sledovat tok suspenze částic  $\text{TiO}_2$  ve vodě. Sledováním pohybu částic při průtoku reaktorem bylo zjištěno, že částice v suspenzi se pohybují rovnoměrně bez náznaků turbulentního toku.



Obr. 37 – A) 3D model bioreaktoru druhé generace, B) pohled shora a z boku, C) vytištěný a sestavený reaktor.

### 6.2.1 Vliv toků na stabilitu polymerních povrchů

Experimentální testování bioreaktoru představného v předešlé podkapitole ukázalo, že i přes optimalizaci jeho konstrukce stále dochází k odplavování buněk z materiálového povrchu. Ve snaze o odpověď na otázku, do jaké míry za tuto skutečnost může materiálový povrch, byly provedeny pokusy simulující rozdílné tokové chování nad polymerním povrchem. Z literatury je známo, že povrchové nerovnosti mohou vést ke vzniku turbulentních proudění v těsné blízkosti obtékaného materiálu [300] stejně jako rozdílné tokové režimy [301] nebo teplotní gradienty, jak bude diskutováno níže.

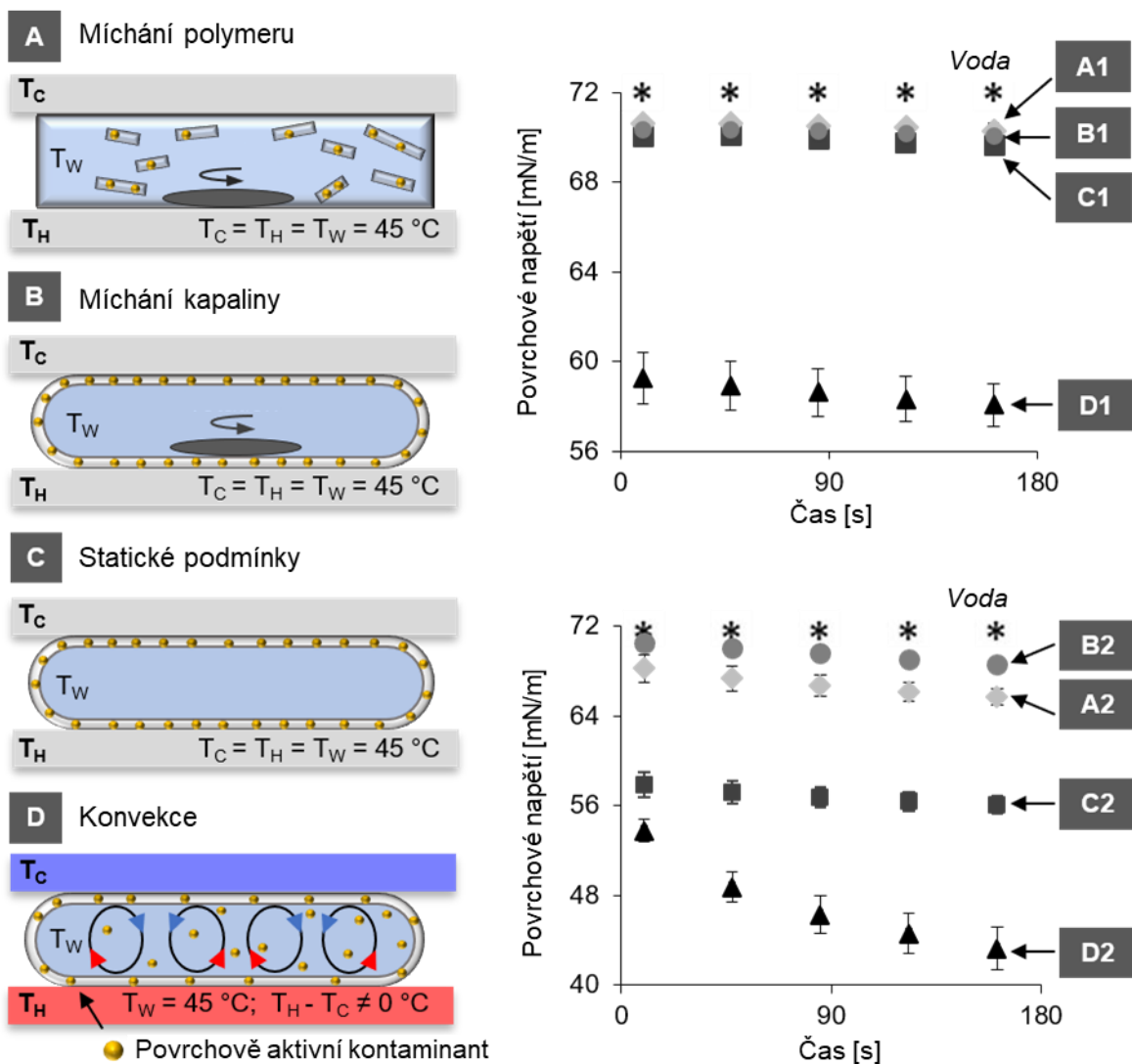
Jako modelový systém pro tyto testy byl vybrán nízko hustotní polyetylen (LDPE). Tento typ materiálu byl zvolen záměrně vzhledem k jeho širokému aplikačnímu potenciálu nejen v biomedicině. [302–304] Nejvíce se uplatňuje v oblasti obalových a distribučních materiálů, například v rozvodech pitné vody. První typ zvoleného LDPE prošel certifikací pro použití ve farmacii, z čehož plyne očekávaný vysoký standard čistoty jak povrchu, tak celého objemu materiálu. Druhý srovnávací typ materiálu byl vyroben z recyklovaného LDPE, bez definované čistoty.

Byly navrženy čtyři experimentální postupy, jak je znázorněno na Obr. 38A–D vlevo. Průměrná teplota vody byla ve všech případech udržována na 45 °C. První schéma, Obr. 38A, představuje kousky LDPE ve vodě intenzivně promíchávané magnetickým míchadlem pro simulaci toku kolem povrchu polymeru. Obr. 38B ukazuje míchání vody magnetickým míchadlem v LDPE fólii pro simulaci náhodného proudění tekutiny po povrchu polymeru. Ustálený stav v LDPE fólii bez míchání, Obr. 38C, odpovídá statickým podmínkám ohřevu. Obr. 38D znázorňuje konvekční proudění (tok) vody v LDPE fólii způsobené teplotním gradientem. Teplotní podmínky byly řízeny a kontrolovány zařízením popsáním ve studii Minaříka a kol. [305]. Po 24 hodinách vystavení LDPE výše uvedeným podmínkám bylo pomocí tenziometrie (změny povrchového napětí v čase) charakterizováno vyplavování kontaminantů z povrchů LDPE do vody. Kde se předpokládá, že vyšší pokles křivky závislosti povrchového napětí na čase znamená vyšší podíl uvolněných kontaminantů z polymerního povrchu. Kontaminanty jsou myšleny povrchově aktivní látky, které se separují na fázovém rozhraní kapalina/plyn. V tomto případě se může rovněž jednat o fragmenty PE, které mají hydrofobní charakter.

Při porovnání křivek povrchového napětí vodných extraktů z farmaceutické LDPE fólie (Obr. 38A1–D1) je možné pozorovat výrazný pokles křivky povrchového napětí (a tedy přítomnost kontaminantů) pouze u extraktu z fólie vystavené teplotnímu gradientu, který způsobuje konvektivní proudění kapaliny.

V případě recyklovaného LDPE vedla nižší čistota materiálu k většímu poklesu povrchového napětí i za statických podmínek (Obr. 38C2) a konvektivního proudění (Obr. 38D2). Avšak i v případě recyklovaného LDPE byl pokles povrchového napětí vodného extraktu za statických podmínek nižší ve srovnání s vlivem konvektivního proudění.

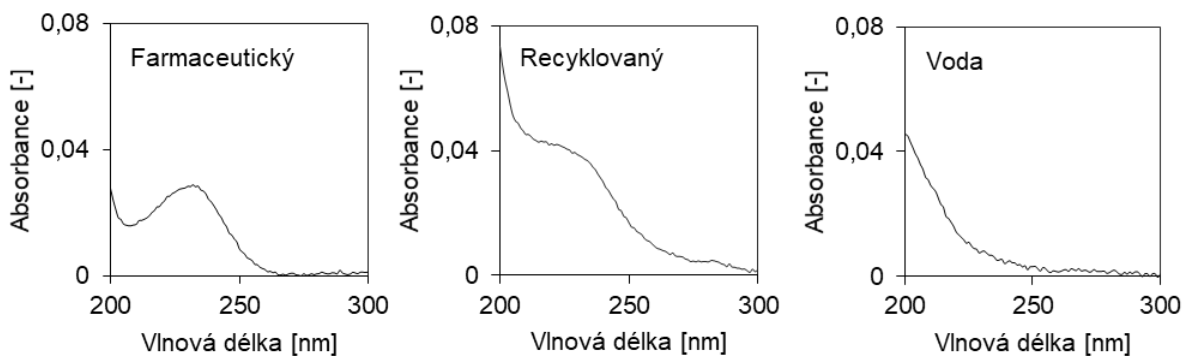
Ze zjištěných informací lze konstatovat, že konvektivní tok je příčinou zvýšeného uvolňování kontaminantů z polymeru do okolního média, jak je možné pozorovat v nejvýraznějším poklesu křivky závislosti povrchového napětí na čase, Obr. 38D1 a D2.



Obr. 38 – vlevo – schématické znázornění experimentů: A) míchání LDPE kousků ve vodě v Petriho misce; B) míchání vody v LDPE nádobě; C) voda v LDPE nádobě bez míchání; D) voda v LDPE nádobě s teplotním spádem.  $T_H$  – teplota topné plochy;  $T_C$  – teplota chladicí plochy;  $T_W$  – střední teplota vody. Žluté částice představují povrchově aktivní nečistoty v polymerních nádobách ve formě aditiv nebo kontaminantů. Vpravo – povrchové napětí vodných extraktů. Označení A-D odpovídá schématům experimentálních postupů vlevo. Označení 1 odpovídá extraktům získaným z LDPE fólie s farmaceutickým certifikátem. Označení 2 odpovídá extraktům získaným z fólie z recyklovaného LDPE.

Vodné extrakty z farmaceutické i recyklované LDPE fólie byly po vystavení teplotnímu gradientu charakterizovány UV-Vis spektrofotometrií. Výsledná spektra na Obr. 39 jasně prokázala přítomnost kontaminantů.





Obr. 39 – spektra vodných extraktů z farmaceutické a recyklované LDPE fólie vystavených teplotnímu gradientu.

Byla také provedena elementární analýza (Tab. 5), která odhalila významné množství uhlíku a dusíku v obou vzorcích ve srovnání s ultračistou vodou.

Tab. 5 – Výsledky prvkové analýzy vodných extraktů z farmaceutické a recyklované LDPE fólie vystavených teplotnímu gradientu

Vzorek	Koncentrace [mg/l]	
	Uhlík	Dusík
Voda	0,03 ± 0,01	0,020 ± 0,001
Farmaceutický	1,45 ± 0,06	0,22 ± 0,01
Recyklovaný	4,23 ± 0,11	0,27 ± 0,02

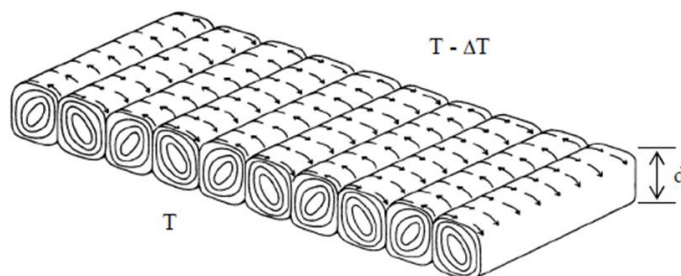
Pro lepší pochopení vlivu teplotního gradientu na uvolňování kontaminantů z polymeru do okolní kapaliny je nutné si přiblížit fenomén známý jako Rayleigh-Bénardova konvekce nebo také Rayleigh-Bénardovo vertikální proudění. Tento jev vzniká u vrstvy kapaliny vystavené teplotnímu gradientu bez přítomnosti fázového rozhraní. [306]

Pokud je překročen určitý horizontální teplotní gradient, dojde ve vrstvě kapaliny ke změně konduktivního vedení tepla na konvektivní spojené s přenosem hmoty, pozorujeme tzv. Rayleigh-Bénardovu konvekci. [306,307] Kritickým parametrem určujícím vznik této tokové nestability je velikost Rayleighova čísla daného vztahem (1) :

$$Ra = \frac{a g \Delta T d^3}{\kappa \nu} \quad (1)$$

kde  $a$  je koeficient objemové teplotní roztažnosti,  $g$  – gravitační konstanta,  $\Delta T$  – změna teploty,  $d$  – tloušťka kapaliny,  $\kappa$  – koeficient teplotní vodivosti a  $\nu$  – kinematická viskozita kapaliny

Při překročení kritické hodnoty Rayleighova čísla ( $R_{ca} = 1708$ ) [308–310] dochází ke změně konduktivního vedení tepla na konvektivní, které je spojeno s přenosem hmoty. Ve zde popisovaném případě je kritická hodnota Rayleighova čísla překročena již při teplotním gradientu menším než  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , lze tedy předpokládat, že i při gradientu okolo  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , kterému je vystaveno experimentální schéma na Obr. 38D k této konvekci dochází. Vznik tohoto proudění ve formě dvou proti sobě rotujících válců kapaliny je řízen poklesem hustoty kapaliny u teplejší stěny nádoby, která je vztlakovou silou hnána vzhůru, kde se ochladí a znovu klesá dolů. [307,311]



Obr. 40 - Rayleigh-Bénardova konvekce v kapalině uzavřené mezi dvěma deskami s teplotním gradientem.  $T$  – teplota,  $\Delta T$  – změna teploty,  $d$  – tloušťka kapaliny. [307]

Rozdíly v uvolňování povrchově aktivních látek lze vysvětlit pomocí teorie hraničních vrstev jejíž problematika je popsána v literatuře popisující mechaniku tekutin, přenos energie a hmoty [301,312]. Matematický popis problému již představila řada autorů [312–315]. Tloušťka hraniční vrstvy a povaha transportních procesů v této vrstvě je dána rychlostí proudění, koncentrací látek a teplotními gradienty nad pevným povrchem. Je třeba vzít v úvahu také vliv topografie povrchu, chemické složení uvolňovaných látek a jejich afinitu ke kapalnému prostředí obklopujícímu pevný povrch. Z tohoto pohledu je zřejmé, že jednotlivé experimentální systémy (Obr. 38A-D) budou vykazovat různou rychlost extrakce povrchově aktivních látek z povrchu do vodného prostředí.

Povaha proudění má zásadní vliv na rychlost přenosu hmoty a tepla (funkce  $h(x)$ , Obr. 41). Rozložení rychlosti proudění určuje nejen advektivní složku přenosu tepelné energie, ale také přenos chemických látek v hraniční vrstvě (černá přerušovaná čára na Obr. 41). Podobně jako u rychlostní hraniční vrstvy laminárního toku dochází ve směru proudění ( $x$ ) k růstu tepelné a koncentrační hraniční vrstvy. Teplotní a koncentrační gradienty v kapalině se ve směru

proudění snižují, stejně tak s rostoucí vzdáleností  $x$  (přechod z bodu I do bodu II, Obr. 41) dochází k poklesu koeficientu přestupu tepla a hmoty [301,312].

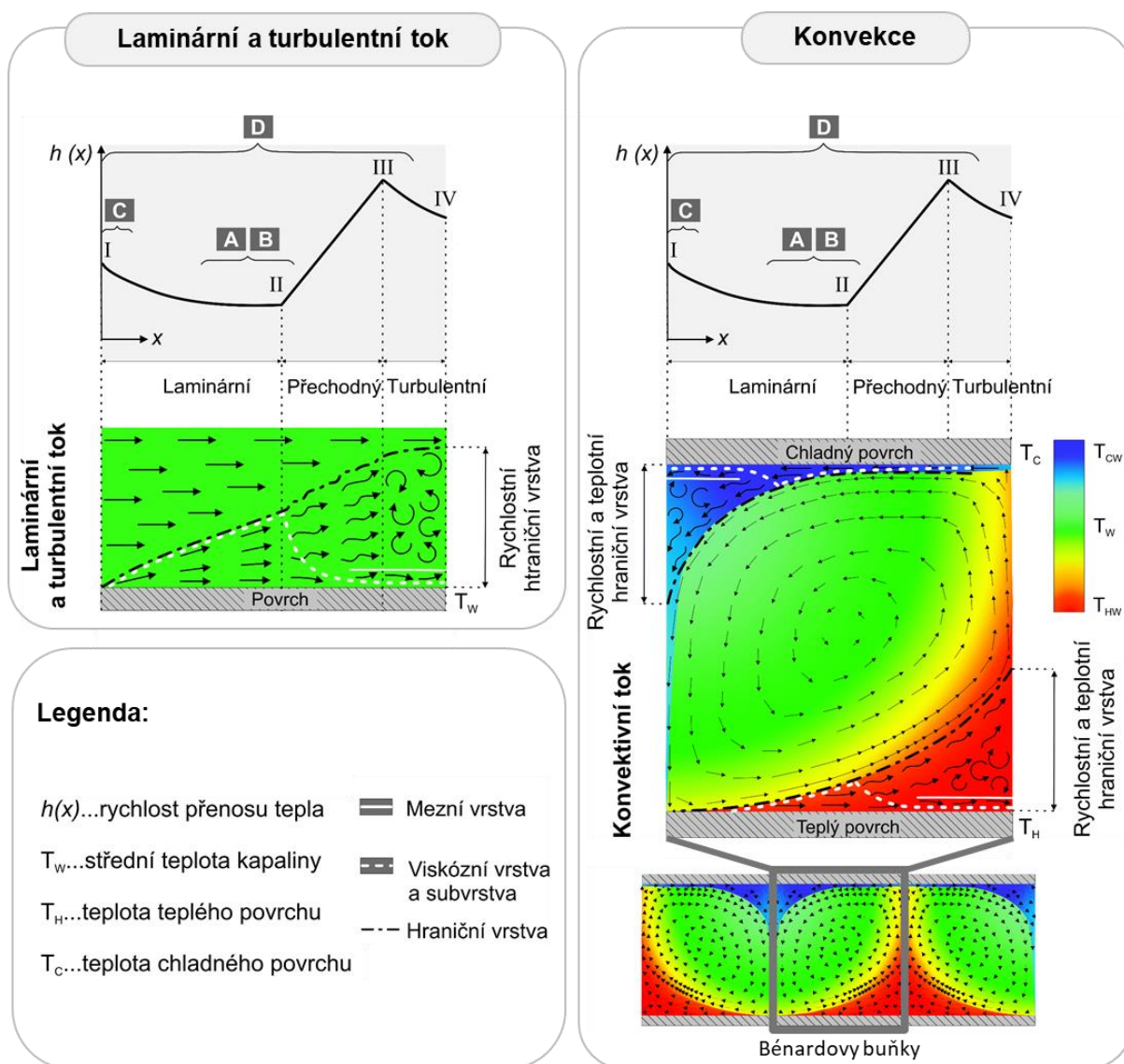
Výše zmíněné vysvětluje, proč za statických podmínek (Obr. 38C2) dochází ke zvýšenému uvolňování povrchově aktivních látek z polymeru do kapaliny než při simulovaném laminárním a přechodném toku (Obr. 38A2, B2). Za statických podmínek (bod I, Obr. 41) nedochází k tvorbě laminárního toku ani teplotní hraniční vrstvy, které by za jiných okolností tvořily bariéru, přes kterou by bylo uvolňování kontaminantů výrazně zpomaleno. V tomto případě pak lze počítat pouze s vlivem koncentračního gradientu nad povrchem polymeru, jak bylo zmíněno v práci Denberga a kol. [316].

Turbulentní míchání, které je charakteristické velkými gradienty rychlosti, podporuje vznik velkých teplotních i koncentračních gradientů v blízkosti pevného povrchu, a také zapříčiňuje zvýšení koeficientů přenosu tepla a hmoty přes přechodovou oblast (funkce  $h(x)$ , jdoucí z bodu II do bodu III, Obr. 41). S rostoucí rychlostí turbulentního proudění (procházející z bodu III do bodu IV, Obr. 41) dochází k mírnému poklesu rychlosti přenosu tepla a hmoty v důsledku chaotických změn ve směru a rychlosti proudění. Nárůst přenosu energie a hmoty v přechodové oblasti (jdoucí z bodu II do bodu III, Obr. 41) souvisí se ztenčením laminární viskózní vrstvy do podoby viskózní subvrstvy (přerušovaná bílá čára, Obr. 41). Transport hmoty v této subvrstvě má difúzní charakter. Nad touto podvrstvou se nachází mezní vrstva shora ohraničená plnou bílou čarou na Obr. 41 (vlevo), ve které je vliv difúze a turbulentního míchání srovnatelný. Nad mezní vrstvou se nachází turbulentní zóna, ve které je transport ovlivněn především turbulentním mícháním. Zúžení viskózní vrstvy do subvrstvy (oblast pod bílou přerušovanou čarou, bod II – bod IV, Obr. 41) vede k růstu smykového napětí  $\tau_s$ , zatímco s rostoucí laminární viskózní vrstvou (bod I – bod II, Obr. 41) toto napětí  $\tau_s$  klesá. Smykové napětí v tomto případě hraje významnou roli a nemůže být zanedbáno, protože jeho vlivem může docházet k odtrhávání fragmentů a povrchově aktivních látek z povrchu polymeru do okolní kapaliny.

Vliv organizovaného proudění ve formě Rayleigh-Bénardovy konvektivní nestability nelze popsat pouze jedním typem hraniční vrstvy, jak je popsáno v práci Wanga a kol. [317]. Tato problematika je schématicky znázorněna na Obr. 41, vpravo uprostřed. Nad pevným povrchem se v tomto případě netvoří pouze rychlostní, ale také teplotní hraniční vrstva. Nad hranicí jednotlivých rotujících válců kapaliny (Bénardovy buňky) se vyskytují oblasti s minimální viskózní vrstvou, subvrstvou a vyšším smykovým napětím  $\tau_s$ .

Výše uvedené vede k závěru, že právě kombinací intenzivního přenosu hmoty, energie a smykového napětí  $\tau_s$  působících na povrch polymeru vlivem minimální

viskózní vrstvy (bod I, Obr. 41) a její zúžení do podoby subvrstvy (interval od bodu II do bodu IV, Obr. 41) dochází v případě Rayleigh-Bénardovy konvekce ke zvýšenému uvolňování povrchově aktivních látek do okolního média (Obr. 38D1 a D2).



Obr. 41 - schématické znázornění a srovnání laminárního a turbulentního proudění (vlevo) vs. konvektivního proudění (vpravo). Graf nahoře zobrazuje lokální součinitel prostupu tepla ( $h(x)$ ) pro proudění přes plochou desku. Písmena A,B,C a D odpovídají jednotlivým experimentálním postupům z Obr. 38.

Získané poznatky spojené s vlivem teplotních spádů na zrychlené uvolňování povrchově aktivních látek do vodného prostředí jsou předmětem připravované publikace s názvem: „Organized fluid flow caused by temperature gradient – a phenomenon threatening water quality“.

## 6.3 Strukturované povrchy a jejich vliv na buňky

Při vývoji vhodných buněčných podpěr (scaffoldů) je nezbytné vzít v potaz celou řadu proměnných. Je třeba ověřit biokompatibilitu zvolených materiálů pro jejich zpracování do požadované podoby. Nově navržené materiály nesmí být cytotoxické a musí mít vhodnou povrchovou strukturu, která nebude negativně ovlivňovat funkce buněk jako je adheze, proliferace a celková viabilita. Jak bylo naznačeno v předešlých podkapitolách a je známo z literatury [255,262,263] nemalou měrou se na finální cytokompatibilitě podílí topografie povrchu, který přichází do kontaktu s buněčnými receptory. Z tohoto důvodu byly vyvíjeny nové postupy vedoucí ke vzniku povrchových prohlubní na vybraných typech biokompatibilních materiálů.

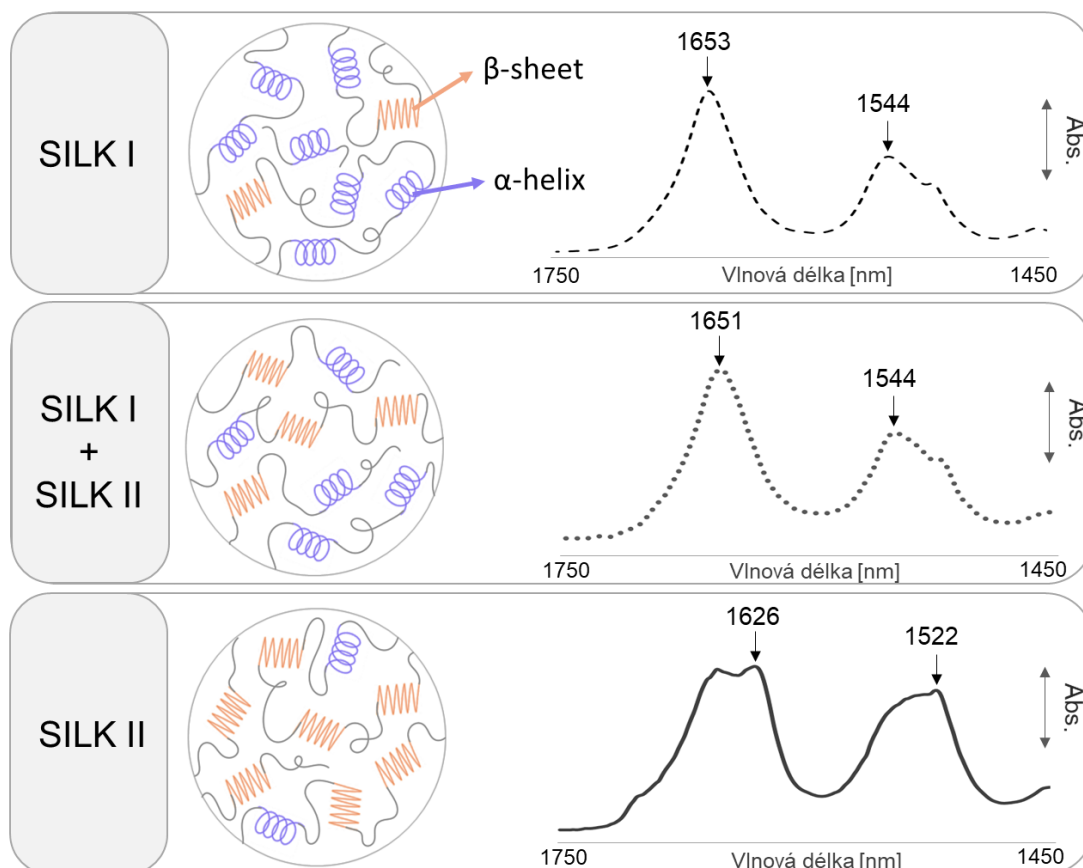
### 6.3.1 Strukturované povrchy na bázi hedvábného proteinu

Jako zástupce přírodních polymerů byl zvolen hedvábný fibroin získaný z kokonů bource morušového. Tento typ materiálu nebyl hlavním předmětem výzkumu řešeného v rámci této disertační práce, nicméně autorka se na jejich získání podílela při účasti na zahraniční stáži na Univerzitě v Bayreuthu proto jsou zde ve stručnosti představeny. Podrobněji budou výsledky věnované této problematice diskutovány v rámci disertační práce Karolíny Kocourkové.

Je známo, že hedvábný fibroin se vyskytuje ve dvou konformacích. V atmosféře bez vzdušné vlhkosti zaujímá stav SILK I, který se vyznačuje amorfní konformací s převládající přítomností  $\alpha$ -šroubovic ( $\alpha$ -helix). V přítomnosti zvýšené vlhkosti, alkoholu (methanolu), pod mechanickým namáháním nebo při zvýšené teplotě se fibroinové řetězce přeskupují do konformace  $\beta$ -skládáných listů ( $\beta$ -sheet) a fibroin se tak nachází ve stavu SILK II. [318]

Jelikož konformace fibroinu silně ovlivňuje možnosti jeho dalšího zpracování (například rozpustnost ve vodě), je nutné jeho aktuální konformaci analyzovat. Jedním ze způsobů, kterým je možné konformaci fibroinu zjistit je infračervená spektroskopie (FTIR). Spektrum fibroinu vykazuje tři charakteristické pásy. Pás Amid I (valenční vibrace skupin CO a CN) absorbující v oblasti  $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ , Amid II (deformační vibrace NH skupiny a valenční vibrace CN skupiny) absorbující v oblasti  $1500-1600\text{ cm}^{-1}$  a Amid III (příspěvky vibrací hlavního a vedlejších řetězců) absorbující v oblasti  $1200-1400\text{ cm}^{-1}$ . Pro stanovení konformace fibroinu je stěžejní sledování pásu Amid I, který je ovlivněn právě sekundární strukturou proteinu a pevností vodíkových vazeb.

Na Obr. 42 jsou znázorněna schémata konformace fibroinu ve stavu SILK I, po částečné transformaci ve stavu SILK I + SILK II a ve stavu SILK II. U každého schématu je vyobrazeno FTIR spektrum charakteristické pro jednotlivé stavy či jejich kombinaci.



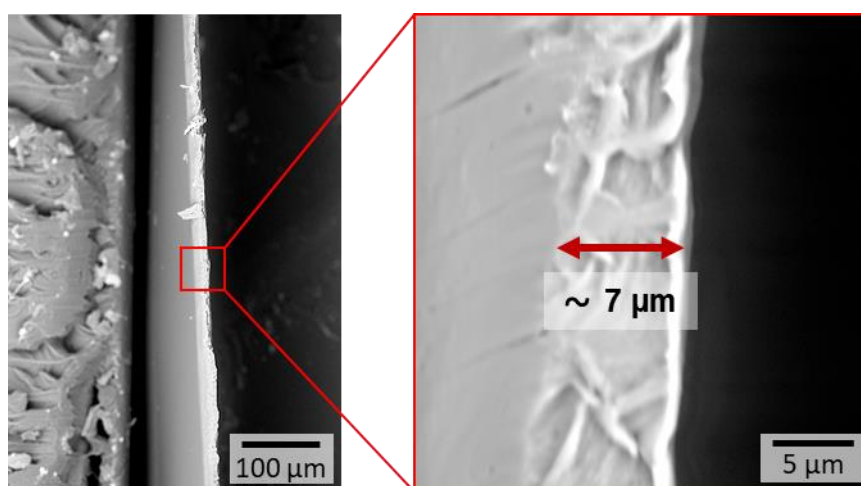
Obr. 42 – schéma možných konformací fibroinu a FTIR spektra pro stavy SILK I, SILK II a kombinaci SILK I + SILK II.

### 6.3.1.1 Příprava fibroinových vrstev pro povrchovou úpravu

Pro přípravu filmů bylo použito regenerované hedvábí z kokonů bource morušového (*bombyx mori*) dle protokolu D. N. Rockwooda [273]. První krok zahrnuje zbavení kokonů sericinu (tzv. degumming), jenž obaluje fibroinová vlákna, a to povařením v 0,02 M roztoku uhličitanu sodného po dobu 1 hodiny. Takto povařený meziprodukt je poté proplachován deionizovanou vodou a vysušen. Po vysušení nastává fáze rozpouštění v 9,3 M roztoku bromidu lithného při 60 °C po dobu 4 hodin. Připravený roztok je dialyzován po dobu 3 dnů a nežádoucí nečistoty jsou odstraněny centrifugací. Finální dočištění připraveného roztoku fibroinu probíhá pomocí lyofilizace.

Fibroinové filmy byly připravovány z roztoků regenerovaného hedvábí v hexafluoroisopropanolu (HFIP). Koncentrace fibroinu v HFIP byla 2 % (w/v). Výsledný roztok byl nanášen v množství 450  $\mu\text{l}$  na sterilní polystyrenové Petriho misky o průměru 3,4 cm. Misky byly umístěny i s víčkem do exikátoru. Misky zakryté víčky zamezují urychlenému odpařování rozpouštědla, jehož důsledkem by byl vznik zvrásnění vlivem koncentračních a teplotních gradientů [287]. Inertní atmosféra bez přítomnosti vzdušné vlhkosti byla zajištěna profukováním exikátoru dusíkem po celou dobu vysoušení (nejméně 12 hodin). Výsledkem sušení 2 % roztoku fibroinu v HFIP byly fibroinové filmy o tloušťce  $7 \pm 0,5 \mu\text{m}$  (Obr. 43).

Takto připravené filmy se vzhledem ke způsobu přípravy (vysoušení v inertní atmosféře  $\text{N}_2$  bez přítomnosti vlhkosti) nachází v amorfním stavu SILK I (viz Obr. 42).

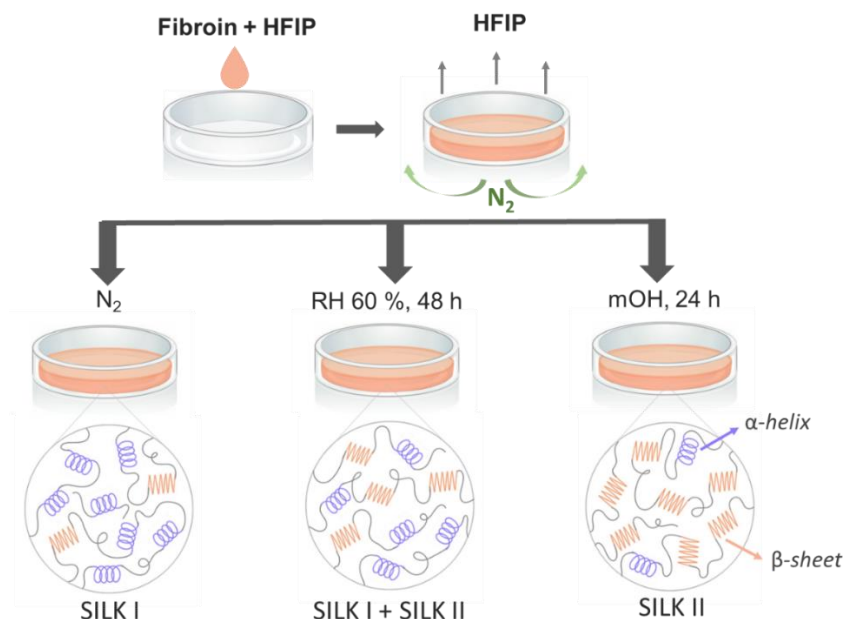


Obr. 43 – SEM snímky lomové plochy vysušeného fibroinového filmu na Petriho misce.

Vzorky byly následně modifikovány pomocí fázové separace směsi dobrého a špatného rozpouštědla za rotace. Vzhledem k vysoké nestabilitě filmů v amorfním stavu, kdy vlivem aplikace modifikační směsi za rotace dochází k jeho smývání k okrajům misky, byly fibroinové filmy vystaveny účinkům zvýšené vlhkosti, která zapříčinila částečnou změnu konformace polymerních řetězců do stavu SILK I + SILK II nebo SILK II (viz Obr. 42). Tato úprava zvyšuje stabilitu vzorků při nanášení směsi rozpouštědel a zároveň podmiňuje charakter vznikající povrchové struktury.

Pro vznik různě strukturovaných povrchů byly před samotným procesem fázové separace zvoleny dva postupy úpravy filmů (viz Obr. 44). Prvním postupem byla změna konformace fibroinu vlivem kontrolovaného působení vlhkosti 60 % po dobu 48 hodin. Takto upravený fibroin se nachází v přechodovém stavu SILK I + SILK II. Druhý způsob úpravy filmu spočíval

v umístění amorfních vzorků do atmosféry nasycené parami methanolu (mOH), které indukují krystalizaci fibroinu a jeho konformace tak odpovídá stavu SILK II (Obr. 44). [319]



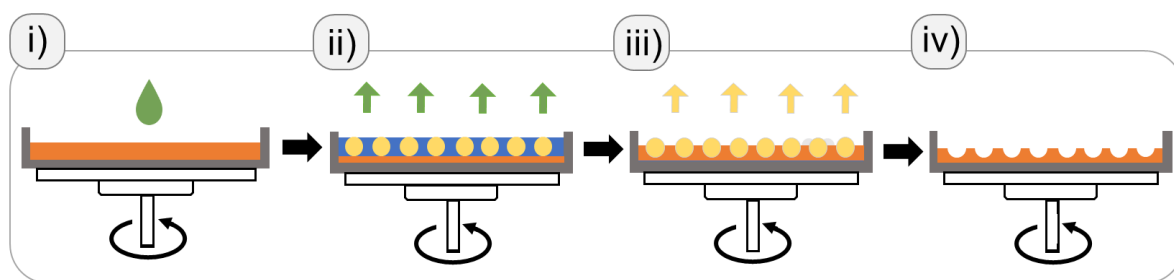
Obr. 44 – schéma přípravy fibroinových filmů s rozdílnou konformací a postup přípravy strukturovaných fibroinových vrstev.

### 6.3.2 Strukturalizace fibroinových vrstev pomocí fázové separace

Změna struktury povrchů filmů pomocí fázové separace za rotace je podmíněna celou řadou procesních faktorů, podobně jako v případě polystyrenových povrchů diskutovaných v práci E. Wrzecionka [320]. Pro zajištění reprodukovatelnosti procesních podmínek povrchové strukturalizace bylo použito TSSC zařízení (Time Sequenced Spin Coater) zkonstruované na Ústavu fyziky a materiálového inženýrství na UTB ve Zlíně. Popis tohoto zařízení je podrobně rozveden v disertační práci E. Wrzecionka [287]. Mezi hlavní proměnné podmiňující typ vznikající povrchové struktury se řadí zejména rychlost rotace, objem dávkované směsi, rychlost dávkování, prodlevy mezi jednotlivými dávkami a počet dávek. [320]

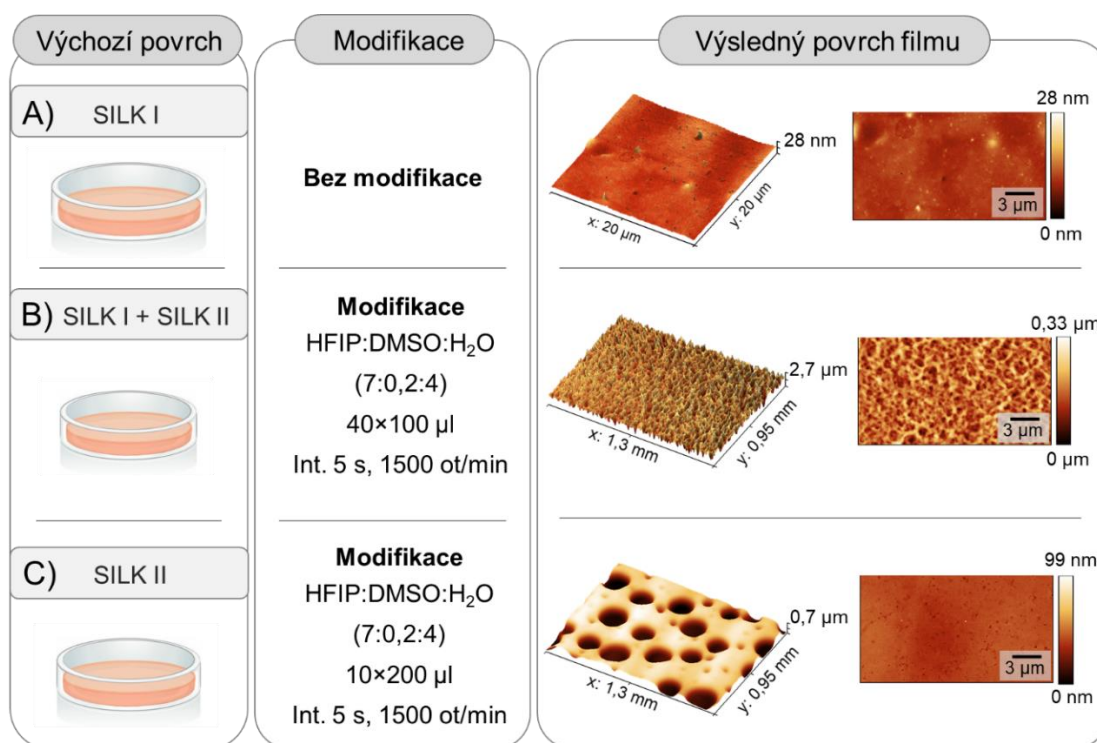
Samotný proces fázové separace za rotace je znázorněn na Obr. 45. Na povrch rotujícího filmu je deponována směs dobrého a špatného rozpouštědla (Obr. 45 i). Dobré rozpouštědlo botná povrch filmu, zatímco špatné se separuje ve formě kapiček, které vytváří šablonu, jež tvoří povrchovou strukturu (Obr. 45 ii). V závěrečné fázi dochází k odpaření špatného rozpouštědla (Obr. 45 iii) a vzniku finální struktury povrchu (Obr. 45 iv).





Obr. 45 – schéma procesu fázové separace směsi dobrého a špatného rozpouštědla za rotace.

Na Obr. 46A je zobrazen fibroinový film ve stavu SILK I, který nebyl vystaven žádné modifikaci. Obr. 46B zobrazuje hierarchicky strukturovaný povrch fibroinu, jenž byl vytvořen díky vhodné volbě procesních parametrů a aplikaci směsi rozpouštědel na film v kombinovaném stavu SILK I + SILK II. Změnou procesních podmínek modifikace a použitím fibroinového filmu ve stavu SILK II je pak možné připravit makro<sup>3</sup> porézní vrstvu s hladkými rozhraními, Obr. 46C.

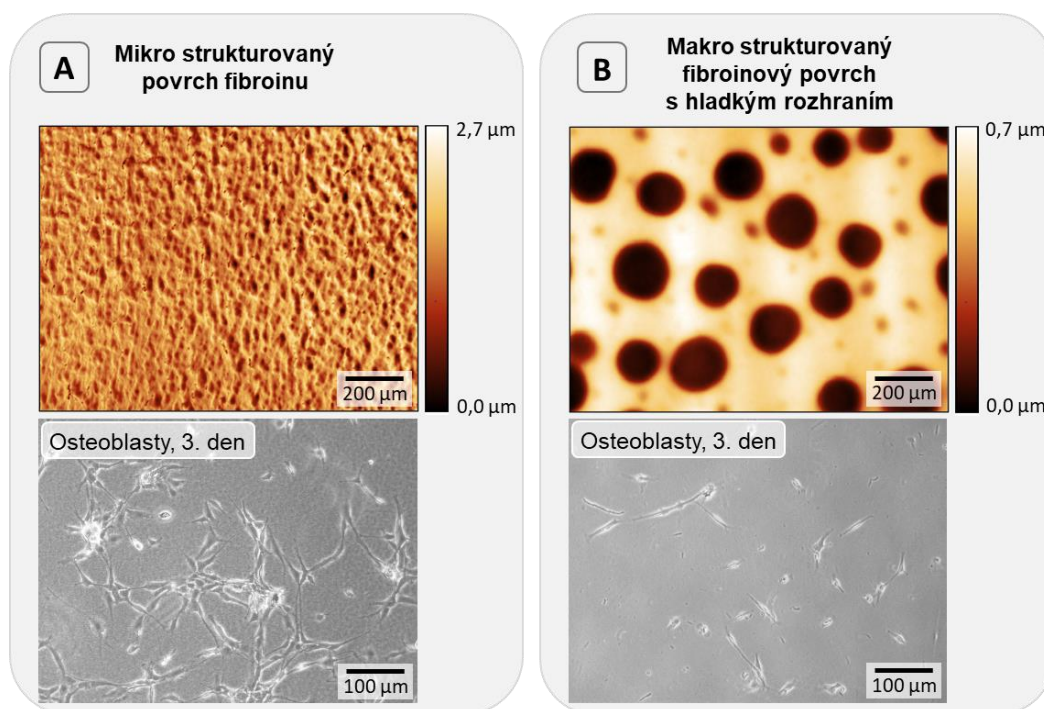


Obr. 46 – příprava fibroinových filmů s různou povrchovou texturou. A) příprava a výsledný povrch fibroinového filmu ve stavu SILK I bez modifikace, B) příprava hierarchicky texturovaného povrchu pomocí fázové separace na filmu ve stavu SILK I+SILK II, C) příprava makro porézního povrchu s hladkým rozhraním vytvořený fázovou separací na filmu ve stavu SILK II. Obrázky z AMF a optického profilometru.

<sup>3</sup> Velikost prohlubní je v této práci charakterizována pojmy **makro** (nad 50 μm), **mezo** (10-50 μm) a **mikro** (0,1-10 μm).

Z porovnání Obr. 46B a Obr. 46C lze konstatovat, že pomocí poměrně jednoduchých postupů přípravy fibroinových vrstev a jejich následnou modifikací pomocí fázové separace získáváme velmi rozdílné povrchové struktury s šířkou v řádu desítek až stovek mikrometrů. Vznik rozdílných povrchových struktur podmiňuje podíl amorfni fáze (SILK I), kterou lze z povrchu snáze odstranit vymytím. Fibroinový film ve stavu SILK II obsahuje amorfni prvků méně, proto pozorujeme převážně hladká rozhraní okolo makro prohlubní vznikajících v důsledku vtlačení kapek DMSO do povrchově nabotnalé polymerní vrstvy.

Ze studia vlivu strukturovaných fibroinových povrchů na chování buněk vyplynulo, že mikro strukturalizace povrchu vede ke zlepšení jejich adheze, Obr. 47 A), v porovnání s hladkými nebo makro strukturovanými povrchy, Obr. 47 B). Na makro strukturovaný povrch lze v rámci provedených experimentů pohlížet jako na hladký povrch, vzhledem ke skutečnosti, že makro prohlubně z povrchu po vystavení vodnému prostředí zaniknou, jak je patrné z Obr. 47 B) dole. Zvýšení adheze buněk na mikro strukturovaném fibroinovém povrchu je úspěchem samo o sobě vzhledem ke skutečnosti, že buňky na hladkém fibroinovém filmu se vyznačují nízkou adhezí k povrchu [321].



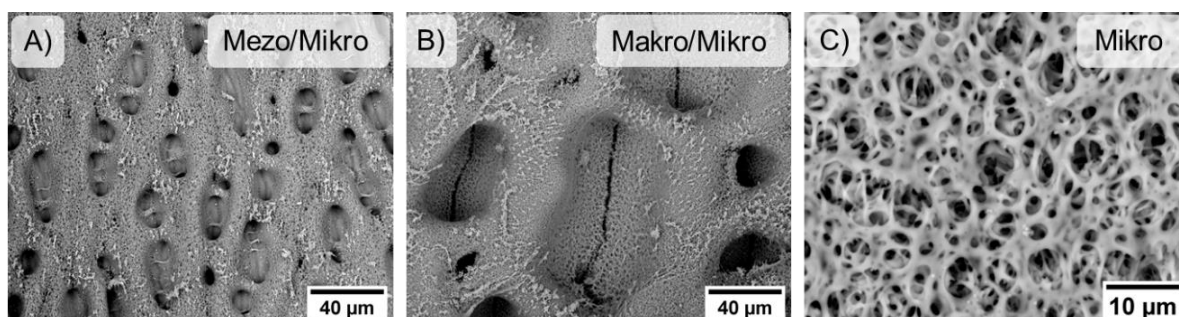
Obr. 47 – porovnání proliferace osteoblastů (MC3T3-E1) na A) mikro a B) makro strukturovaném fibroinovém povrchu. Nahoře obrázky z optického profilometru. Dole obrázky z optické mikroskopie. Testy buněčné kompatibility byly provedeny na Univerzitě v Bayreuthu v rámci zahraniční stáže.

Prezentované výsledky v rámci této podkapitoly jsou předmětem připravované publikace.

### 6.3.3 Strukturované povrchy na bázi polystyrenu

Tato kapitola experimentální práce pojednává o přípravě strukturovaných polystyrenových povrchů. Polystyren jako nosný substrát byl vybrán s ohledem na jeho časté použití při *in vitro* buněčných testech. [322–324] Stejně jako v předchozí kapitole pojednávající o přípravě strukturovaných fibroinových filmů i zde byla využita metoda fázové separace založená na postupném dávkování směsi dobrého a špatného rozpouštědla (případně směsi polymer – dobré – špatné rozpouštědlo) za rotace jejíž princip je diskutován v práci E. Wrzecionka [320]. V případě využití fázové separace při přípravě strukturovaných povrchů je nutné splnit několik podmínek. Vybrat směs dobrého a špatného rozpouštědla, která jsou vzájemně mísitelná. Při samotném procesu fázové separace je nezbytné, aby se dobré rozpouštědlo odpařovalo rychleji než špatné. Tato podmínka zaručí fixaci vznikajících struktur, vytvářených kapkami špatného rozpouštědla v rozpuštěné/nabotnalé polymerní vrstvě.

V rámci této práce byl navržen nový postup přípravy hierarchicky strukturovaných povrchů principiálně založený na postupném víceúrovňovém dávkování rozdílných směsí rozpouštědel bez a s přidáním polymerní složky, Výsledné hierarchicky strukturované povrchy jsou zobrazeny na Obr. 48. Obr. 49 a Obr. 50 popisují proces přípravy těchto povrchů.

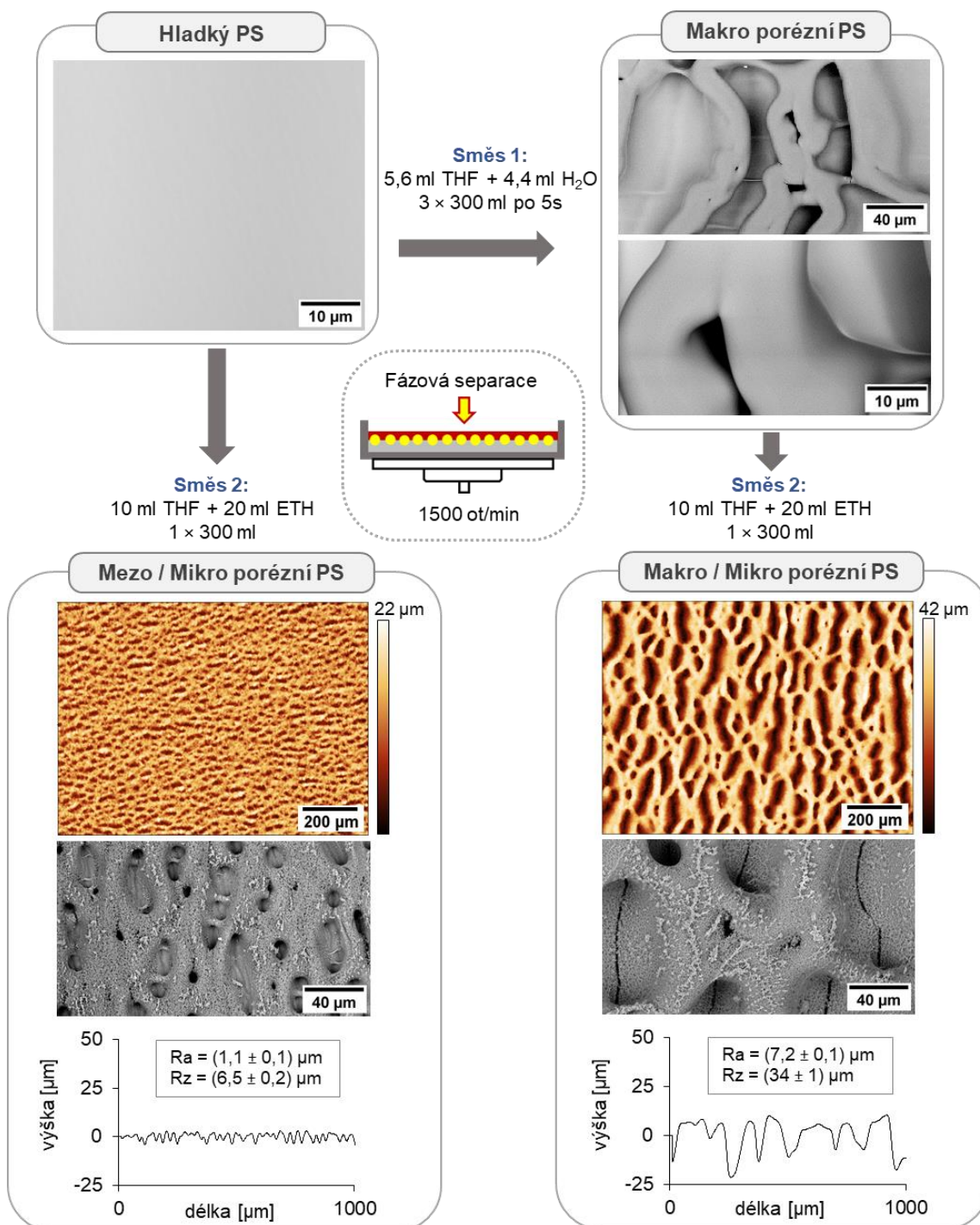


Obr. 48 – strukturované PS povrchy připravené fázovou separací/inverzí.<sup>4</sup>

Pro přípravu hierarchicky strukturovaného povrchu znázorněného na Obr. 49B byl v prvním kroku vytvořen makro porézní povrch za použití směsi tetrahydrofuranu (THF) a H<sub>2</sub>O (Obr. 49 vpravo nahoře) podobně jako v práci [325]. Ve druhém kroku byla na povrch aplikována jedna dávka směsi THF a ethoxyethanolu (ETH). Depozice druhého typu směsi rozpouštědel má za následek vytvoření specifické mikro textury na povrchu primárních makro pórů (Obr. 49 vpravo dole). Sekundární mikro strukturu lze získat pouze nanesením jedné dávky směsi THF + ETH za rotace. Opakovaná depozice dvou nebo více

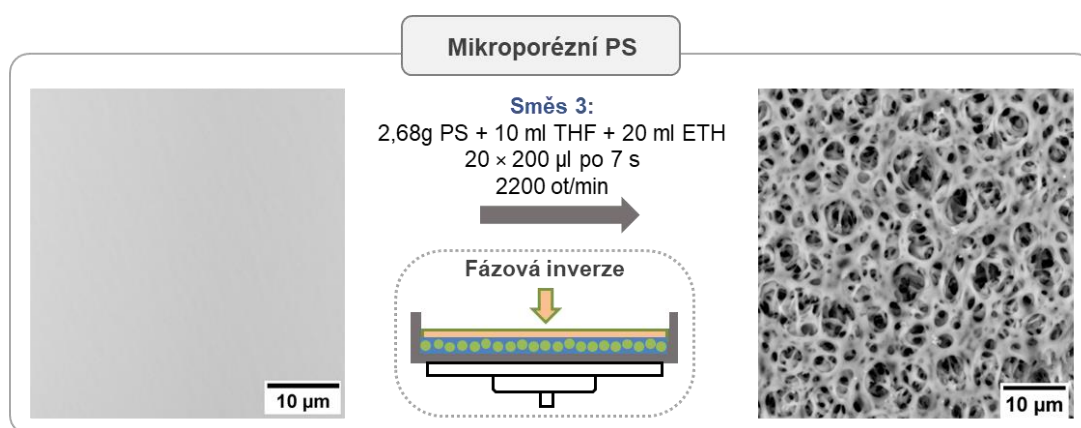
<sup>4</sup> Označení „Makro“, „Mezo“ a „Mikro“ začínající velkým písmenem odpovídají názvům konkrétních hierarchicky strukturovaných povrchů (Obr. 48).

dávek vede ke slinutí primárních makro pórů. Pro srovnání byla směs THF + ETH použita přímo k úpravě plochého povrchu PS. Po nanesení jedné dávky na rotační plochu se vytvoří specifické zvlnění charakterizované středně velkými (mezo) póry o velikosti 10 až 50  $\mu\text{m}$  oddělenými širokými rozhraními s prohlubněmi o velikostech 0,1 až 10  $\mu\text{m}$ , jak je patrné z Obr. 48A a Obr. 49 vlevo dole.

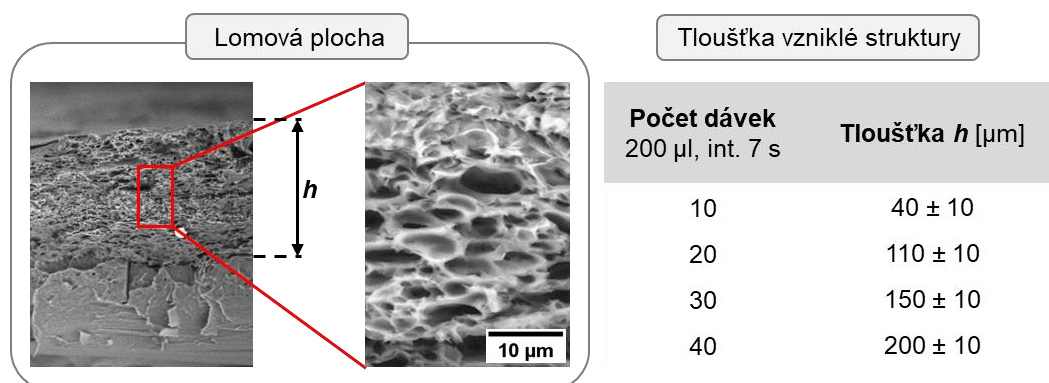


Obr. 49 – schéma přípravy hierarchicky strukturovaných polystyrenových povrchů pomocí jedno či dvou krokové fázové separace.

Postupnou více krokovou fázovou separaci za rotace lze také použít k přípravě objemově porézních mikro struktur. K tomuto účelu je nutné modifikační směs obohatit o polymerní složku – v tomto případě polystyren. Přidaný PS se během rychlého odpařování THF vysráží okolo kapek špatného rozpouštědla (ETH). Z fyzikálně-chemického hlediska tento přístup odpovídá jevu známému jako fázová inverze. [326–328] Jednou z hlavních podmínek této metody je nalezení vhodného poměru všech složek směsi THF + PS + ETH, kdy ETH musí být přítomno v množství těsně před vysrážením PS z roztoku a zároveň koncentrace PS v THF musí být dostatečně vysoká pro vytvoření porézní vrstvy. Při nastavení správného poměru všech složek směsi pak nastává při jejím nadávkování na substrát rychlé oddělení jednotlivých složek systému a dochází k tvorbě více úrovně porézní vrstvy. Z provedených experimentů bylo zjištěno, že ideálním poměrem této směsi je 2,68 g PS v 10 ml THF s postupným přidavkem 20 ml ETH. Použitím této směsi dochází při dávkování na substrát k výše zmíněnému jevu fázové inverze, kde výsledným produktem je mikroporézní PS struktura, Obr. 50.



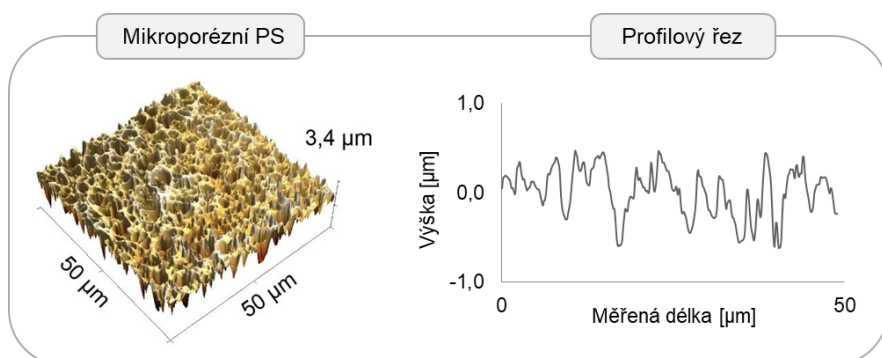
Obr. 50 - porézní PS vrstva připravená pomocí více krokové fázové separace (inverze) ze směsi polystyrenu, dobrého a špatného rozpouštědla.



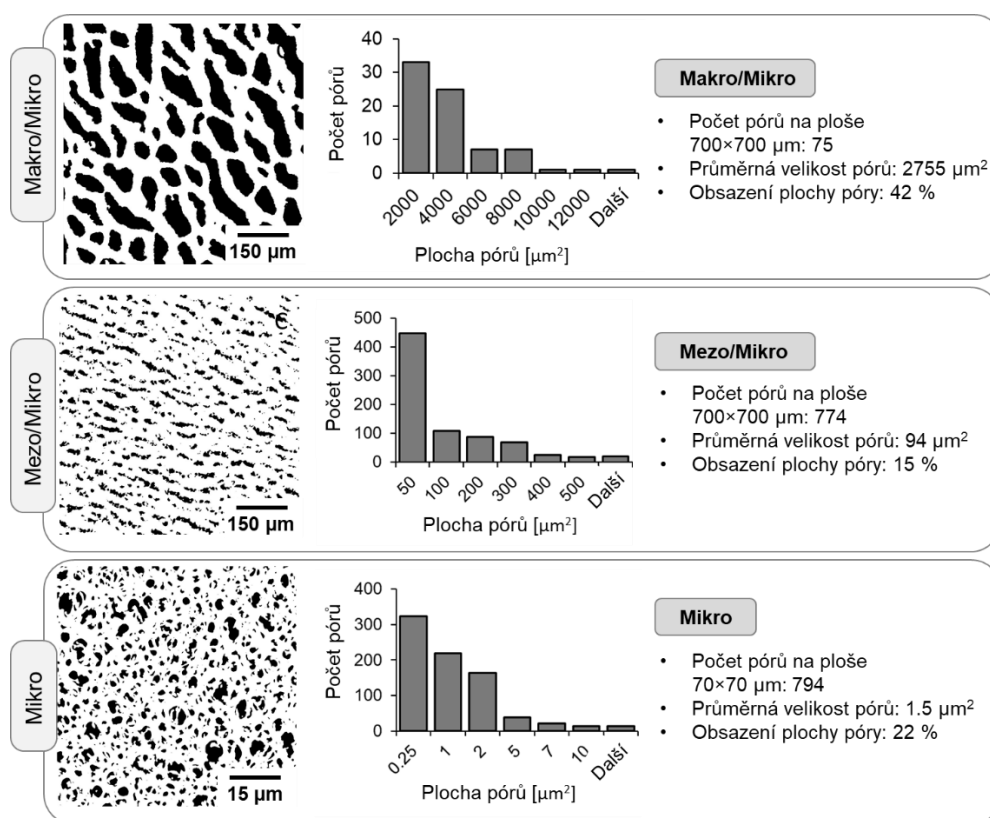
Obr. 51 – snímek lomové plochy polystyrenové porézní vrstvy a přehled tloušťky vrstev při různém počtu deponovaných dávek.

Při aplikaci více dávek směsi PS + THF + ETH dochází k překrývání a narůstání celkové tloušťky vrstvy vytvářejícího se porézního systému (viz Obr. 51). Aby však nedocházelo ke slinování jednotlivých vrstev, je nutné stanovit vhodnou rychlost rotace substrátu a také prodlevu mezi každou dávkou směsi. Experimentálně bylo zjištěno, že ideální časová prodleva mezi jednotlivými dávkami je 7 s.

Připravené mikro strukturované PS povrchy byly charakterizovány pomocí AFM, viz Obr. 52. Z této analýzy je patrné, že na povrchu se vyskytují mikro prohlubně jak z hlediska jejich šířky, tak hloubky, viz profilový řez na Obr. 52.



Obr. 52 – 3D rekonstrukce povrchu a profilový řez středem zobrazené plochy mikroporézního PS.



Obr. 53 – analýza distribuce prohlubní/pórů strukturovaných PS povrchů uvedených na Obr. 48.

Analýza distribuce prohlubní/pórů na Obr. 53 číselně reflektuje pozorované rozdíly mezi srovnávanými povrchy.

V disertační práci E. Wrzecionka [287] bylo zjištěno, že specificky texturované povrchy vytvořené pomocí směsi THF a ETH mohou lépe simulovat přirozené prostředí pro adherentní typy buněk (fibroblasty – NIH/3T3). Nejen textura, ale i smáčivost povrchu vodou jsou důležitými parametry, které mají velký vliv na chování buněk během kultivace. Z tohoto důvodu bylo provedeno měření kontaktního úhlu smáčení vodou na všech strukturovaných površích, Obr. 48, před a po plazmatické úpravě. Byl změřen kontaktní úhel i po aplikaci média na plazmovaný povrch. Výsledné hodnoty měření kontaktního úhlu smáčení PS povrchů vodou jsou uvedeny v Tab. 6. Z naměřených hodnot lze konstatovat, že plazmatická úprava povrchu, která napomáhá lepší adhezi buněk, je stabilní i v přítomnosti kultivačního média.

Tab. 6 – porovnání kontaktních úhlů smáčení PS povrchů vodou. \*Neplazmovaný povrch – referenční vzorek hladké misky určené přímo výrobcem pro kultivaci buněk.

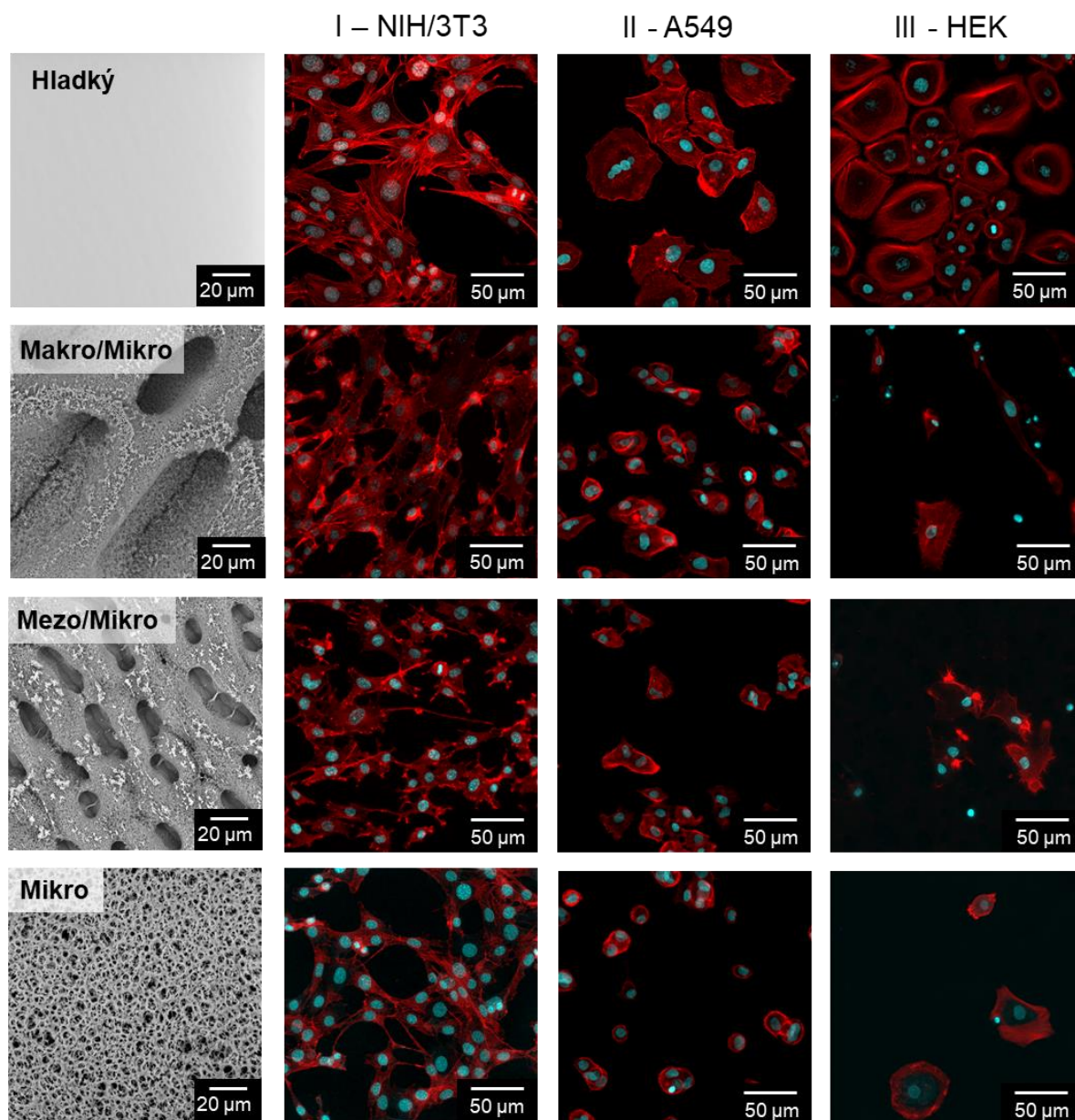
Typ vzorku	Před plazmováním	Po plazmování	Po plazmování a aplikaci kultivačního média
Hladký	71 ± 1	*	*
Mezo/Mikro	104 ± 3	28 ± 7	23 ± 3
Makro/Mikro	115 ± 8	27 ± 2	24 ± 2
Mikro	122 ± 2	25 ± 2	28 ± 6

Jak bylo výše zmíněno, chování buněk silně ovlivňuje struktura povrchu, na který jsou buňky adherovány. Velmi důležitou roli zde hraje přítomnost mikro prohlubní s šířkou v řádech jednotek až desítek mikrometrů na rozhraní makro a mezo prohlubní. Ke stanovení liniově specifické odpovědi na hierarchicky strukturované PS povrchy, Obr. 48, byly testovány<sup>5</sup> čtyři buněčné linie – myší fibroblasty (NIH/3T3), adenokarcinomické epiteliální buňky (A549), keratinocyty (HEK) a embryonální kmenové buňky (ESC). Výsledné snímky pořízené konfokálním mikroskopem jsou zobrazeny na Obr. 54 a Obr. 55. Modře jsou značená jádra buněk, červeně buněčný cytoskelet.

Jak je vidět na Obr. 54, HEK na jednotlivých površích vykazovaly sníženou proliferaci (Obr. 54, sloupec III). Nízká schopnost proliferace v tomto případě pravděpodobně souvisí s velikostí pórů, které se pohybují v rozmezí

<sup>5</sup> Testy buněčné kompatibility, jejichž výsledky jsou uvedené v této kapitole, byly provedeny v laboratořích buněčné biologie na CPS UTB ve Zlíně nebo přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně.

5-150  $\mu\text{m}$ . Pro kultivaci keratinocytů by však póry neměly přesáhnout jednotky mikrometrů, aby byla omezena migrace buněk do pórů. [329]



Obr. 54 – snímky různých buněčných linií pořízených konfokálním mikroskopem. Sloupec I – myši fibroblasty (NIH/3T3), sloupec II – adenokarcinomické epiteliální buňky (A549), sloupec III – keratinocyty (HEK). Modře značená jádra buněk, červeně buněčný cytoskelet.

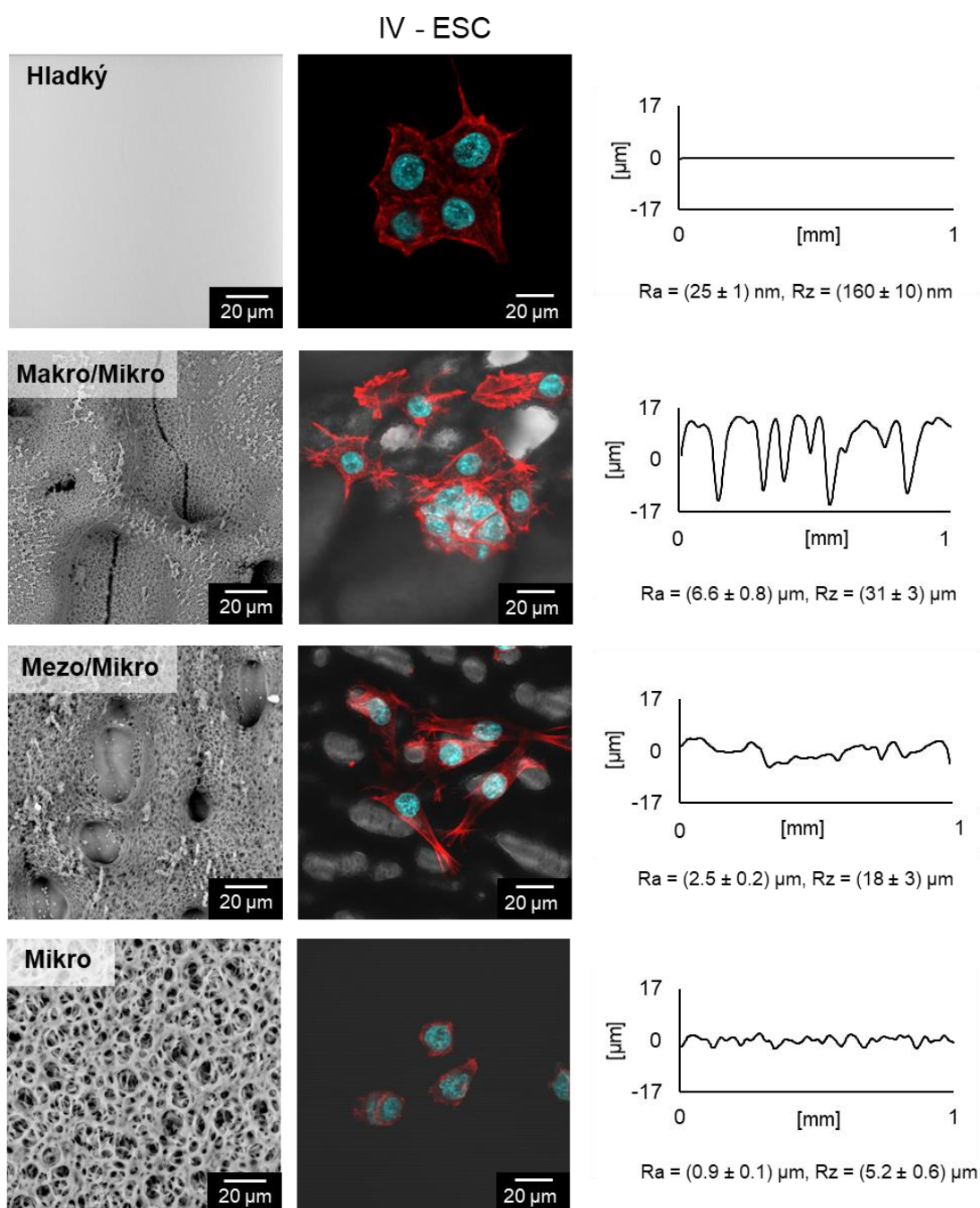
Buňky A549 byly schopny růst na všech hierarchicky strukturovaných površích a nebyla pozorována žádná vizuální změna morfologie (Obr. 54, sloupec II).

V případě použití buněk NIH/3T3 však nastal zvrát, kdy je možné pozorovat zajímavou morfologii myších fibroblastů (Obr. 54, sloupec I). Na strukturovaných površích („Makro/Mikro“ nebo „Mezo/Mikro“) došlo k výrazné eliminaci výskytu stresových vláken, která je spjata především s kultivací fibroblastů



na hladkém nebo „Mikro“ PS povrchu, Obr. 54. Toto zjištění přináší možné použití těchto povrchů jako substrátů schopných napodobit architekturu *in vivo* tkáně.

Jednou z dalších testovaných buněčných linií byly embryonální kmenové buňky (ESC). Studované kmenové buňky na mikro porézním povrchu („Mikro“), stejně jako na hladkém povrchu („Hladký“) nemění tvar svého cytoskeletu, viz Obr. 55. Vyznačují se kompaktním tvarem s velkým jádrem (značeno modře).



Obr. 55 – snímky embryonálních kmenových buněk (ESC) na PS površích pořizené konfokálním mikroskopem. Vpravo – profilové řezy PS povrchů.

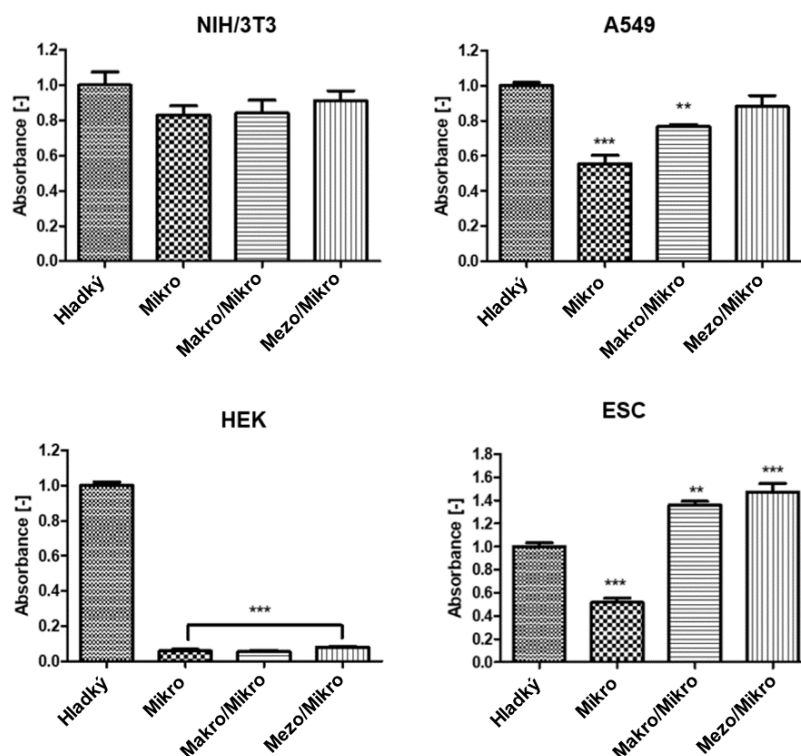
Při kontaktu s hierarchicky strukturovanými „Mezo/Mikro“ nebo „Makro/Mikro“ povrchy lze pozorovat výrazné změny ve tvaru cytoskeletu (značen červeně). Na povrchu „Mezo/Mikro“ lze sledovat přednostní umístění buněčných jader uvnitř pórů. Také je možné sledovat preferenční orientaci cytoskeletu shodnou s orientací mikro pórů. Jak je známo z literatury [330,331], tvar buněčného cytoskeletu je jedním z klíčových faktorů pro další vývoj buňky. Právě tyto specifické orientace cytoskeletu mohou dále souviset s možnou diferenciací kmenových buněk. [332]

Z výsledků a literárních poznatků plyne že geometrie povrchu hraje zásadní roli při vývoji chování kmenových buněk. Z Obr. 55 jasně vyplývá, že buňky, které měly při kultivaci více prostoru, se formovaly primárně do polygonálního tvaru, na rozdíl od buněk na povrchu s menšími póry („Mikro“), které získaly kulovitý tvar podobný nediferenciovanému stavu.

Pro celistvost uskutečněných buněčných tesů byla provedena i kvantifikace jednotlivých buněčných linií na PS povrchích. Výsledky ve formě grafů jsou zobrazeny na Obr. 56. Hodnota absorpance (osa Y) odpovídá celkovému množství buněk.

Z prvotního shlédnutí grafů je patrné, že ani jeden z připravených strukturovaných PS povrchů není vhodný pro proliferaci keratinocytů (HEK). Buňky HEK vykazují proliferaci pouze na hladkém PS povrchu. Naproti tomu naměřené hodnoty absorpance u myších fibroblastů (NIH/3T3) ukazují schopnost růstu na všech uvedených strukturovaných substrátech. V případě nádorových buněk (A549) je možné pozorovat inhibovaný růst na „Mikro“ povrchu.

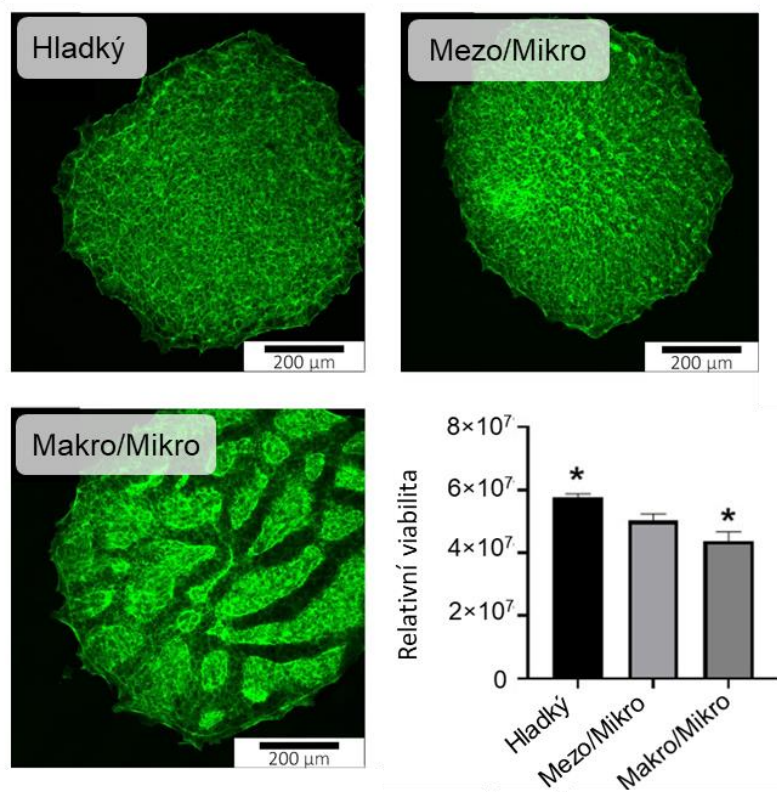
V případě kvantifikace růstu kmenových buněk je patrné, že dochází k výraznému zlepšení proliferace na obou typech hierarchicky strukturovaných povrchů („Makro/Mikro“ a „Mezo/Mikro“). Z výše zmíněného je tedy možné konstatovat, že v případě kultivace kmenových buněk mají hierarchicky strukturované povrchy připravené v této práci velký potenciál i vzhledem k faktu, že právě na těchto povrchích dochází k největším morfologickým změnám ESC (viz Obr. 55).



Obr. 56 – kvantifikace proliferace různých buněčných linií pomocí MTT testu. NIH/3T3 – fibroblasty, A549 – buňky lidského karcinomu, HEK – keratinocyty a ESC – embryonální kmenové buňky. K určení statistických rozdílů mezi vzorky byla použita ANOVA s post hoc Tukeyho testem vícenásobného srovnání; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Testy buněčné kompatibility byly provedeny v laboratořích buněčné biologie na CPS UTB ve Zlíně.

Výše uvedené výsledky prezentované v rámci této podkapitoly byly publikovány v impaktovaném časopise [333].

Na vybraných substrátech byla testována další buněčná linie – nediferencovaná forma lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk (hiPSC), která má potenciál tvořit všechny tkáně v lidském těle. [334] Obr. 57 zobrazuje buňky hiPSC na polystyrenových površích. Z grafu na Obr. 57, který zobrazuje relativní viabilitu buněk vyplývá, že povrch „Makro/Mikro“ mírně inhibuje proliferaci hiPSC. I přes tuto skutečnost jsou oba hierarchicky strukturované povrchy („Mezo/Mikro“ a „Makro/Mikro“) vhodné pro kultivaci hiPSC buněk díky vysokým hodnotám relativní viability.

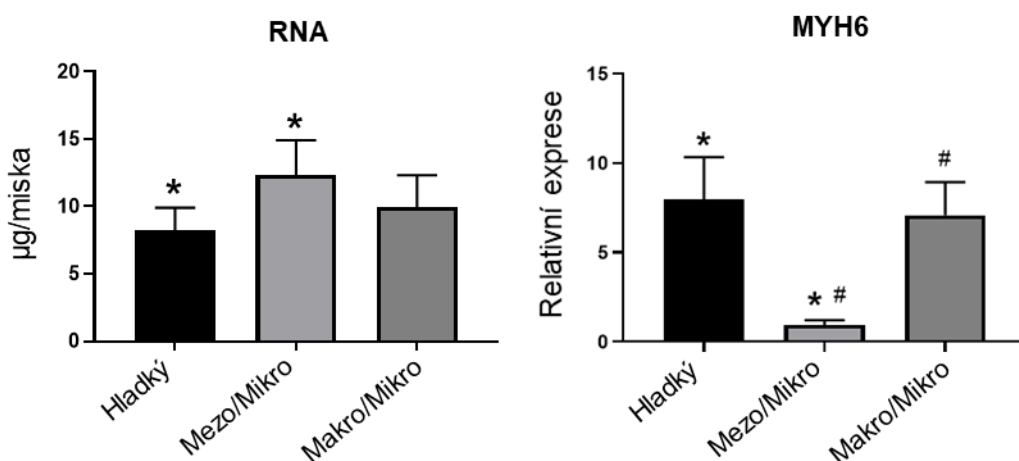


Obr. 57 - hiPSC kultivované na hladkém, „Mezo/Mikro“ a „Makro/Mikro“ substrátech po čtyřech dnech proliferace kontrastně obarvené pomocí Phalloidin-FITC. Graf zobrazuje relativní viabilitu pro všechny povrchy. Indexy \* vyjadřují významné odchylky ( $p \leq 0,05$ ). Testy provedeny na přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně.

Buňky hiPSC jsou schopny diferencovat do podoby funkčních kardiomyocytů (iPSC-CM), jak nastalo i v případě zde připravených PS substrátů. Je známo, že proliferace a zrání iPSC-CM je ovlivněna strukturou substrátu. [335,336] Úpravou topografie substrátu je možné napomoci buňkám hiPSC-CM ke správnému vývoji. V dalším kroku tedy bylo stanoveno množství celkové RNA na připravených površích po 14ti dnech diferenciaci. Při srovnání strukturovaných povrchů s nativním (hladkým) povrchem lze říci, že nedochází k výrazným rozdílům v množství RNA (viz Obr. 58). Strukturovaný „Mezo/Mikro“ povrch však vykazuje statisticky významně větší množství RNA než na hladkém povrchu.

Množství RNA však nedává informaci o podílu jednotlivých druhů buněčných populací. Z tohoto důvodu byly hodnoceny exprese vybraných genů, které jsou spojené právě s kardiogenezí. Bylo studováno několik kardiomarkerů z nichž byl pro tuto práci vybrán jeden reprezentativní vzorek genu  $\alpha$ -isoformy těžkého myozinového řetězce (MYH6). Graf vpravo na Obr. 58 reflektuje podíl buněk procházejících kardiomyogenezou. Z porovnání jednotlivých povrchů je možné konstatovat, že i přes skutečnost, že na povrchu „Mezo/Mikro“ bylo izolováno

větší množství RNA (Obr. 58 vlevo), projev genu souvisejícího s kardiomyogenezí vykazuje opačné tendence. Výše zmíněné skutečnosti tedy napovídají, že hierarchicky strukturovaný povrch „Mezo/Mikro“ podporuje adhezi diferencovaných buněk hiPSC avšak nepřispívá ke zvýšené tvorbě kardiomyocytů. Oproti tomu topografie povrchu „Makro/Mikro“ sice vykazovala nižší přítomnost buněk, avšak specifická struktura povrchu má pozitivní dopad na jejich diferenciaci.



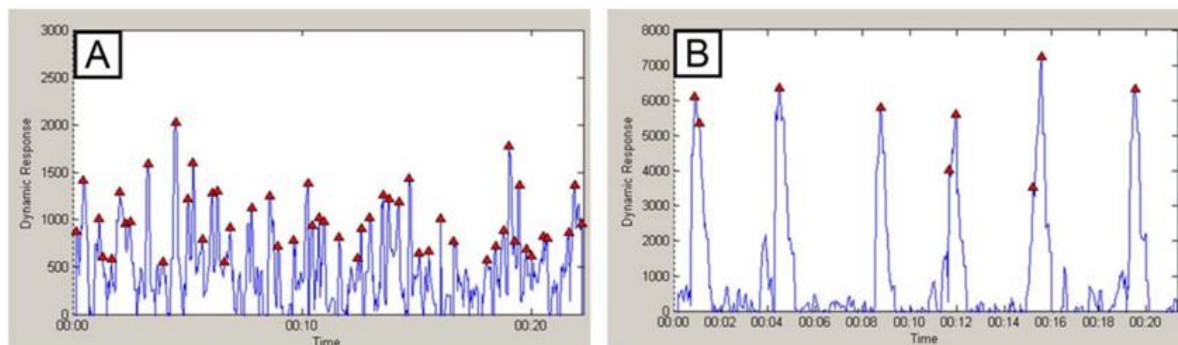
Obr. 58 – vpravo – graf zobrazující množství RNA. Vlevo – graf vyjadřující expresi genu MYH6 na jednotlivých PS površích. Indexy \* a # vyjadřují významné odchylky ( $p \leq 0,05$ ). Testy provedeny na přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně.

Přítomnost zralých kardiomyocytů je možné stanovit pomocí metody sledující průtok iontů  $Ca^{2+}$ . Prostřednictvím této analýzy byly zpozorovány neobvyklé vlastnosti hierarchicky strukturovaného „Makro/Mikro“ PS substrátu, což je patrné z Obr. 59B. Právě tato specifická topografie totiž způsobuje ojedinělé zesílení fluorescenčního signálu. Z výše uvedeného plyne, že úpravu polystyrenového substrátu, který je běžně používán pro tkáňové kultury, je možné využít ke zvýšení citlivosti reakce kardiomyocytů na ionty  $Ca^{2+}$  a je tedy možné použít běžnou kameru, která tyto zesílené signály dokáže bez problémů detekovat.

Z vyhodnocení fluorescenčních signálů na různě strukturovaných površích, plyne, že strukturované PS povrchy mají mnohem vyšší autofluorescenční signál než hladké. Tato skutečnost je s největší pravděpodobností způsobena mnohonásobným odrazem jak excitačního, tak emisního záření na různě strukturovaných površích. Stejně tak můžeme pozorovat mnohem silnější fluorescenční signál v případě značených buněk na strukturovaných površích. Zesílení signálu je největší na površích vyznačujících se mikro nerovnostmi o průměru v rozmezí 0,1 až 10 µm. To znamená, že za největší kvantové výtěžky fluorescenčního procesu jsou zodpovědné mikro nerovnosti, které v kombinaci

s mezo a makro prohlubněmi vytvářejí nový typ vysoce efektivního povrchu pro studium buněčných procesů.

Podrobněji jsou poznatky spojené se zesilováním fluorescenčního signálu při studiu chování kardiomyocytů diskutovány v publikované práci v impaktovaném časopise [337].



*Obr. 59 - záznamy intracelulárních vln iontů  $Ca^{2+}$  v tepu kardiomyocytů stanovené sondou Fura4. Záznam růstu hiPSC-CM na A) hladkém a B) Makro/Mikro PS substrátu. Testy provedeny na přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně.*

## 6.4 Příprava strukturovaných povrchů na bázi hliníku

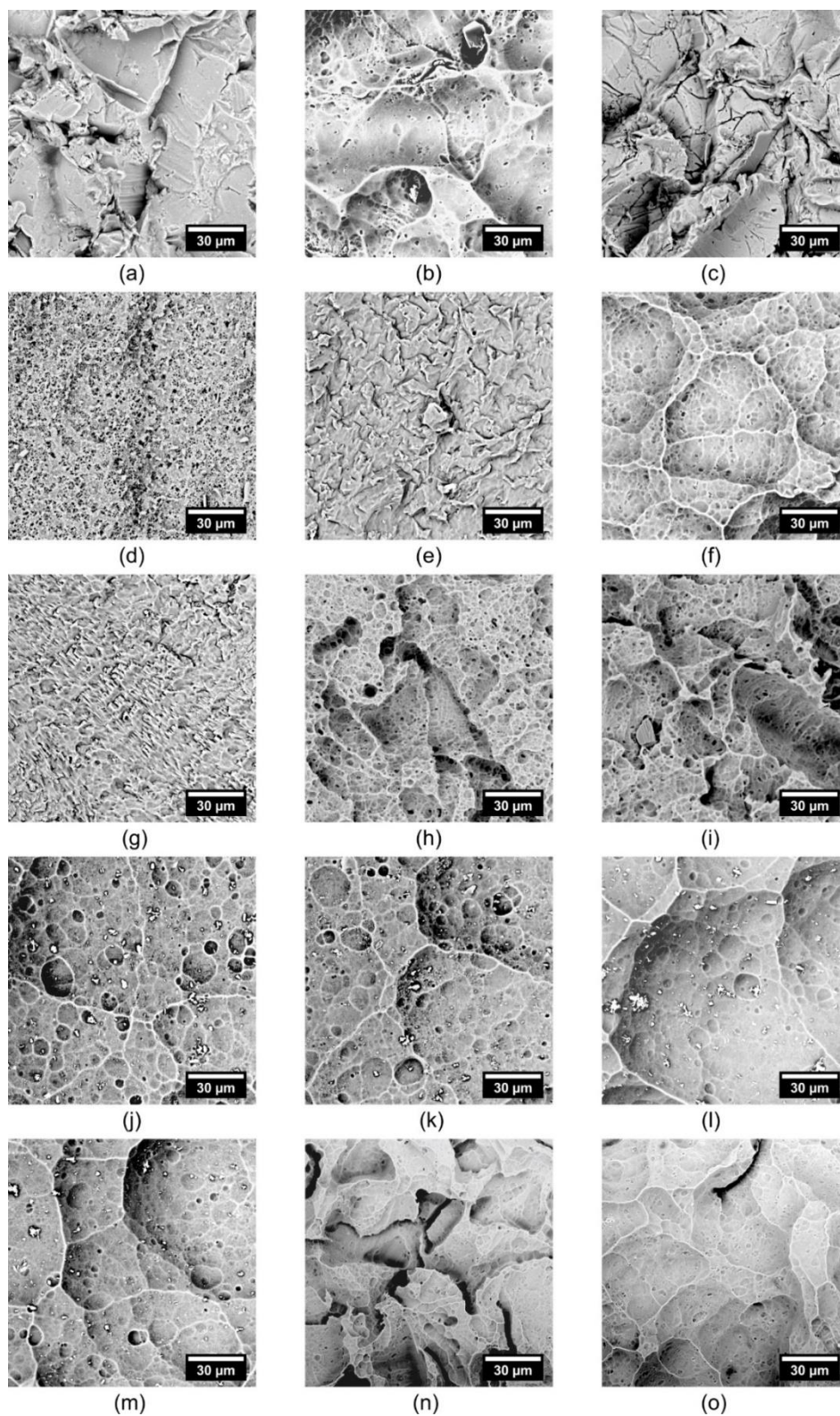
Uplatnění hliníku na poli tkáňového inženýrství lze objevit například při přípravě porézních aluminových keramik [338], scaffoldů z oxidu hlinitého nejen pro kostní tkáňové inženýrství [339–342] nebo použití strukturovaného hliníku a jeho oxidu jako šablony pro replikaci struktury na polymerní materiály [343,344]. Popis vlivu povrchové struktury hliníku na buněčné chování lze nalézt ve studii Ming-Lianga [345]. Výsledky této studie udávají, že nejlépe proliferují buňky na povrchu s kombinovanými mikro a nano nerovnostmi.

V této práci byly optimalizovány procesní parametry leptacích procesů s cílem připravit specificky strukturované hliníkové povrchy. Byly zkoumány možnosti jejich hydrofobizace a vliv jejich povrchové textury na adhezi polymerních systémů.

V prvních fázích experimentů byl studován vliv složení leptacích směsí na změnu povrchové drsnosti, Tab. 7. Spolu se změnou povrchové drsnosti se rovněž měnil vzhled povrchových struktur, Obr. 60. Čas a teplota leptání byla nastavena na 4 minuty a 70 °C pro všechny srovnávané leptací pokusy uvedené v Tab. 7 a na Obr. 60.

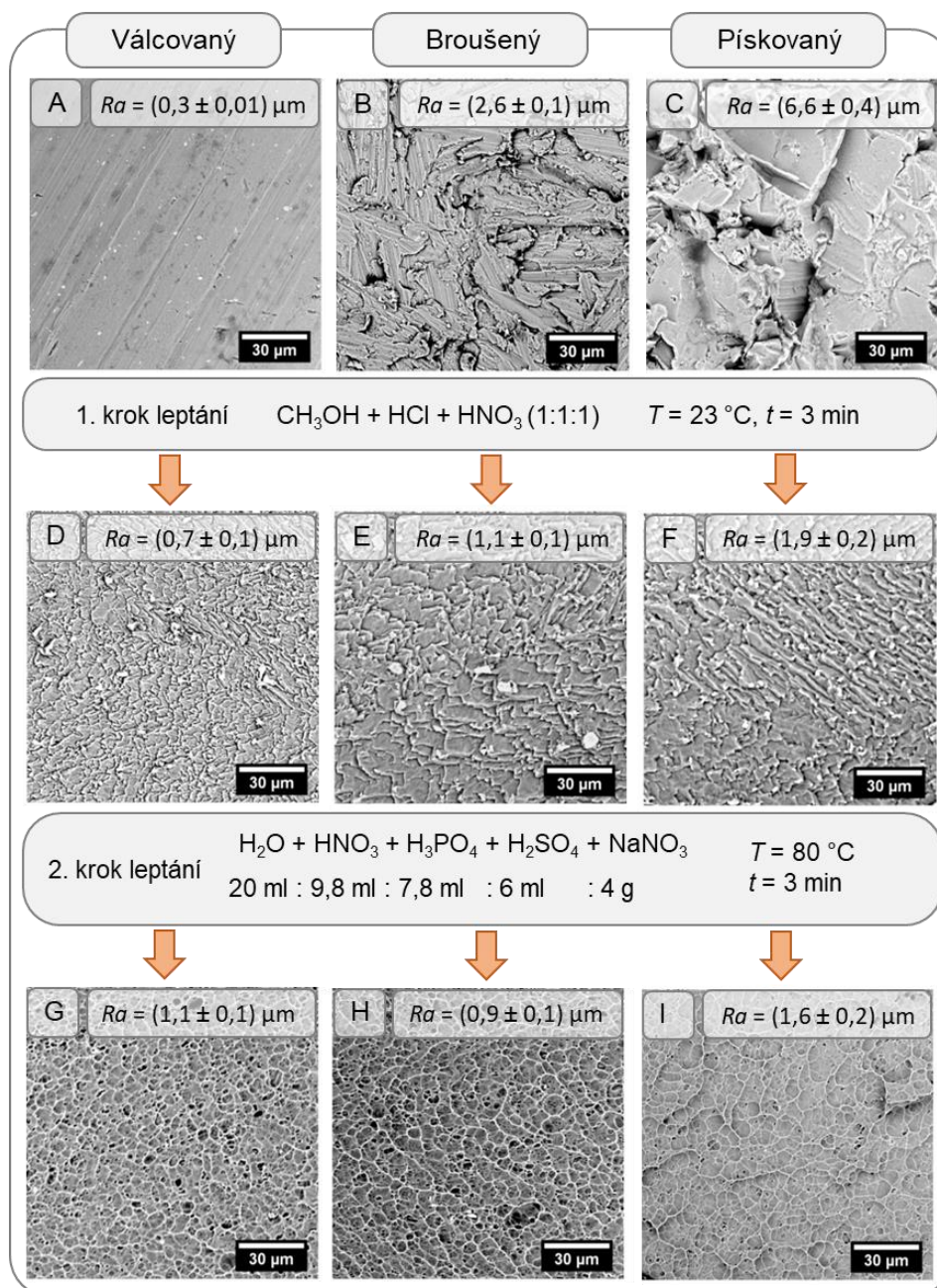
Tab. 7 – složení leptacích směsí a hodnoty drsnosti výsledných povrchů, uvedených na Obr. 60.

Označení	Složení leptací směsi	Poměr složek [ml]	Ra [ $\mu\text{m}$ ]
(a)	Pískovaný povrch	-	6,6 $\pm$ 0,4
(b)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	10	6,7 $\pm$ 0,7
(c)	HNO <sub>3</sub>	10	5,2 $\pm$ 0,6
(d)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + HCl	5 : 5	4,7 $\pm$ 0,9
(e)	HNO <sub>3</sub> + HCl	5 : 5	2,6 $\pm$ 0,8
(f)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + HNO <sub>3</sub>	5 : 5	7,5 $\pm$ 2,2
(g)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + HNO <sub>3</sub> + HCl	3,5 : 3,5 : 3,5	2,7 $\pm$ 0,5
(h)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + HNO <sub>3</sub> + HCl + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,5 : 2,5 : 2,5 : 1	5,3 $\pm$ 0,8
(i)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + HNO <sub>3</sub> + HCl + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O	2,5 : 2,5 : 2,5 : 1 : 1	5,6 $\pm$ 0,7
(j)	H <sub>2</sub> O + NaOH	10 : 0,4 g	6,0 $\pm$ 2,4
(k)	H <sub>2</sub> O + NaOH + NaNO <sub>2</sub>	10 : 0,4 g : 8 g	4,9 $\pm$ 0,8
(l)	H <sub>2</sub> O + NaOH + NaNO <sub>3</sub>	10 : 0,4 g : 2 g	7,5 $\pm$ 0,7
(m)	H <sub>2</sub> O + NaOH + NaNO <sub>2</sub> + NaNO <sub>3</sub>	10 : 0,4 g : 8 g : 2 g	6,8 $\pm$ 1,5
(n)	H <sub>2</sub> O + HNO <sub>3</sub> + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + NaNO <sub>3</sub>	10 : 9,8 : 7,8 : 6 : 4 g	6,0 $\pm$ 0,4
(o)	HNO <sub>3</sub> + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,5 : 3,5 : 3,5	5,2 $\pm$ 0,2



*Obr. 60 – snímky leptaných povrchů hliníků získané pomocí SEM. Značení vzorků odpovídá informacím uvedeným v Tab. 7.*





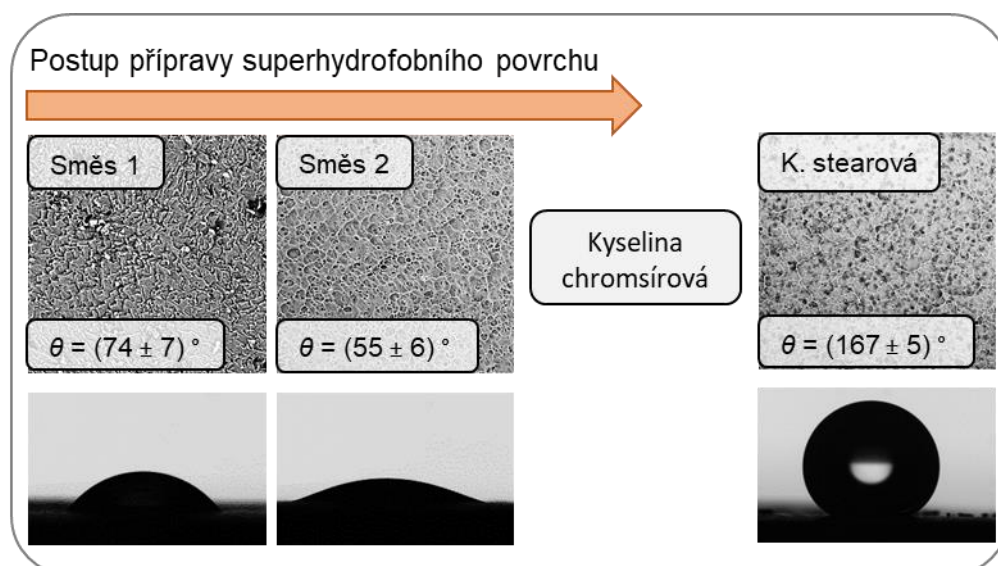
Obr. 61 – snímky povrchu hliníku v různých stupních úpravy chemickým leptáním.

Z provedených experimentů vyplynulo, že u většiny použitých leptacích směsí uvedených v Tab. 7 je typ vznikající povrchové struktury podmínován výchozí drsností hliníkové povrchu. Z tohoto důvodu byl vyhledáván leptací postup, který by umožňoval připravovat srovnatelné povrchové struktury bez ohledu na výchozí drsnost povrchu. Bylo zjištěno, že tohoto cíle lze částečně dosáhnout pomocí roztoku  $\text{CH}_3\text{OH} + \text{HCl} + \text{HNO}_3 (1:1:1)$ , dále v textu označována jako „směs 1“, Obr. 61D-F. Proces leptání probíhal při  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 3 minut. Na obrázcích jsou uvedeny hodnoty parametru drsnosti  $Ra$ . Experimenty ukázaly, že s pomocí této leptací směsi lze připravit relativně podobné povrchy bez ohledu na výchozí topografii povrchů uvedených na Obr. 61A-C. U válcovaného povrchu

dochází k mírnému zvyšování hodnoty  $Ra$  po procesu leptání, zatímco u broušeného a pískovaného povrchu dochází ke snižování hodnot  $Ra$ .

Pro tvorbu Al povrchů připomínajících porézní strukturu, podobně jako v případě fibroinu a polystyrenu diskutované v předešlých podkapitolách, byla použita leptací směs skládající se z  $H_2O + HNO_3 + H_3PO_4 + H_2SO_4 + NaNO_3$  (v poměru složek 20 ml : 9,8 ml : 7,8 ml : 6 ml : 4 g) dále označována jako „směs 2“. Proces leptání touto směsí probíhal při 80 °C po dobu 3 minut. Na výsledných snímcích z elektronového mikroskopu (viz Obr. 61G-I) je možné pozorovat vzniklé strukturované povrchy připomínající povrchové prohlubně.

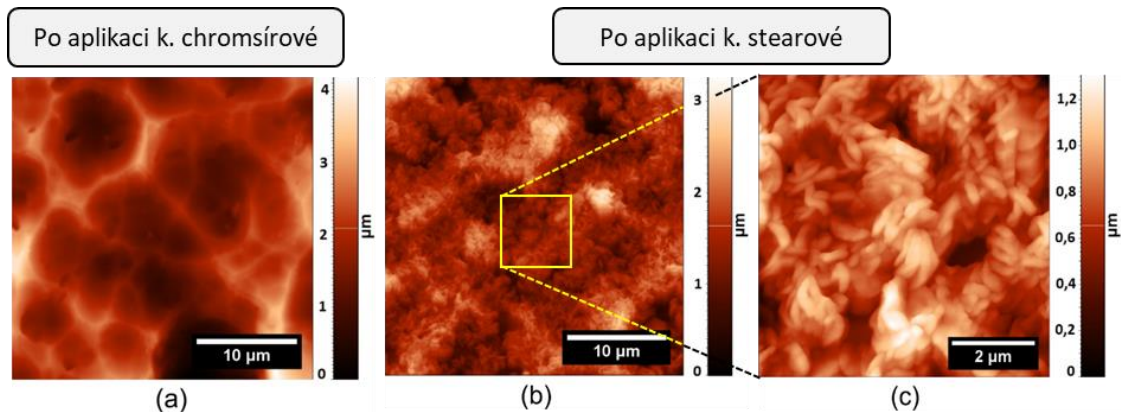
V následných experimentech byly leptané hliníkové povrchy dále modifikovány tak, aby se vyznačovaly superhydrofobním charakterem, Obr. 62. Z poznatků prezentovaných v literatuře byl převzat postup využívající pro tyto účely kyselinu stearovou [346–348].



Obr. 62 – schéma přípravy superhydrofobního Al povrchu pomocí leptání a deponování kyseliny stearové.

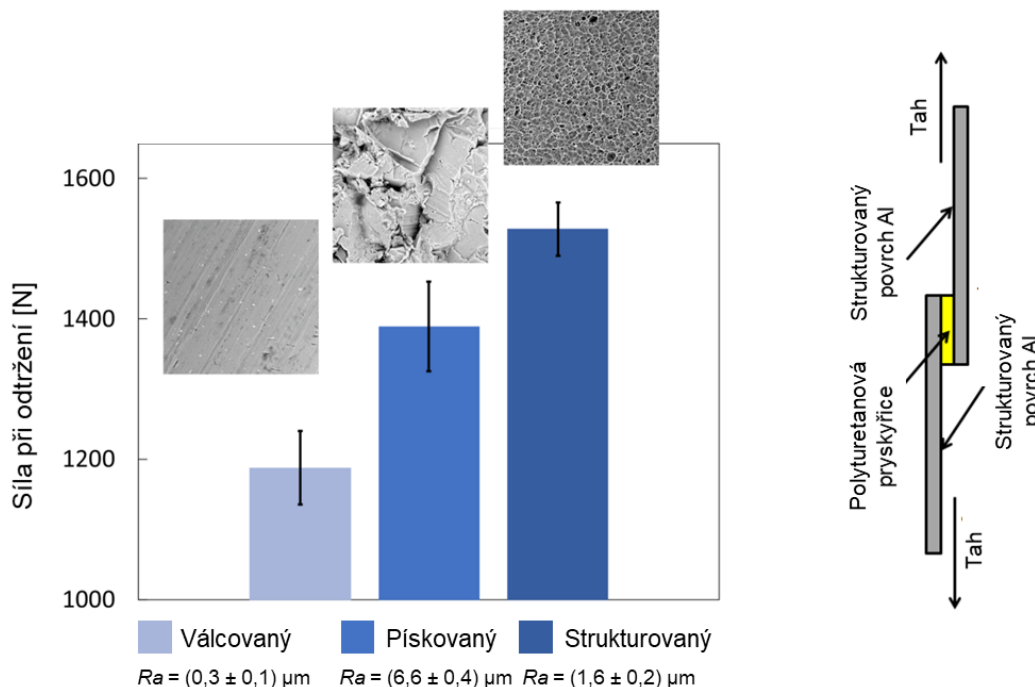
Z takto provedených experimentů vyplynulo, že kombinací nových leptacích postupů s literárně známým krytím pomocí kyseliny stearové lze připravit povrchy s mnohem vyšší hodnotou kontaktního úhlu smáčení v porovnání s poznatky prezentovanými v literatuře [346–348]. Bylo zjištěno, že jedním z kritických kroků před depozicí kyseliny stearové na povrch leptaného hliníku je odstranění oxidačních zbytků leptacího procesu pomocí kyseliny chromsírové po dobu 2 minut při 23 °C. Poté byly vzorky vystaveny působení roztoku kyseliny stearové v ethanolu (1:1, w/w) při teplotě 60 °C po dobu 29 hodin. S tímto přístupem pak lze dosáhnout povrchů s kontaktním úhlem smáčení vodou až 173 °, Obr. 34. Superhydrofobní povrchy se vyznačují kombinací chemického složení spolu se specifickou povrchovou mikro a nano texturou [349–351].

Jak je vidět z AFM snímků, Obr. 63, kys. stearová vytváří nano texturu na porézním povrchu, čímž přispívá k hydrofobním vlastnostem. Bez ošetření kys. chromsírovou lze dosáhnout kontaktních úhlů smáčení vodou okolo 150 °.



Obr. 63 – zobrazení hliníkového povrchu před (a) a po (b,c) deponování vrstvy kyseliny stearové. Obrázky pořízeny pomocí AFM.

Je známo, že texturované povrchy ovlivňují užité vlastnosti materiálu, zvyšují adhezi [352–354] a podmiňují vývoj buněčných systémů [355,356]. S ohledem na tuto skutečnost byla modelově testována pevnost „lepených“ spojů rozdílně strukturovaných hliníkových povrchů. Schéma modelového systému je zobrazeno na Obr. 64 vpravo. Hliníkové vzorky byly spojovány pomocí polyuretanové pryskyřice. Rozměr spojované plochy zaujímal 2×2 cm.



Obr. 64 – vliv povrchové struktury hliníku na pevnost lepeného spoje (vlevo) a schéma testovaného systému (vpravo).

Pomocí univerzálního testovacího stroje byly připravené systémy namáhány tahem až po mez, kdy došlo odtržení spojovaných hliníkových ploch. Získané výsledky ukazují, že specifická povrchová struktura v podobě prohlubní vede ke zvýšení mezní síly pro oddělení spojovaných ploch i přes nižší hodnotu *Ra* v porovnání s pískovaným nebo hladkým povrchem, Obr. 64 vlevo.

Poznatky spojené s texturizací hliníku a jejím vlivem na polymerní systémy byly publikovány ve třech impaktovaných člancích [357–359].

## 7. Přínos pro vědu a praxi

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

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

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

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

## 8. Závěr

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Reference

1. Bruen, D.; Delaney, C.; Florea, L.; Diamond, D. Glucose Sensing for Diabetes Monitoring: Recent Developments. *Sensors* 2017, 17.
2. Berry, E.; Guo, J.J.; Kelton, C.M.; Shiyanbade, H.; Knight, D.; Heaton, P.C. PMS19 DRUG UTILIZATION AND SPENDING TRENDS OF BISPHOSPHONATE MEDICATIONS MEDICAID PROGRAMS IN THE UNITED STATES. *Value Heal.* **2009**, 12, A67, doi:10.1016/S1098-3015(10)73395-7.
3. Daar, A.S.; Greenwood, H.L. A proposed definition of regenerative medicine. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2007**, 1, 179–184, doi:https://doi.org/10.1002/term.20.
4. Terzic, A.; Folmes, C.D.; Martinez-Fernandez, A.; Behfar, A. Regenerative Medicine: On the Vanguard of Health Care. *Mayo Clin. Proc.* **2011**, 86, 600–602, doi:10.4065/mcp.2011.0325.
5. Nelson, T.J.; Behfar, A.; Terzic, A. Strategies for therapeutic repair: The “R(3)” regenerative medicine paradigm. *Clin. Transl. Sci.* **2008**, 1, 168–171, doi:10.1111/j.1752-8062.2008.00039.x.
6. Langer, R.; Vacanti, J. Tissue engineering. *Science (80-. )*. 260, 920–926, doi:10.1126/science.8493529.
7. Eltom, A.; Zhong, G.; Muhammad, A. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes. *Adv. Mater. Sci. Eng.* 2019, 1–13, doi:10.1155/2019/3429527.
8. Stratakis, E. Novel Biomaterials for Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19, doi:10.3390/ijms19123960.
9. Tung, A.; Levin, M. Extra-genomic instructive influences in morphogenesis. *Dev. Biol.* **2020**, 461, 1–12, doi:10.1016/j.ydbio.2020.01.010.
10. Pinet, K.; McLaughlin, K.A. Mechanisms of physiological tissue remodeling in animals. *Dev. Biol.* **2019**, 451, 134–145, doi:10.1016/j.ydbio.2019.04.001.
11. Hasan, A.; Morshed, M.; Memic, A.; Hassan, S.; Webster, T.; Marei, H. Nanoparticles in tissue engineering. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, 13, 5637–5655, doi:10.2147/IJN.S153758.
12. Liaw, C.-Y.; Guvendiren, M. Current and emerging applications of 3D printing in medicine. *Biofabrication* 9, doi:10.1088/1758-5090/aa7279.
13. Lee, G.; Carrillo, M.; McKittrick, J.; Martin, D.G.; Olevsky, E.A. Fabrication of ceramic bone scaffolds by solvent jetting 3D printing and sintering. *Addit. Manuf.* **2020**, 33, doi:10.1016/j.addma.2020.101107.
14. Shie, M.-Y.; Fang, H.-Y.; Lin, Y.-H.; Lee, A.K.-X.; Yu, J.; Chen, Y.-W. Application of piezoelectric cells printing on three-dimensional porous bioceramic scaffold for bone regeneration. *Int. J. Bioprinting* 5, 22–30, doi:10.18063/ijb.v5i2.210.



15. Lopez, C.D.; Diaz-Siso, J.R.; Witek, L.; Bekisz, J.M.; Cronstein, B.N.; Torroni, A.; Flores, R.L.; Rodriguez, E.D.; Coelho, P.G. Three dimensionally printed bioactive ceramic scaffold osseointegration across critical-sized mandibular defects. *J. Surg. Res.* **2018**, *223*, 115–122, doi:10.1016/j.jss.2017.10.027.
16. Shao, H.; He, J.; Lin, T.; Zhang, Z.; Zhang, Y.; Liu, S. 3D gel-printing of hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. *Ceram. Int.* **2019**, *45*, 1163–1170, doi:10.1016/j.ceramint.2018.09.300.
17. Ren, X.; Tuo, Q.; Tian, K.; Huang, G.; Li, J.; Xu, T.; Lv, X.; Wu, J.; Chen, Z.; Weng, J.; et al. Enhancement of osteogenesis using a novel porous hydroxyapatite scaffold in vivo and vitro. *Ceram. Int.* **2018**, *44*, 21656–21665, doi:10.1016/j.ceramint.2018.08.249.
18. Surmeneva, M.A.; Surmenev, R.A.; Chudinova, E.A.; Koptioug, A.; Tkachev, M.S.; Gorodzha, S.N.; Rännar, L.-E. Fabrication of multiple-layered gradient cellular metal scaffold via electron beam melting for segmental bone reconstruction. **2017**, *133*, 195–204, doi:10.1016/j.matdes.2017.07.059.
19. Meißner, R.; Bertol, L.; Rehman, M.A.U.; dos Santos, L.A.L.; Boccaccini, A.R. Bioprinted 3D calcium phosphate scaffolds with gentamicin releasing capability. *Ceram. Int.* **2019**, *45*, 7090–7094, doi:10.1016/j.ceramint.2018.12.212.
20. Araújo, M.; Viveiros, R.; Philippart, A.; Miola, M.; Doumet, S.; Baldi, G.; Perez, J.; Boccaccini, A.R.; Aguiar-Ricardo, A.; Verné, E. Bioactivity, mechanical properties and drug delivery ability of bioactive glass-ceramic scaffolds coated with a natural-derived polymer. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *77*, 342–351, doi:10.1016/j.msec.2017.03.169.
21. Pei, P.; Tian, Z.; Zhu, Y. 3D printed mesoporous bioactive glass/metal-organic framework scaffolds with antitubercular drug delivery. *Microporous Mesoporous Mater.* **2018**, *272*, 24–30, doi:10.1016/j.micromeso.2018.06.012.
22. Ozaki, Y.; Garcia-Garcia, H.M.; Shlofmitz, E.; Hideo-Kajita, A.; Waksman, R. Second-Generation Drug-Eluting Resorbable Magnesium Scaffold. *Cardiovasc. Revascularization Med.* **2020**, *21*, 127–136, doi:10.1016/j.carrev.2019.10.012.
23. Santoro, M.; Shah, S.R.; Walker, J.L.; Mikos, A.G. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *107*, 206–212, doi:10.1016/j.addr.2016.04.019.
24. Cheng, C.-H.; Chen, Y.-W.; Lee, A.K.-X.; Yao, C.-H.; Shie, M.-Y. Development of mussel-inspired 3D-printed poly (lactic acid) scaffold grafted with bone morphogenetic protein-2 for stimulating osteogenesis. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2019**, *30*, doi:10.1007/s10856-019-6279-x.
25. Helal, M.H.; Hendawy, H.D.; Gaber, R.A.; Helal, N.R.; Aboushelib, M.N. Osteogenesis ability of CAD-CAM biodegradable polylactic acid scaffolds

- for reconstruction of jaw defects. *J. Prosthet. Dent.* **2019**, *121*, 118–123, doi:10.1016/j.prosdent.2018.03.033.
26. Turnbull, G.; Clarke, J.; Picard, F.; Riches, P.; Jia, L.; Han, F.; Li, B.; Shu, W. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioact. Mater.* **2018**, *3*, 278–314, doi:10.1016/j.bioactmat.2017.10.001.
  27. Cojocaru, D.G.; Hondke, S.; Krüger, J.P.; Bosch, C.; Croicu, C.; Florescu, S.; Lazarescu, A.; Patrascu, J.; Patrascu, J.; Dauner, M.; et al. Meniscus-shaped cell-free polyglycolic acid scaffold for meniscal repair in a sheep model. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **108**, 809–818, doi:10.1002/jbm.b.34435.
  28. Otsuki, S.; Nakagawa, K.; Murakami, T.; Sezaki, S.; Sato, H.; Suzuki, M.; Okuno, N.; Wakama, H.; Kaihatsu, K.; Neo, M. Evaluation of Meniscal Regeneration in a Mini Pig Model Treated With a Novel Polyglycolic Acid Meniscal Scaffold. *Am. J. Sports Med.* **2019**, *47*, 1804–1815, doi:10.1177/0363546519850578.
  29. Bruder, L.; Brakmann, K.; Stegner, V.; Sigler, M.; Berger, F.; Schmitt, B. Retraction. *J. Funct. Biomater.* **2019**, *10*, doi:10.3390/jfb10010008.
  30. Zuidema, J.M.; Dumont, C.M.; Wang, J.; Batchelor, W.M.; Lu, Y.; Kang, J.; Bertucci, A.; Ziebarth, N.M.; Shea, L.D.; Sailor, M.J. Porous Silicon Nanoparticles Embedded in Poly(lactic- co -glycolic acid) Nanofiber Scaffolds Deliver Neurotrophic Payloads to Enhance Neuronal Growth. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, doi:10.1002/adfm.202002560.
  31. Li, L.; Shi, X.; Wang, Z.; Guo, M.; Wang, Y.; Jiao, Z.; Zhang, P. Porous Scaffolds of Poly(lactic- co -glycolic acid) and Mesoporous Hydroxyapatite Surface Modified by Poly( $\gamma$ -benzyl- l -glutamate) (PBLG) for in Vivo Bone Repair. *5*, 2466–2481, doi:10.1021/acsbiomaterials.8b01614.
  32. Zhang, W.; Ullah, I.; Shi, L.; Zhang, Y.; Ou, H.; Zhou, J.; Ullah, M.W.; Zhang, X.; Li, W. Fabrication and characterization of porous polycaprolactone scaffold via extrusion-based cryogenic 3D printing for tissue engineering. **2019**, *180*, doi:10.1016/j.matdes.2019.107946.
  33. Yu, Y.-H.; Lee, D.; Hsu, Y.-H.; Chou, Y.-C.; Ueng, S.W.N.; Chen, C.-K.; Liu, S.-J. <p>A Three-Dimensional Printed Polycaprolactone Scaffold Combined with Co-Axially Electrospun Vancomycin/Ceftazidime/Bone Morphological Protein-2 Sheath-Core Nanofibers for the Repair of Segmental Bone Defects During the Masquelet Procedure</p>. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *15*, 913–925, doi:10.2147/IJN.S238478.
  34. Silva, J.C.; Carvalho, M.S.; Udangawa, R.N.; Moura, C.S.; Cabral, J.M.S.; da Silva, C.L.; Ferreira, F.C.; Vashishth, D.; Linhardt, R.J. Extracellular matrix decorated polycaprolactone scaffolds for improved mesenchymal stem/stromal cell osteogenesis towards a patient-tailored bone tissue engineering approach. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2020**, *108*, 2153–2166, doi:10.1002/jbm.b.34554.

35. Wen, Y.; Yu, S.; Wu, Y.; Ju, R.; Wang, H.; Liu, Y.; Wang, Y.; Xu, Q. Spinal cord injury repair by implantation of structured hyaluronic acid scaffold with PLGA microspheres in the rat. *Cell Tissue Res.* **2016**, *364*, 17–28, doi:10.1007/s00441-015-2298-1.
36. Sanad, R.A.-B.; Abdel-Bar, H.M. Chitosan–hyaluronic acid composite sponge scaffold enriched with Andrographolide-loaded lipid nanoparticles for enhanced wound healing. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *173*, 441–450, doi:10.1016/j.carbpol.2017.05.098.
37. Chanda, A.; Adhikari, J.; Ghosh, A.; Chowdhury, S.R.; Thomas, S.; Datta, P.; Saha, P. Electrospun chitosan/polycaprolactone-hyaluronic acid bilayered scaffold for potential wound healing applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *116*, 774–785, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.099.
38. Wang, J.; Sun, X.; Zhang, Z.; Wang, Y.; Huang, C.; Yang, C.; Liu, L.; Zhang, Q. Silk fibroin/collagen/hyaluronic acid scaffold incorporating pilose antler polypeptides microspheres for cartilage tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *94*, 35–44, doi:10.1016/j.msec.2018.09.017.
39. Pfeifer, C.; Berner, A.; Koch, M.; Krutsch, W.; Kujat, R.; Angele, P.; Nerlich, M.; Zellner, J. Higher Ratios of Hyaluronic Acid Enhance Chondrogenic Differentiation of Human MSCs in a Hyaluronic Acid–Gelatin Composite Scaffold. *Materials (Basel)*. **2016**, *9*, doi:10.3390/ma9050381.
40. Chia, H.N.; Wu, B.M. Recent advances in 3D printing of biomaterials. *J. Biol. Eng.* **2015**, *9*, doi:10.1186/s13036-015-0001-4.
41. An, J.; Teoh, J.E.M.; Suntornnond, R.; Chua, C.K. Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues. *Engineering* **2015**, *1*, 261–268, doi:10.15302/J-ENG-2015061.
42. Do, A.-V.; Khorsand, B.; Geary, S.M.; Salem, A.K. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4*, 1742–1762, doi:10.1002/adhm.201500168.
43. Dalton, P.D. Melt electrowriting with additive manufacturing principles. *Curr. Opin. Biomed. Eng.* **2017**, *2*, 49–57, doi:10.1016/j.cobme.2017.05.007.
44. Brown, T.D.; Dalton, P.D.; Hutmacher, D.W. Melt electrospinning today. *Prog. Polym. Sci.* **2016**, *56*, 116–166, doi:10.1016/j.progpolymsci.2016.01.001.
45. Ng, W.L.; Lee, J.M.; Yeong, W.Y.; Naing, M.W. Microvalve-based bioprinting – process, bio-inks and applications. *Biomater. Sci.* **2017**, *5*, 632–647, doi:10.1039/C6BM00861E.
46. Maria, C. De; Vozzi, G.; Moroni, L. Multimaterial, heterogeneous, and multicellular three-dimensional bioprinting. *MRS Bull.* **2017**, *42*, 578–584, doi:10.1557/mrs.2017.165.
47. Park, J.H.; Jang, J.; Lee, J.-S.; Cho, D.-W. Three-Dimensional Printing of Tissue/Organ Analogues Containing Living Cells. *Ann. Biomed. Eng.*

- 2017, 45, 180–194, doi:10.1007/s10439-016-1611-9.
48. Cui, H.; Zhu, W.; Nowicki, M.; Zhou, X.; Khademhosseini, A.; Zhang, L.G. Hierarchical Fabrication of Engineered Vascularized Bone Biphasic Constructs via Dual 3D Bioprinting. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, 5, 2174–2181, doi:10.1002/adhm.201600505.
  49. Wang, X.; Rijff, B.L.; Khang, G. A building-block approach to 3D printing a multichannel, organ-regenerative scaffold. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2017**, 11, 1403–1411, doi:10.1002/term.2038.
  50. Lee, V.; Singh, G.; Trasatti, J.P.; Bjornsson, C.; Xu, X.; Tran, T.N.; Yoo, S.-S.; Dai, G.; Karande, P. Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting. *Tissue Eng. Part C Methods* **2014**, 20, 473–484, doi:10.1089/ten.tec.2013.0335.
  51. Duan, B.; Hockaday, L.A.; Kang, K.H.; Butcher, J.T. 3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2013**, 101A, 1255–1264, doi:10.1002/jbm.a.34420.
  52. Markstedt, K.; Mantas, A.; Tournier, I.; Ávila, H.M.; Hägg, D.; Gatenholm, P. 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose–Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules* **16**, 1489–1496, doi:10.1021/acs.biomac.5b00188.
  53. Laronda, M.M.; Rutz, A.L.; Xiao, S.; Whelan, K.A.; Duncan, F.E.; Roth, E.W.; Woodruff, T.K.; Shah, R.N. A bioprosthetic ovary created using 3D printed microporous scaffolds restores ovarian function in sterilized mice. *Nat. Commun.* **2017**, 8, doi:10.1038/ncomms15261.
  54. Choi, J.-W.; Kim, H.-C.; Wicker, R. Multi-material stereolithography. *J. Mater. Process. Technol.* **2011**, 211, 318–328, doi:10.1016/j.jmatprotec.2010.10.003.
  55. Kim, Y.; Castro, K.; Bhattacharjee, N.; Folch, A. Digital Manufacturing of Selective Porous Barriers in Microchannels Using Multi-Material Stereolithography. *Micromachines* **2018**, 9, doi:10.3390/mi9030125.
  56. Miri, A.K.; Nieto, D.; Iglesias, L.; Hosseinabadi, H.G.; Maharjan, S.; Ruiz-Esparza, G.U.; Khoshakhlagh, P.; Manbachi, A.; Dokmeci, M.R.; Chen, S.; et al. Microfluidics-Enabled Multimaterial Maskless Stereolithographic Bioprinting. *Adv. Mater.* **2018**, 30, doi:10.1002/adma.201800242.
  57. Choi, J.-W.; Wicker, R.; Lee, S.-H.; Choi, K.-H.; Ha, C.-S.; Chung, I. Fabrication of 3D biocompatible/biodegradable micro-scaffolds using dynamic mask projection microstereolithography. *J. Mater. Process. Technol.* **2009**, 209, 5494–5503, doi:10.1016/j.jmatprotec.2009.05.004.
  58. Raman, R.; Bashir, R. Stereolithographic 3D Bioprinting for Biomedical Applications. *Essentials 3D Biofabrication Transl.* **2015**, 89–121, doi:10.1016/B978-0-12-800972-7.00006-2.
  59. Warner, J.; Soman, P.; Zhu, W.; Tom, M.; Chen, S. Design and 3D

- Printing of Hydrogel Scaffolds with Fractal Geometries. 2, 1763–1770, doi:10.1021/acsbiomaterials.6b00140.
60. Bens, A.; Seitz, H.; Bermes, G.; Emons, M.; Pansky, A.; Roitzheim, B.; Tobiasch, E.; Tille, C. Non-toxic flexible photopolymers for medical stereolithography technology. *Rapid Prototyp. J.* **13**, 38–47, doi:10.1108/13552540710719208.
  61. Guéhenec, L. Le; hede, D. Van; Plougonven, E.; Nolens, G.; Verlée, B.; Pauw, M. De; Lambert, F. In vitro and in vivo biocompatibility of calcium-phosphate scaffolds three-dimensional printed by stereolithography for bone regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **108**, 412–425, doi:10.1002/jbm.a.36823.
  62. Schmidleithner, C.; Malferrari, S.; Palgrave, R.; Bomze, D.; Schwentenwein, M.; Kalaskar, D.M. Application of high resolution DLP stereolithography for fabrication of tricalcium phosphate scaffolds for bone regeneration. *Biomed. Mater.* **14**, doi:10.1088/1748-605X/ab279d.
  63. Zhu, W.; Qu, X.; Zhu, J.; Ma, X.; Patel, S.; Liu, J.; Wang, P.; Lai, C.S.E.; Gou, M.; Xu, Y.; et al. Direct 3D bioprinting of prevascularized tissue constructs with complex microarchitecture. *Biomaterials* **2017**, *124*, 106–115, doi:10.1016/j.biomaterials.2017.01.042.
  64. Lee, S.-J.; Kang, H.-W.; Park, J.K.; Rhie, J.-W.; Hahn, S.K.; Cho, D.-W. Application of microstereolithography in the development of three-dimensional cartilage regeneration scaffolds. *Biomed. Microdevices* **2008**, *10*, 233–241, doi:10.1007/s10544-007-9129-4.
  65. Jia, W.; Li, M.; Kang, L.; Gu, G.; Guo, Z.; Chen, Z. Fabrication and Comprehensive Characterization of Biomimetic Extracellular Matrix Electrospun Scaffold for Vascular Tissue Engineering Applications. *J. Mater. Sci.* **2019**, *54*, 10871–10883, doi:10.1007/s10853-019-03667-6.
  66. Pezeshki-Modaress, M.; Zandi, M.; Rajabi, S. Tailoring the gelatin/chitosan electrospun scaffold for application in skin tissue engineering: an in vitro study. *Prog. Biomater.* **2018**, *7*, 207–218, doi:10.1007/s40204-018-0094-1.
  67. Bazmandeh, A.Z.; Mirzaei, E.; Fadaie, M.; Shirian, S.; Ghasemi, Y. Dual spinneret electrospun nanofibrous/gel structure of chitosan-gelatin/chitosan-hyaluronic acid as a wound dressing: In-vitro and in-vivo studies. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *162*, 359–373, doi:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.181.
  68. Li, X.; Huang, L.; Li, L.; Tang, Y.; Liu, Q.; Xie, H.; Tian, J.; Zhou, S.; Tang, G. Biomimetic dual-oriented/bilayered electrospun scaffold for vascular tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2020**, *31*, 439–455, doi:10.1080/09205063.2019.1697171.
  69. Orash Mahmoud Salehi, A.; Nourbakhsh, M.S.; Rafienia, M.; Baradaran-Rafii, A.; Heidari Keshel, S. Corneal stromal regeneration by hybrid oriented poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/lyophilized silk fibroin electrospun scaffold.

- Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *161*, 377–388,  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.045>.
70. Karimi, A.; Karbasi, S.; Razavi, S.; Zargar, E.N. Poly(hydroxybutyrate)/chitosan Aligned Electrospun Scaffold as a Novel Substrate for Nerve Tissue Engineering. *Adv. Biomed. Res.* **2018**, *7*, 44, doi:10.4103/abr.abr\_277\_16.
  71. Aidun, A.; Safaei Firoozabady, A.; Moharrami, M.; Ahmadi, A.; Haghighipour, N.; Bonakdar, S.; Faghihi, S. Graphene oxide incorporated polycaprolactone/chitosan/collagen electrospun scaffold: Enhanced osteogenic properties for bone tissue engineering. *Artif. Organs* **2019**, *43*, E264–E281, doi:<https://doi.org/10.1111/aor.13474>.
  72. Pauly, H.; Kelly, D.; Papat, K.; Easley, J.; Palmer, R.; Haut Donahue, T.L. Mechanical properties of a hierarchical electrospun scaffold for ovine anterior cruciate ligament replacement. *J. Orthop. Res.* **2019**, *37*, 421–430, doi:<https://doi.org/10.1002/jor.24183>.
  73. Saidy, N.T.; Wolf, F.; Bas, O.; Keijdener, H.; Hutmacher, D.W.; Mela, P.; De-Juan-Pardo, E.M. Biologically Inspired Scaffolds for Heart Valve Tissue Engineering via Melt Electrowriting. *Small* **15**, doi:10.1002/sml.201900873.
  74. Paxton, N.C.; Daley, R.; Forrestal, D.P.; Allenby, M.C.; Woodruff, M.A. Auxetic tubular scaffolds via melt electrowriting. **2020**, *193*, doi:10.1016/j.matdes.2020.108787.
  75. Bhullar, S.K.; Ko, J.; Cho, Y.; Jun, M.B.G. Fabrication and Characterization of Nonwoven Auxetic Polymer Stent. *Polym. Plast. Technol. Eng.* **54**, 1553–1559, doi:10.1080/03602559.2014.986812.
  76. Ren, X.; Shen, J.; Ghaedizadeh, A.; Tian, H.; Xie, Y.M. A simple auxetic tubular structure with tuneable mechanical properties. *Smart Mater. Struct.* **25**, doi:10.1088/0964-1726/25/6/065012.
  77. McMaster, R.; Hoefner, C.; Hrynevich, A.; Blum, C.; Wiesner, M.; Wittmann, K.; Dargaville, T.R.; Bauer-Kreisel, P.; Groll, J.; Dalton, P.D.; et al. Tailored Melt Electrowritten Scaffolds for the Generation of Sheet-Like Tissue Constructs from Multicellular Spheroids. *Adv. Healthc. Mater.* **8**, doi:10.1002/adhm.201801326.
  78. Grumezescu, A. *Engineering of Nanobiomaterials*; 2.; William Andrew: Chennai, 2016; ISBN 978-0-323-41532-3.
  79. Li, W.-J.; Laurencin, C.T.; Caterson, E.J.; Tuan, R.S.; Ko, F.K. Electrospun nanofibrous structure. *J. Biomed. Mater. Res.* **60**, 613–621, doi:10.1002/jbm.10167.
  80. Hay, E.D. *Cell biology of extracellular matrix*; 2nd ed.; Plenum Press: New York; ISBN 03-064-3951-4.
  81. Chung, S.; King, M.W. Design concepts and strategies for tissue engineering scaffolds. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2011**, *58*, 423–438, doi:10.1002/bab.60.

82. Ma, Z.; Kotaki, M.; Inai, R.; Ramakrishna, S. Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds. *Tissue Eng.* **2005**, *11*, 101–109, doi:10.1089/ten.2005.11.101.
83. Aszódi, A.; Legate, K.R.; Nakchbandi, I.; Fässler, R. What Mouse Mutants Teach Us About Extracellular Matrix Function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2006**, *22*, 591–621, doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104258.
84. O'Brien, F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today* **2011**, *14*, 88–95, doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
85. Song, A.; Rane, A.A.; Christman, K.L. Antibacterial and cell-adhesive polypeptide and poly(ethylene glycol) hydrogel as a potential scaffold for wound healing. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 41–50, doi:10.1016/j.actbio.2011.10.004.
86. Navrátil, L.; Rosina, J. *Medicínská biofyzika; 2.*; Grada Publishing: Praha, 2019; ISBN 978-80-271-0209-9.
87. Hollister, S.J. Scaffold Design and Manufacturing. *Adv. Mater.* *21*, 3330–3342, doi:10.1002/adma.200802977.
88. Ambrosio, L. *Biomedical composites*; 2nd editio.; Scitus Academics: Valley Cottage, NY, 2018; ISBN 978-168-1179-926.
89. Santos, S.G.; Lamghari, M.; Almeida, C.R.; Oliveira, M.I.; Neves, N.; Ribeiro, A.C.; Barbosa, J.N.; Barros, R.; Maciel, J.; Martins, M.C.L.; et al. Adsorbed fibrinogen leads to improved bone regeneration and correlates with differences in the systemic immune response. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 7209–7217, doi:10.1016/j.actbio.2013.04.008.
90. Spiller, K.L.; Anfang, R.R.; Spiller, K.J.; Ng, J.; Nakazawa, K.R.; Daulton, J.W.; Vunjak-Novakovic, G. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* **2014**, *35*, 4477–4488, doi:10.1016/j.biomaterials.2014.02.012.
91. Crupi, A.; Costa, A.; Tarnok, A.; Melzer, S.; Teodori, L. Inflammation in tissue engineering. *Eur. J. Immunol.* **2015**, *45*, 3222–3236, doi:10.1002/eji.201545818.
92. Ivanov, A.N.; Saveleva, M.S.; Kozadaev, M.N.; Matveeva, O. V.; Sal'kovskiy, Y.E.; Lyubun, G.P.; Gorin, D.A.; Norkin, I.A. New Approaches to Scaffold Biocompatibility Assessment. *Bionanoscience* **2019**, *9*, 395–405, doi:10.1007/s12668-019-00613-3.
93. Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 1: Hodnocení a zkoušení v rámci procesu řízení rizika 2010.
94. Babensee, J.E.; Anderson, J.M.; McIntire, L. V; Mikos, A.G. Host response to tissue engineered devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *33*, 111–139, doi:10.1023/B:JMSM.0000030216.73274.86.
95. Day, R.M.; Boccaccini, A.R.; Maquet, V.; Shurey, S.; Forbes, A.; Gabe, S.M.; Jérôme, R. In vivo characterisation of a novel bioresorbable poly(lactide-co-glycolide) tubular foam scaffold for tissue engineering applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2004**, *15*, 729–734,

doi:10.1023/B:JMSM.0000030216.73274.86.

96. Williams, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2941–2953, doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
97. Chen, G.; Ushida, T.; Tateishi, T. Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromol. Biosci.* **2002**, *2*, 67–77.
98. Raghunath, J.; Rollo, J.; Sales, K.M.; Butler, P.E.; Seifalian, A.M. Biomaterials and scaffold design. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2010**, *46*, 73–84, doi:10.1042/BA20060134.
99. CHAIKOF, E.L.; MATTHEW, H.; KOHN, J.; MIKOS, A.G.; PRESTWICH, G.D.; YIP, C.M. Biomaterials and Scaffolds in Reparative Medicine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *961*, 96–105, doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb03057.x.
100. Aronin, C.E.P.; Sadik, K.W.; Lay, A.L.; Rion, D.B.; Tholpady, S.S.; Ogle, R.C.; Botchwey, E.A. Comparative effects of scaffold pore size, pore volume, and total void volume on cranial bone healing patterns using microsphere-based scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2009**, *89A*, 632–641, doi:10.1002/jbm.a.32015.
101. O'Brien, F.J.; Harley, B.A.; Yannas, I. V; Gibson, L.J. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* **2005**, *26*, 433–441, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.052.
102. Woodfield, T.B.F.; Malda, J.; de Wijn, J.; Péters, F.; Riesle, J.; van Blitterswijk, C.A. Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique. *Biomaterials* **2004**, *25*, 4149–4161, doi:10.1016/j.biomaterials.2003.10.056.
103. GRIFFON, D.; SEDIGHI, M.; SCHAEFFER, D.; EURELL, J.; JOHNSON, A. Chitosan scaffolds. *Acta Biomater.* **2006**, *2*, 313–320, doi:10.1016/j.actbio.2005.12.007.
104. Ko, Y.-G.; Grice, S.; Kawazoe, N.; Tateishi, T.; Chen, G. Preparation of Collagen-Glycosaminoglycan Sponges with Open Surface Porous Structures Using Ice Particulate Template Method. *Macromol. Biosci.* *10*, 860–871, doi:10.1002/mabi.200900468.
105. Phelps, E.A.; Garcia, A.J. Update on therapeutic vascularization strategies. *Regen. Med.* **2009**, *4*, 65–80, doi:10.2217/17460751.4.1.65.
106. Ko, H.C.H.; Milthorpe, B.K.; McFarland, C.D. Engineering thick tissues - the vascularisation problem. *Eur. Cells Mater.* *14*, 1–19, doi:10.22203/eCM.v014a01.
107. Woodard, J.R.; Hilldore, A.J.; Lan, S.K.; Park, C.J.; Morgan, A.W.; Eurell, J.A.C.; Clark, S.G.; Wheeler, M.B.; Jamison, R.D.; Johnson, A.J.W. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials* **2007**, *28*, 45–54, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.08.021.
108. Bose, S.; Roy, M.; Bandyopadhyay, A. Recent advances in bone tissue



- engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 546–554, doi:10.1016/j.tibtech.2012.07.005.
109. YANNAS, I. V Models of Organ Regeneration Processes Induced by Templates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1997**, *831*, 280–293, doi:10.1111/j.1749-6632.1997.tb52203.x.
  110. Yannas, I. V *Tissue and Organ Regeneration in Adults*; 2nd editio.; Springer: New York, 2001; ISBN 978-0-387-95214-7.
  111. KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5474–5491, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.
  112. Takemoto, M.; Fujibayashi, S.; Otsuki, B.; Matsushita, T.; Kokubo, T.; Nakamura, T. 3-D Analysis of Pore Structure of Porous Biomaterials Using Micro Focus X-Ray Computed Tomography. *Key Eng. Mater.* **2006**, *309–311*, 1095–1098, doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.309-311.1095.
  113. Hutmacher, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **2000**, *21*, 2529–2543, doi:10.1016/S0142-9612(00)00121-6.
  114. Thadavirul, N.; Pavasant, P.; Supaphol, P. Development of polycaprolactone porous scaffolds by combining solvent casting, particulate leaching, and polymer leaching techniques for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2014**, *102*, 3379–3392, doi:10.1002/jbm.a.35010.
  115. Webster, T. *Nanomedicine: technologies and applications*; Woodhead Publishing series in biomaterials: Philadelphia, 2012; ISBN 978-0-85709-233-5.
  116. Sin, D.; Miao, X.; Liu, G.; Wei, F.; Chadwick, G.; Yan, C.; Friis, T. Polyurethane (PU) scaffolds prepared by solvent casting/particulate leaching (SCPL) combined with centrifugation. *Mater. Sci. Eng. C* **2010**, *30*, 78–85, doi:10.1016/j.msec.2009.09.002.
  117. Gorth, D.; Webster, T.J. Matrices for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomater. Artif. Organs* **2011**, 270–286, doi:10.1533/9780857090843.2.270.
  118. Lanza, R.; Langer, R.; Vacanti, J. *Principles of Tissue Engineering*; 4th ed.; Academic Press, 2004; ISBN 9780123983701.
  119. Dutta, R.C.; Dey, M.; Dutta, A.K.; Basu, B. Competent processing techniques for scaffolds in tissue engineering. *Biotechnol. Adv.* **2017**, *35*, 240–250, doi:10.1016/j.biotechadv.2017.01.001.
  120. Roseti, L.; Parisi, V.; Petretta, M.; Cavallo, C.; Desando, G.; Bartolotti, I.; Grigolo, B. Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *78*, 1246–1262, doi:10.1016/j.msec.2017.05.017.
  121. Aranaz, I.; Gutiérrez, M.; Ferrer, M.; del Monte, F. Preparation of Chitosan Nanocomposites with a Macroporous Structure by Unidirectional Freezing and Subsequent Freeze-Drying. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 5619–

- 5642, doi:10.3390/md12115619.
122. Wong, K. V.; Hernandez, A. A Review of Additive Manufacturing. *ISRN Mech. Eng.* **2012**, *2012*, 208760, doi:10.5402/2012/208760.
  123. Peltola, S.M.; Melchels, F.P.W.; Grijpma, D.W.; Kellomäki, M. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Ann. Med.* **40**, 268–280, doi:10.1080/07853890701881788.
  124. Bártolo, P.J.; Almeida, H.A.; Rezende, R.A.; Laoui, T.; Bidanda, B. *Virtual Prototyping & Bio Manufacturing in Medical Applications*; 1st ed.; Springer: Boston, 2008; ISBN 978-0-387-68831-2.
  125. Zein, I.; Hutmacher, D.W.; Tan, K.C.; Teoh, S.H. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1169–1185, doi:10.1016/S0142-9612(01)00232-0.
  126. Landers, R.; Pfister, A.; Hübner, U.; John, H.; Schmelzeisen, R.; Mülhaupt, R. Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques. *J. Mater. Sci.* **2002**, *37*, 3107–3116, doi:10.1023/A:1016189724389.
  127. Wang, F.; Shor, L.; Darling, A.; Khalil, S.; Sun, W.; Güçeri, S.; Lau, A. Precision extruding deposition and characterization of cellular poly- $\epsilon$ -caprolactone tissue scaffolds. *Rapid Prototyp. J.* **2004**, *10*, 42–49, doi:10.1108/13552540410512525.
  128. Sachs, E.M.; Haggerty, J.S.; Cima, M.J.; Williams, P.A. Three-dimensional printing techniques.
  129. Sachs, E.; Cima, M.; Williams, P.; Brancazio, D.; Cornie, J. Three Dimensional Printing. *J. Eng. Ind.* **114**, 481–488, doi:10.1115/1.2900701.
  130. Park, A.; Wu, B.; Griffith, L.G. Integration of surface modification and 3D fabrication techniques to prepare patterned poly(L-lactide) substrates allowing regionally selective cell adhesion. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **9**, 89–110, doi:10.1163/156856298X00451.
  131. Gbureck, U.; Hölzel, T.; Biermann, I.; Barralet, J.E.; Grover, L.M. Preparation of tricalcium phosphate/calcium pyrophosphate structures via rapid prototyping. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 1559–1563, doi:10.1007/s10856-008-3373-x.
  132. HABIBOVIC, P.; GBURECK, U.; DOILLON, C.; BASSETT, D.; VANBLITTERSWIJK, C.; BARRALET, J. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials* **2008**, *29*, 944–953, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.10.023.
  133. Chumnanklang, R.; Panyathanmaporn, T.; Sitthiseripratip, K.; Suwanprateeb, J. 3D printing of hydroxyapatite. *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27*, 914–921, doi:10.1016/j.msec.2006.11.004.
  134. Seitz, H.; Rieder, W.; Irsen, S.; Leukers, B.; Tille, C. Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2005**, *74B*, 782–788,

doi:10.1002/jbm.b.30291.

135. Irsen, S.H.; Leukers, B.; Höckling, C.; Tille, C.; Seitz, H. Bioceramic Granulates for use in 3D Printing. *Materwiss. Werksttech.* **2006**, *37*, 533–537, doi:10.1002/mawe.200600033.
136. Fierz, F.C.; Beckmann, F.; Huser, M.; Irsen, S.H.; Leukers, B.; Witte, F.; Degistirici, Ö.; Andronache, A.; Thie, M.; Müller, B. The morphology of anisotropic 3D-printed hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials* **2008**, *29*, 3799–3806, doi:10.1016/j.biomaterials.2008.06.012.
137. Sun, H.; Hu, C.; Zhou, C.; Wu, L.; Sun, J.; Zhou, X.; Xing, F.; Long, C.; Kong, Q.; Liang, J.; et al. 3D printing of calcium phosphate scaffolds with controlled release of antibacterial functions for jaw bone repair. **2020**, *189*, doi:10.1016/j.matdes.2020.108540.
138. Kelder, C.; Bakker, A.; Klein-Nulend, J.; Wismeijer, D. The 3D Printing of Calcium Phosphate with K-Carrageenan under Conditions Permitting the Incorporation of Biological Components—A Method. *J. Funct. Biomater.* **2018**, *9*, doi:10.3390/jfb9040057.
139. Lam, C.X.F.; Mo, X.M.; Teoh, S.H.; Hutmacher, D.W. Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer. *Mater. Sci. Eng. C* **2002**, *20*, 49–56, doi:10.1016/S0928-4931(02)00012-7.
140. Shakor, P.; Sanjayan, J.; Nazari, A.; Nejadi, S. Modified 3D printed powder to cement-based material and mechanical properties of cement scaffold used in 3D printing. *Constr. Build. Mater.* **2017**, *138*, 398–409, doi:10.1016/j.conbuildmat.2017.02.037.
141. Billiet, T.; Vandenhaute, M.; Schelfhout, J.; Vlierberghe, S. Van; Dubruel, P. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials* **2012**, *33*, 6020–6041, doi:10.1016/j.biomaterials.2012.04.050.
142. Tibbits, S. In The Emergence of “4D printing,” TED conference, 2013.
143. Momeni, F.; Hassani, N., S.M.M.; Liu, X.; Ni, J. A review of 4D printing. **2017**, *122*, 42–79, doi:10.1016/j.matdes.2017.02.068.
144. Khoo, Z.X.; Teoh, J.E.M.; Liu, Y.; Chua, C.K.; Yang, S.; An, J.; Leong, K.F.; Yeong, W.Y. 3D printing of smart materials. *Virtual Phys. Prototyp.* *10*, 103–122, doi:10.1080/17452759.2015.1097054.
145. Gladman, A.S.; Matsumoto, E.A.; Nuzzo, R.G.; Mahadevan, L.; Lewis, J.A. Biomimetic 4D printing. *Nat. Mater.* **2016**, *15*, 413–418, doi:10.1016/j.matdes.2017.02.068.
146. Ge, Q.; Sakhaei, A.H.; Lee, H.; Dunn, C.K.; Fang, N.X.; Dunn, M.L. Multimaterial 4D Printing with Tailorable Shape Memory Polymers. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, doi:10.1038/srep31110.
147. Choong, Y.Y.C.; Maleksaeedi, S.; Eng, H.; Wei, J.; Su, P.-C. 4D printing of high performance shape memory polymer using stereolithography. **2017**, *126*, 219–225, doi:10.1016/j.matdes.2017.04.049.
148. Skoog, S.A.; Goering, P.L.; Narayan, R.J. Stereolithography in tissue

- engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2014**, *25*, 845–856, doi:10.1007/s10856-013-5107-y.
149. Mondschein, R.J.; Kanitkar, A.; Williams, C.B.; Verbridge, S.S.; Long, T.E. Polymer structure-property requirements for stereolithographic 3D printing of soft tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* **2017**, *140*, 170–188, doi:10.1016/j.biomaterials.2017.06.005.
  150. Jun, I.; Han, H.-S.; Edwards, J.; Jeon, H. Electrospun Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19030745.
  151. Lannutti, J.; Reneker, D.; Ma, T.; Tomasko, D.; Farson, D. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27*, 504–509, doi:10.1016/j.msec.2006.05.019.
  152. Rayleigh, Lord XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* *14*, 184–186, doi:10.1080/14786448208628425.
  153. Dalton, P.D.; Vaquette, C.; Farrugia, B.L.; Dargaville, T.R.; Brown, T.D.; Hutmacher, D.W. Electrospinning and additive manufacturing. *Biomater. Sci* **2013**, *1*, 171–185, doi:10.1039/C2BM00039C.
  154. Rogina, A. Electrospinning process. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *296*, 221–230, doi:10.1016/j.apsusc.2014.01.098.
  155. Seidlits, S.K.; Lee, J.Y.; Schmidt, C.E. Nanostructured scaffolds for neural applications. *Nanomedicine* **2008**, *3*, 183–199, doi:10.2217/17435889.3.2.183.
  156. Zhang, R.; Ma, P. Synthetic nano-fibrillar extracellular matrices with pre-designed macroporous architectures. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52*, doi:10.1002/1097-4636(200011)52:2<430::AID-JBM25>3.0.CO;2-L.
  157. CHIU-WEBSTER, S.; LISTER, J.R. The fall of a viscous thread onto a moving surface. *J. Fluid Mech.* *569*, doi:10.1017/S0022112006002503.
  158. Taylor, G.I. Electrically driven jets. *Proc. R. Soc. London. A. Math. Phys. Sci.* *313*, 453–475, doi:10.1098/rspa.1969.0205.
  159. Jordahl, J.H.; Solorio, L.; Sun, H.; Ramcharan, S.; Teeple, C.B.; Haley, H.R.; Lee, K.J.; Eyster, T.W.; Luker, G.D.; Krebsbach, P.H.; et al. 3D Jet Writing. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, doi:10.1002/adma.201707196.
  160. Park, J.; Lakes, R.S. *Biomaterials*; 3rd ed.; Springer: New York, 2007; ISBN 978-0-387-37879-4.
  161. Vats, A.; Tolley, N.S.; Polak, J.M.; Gough, J.E. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* **2003**, *28*, 165–172, doi:10.1046/j.1365-2273.2003.00686.x.
  162. Ghassemi, T.; Shahroodi, A.; Ebrahimzadeh, M.H.; Mousavian, A.; Movaffagh, J.; Moradi, A. Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. *Arch. Bone Jt. Surg.* **2018**, *6*, 90–99, doi:10.22038/abjs.2018.26340.1713.
  163. Thomson, T. *Polyurethane Immobilization of Cells and Biomolecules*; John Wiley & Sons, 2018; ISBN 9781119264958.

164. Prasad, K.; Bazaka, O.; Chua, M.; Rochford, M.; Fedrick, L.; Spoor, J.; Symes, R.; Tieppo, M.; Collins, C.; Cao, A.; et al. Metallic Biomaterials. *Materials (Basel)*. **2017**, *10*, doi:10.3390/ma10080884.
165. McNeeley, K.M.; Lyon, J.G.; Bellamkonda, R. Biomaterial strategies to modulate cancer. *Biomater. Cancer Ther.* **2013**, 417–444, doi:10.1533/9780857096760.4.417.
166. JANOUŠKOVÁ, O. Synthetic Polymer Scaffolds for Soft Tissue Engineering. *Physiol. Res.* **2018**, 335–348, doi:10.33549/physiolres.933983.
167. Rotter, N.; Ung, F.; Roy, A.K.; Vacanti, M.; Eavey, R.D.; Vacanti, C.A.; Bonassar, L.J. Role for Interleukin 1 $\alpha$  in the Inhibition of Chondrogenesis in Autologous Implants Using Polyglycolic Acid–Polylactic Acid Scaffolds. *Tissue Eng.* **2005**, *11*, 192–200, doi:10.1089/ten.2005.11.192.
168. Narayanan, G.; Gupta, B.S.; Tonelli, A.E. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Nanowebs Functionalized with  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Cyclodextrins. *Biomacromolecules* *15*, 4122–4133, doi:10.1021/bm501158w.
169. Ronca, A.; Ambrosio, L. Polymer based scaffolds for tissue regeneration by stereolithography. *Adv. Biomater. Devices Med.* **2017**, 1–15.
170. Jorge, J.H.; Giampaolo, E.T.; Machado, A.L.; Vergani, C.E. Cytotoxicity of denture base acrylic resins. *J. Prosthet. Dent.* **2003**, *90*, 190–193, doi:10.1016/S0022-3913(03)00349-4.
171. Souza, I.R.; Pansani, T.N.; Basso, F.G.; Hebling, J.; de Souza Costa, C.A. Cytotoxicity of acrylic resin-based materials used to fabricate interim crowns. *J. Prosthet. Dent.* **2020**, doi:10.1016/j.prosdent.2020.01.030.
172. Masetti, P.; Arbeláez, M.I.A.; Pavarina, A.C.; Sanitá, P.V.; Jorge, J.H. Cytotoxic potential of denture base and reline acrylic resins after immersion in disinfectant solutions. *J. Prosthet. Dent.* **2018**, *120*, 155.e1–155.e7, doi:10.1016/j.prosdent.2018.01.001.
173. de Castro, D.T.; da Costa Valente, M.L.; Aires, C.P.; Alves, O.L.; dos Reis, A.C. Elemental ion release and cytotoxicity of antimicrobial acrylic resins incorporated with nanomaterial. *Gerodontology* **2017**, *34*, 320–325, doi:10.1111/ger.12267.
174. Gill, A.A.; Claeysens, F. 3D Structuring of Biocompatible and Biodegradable Polymers Via Stereolithography. *3D Cell Cult.* **2011**, 309–321, doi:10.1007/978-1-60761-984-0\_19.
175. Lee, K.-W.; Wang, S.; Fox, B.C.; Ritman, E.L.; Yaszemski, M.J.; Lu, L. Poly(propylene fumarate) Bone Tissue Engineering Scaffold Fabrication Using Stereolithography. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1077–1084, doi:10.1021/bm060834v.
176. Lee, J.W.; Lan, P.X.; Kim, B.; Lim, G.; Cho, D.-W. Fabrication and characteristic analysis of a poly(propylene fumarate) scaffold using micro-stereolithography technology. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2008**, *87B*, 1–9, doi:10.1002/jbm.b.31057.

177. Lee, J.W.; Lan, P.X.; Kim, B.; Lim, G.; Cho, D.-W. 3D scaffold fabrication with PPF/DEF using micro-stereolithography. *Microelectron. Eng.* **2007**, *84*, 1702–1705, doi:10.1016/j.mee.2007.01.267.
178. Syed, I.; Garg, S.; Sarkar, P. Entrapment of essential oils in hydrogels for biomedical applications. *Polym. Gels* **2018**, 125–141, doi:10.1016/B978-0-08-102179-8.00005-3.
179. Ivanova, E.P.; Bazaka, K.; Crawford, R.J. Advanced synthetic polymer biomaterials derived from organic sources. *New Funct. Biomater. Med. Healthc.* **2014**, 71–99, doi:10.1533/9781782422662.71.
180. Akhtar, M.F.; Hanif, M.; Ranjha, N.M. Methods of synthesis of hydrogels ... A review. *Saudi Pharm. J.* **2016**, *24*, 554–559, doi:10.1016/j.jsps.2015.03.022.
181. BURDICK, J.A.; STEVENS, M.M. Biomedical hydrogels. *Biomater. Artif. Organs Tissue Eng.* **2005**, 107–115, doi:10.1533/9781845690861.2.107.
182. Zhang, X.; Xu, B.; Puperi, D.S.; Yonezawa, A.L.; Wu, Y.; Tseng, H.; Cuchiara, M.L.; West, J.L.; Grande-Allen, K.J. Integrating valve-inspired design features into poly(ethylene glycol) hydrogel scaffolds for heart valve tissue engineering. *Acta Biomater.* **2015**, *14*, 11–21, doi:10.1016/j.actbio.2014.11.042.
183. Kar, M.; Shih, Y.-R.V.; Velez, D.O.; Cabrales, P.; Varghese, S. Poly(ethylene glycol) hydrogels with cell cleavable groups for autonomous cell delivery. *Biomaterials* **2016**, *77*, 186–197, doi:10.1016/j.biomaterials.2015.11.018.
184. Guo, J.; Sun, H.; Lei, W.; Tang, Y.; Hong, S.; Yang, H.; Tay, F.R.; Huang, C. MMP-8-Responsive Polyethylene Glycol Hydrogel for Intraoral Drug Delivery. *J. Dent. Res.* *98*, 564–571, doi:10.1177/0022034519831931.
185. Grover, G.N.; Rao, N.; Christman, K.L. Myocardial matrix–polyethylene glycol hybrid hydrogels for tissue engineering. *Nanotechnology* *25*, doi:10.1088/0957-4484/25/1/014011.
186. Tan, H.-L.; Kai, D.; Pasbakhsh, P.; Teow, S.-Y.; Lim, Y.-Y.; Pushpamalar, J. Electrospun cellulose acetate butyrate/polyethylene glycol (CAB/PEG) composite nanofibers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2020**, *188*, 74–82, doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110713.
187. Park, S.A.; Lee, S.J.; Seok, J.M.; Lee, J.H.; Kim, W.D.; Kwon, I.K. Fabrication of 3D Printed PCL/PEG Polyblend Scaffold Using Rapid Prototyping System for Bone Tissue Engineering Application. *J. Bionic Eng.* **2018**, *15*, 435–442, doi:10.1007/s42235-018-0034-8.
188. Hamid, Z.A.A.; Lim, K.W. Evaluation of UV-crosslinked Poly(ethylene glycol) Diacrylate/Poly(dimethylsiloxane) Dimethacrylate Hydrogel. *Procedia Chem.* **2016**, *19*, 410–418, doi:10.1016/j.proche.2016.03.032.
189. Ruedinger, F.; Lavrentieva, A.; Blume, C.; Pepelanova, I.; Scheper, T. Hydrogels for 3D mammalian cell culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

- 2015**, 99, 623–636, doi:10.1007/s00253-014-6253-y.
190. Kawai, F. Biodegradation of Polyethers (Polyethylene Glycol, Polypropylene Glycol, Polytetramethylene glycol, and Others). *Biopolym. Online* **2005**, doi:10.1002/3527600035.bpol9012.
  191. Razzak, M.T.; Darwis, D.; Zainuddin; Sukirno Irradiation of polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone blended hydrogel for wound dressing. *Radiat. Phys. Chem.* **2001**, 62, 107–113, doi:10.1016/S0969-806X(01)00427-3.
  192. DeMerlis, C.C.; Schoneker, D.R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food Chem. Toxicol.* **2003**, 41, 319–326, doi:10.1016/S0278-6915(02)00258-2.
  193. Schmedlen, R.H.; Masters, K.S.; West, J.L. Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering. *Biomaterials* **2002**, 23, 4325–4332, doi:10.1016/S0142-9612(02)00177-1.
  194. Kita, M.; Ogura, Y.; Honda, Y.; Hyon, S.-H.; Cha, W.-I.; Ikada, Y. Evaluation of polyvinyl alcohol hydrogel as a soft contact lens material. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **1990**, 228, 533–537, doi:10.1007/BF00918486.
  195. Göbbels, M.; Spitznas, M. Effects of artificial tears on corneal epithelial permeability in dry eyes. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **1991**, 229, 345–349, doi:10.1007/BF00170693.
  196. Kobayashi, M.; Toguchida, J.; Oka, M. Development of the shields for tendon injury repair using polyvinyl alcohol ? hydrogel ( PVA-H). *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 58, 344–351, doi:10.1002/jbm.1027.
  197. Orienti, I.; Treré, R.; Zecchi, V. Hydrogels Formed by Cross-Linked Polyvinylalcohol as Colon-Specific Drug Delivery Systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27, 877–884, doi:10.1081/DDC-100107253.
  198. Mondal, D.; Griffith, M.; Venkatraman, S.S. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 65, 255–265, doi:10.1080/00914037.2015.1103241.
  199. Khor, H.L.; Ng, K.W.; Schantz, J.T.; Phan, T.-T.; Lim, T.C.; Teoh, S.H.; Hutmacher, D.W. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) films as a potential substrate for tissue engineering an epidermal equivalent. *Mater. Sci. Eng. C* **2002**, 20, 71–75, doi:10.1016/S0928-4931(02)00015-2.
  200. Ciapetti, G.; Ambrosio, L.; Savarino, L.; Granchi, D.; Cenni, E.; Baldini, N.; Pagani, S.; Guizzardi, S.; Causa, F.; Giunti, A. Osteoblast growth and function in porous poly  $\epsilon$ -caprolactone matrices for bone repair. *Biomaterials* **2003**, 24, 3815–3824, doi:10.1016/S0142-9612(03)00263-1.
  201. Alberts, B. *Molecular biology of the cell*; 4th ed.; Garland Science: New York, 2002; ISBN 08-153-3218-1.
  202. Dong, C.; Lv, Y. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. **2016**, 8, doi:10.3390/polym8020042.

203. Gelse, K. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 1531–1546, doi:10.1016/j.addr.2003.08.002.
204. Chevallay, B.; Herbage, D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures. **2000**, 38, 211–218, doi:10.1016/j.semcd.2009.08.005.
205. Wolf, K.; Alexander, S.; Schacht, V.; Coussens, L.M.; von Andrian, U.H.; van Rheenen, J.; Deryugina, E.; Friedl, P. Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. **2009**, 20, 931–941, doi:10.1016/j.semcd.2009.08.005.
206. Vasaturo, A.; Caserta, S.; Russo, I.; Preziosi, V.; Ciacci, C.; Guido, S.; Rappoport, J.Z. A Novel Chemotaxis Assay in 3-D Collagen Gels by Time-Lapse Microscopy. *PLoS One* 7, doi:10.1371/journal.pone.0052251.
207. Radice, M.; Cardarelli, L.; Cortivo, R.; Abatangelo, G. Chemotactic Properties of Human Collagen Breakdown Products in Wound Healing. *Proteolysis in Wound Repair* **1996**, 51–60, doi:10.1007/978-3-642-61130-8\_5.
208. Scharffetter-Kochanek, K.; Klein, C.E.; Heinen, G.; Mauch, C.; Schaefer, T.; Adelman-Grill, B.C.; Goerz, G.; Fusenig, N.E.; Krieg, T.M.; Plewig, G. Migration of a Human Keratinocyte Cell Line (HACAT) to Interstitial Collagen Type I Is Mediated by the  $\alpha 2\beta 1$ -Integrin Receptor. *J. Invest. Dermatol.* **1992**, 98, 3–11, doi:10.1111/1523-1747.ep12493266.
209. Postlethwaite, A.E.; Seyer, J.M.; Kang, A.H. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 871–875, doi:10.1073/pnas.75.2.871.
210. Bowersox, J.C.; Sorgente, N. Chemotaxis of Aortic Endothelial Cells in Response to Fibronectin. *Am. Assoc. Cancer Res.* **1982**, 42, 2547–2551.
211. Fleck, C.A.; Simman, R. Modern Collagen Wound Dressings. *J. Am. Col. Certif. Wound Spec.* **2010**, 2, 50–54, doi:10.1016/j.jcws.2010.12.003.
212. Yannas, I.; Burke, J.; Orgill, D.; Skrabut, E. Wound tissue can utilize a polymeric template to synthesize a functional extension of skin. *Science* (80-. ). 215, 174–176, doi:10.1126/science.7031899.
213. Grath, K.M.; Kaplan, D. *Protein-Based Materials*; Springer Science & Business Media, 2012; ISBN 9781461240945.
214. Altman, G.H.; Diaz, F.; Jakuba, C.; Calabro, T.; Horan, R.L.; Chen, J.; Lu, H.; Richmond, J.; Kaplan, D.L. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* **2003**, 24, 401–416, doi:10.1016/S0142-9612(02)00353-8.
215. Kundu, B.; Rajkhowa, R.; Kundu, S.C.; Wang, X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, 65, 457–470, doi:10.1016/j.addr.2012.09.043.
216. Chen, J.; Altman, G.H.; Karageorgiou, V.; Horan, R.; Collette, A.; Volloch, V.; Calabro, T.; Kaplan, D.L. Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses on RGD-modified silk fibers. *J. Biomed. Mater. Res.* 67A, 559–570, doi:10.1002/jbm.a.10120.
217. Liivak, O.; Blye, A.; Shah, N.; Jelinski, L.W. A Microfabricated Wet-



- Spinning Apparatus To Spin Fibers of Silk Proteins. Structure–Property Correlations. *Macromolecules* **1998**, *31*, 2947–2951, doi:10.1021/ma971626l.
218. Li, C.; Vepari, C.; Jin, H.-J.; Kim, H.J.; Kaplan, D.L. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2006**, *27*, 3115–3124, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.022.
  219. Arai, T.; Freddi, G.; Innocenti, R.; Tsukada, M. Biodegradation of Bombyx mori silk fibroin fibers and films. *J. Appl. Polym. Sci.* *91*, 2383–2390, doi:10.1002/app.13393.
  220. Cubayachi, C.; Lemos, C.N.; Pereira, F.; Dias, K.; Herculano, R.D.; de Freitas, O.; Lopez, R.F. V Silk fibroin films stabilizes and releases bioactive insulin for the treatment of corneal wounds. *Eur. Polym. J.* **2019**, *118*, 502–513, doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.06.022.
  221. Zhang, X.; Bao, H.; Donley, C.; Liang, J.; Yang, S.; Xu, S. Thiolation and characterization of regenerated Bombyx mori silk fibroin films with reduced glutathione. *BMC Chem.* **2019**, *13*, doi:10.1186/s13065-019-0583-x.
  222. Ramachandran, C.; Gupta, P.; Hazra, S.; Mandal, B.B. In Vitro Culture of Human Corneal Endothelium on Non-Mulberry Silk Fibroin Films for Tissue Regeneration. *9*, doi:10.1167/tvst.9.4.12.
  223. Jin, H.-J.; Park, J.; Valluzzi, R.; Cebe, P.; Kaplan, D.L. Biomaterial Films of Bombyx Mori Silk Fibroin with Poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 711–717, doi:10.1021/bm0343287.
  224. Zuluaga-Vélez, A.; Cómbita-Merchán, D.F.; Buitrago-Sierra, R.; Santa, J.F.; Aguilar-Fernández, E.; Sepúlveda-Arias, J.C.; Athanassiou, A. Silk fibroin hydrogels from the Colombian silkworm Bombyx mori L. *PLoS One* *14*, doi:10.1371/journal.pone.0213303.
  225. Guan, Y.; Sun, F.; Zhang, X.; Peng, Z.; jiang, B.; Liang, M.; Wang, Y. Silk fibroin hydrogel promote burn wound healing through regulating TLN1 expression and affecting cell adhesion and migration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2020**, *31*, doi:10.1007/s10856-020-06384-8.
  226. Rammensee, S.; Huemmerich, D.; Hermanson, K.D.; Scheibel, T.; Bausch, A.R. Rheological characterization of hydrogels formed by recombinantly produced spider silk. *Appl. Phys. A* **2006**, *82*, 261–264, doi:10.1007/s00339-005-3431-x.
  227. Vepari, C.; Kaplan, D.L. Silk as a biomaterial. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 991–1007, doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013.
  228. Collins, M.N.; Birkinshaw, C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 1262–1279, doi:10.1016/j.carbpol.2012.10.028.
  229. Zhu, Z.; Wang, Y.-M.; Yang, J.; Luo, X.-S. Hyaluronic acid. *Plast. Aesthetic Res.* *4*, 219–227, doi:10.20517/2347-9264.2017.71.
  230. Jacob, J.; More, N.; Kalia, K.; Kapusetti, G. Piezoelectric smart

- biomaterials for bone and cartilage tissue engineering. *Inflamm. Regen.* **2018**, 38, doi:10.1186/s41232-018-0059-8.
231. Zhang, X.; Zhang, C.; Lin, Y.; Hu, P.; Shen, Y.; Wang, K.; Meng, S.; Chai, Y.; Dai, X.; Liu, X.; et al. Nanocomposite Membranes Enhance Bone Regeneration Through Restoring Physiological Electric Microenvironment. *ACS Nano* **10**, 7279–7286, doi:10.1021/acsnano.6b02247.
  232. Rajabi, A.H.; Jaffe, M.; Arinzeh, T.L. Piezoelectric materials for tissue regeneration. *Acta Biomater.* **2015**, 24, 12–23, doi:10.1016/j.actbio.2015.07.010.
  233. Singh, J.; Rani, S.; Rohini; Parida, A. Generation of piezoelectricity from the human body. *2014 Annu. Int. Conf. Emerg. Res. Areas Magn. Mach. Drives* **2014**, 1–5, doi:10.1109/AICERA.2014.6908277.
  234. Lee, Y.-S.; Arinzeh, T.L. Electrospun Nanofibrous Materials for Neural Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. **2011**, 3, 413–426, doi:10.3390/polym3010413.
  235. Neuss, S.; Apel, C.; Buttler, P.; Denecke, B.; Dhanasingh, A.; Ding, X.; Grafahrend, D.; Groger, A.; Hemmrich, K.; Herr, A.; et al. Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering. *Biomaterials* **2008**, 29, 302–313, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.09.022.
  236. Fukada, E. New Piezoelectric Polymers. *Jpn. J. Appl. Phys.* **37**, 2775–2780, doi:10.1143/JJAP.37.2775.
  237. Weber, N.; Lee, Y.-S.; Shanmugasundaram, S.; Jaffe, M.; Arinzeh, T.L. Characterization and in vitro cytocompatibility of piezoelectric electrospun scaffolds. *Acta Biomater.* **2010**, 6, 3550–3556, doi:10.1016/j.actbio.2010.03.035.
  238. Huang, W.M.; Yang, B.; Zhao, Y.; Ding, Z. Thermo-moisture responsive polyurethane shape-memory polymer and composites. *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, doi:10.1039/b922943d.
  239. Buckley, P.R.; McKinley, G.H.; Wilson, T.S.; Small, W.; Benett, W.J.; Bearinger, J.P.; McElfresh, M.W.; Maitland, D.J. Inductively Heated Shape Memory Polymer for the Magnetic Actuation of Medical Devices. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2006**, 53, 2075–2083, doi:10.1109/TBME.2006.877113.
  240. Mohr, R.; Kratz, K.; Weigel, T.; Lucka-Gabor, M.; Moneke, M.; Lendlein, A. Initiation of shape-memory effect by inductive heating of magnetic nanoparticles in thermoplastic polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 3540–3545, doi:10.1073/pnas.0600079103.
  241. Lendlein, A.; Jiang, H.; Jünger, O.; Langer, R. Light-induced shape-memory polymers. *Nature* **2005**, 434, 879–882, doi:10.1038/nature03496.
  242. Langer, R.; Tirrell, D.A. Designing materials for biology and medicine. *Nature* **2004**, 428, 487–492, doi:10.1038/nature02388.
  243. Montgomery, M.; Ahadian, S.; Huyer, L.D.; Rito, M. Lo; Civitarese, R.A.;

- Vanderlaan, R.D.; Wu, J.; Reis, L.A.; Momen, A.; Akbari, S.; et al. Flexible shape-memory scaffold for minimally invasive delivery of functional tissues. *Nat. Mater.* **2017**, *16*, 1038–1046, doi:10.1038/nmat4956.
244. Liu, X.; Zhao, K.; Gong, T.; Song, J.; Bao, C.; Luo, E.; Weng, J.; Zhou, S. Delivery of Growth Factors Using a Smart Porous Nanocomposite Scaffold to Repair a Mandibular Bone Defect. *Biomacromolecules* *15*, 1019–1030, doi:10.1021/bm401911p.
245. Yu, J.; Xia, H.; Teramoto, A.; Ni, Q.-Q. Fabrication and characterization of shape memory polyurethane porous scaffold for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2017**, *105*, 1132–1137, doi:10.1002/jbm.a.36009.
246. Fer, G. Le; Becker, M.L. 4D Printing of Resorbable Complex Shape-Memory Poly(propylene fumarate) Star Scaffolds. *12*, 22444–22452, doi:10.1021/acsami.0c01444.
247. Balk, M.; Behl, M.; Wischke, C.; Zotzmann, J.; Lendlein, A. Recent advances in degradable lactide-based shape-memory polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *107*, 136–152, doi:10.1016/j.addr.2016.05.012.
248. Hager, M.D.; Greil, P.; Leyens, C.; van der Zwaag, S.; Schubert, U.S. Self-Healing Materials. *Adv. Mater.* *22*, 5424–5430, doi:10.1002/adma.201003036.
249. Diba, M.; Spaans, S.; Ning, K.; Ippel, B.D.; Yang, F.; Loomans, B.; Dankers, P.Y.W.; Leeuwenburgh, S.C.G. Self-Healing Biomaterials. *Adv. Mater. Interfaces* **2018**, *5*, doi:10.1002/admi.201800118.
250. Brown, E.N.; White, S.R.; Sottos, N.R. Microcapsule induced toughening in a self-healing polymer composite. *J. Mater. Sci.* **2004**, *39*, 1703–1710, doi:10.1023/B:JMISC.0000016173.73733.dc.
251. White, S.R.; Sottos, N.R.; Geubelle, P.H.; Moore, J.S.; Kessler, M.R.; Sriram, S.R.; Brown, E.N.; Viswanathan, S. Autonomic healing of polymer composites. *Nature* **2001**, *409*, 794–797, doi:10.1038/35057232.
252. Trask, R.S.; Williams, G.J.; Bond, I.P. Bioinspired self-healing of advanced composite structures using hollow glass fibres. *J. R. Soc. Interface* *4*, 363–371, doi:10.1098/rsif.2006.0194.
253. Montarnal, D.; Cordier, P.; Soulié-Ziakovic, C.; Tournilhac, F.; Leibler, L. Synthesis of self-healing supramolecular rubbers from fatty acid derivatives, diethylene triamine, and urea. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* *46*, 7925–7936, doi:10.1002/pola.23094.
254. Cordier, P.; Tournilhac, F.; Soulié-Ziakovic, C.; Leibler, L. Self-healing and thermoreversible rubber from supramolecular assembly. *Nature* **2008**, *451*, 977–980, doi:10.1038/nature06669.
255. Hasirci, V.; Kenar, H. Novel surface patterning approaches for tissue engineering and their effect on cell behavior. *Nanomedicine* **2006**, *1*, 73–90, doi:10.2217/17435889.1.1.73.

256. Boudreau, N.; Bissell, M.J. Extracellular matrix signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *10*, 640–646, doi:10.1016/S0955-0674(98)80040-9.
257. Andersson, A.-S.; Bäckhed, F.; von Euler, A.; Richter-Dahlfors, A.; Sutherland, D.; Kasemo, B. Nanoscale features influence epithelial cell morphology and cytokine production. *Biomaterials* **2003**, *24*, 3427–3436, doi:10.1016/S0142-9612(03)00208-4.
258. Kasemo, B. Biological surface science. *Surf. Sci.* **2002**, *500*, 656–677, doi:10.1016/S0039-6028(01)01809-X.
259. Parsons, J.T.; Horwitz, A.R.; Schwartz, M.A. Cell adhesion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 633–643, doi:10.1038/nrm2957.
260. Kramer, I. *Signal Transduction*; 3rd ed.; Academic Press, 2015; ISBN 9780123948199.
261. Biggs, M.J.P.; Richards, R.G.; McFarlane, S.; Wilkinson, C.D.W.; Oreffo, R.O.C.; Dalby, M.J. Adhesion formation of primary human osteoblasts and the functional response of mesenchymal stem cells to 330 nm deep microgrooves. *J. R. Soc. Interface* *5*, 1231–1242, doi:10.1098/rsif.2008.0035.
262. Wilkinson, C.D.W.; Riehle, M.; Wood, M.; Gallagher, J.; Curtis, A.S.G. The use of materials patterned on a nano- and micro-metric scale in cellular engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2002**, *19*, 263–269, doi:10.1016/S0928-4931(01)00396-4.
263. Flemming, R.G.; Murphy, C.J.; Abrams, G.A.; Goodman, S.L.; Nealey, P.F. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials* **1999**, *20*, 573–588, doi:10.1016/S0142-9612(98)00209-9.
264. YIM, E.; REANO, R.; PANG, S.; YEE, A.; CHEN, C.; LEONG, K. Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5405–5413, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.01.058.
265. Dalby, M.J.; Gadegaard, N.; Tare, R.; Andar, A.; Riehle, M.O.; Herzyk, P.; Wilkinson, C.D.W.; Oreffo, R.O.C. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 997–1003, doi:10.1038/nmat2013.
266. Yim, E.K.F.; Pang, S.W.; Leong, K.W. Synthetic nanostructures inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into neuronal lineage. *Exp. Cell Res.* **2007**, *313*, 1820–1829, doi:10.1016/j.yexcr.2007.02.031.
267. Oh, S.; Brammer, K.S.; Li, Y.S.J.; Teng, D.; Engler, A.J.; Chien, S.; Jin, S. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 2130–2135, doi:10.1073/pnas.0813200106.
268. McMurray, R.J.; Gadegaard, N.; Tsimbouri, P.M.; Burgess, K. V; McNamara, L.E.; Tare, R.; Murawski, K.; Kingham, E.; Oreffo, R.O.C.; Dalby, M.J. Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. *Nat. Mater.* **2011**, *10*,

- 637–644, doi:10.1038/nmat3058.
269. Ventre, M.; Natale, C.F.; Rianna, C.; Netti, P.A. Topographic cell instructive patterns to control cell adhesion, polarization and migration. *J. R. Soc. Interface* **11**, doi:10.1098/rsif.2014.0687.
  270. Yim, E.K.F.; Darling, E.M.; Kulangara, K.; Guilak, F.; Leong, K.W. Nanotopography-induced changes in focal adhesions, cytoskeletal organization, and mechanical properties of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **2010**, *31*, 1299–1306, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.10.037.
  271. Bettinger, C.J.; Langer, R.; Borenstein, J.T. Engineering Substrate Topography at the Micro- and Nanoscale to Control Cell Function. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2009**, *48*, 5406–5415, doi:10.1002/anie.200805179.
  272. Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.; Schoen, F.J.; Lemons, J.E. *Biomaterials Science*; 2nd ed.; Elsevier, 2004; ISBN 9780080470368.
  273. Rockwood, D.N.; Preda, R.C.; Yücel, T.; Wang, X.; Lovett, M.L.; Kaplan, D.L. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 1612–1631, doi:10.1038/nprot.2011.379.
  274. Surface Roughness Measurement—Parameters Available online: <https://www.olympus-ims.com/>.
  275. Du, Y.; Guo, J.L.; Wang, J.; Mikos, A.G.; Zhang, S. Hierarchically designed bone scaffolds: From internal cues to external stimuli. *Biomaterials* **2019**, *218*, 119334, doi:https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119334.
  276. Teoh, S.-H.; Goh, B.-T.; Lim, J. Three-Dimensional Printed Polycaprolactone Scaffolds for Bone Regeneration Success and Future Perspective. *Tissue Eng. Part A* **2019**, *25*, 931–935, doi:10.1089/ten.tea.2019.0102.
  277. Radhakrishnan, S.; Nagarajan, S.; Belaid, H.; Farha, C.; Iatsunskyi, I.; Coy, E.; Soussan, L.; Huon, V.; Bares, J.; Belkacemi, K.; et al. Fabrication of 3D printed antimicrobial polycaprolactone scaffolds for tissue engineering applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *118*, 111525, doi:https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111525.
  278. Permyakova, E.S.; Kiryukhantsev-Korneev, P. V; Gudz, K.Y.; Konopatsky, A.S.; Polčák, J.; Zhitnyak, I.Y.; Gloushankova, N.A.; Shtansky, D. V; Manakhov, A.M. Comparison of Different Approaches to Surface Functionalization of Biodegradable Polycaprolactone Scaffolds. *Nanomaterials* **2019**, *9*, doi:10.3390/nano9121769.
  279. Fuchs, A.; Youssef, A.; Seher, A.; Hochleitner, G.; Dalton, P.D.; Hartmann, S.; Brands, R.C.; Müller-Richter, U.D.A.; Linz, C. Medical-grade polycaprolactone scaffolds made by melt electrospinning writing for oral bone regeneration – a pilot study in vitro. *BMC Oral Health* **2019**, *19*, 28, doi:10.1186/s12903-019-0717-5.
  280. AU - Wunner, F.M.; AU - Bas, O.; AU - Saidy, N.T.; AU - Dalton,

- P.D.; AU - Pardo, E.M.D.-J.; AU - Hutmacher, D.W. Melt Electrospinning Writing of Three-dimensional Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Scaffolds with Controllable Morphologies for Tissue Engineering Applications. *JoVE* **2017**, e56289, doi:doi:10.3791/56289.
281. Zaiss, S.; Brown, T.; Reichert, J.; Berner, A. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Scaffolds Fabricated by Melt Electrospinning for Bone Tissue Engineering. *Materials (Basel)*. **2016**, *9*, 232, doi:10.3390/ma9040232.
282. Zhang, X.; Wang, J.; Liu, T. 3D printing of polycaprolactone-based composites with diversely tunable mechanical gradients via multi-material fused deposition modeling. *Compos. Commun.* **2021**, *23*, 100600, doi:https://doi.org/10.1016/j.coco.2020.100600.
283. Prasad, A.; Kandasubramanian, B. Fused deposition processing polycaprolactone of composites for biomedical applications. *Polym. Technol. Mater.* **2019**, *58*, 1365–1398, doi:10.1080/25740881.2018.1563117.
284. Khandan, A.; Esmaeili, S. Fabrication of polycaprolactone and polylactic acid shapeless scaffolds via fused deposition modelling technology. *J. Adv. Mater. Process.* **2019**, *7*, 16–29.
285. Park, H.; Kim, I.G.; Wu, Y.; Cho, H.; Shin, J.-W.; Park, S.A.; Chung, E.-J. Experimental investigation of esophageal reconstruction with electrospun polyurethane nanofiber and 3D printing polycaprolactone scaffolds using a rat model. *Head & Neck* **2021**, *43*, 833–848, doi:https://doi.org/10.1002/hed.26540.
286. Vyas, C.; Ates, G.; Aslan, E.; Hart, J.; Huang, B.; Bartolo, P. Three-Dimensional Printing and Electrospinning Dual-Scale Polycaprolactone Scaffolds with Low-Density and Oriented Fibers to Promote Cell Alignment. *3D Print. Addit. Manuf.* **2020**, *7*, 105–113, doi:10.1089/3dp.2019.0091.
287. Wrzecionko, E. Příprava a charakterizace hierarchicky organizovaných polymerních vrstev a porózních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2021.
288. RAYLEIGH Breath Figures. *Nature* **1912**, *90*, 436–438, doi:10.1038/090436c0.
289. Rodriguez Hernandez, J.; Bormashenko, E. *Breath Figures: Mechanisms of Multi-scale Patterning and Strategies for Fabrication and Applications of Microstructured Functional Porous Surfaces*; 2020; ISBN 978-3-030-51135-7.
290. Martins, A.; Reis, R.L.; Neves, N.M. Electrospinning: processing technique for tissue engineering scaffolding. *Int. Mater. Rev.* **2008**, *53*, 257–274, doi:10.1179/174328008X353547.
291. Fang, J.; Niu, H.; Lin, T.; Wang, X. Applications of electrospun nanofibers. *Chinese Sci. Bull.* **2008**, *53*, 2265–2286, doi:10.1007/s11434-008-0319-0.

292. Kawai, H. The Piezoelectricity of Poly (vinylidene Fluoride). *Jpn. J. Appl. Phys.* **1969**, *8*, 975–976, doi:10.1143/jjap.8.975.
293. Pärssinen, J.; Hammarén, H.; Rahikainen, R.; Sencadas, V.; Ribeiro, C.; Vanhatupa, S.; Miettinen, S.; Lanceros-Méndez, S.; Hytönen, V.P. Enhancement of adhesion and promotion of osteogenic differentiation of human adipose stem cells by poled electroactive poly(vinylidene fluoride). *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2015**, *103*, 919–928, doi:https://doi.org/10.1002/jbm.a.35234.
294. Foster, F.S.; Harasiewicz, K.A.; Sherar, M.D. A history of medical and biological imaging with polyvinylidene fluoride (PVDF) transducers. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2000**, *47*, 1363–1371, doi:10.1109/58.883525.
295. Harris, G.R.; Preston, R.C.; DeReggi, A.S. The impact of piezoelectric PVDF on medical ultrasound exposure measurements, standards, and regulations. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2000**, *47*, 1321–1335, doi:10.1109/58.883521.
296. Buckley, G.S.; Roland, C.M.; Casalini, R.; Petchsuk, A.; Chung, T.C. Electrostrictive Properties of Poly(vinylidene fluoride–trifluoroethylene–chlorotrifluoroethylene). *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 2590–2593, doi:10.1021/cm0116471.
297. Costa, R.; Ribeiro, C.; Lopes, A.C.; Martins, P.; Sencadas, V.; Soares, R.; Lanceros-Mendez, S. Osteoblast, fibroblast and in vivo biological response to poly(vinylidene fluoride) based composite materials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, *24*, 395–403, doi:10.1007/s10856-012-4808-y.
298. Martins, P.M.; Ribeiro, S.; Ribeiro, C.; Sencadas, V.; Gomes, A.C.; Gama, F.M.; Lanceros-Méndez, S. Effect of poling state and morphology of piezoelectric poly(vinylidene fluoride) membranes for skeletal muscle tissue engineering. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 17938–17944, doi:10.1039/C3RA43499K.
299. Xia, F.; Razavi, B.; Xu, H.; Cheng, Z.-Y.; Zhang, Q.M. Dependence of threshold thickness of crystallization and film morphology on film processing conditions in poly(vinylidene fluoride–trifluoroethylene) copolymer thin films. *J. Appl. Phys.* **2002**, *92*, 3111–3115, doi:10.1063/1.1503395.
300. Kadivar, M.; Tormey, D.; Mcgranaghan, G. A review on turbulent flow over rough surfaces: Fundamentals and theories. *Int. J. Thermofluids* **2021**, *10*, 100077, doi:10.1016/j.ijft.2021.100077.
301. Incropera, F.P. *Fundamentals of Heat and Mass Transfer*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2006; ISBN 0470088400.
302. Pandiyaraj, K.N.; Ferraria, A.M.; do Rego, A.M.B.; Deshmukh, R.R.; Su, P.-G.; Halleluyah, J.M.; Halim, A.S. Low-pressure plasma enhanced immobilization of chitosan on low-density polyethylene for bio-medical applications. *Appl. Surf. Sci.* **2015**, *328*, 1–12,

- doi:<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.12.030>.
303. Caldwell, R.A.; Woodell, J.E.; Ho, S.P.; Shalaby, S.W.; Boland, T.; Langan, E.M.; Laberge, M. In vitro evaluation of phosphonylated low-density polyethylene for vascular applications. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *62*, 514–524, doi:<https://doi.org/10.1002/jbm.10249>.
  304. Ozaltin, K.; Lehocký, M.; Humpolíček, P.; Pelková, J.; Sába, P. A New Route of Fucoidan Immobilization on Low Density Polyethylene and Its Blood Compatibility and Anticoagulation Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, doi:10.3390/ijms17060908.
  305. Minařík, A.; Smolka, P.; Minařík, M.; Mráček, A.; Rajnohová, E.; Minaříková, M.; Grundělová, L.; Foglarová, M.; Velebný, V. A special instrument for the defined modification of polymer properties in solutions and polymer layers. *Meas. J. Int. Meas. Confed.* **2017**, *97*, 218–225, doi:10.1016/j.measurement.2016.11.006.
  306. F.R.S., L.R.O.M. LIX. On convection currents in a horizontal layer of fluid, when the higher temperature is on the under side. *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **1916**, *32*, 529–546, doi:10.1080/14786441608635602.
  307. Colinet, P.; Legros, J.; Velarde, M. Nonlinear Dynamics of Surface-Tension-Driven Instabilities. **2005**, 505–512, doi:10.1002/3527603115.index.
  308. Akiyama, M.; Hwang, G.J.; Cheng, K.C. Experiments on the Onset of Longitudinal Vortices in Laminar Forced Convection Between Horizontal Plates. *J. Heat Transfer* **1971**, *93*, 335–341, doi:10.1115/1.3449828.
  309. Pellew, A.; Southwell, R.V. On maintained convective motion in a fluid heated from below. *Proc. R. Soc. London. Ser. A. Math. Phys. Sci.* **1940**, *176*, 312–343.
  310. Volmar, U.E.; Müller, H.W. Quasiperiodic patterns in Rayleigh-Bénard convection under gravity modulation. *Phys. Rev. E* **1997**, *56*, 5423–5430, doi:10.1103/PhysRevE.56.5423.
  311. Bénard, Henri Les tourbillons cellulaires dans une nappe liquide. - Méthodes optiques d'observation et d'enregistrement. *J. Phys. Theor. Appl.* **1901**, *10*, 254–266, doi:10.1051/jphystap:0190100100025400.
  312. Schlichting, H.; Gersten, K. Fundamentals of Boundary-Layer Theory. *Boundary-Layer Theory* **2017**, 29–49, doi:10.1007/978-3-662-52919-5\_2.
  313. Benedict, R.P. *Fundamentals of Pipe Flow*; A Wiley - Interscience publication; Wiley, 1980; ISBN 9780471033752.
  314. Cebeci, T.; Cousteix, J. *Modeling and Computation of Boundary-Layer Flows: Laminar, Turbulent and Transitional Boundary Layers in Incompressible and Compressible Flows*; Horizons Pub., 2005; ISBN 9783540276241.
  315. Oleinik, O.A.; Samokhin, V.N. *Mathematical Models in Boundary Layer Theory.*; 1999.



316. Denberg, M.; Arvin, E.; Hassager, O. Modelling of the release of organic compounds from polyethylene pipes to water. *J. Water Supply Res. Technol.* **2007**, *56*, 435–443, doi:10.2166/aqua.2007.020.
317. Wang, Q.; Wan, Z.-H.; Yan, R.; Sun, D.-J. Multiple states and heat transfer in two-dimensional tilted convection with large aspect ratios. *Phys. Rev. Fluids* **2018**, *3*, 113503, doi:10.1103/PhysRevFluids.3.113503.
318. Sashina, E.S.; Bocek, A.M.; Novoselov, N.P.; Kirichenko, D.A. Structure and solubility of natural silk fibroin. *Russ. J. Appl. Chem.* **2006**, *79*, 869–876, doi:10.1134/S1070427206060012.
319. Kocourková, K. Příprava strukturovaných biopolymerních povrchů a studium jejich interakce s buňkami, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně: Zlín, 2019.
320. Wrzecionko, E.; Minařík, A.; Smolka, P.; Minařík, M.; Humpolíček, P.; Rejmontová, P.; Mráček, A.; Minaříková, M.; Grundělová, L. Variations of Polymer Porous Surface Structures via the Time-Sequenced Dosing of Mixed Solvents. *Appl. Mater. Interfaces* **2017**, 6472–6481, doi:10.1021/acsami.6b15774.
321. Leal-Egana, A.; Scheibel, T. Interactions of cells with silk surfaces. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 14330–14336, doi:10.1039/C2JM31174G.
322. Lerman, M.; Lembong, J.; Muramoto, S.; Gillen, G.; Fisher, J. The Evolution of Polystyrene as a Cell Culture Material. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2018**, *24*, doi:10.1089/ten.TEB.2018.0056.
323. Tasnim, F.; Singh, N.H.; Tan, E.K.F.; Xing, J.; Li, H.; Hissette, S.; Manesh, S.; Fulwood, J.; Gupta, K.; Ng, C.W.; et al. Tethered primary hepatocyte spheroids on polystyrene multi-well plates for high-throughput drug safety testing. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 4768, doi:10.1038/s41598-020-61699-4.
324. Pouran, H.M.; Banwart, S.A.; Romero-Gonzalez, M. Coating a polystyrene well-plate surface with synthetic hematite, goethite and aluminium hydroxide for cell mineral adhesion studies in a controlled environment. *Appl. Geochemistry* **2014**, *42*, 60–68, doi:https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.01.005.
325. DeRosa, M.E.; Hong, Y.; Faris, R.A.; Rao, H. Microtextured polystyrene surfaces for three-dimensional cell culture made by a simple solvent treatment method. *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *131*, doi:https://doi.org/10.1002/app.40181.
326. Kimmerle, K.; Strathmann, H. Analysis of the structure-determining process of phase inversion membranes. *Desalination* **1990**, *79*, 283–302, doi:https://doi.org/10.1016/0011-9164(90)85012-Y.
327. Sukitpaneenit, P.; Chung, T.-S. Molecular elucidation of morphology and mechanical properties of PVDF hollow fiber membranes from aspects of phase inversion, crystallization and rheology. *J. Memb. Sci.* **2009**, *340*, 192–205, doi:https://doi.org/10.1016/j.memsci.2009.05.029.

328. Kim, J.-H.; Lee, K.-H. Effect of PEG additive on membrane formation by phase inversion. *J. Memb. Sci.* **1998**, *138*, 153–163, doi:[https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(97\)00224-X](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(97)00224-X).
329. Nashchekina, Y.; Samusenko, I.; Zorin, I.; Kukhareva, L.; Bilibin, A.; Blinova, M. Poly(D,L-lactide)/{PEG} blend films for keratinocyte cultivation and skin reconstruction. *Biomed. Mater.* **2019**, *14*, 65005, doi:10.1088/1748-605x/ab3aa2.
330. Jhala, D.; Vasita, R. A Review on Extracellular Matrix Mimicking Strategies for an Artificial Stem Cell Niche. *Polym. Rev.* **2015**, *55*, 561–595, doi:10.1080/15583724.2015.1040552.
331. Luo, W.; Jones, S.R.; Yousaf, M.N. Geometric control of stem cell differentiation rate on surfaces. *Langmuir* **2008**, *24*, 12129–12133, doi:10.1021/la802836g.
332. Watt, F.M.; Jordan, P.W.; O’Neill, C.H. Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 5576–5580, doi:10.1073/pnas.85.15.5576.
333. Kadlečková, M.; Skopalová, K.; Ptošková, B.; Wrzecionko, E.; Dad’ová, E.; Kocourková, K.; Mráček, A.; Musilová, L.; Smolka, P.; Humpolíček, P.; et al. Hierarchically Structured Surfaces Prepared by Phase Separation: Tissue Mimicking Culture Substrate. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23052541.
334. Stadtfeld, M.; Brennand, K.; Hochedlinger, K. Reprogramming of Pancreatic  $\beta$  Cells into Induced Pluripotent Stem Cells. *Curr. Biol.* **2008**, *18*, 890–894, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.05.010>.
335. Carson, D.; Hnilova, M.; Yang, X.; Nemeth, C.L.; Tsui, J.H.; Smith, A.S.T.; Jiao, A.; Regnier, M.; Murry, C.E.; Tamerler, C.; et al. Nanotopography-Induced Structural Anisotropy and Sarcomere Development in Human Cardiomyocytes Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 21923–21932, doi:10.1021/acsami.5b11671.
336. Xu, C.; Wang, L.; Yu, Y.; Yin, F.; Zhang, X.; Jiang, L.; Qin, J. Bioinspired onion epithelium-like structure promotes the maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Biomater. Sci.* **2017**, *5*, 1810–1819, doi:10.1039/c7bm00132k.
337. Skopalová, K.; Radaszkiewicz, K.A.; Kadlečková, M.; Pacherník, J.; Minařík, A.; Capáková, Z.; Kašpárková, V.; Mráček, A.; Dad’ová, E.; Humpolíček, P. Hierarchically Structured Polystyrene-Based Surfaces Amplifying Fluorescence Signals: Cytocompatibility with Human Induced Pluripotent Stem Cell. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms222111943.
338. Yoon, B.-H.; Choi, W.-Y.; Kim, H.-E.; Kim, J.-H.; Koh, Y.-H. Aligned porous alumina ceramics with high compressive strengths for bone tissue engineering. *Scr. Mater.* **2008**, *58*, 537–540,

- doi:<https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2007.11.006>.
339. Sarhadi, F.; Shafiee Afarani, M.; Mohebbi-Kalhari, D.; Shayesteh, M. Fabrication of alumina porous scaffolds with aligned oriented pores for bone tissue engineering applications. *Appl. Phys. A* **2016**, *122*, 390, doi:10.1007/s00339-016-9952-7.
  340. Soh, E.; Kolos, E.; Ruys, A.J. Foamed high porosity alumina for use as a bone tissue scaffold. *Ceram. Int.* **2015**, *41*, 1031–1047, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.09.026>.
  341. Su, B.; He, X.; Dhara, S.; Mansell, J.P. Porous and Bioactive Alumina Ceramics for Bone Grafts and Tissue Engineering Scaffolds. In Proceedings of the Bioceramics 19; Trans Tech Publications Ltd, 2007; Vol. 330, pp. 975–978.
  342. Davoodi, E.; Zhianmanesh, M.; Montazerian, H.; Milani, A.S.; Hoorfar, M. Nano-porous anodic alumina: fundamentals and applications in tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2020**, *31*, 60, doi:10.1007/s10856-020-06398-2.
  343. Choi, M.K.; Yoon, H.; Lee, K.; Shin, K. Simple Fabrication of Asymmetric High-Aspect-Ratio Polymer Nanopillars by Reusable AAO Templates. *Langmuir* **2011**, *27*, 2132–2137, doi:10.1021/la104839a.
  344. Brock, L.; Sheng, J. Robust Fabrication of Polymeric Nanowire with Anodic Aluminum Oxide Templates. *Micromachines* **2020**, *11*, doi:10.3390/mi11010046.
  345. Yen, M.-L.; Hsiao, H.-M.; Huang, C.-F.; Lin, Y.; Shen, Y.-K.; Tsai, Y.-L.; Chang, C.-W.; Yen, H.-J.; Lu, Y.-J.; Kuo, Y.-W. Aluminum Templates of Different Sizes with Micro-, Nano- and Micro/Nano-Structures for Cell Culture. *Coatings* **2017**, *7*, 179, doi:10.3390/coatings7110179.
  346. Feng, L.; Zhang, H.; Mao, P.; Wang, Y.; Ge, Y. Superhydrophobic alumina surface based on stearic acid modification. *Appl. Surf. Sci. - APPL SURF SCI* **2011**, *257*, 3959–3963, doi:10.1016/j.apsusc.2010.11.143.
  347. Richard, E.; Aruna, S.T.; Basu, B.J. Superhydrophobic surfaces fabricated by surface modification of alumina particles. *Appl. Surf. Sci.* **2012**, *258*, 10199–10204, doi:<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.07.009>.
  348. Wang, Q.; Zhang, B.; Qu, M.; Zhang, J. Fabrication of superhydrophobic surfaces on engineering material surfaces with stearic acid. *Appl. Surf. Sci.* **2008**, *254*, 2009–2012, doi:10.1016/j.apsusc.2007.08.039.
  349. He, M.; Zhou, X.; Zeng, X.; Cui, D.; Zhang, Q.; Chen, J.; Li, H.; Wang, J.; Cao, Z.; Song, Y.; et al. Hierarchically structured porous aluminum surfaces for high-efficient removal of condensed water. *Soft Matter* **2012**, *8*, 6680–6683, doi:10.1039/C2SM25828E.
  350. Sarkar, D.K.; Farzaneh, M.; Paynter, R.W. Superhydrophobic properties of ultrathin rf-sputtered Teflon films coated etched aluminum surfaces. *Mater. Lett.* **2008**, *62*, 1226–1229, doi:<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.08.051>.

351. Wu, R.; Chao, G.; Jiang, H.; Hu, Y.; Pan, A. The superhydrophobic aluminum surface prepared by different methods. *Mater. Lett.* **2015**, *142*, 176–179, doi:<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.12.007>.
352. Borsellino, C.; Di Bella, G.; Ruisi, V.F. Adhesive joining of aluminium AA6082: The effects of resin and surface treatment. *Int. J. Adhes. Adhes.* **2009**, *29*, 36–44, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2008.01.002>.
353. Prolongo, S.G.; Ureña, A. Effect of surface pre-treatment on the adhesive strength of epoxy–aluminium joints. *Int. J. Adhes. Adhes.* **2009**, *29*, 23–31, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2008.01.001>.
354. Boutar, Y.; Naimi, S.; Mezlini, S.; Ali, M. Effect of surface treatment on the shear strength of aluminum adhesive single-lap joints for automotive applications. *Int. J. Adhes. Adhes.* **2015**, *67*, doi:[10.1016/j.ijadhadh.2015.12.023](https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2015.12.023).
355. Soboyejo, W.O.; Nemetski, B.; Allameh, S.; Marcantonio, N.; Mercer, C.; Ricci, J. Interactions between MC3T3-E1 cells and textured Ti6Al4V surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *62*, 56–72, doi:<https://doi.org/10.1002/jbm.10221>.
356. Mwenifumbo, S.; Li, M.; Chen, J.; Beye, A.; Soboyejo, W. Cell/surface interactions on laser micro-textured titanium-coated silicon surfaces. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 9–23, doi:[10.1007/s10856-006-0658-9](https://doi.org/10.1007/s10856-006-0658-9).
357. Kadlečková, M.; Minařík, A.; Smolka, P.; Mráček, A.; Wrzecionko, E.; Novák, L.; Musilová, L.; Gajdošík, R. Preparation of textured surfaces on aluminum-alloy substrates. *Materials (Basel)*. **2018**, *12*, doi:[10.3390/ma12010109](https://doi.org/10.3390/ma12010109).
358. Novák, L.; Fojtl, L.; Kadlečková, M.; Mañas, L.; Smolková, I.; Musilová, L.; Minařík, A.; Mráček, A.; Sedláček, T.; Smolka, P. Surface Modification of Metallic Inserts for Enhancing Adhesion at the Metal–Polymer Interface. *Polymers (Basel)*. **2021**, *13*, doi:[10.3390/polym13224015](https://doi.org/10.3390/polym13224015).
359. Matta, A.; Sedlacek, T.; Kadleckova, M.; Lengalova, A. The Effect of Surface Substrate Treatments on the Bonding Strength of Aluminium Inserts with Glass-Reinforced Poly(phenylene) Sulphide. *Materials (Basel)*. **2022**, *15*, doi:[10.3390/ma15051929](https://doi.org/10.3390/ma15051929).

## Seznam obrázků

<i>Obr. 1 – schéma optimálního vývoje mechanických vlastností scaffoldu v čase. [98]</i>	13
<i>Obr. 2 – SEM snímky scaffoldů vyrobených různými technologiemi. a) PLGA scaffold připravený částicovým loužením, b) hedvábný scaffold vyrobený loužením v soli a napěňováním, c) PLA scaffold vyroben za podmínek superkritického CO<sub>2</sub>, tlaku 240 barů a teplotě 35 °C, d) 15% PLA pěna připravena termicky indukovanou fázovou separací, e) PGA scaffold připraven spojováním vláken, f) scaffold připravený vložením spongiózní matrice, g) zpěňovaný scaffold, h) 7,3% PLA scaffold vyrobený elektrostatickým zvlákňováním, i) scaffold připravený stereolitografií, j) CaSiO<sub>3</sub> scaffold vyroben 3D tiskem, k) scaffold připravený fused deposition modelling (FDM) technologií, l) scaffold vyrobený metodou Bioplotter. [119]</i>	16
<i>Obr. 3 – schéma procesu 3-D tisku. [141]</i>	18
<i>Obr. 4 – schéma procesu dvou typů stereolitografického tisku. [141]</i>	19
<i>Obr. 5 – příklady tekutin bez a s působením elektrického napětí. A) znázorňuje tok vody při různých hodnotách aplikovaného napětí. B) zobrazuje tok vody při překročení hraničního napětí, kdy se stává stabilním. [152]</i>	20
<i>Obr. 6 – 3D jet writing. A) Schéma aparatury pro 3D jet writing s patrnou elektrodou, zajišťující stabilitu toku tekutiny. B,C) Příklady tištěné struktury pomocí technologie 3D jet writingu. D,E,F) Tištěné geometrie typu teselovaných polí do výšky 400 μm. G) Svazky tištěných navrstvených vláken s viditelnou přesností tisku. H,I) Ukázka průměru vláken od 50μm (H) po 6μm (I). [159]</i>	21
<i>Obr. 7 - příklady textur povrchu scaffoldu. A) hřebenový patern, B) výstupky, C) prohlubně. [272]</i>	29
<i>Obr. 8 – strukturní vzorec polystyrenu</i>	31
<i>Obr. 9 – strukturní vzorec polykaprolaktonu</i>	32
<i>Obr. 10 – strukturní vzorec PVDF-TrFE-CTFE</i>	32
<i>Obr. 11 - strukturní vzorec fibroinu</i>	34
<i>Obr. 12 – znázornění parametrů Ra (A) a Rz (B) na měřené vzdálenosti profilu daného vzorku. [275]</i>	35
<i>Obr. 13 – porovnání návrhu modelu získaného ze softwaru AutoCAD Inventor a reálných výtisků připravených pomocí metod 3D tisku A) FDM, B) SLA, C) DLP. Obrázky A), B) a C) ze SEM</i>	38
<i>Obr. 14 – SEM snímky povrchů výtisků (horní řada) získaných pomocí metody SLA 3D tisku a ukázka jejich orientace v programu PreForm (spodní řada). A) horizontální tisk, B) svislý tisk, C) tisk pod úhlem</i>	39
<i>Obr. 15 – rekonstrukce vytištěného scaffoldu pomocí SLA tiskárny Form2 (vlevo). Řez středem vytištěné prostorové mřížky (vpravo). Data z rentgenové tomografie</i>	40

<i>Obr. 16 – schéma extruzního tisku termoplastického materiálu či polymerních roztoků. ....</i>	<i>41</i>
<i>Obr. 17 – snímky reálných 3D tištěných PCL vlákných scaffoldů pořízené pomocí digitálního mikroskopu. ....</i>	<i>43</i>
<i>Obr. 18 – detailní pohled na povrch vlákných PCL scaffoldů uvedených na Obr. 17. Povrchy zobrazeny pomocí SEM. ....</i>	<i>44</i>
<i>Obr. 19 – detail povrchu vláken PCL tvořících scaffold vytištěných ze směsi polymeru s dobrým či dobrým i špatným rozpouštědlem tištěných při různých teplotách. Obrázky ze SEM. ....</i>	<i>45</i>
<i>Obr. 20 – detail povrchu vlákna tištěného PCL scaffoldu bez a s přidavkem vody do tiskové směsi. Obrázky ze SEM. ....</i>	<i>46</i>
<i>Obr. 21 – hierarchicky strukturovaná mikrovlákná připravená pomocí electrospinningu ze směsi obsahující PCL s CF, toluenem a DMSO. Obrázky ze SEM. ....</i>	<i>47</i>
<i>Obr. 22 – detail strukturovaného PCL vlákna připraveného pomocí electrospinningu ze směsi PCL + CF + DMSO. Koncentrace polymeru v roztoku 12,5 hm. %. Obrázky ze SEM. ....</i>	<i>48</i>
<i>Obr. 23 – detail strukturovaného PCL vlákna připraveného pomocí electrospinningu ze směsi PCL+toluen+DMSO. Koncentrace polymeru v roztoku 12,5 hm. %. Obrázky ze SEM. ....</i>	<i>48</i>
<i>Obr. 24 – snímek reálně vytištěného scaffoldu ze směsi PiezoRT:DMSO (1:1). Vlevo mřížka snímaná pod úhlem, vpravo mřížka z vrchu. Obrázky z optického mikroskopu. ....</i>	<i>49</i>
<i>Obr. 25 – porovnání působení dobrého rozpouštědla DMSO po dobu 5 minut na povrch PCL strun tištěných při různých teplotách. Obrázky ze SEM. ....</i>	<i>50</i>
<i>Obr. 26 – porovnání vlivu rozpouštědel na texturu vytisknuté struny. A) struna bez působení rozpouštědla, B) struna po působení rozpouštědla DMSO po dobu 5 minut, C) povrch struny po vystavení účinkům acetonu po dobu 15 s, D) struna po aplikaci rozpouštědla triacetinu po dobu 5 minut. Snímky ze SEM. ....</i>	<i>51</i>
<i>Obr. 27 - vliv hmotnostního podílu polymeru PiezoRT v DMSO na změnu povrchového zvrásnění tištěných vláken. Nahoře snímky ze SEM, dole z AFM. ....</i>	<i>52</i>
<i>Obr. 28 – porovnání IR spekter čistého rozpouštědla (DMSO), polymeru (PiezoRT) a tištěných vláken (PiezoRT:DMSO) před a po vymývání. ....</i>	<i>53</i>
<i>Obr. 29 – snímky strukturovaného povrchu PiezoRT připraveného z roztoku s acetonem. Obrázky pořízeny pomocí SEM. ....</i>	<i>54</i>
<i>Obr. 30 - vliv koncentrace polymeru v rozpouštědle na vlákna vytvářená pomocí electrospinningu. Materiálem pro electrospinning byl roztok polymeru PiezoRT v DMSO. Obrázky ze SEM. ....</i>	<i>55</i>
<i>Obr. 31 – schéma elektrickým polem asistovaného 3D tisku (EPA 3D). ....</i>	<i>56</i>
<i>Obr. 32 – snímky mřížek tištěných pomocí EPA 3D tisku. ....</i>	<i>56</i>
<i>Obr. 33 – charakteristika PiezoRT pomocí piezoresponsivní silové mikroskopie. ....</i>	<i>57</i>

<i>Obr. 34 – model složeného bioreaktoru první generace vytvořený v softwaru Autodesk Inventor A) pohled na celou komoru, B) řez středem bioreaktoru, C) sestavený reaktor vyrobený pomocí 3D tisku.</i>	59
<i>Obr. 35 – příklady insertů vkládaných do bioreaktoru vytvořené v programu AutoCAD Inventor.</i>	60
<i>Obr. 36 – modelace insertu s rozdílně strukturovanými povrchy na bázi polystyrenu.</i>	61
<i>Obr. 37 – A) 3D model bioreaktoru druhé generace, B) pohled shora a z boku, C) vytištěný a sestavený reaktor.</i>	62
<i>Obr. 38 – vlevo – schématické znázornění experimentů: A) míchání LDPE kousků ve vodě v Petriho misce; B) míchání vody v LDPE nádobě; C) voda v LDPE nádobě bez míchání; D) voda v PE nádobě s teplotním spádem. <math>T_H</math> – teplota topné plochy; <math>T_C</math> – teplota chladicí plochy; <math>T_W</math> – střední teplota vody. Žluté částice představují povrchově aktivní nečistoty v polymerních nádobách ve formě aditiv nebo kontaminantů. Vpravo – povrchové napětí vodných extraktů. Označení A-D odpovídá schématům experimentálních postupů vlevo. Označení 1 odpovídá extraktům získaným z LDPE fólie s farmaceutickým certifikátem. Označení 2 odpovídá extraktům získaným z fólie z recyklovaného PE.</i>	64
<i>Obr. 39 – spektra vodných extraktů z farmaceutické a recyklované LDPE fólie vystavených teplotnímu gradientu.</i>	65
<i>Obr. 40 - Rayleigh-Bénardova konvekce v kapalině uzavřené mezi dvěma deskami s teplotním gradientem. [308]</i>	66
<i>Obr. 41 - schématické znázornění a srovnání laminárního a turbulentního proudění (vlevo) vs. konvektivního proudění (vpravo). Graf nahoře zobrazuje lokální součinitel prostupu tepla (<math>h(x)</math>) pro proudění přes plochou desku. Písmena A,B,C a D odpovídají jednotlivým experimentálním postupům z Obr. 38.</i>	68
<i>Obr. 42 – schéma možných konformací fibroinu a FTIR spektra pro stavy SILK I, SILK II a kombinaci SILK I + SILK II.</i>	70
<i>Obr. 43 – SEM snímky lomové plochy vysušeného fibroinového filmu na Petriho misce.</i>	71
<i>Obr. 44 – schéma přípravy fibroinových filmů s rozdílnou konformací a postup přípravy strukturovaných fibroinových vrstev.</i>	72
<i>Obr. 45 – schéma procesu fázové separace směsi dobrého a špatného rozpouštědla za rotace.</i>	73
<i>Obr. 46 – příprava fibroinových filmů s různou povrchovou texturou. A) příprava a výsledný povrch fibroinového filmu ve stavu SILK I bez modifikace, B) příprava hierarchicky texturovaného povrchu pomocí fázové separace na filmu ve stavu SILK I+ SILK II, C) příprava makro porézního povrchu s hladkým rozhraním vytvořený fázovou separací na filmu ve stavu SILK II. Obrázky z AMF a optického profilometru.</i>	73

<i>Obr. 47 – porovnání proliferace osteoblastů (MC3T3-E1) na A) mikro- a B) makro- strukturovaném fibroinovém povrchu. Nahoře obrázky z optického profilometru. Dole obrázky z optické mikroskopie. Testy buněčné kompatibility byly provedeny na Univerzitě v Bayreuthu v rámci zahraniční stáže. ....</i>	<i>74</i>
<i>Obr. 48 – strukturované PS povrchy připravené fázovou separací/inverzí. ....</i>	<i>75</i>
<i>Obr. 49 – schéma přípravy hierarchicky strukturovaných polystyrenových povrchů pomocí jedno či dvou krokové fázové separace. ....</i>	<i>76</i>
<i>Obr. 50 - porézní PS vrstva připravená pomocí více krokové fázové separace (inverze) ze směsi polystyrenu, dobrého a špatného rozpouštědla. ....</i>	<i>77</i>
<i>Obr. 51 – snímek lomové plochy polystyrenové porézní vrstvy a přehled tloušťky vrstev při různém počtu deponovaných dávek. ....</i>	<i>77</i>
<i>Obr. 52 – 3D rekonstrukce povrchu a profilový řez středem zobrazené plochy mikroporézního PS. ....</i>	<i>78</i>
<i>Obr. 53 – analýza distribuce prohlubní/pórů strukturovaných PS povrchů uvedených na Obr. 48. ....</i>	<i>78</i>
<i>Obr. 54 – snímky různých buněčných linií pořízených konfokálním mikroskopem. Sloupec I – myší fibroblasty (NIH/3T3), sloupec II – adenokarcinomické epiteliální buňky (A549), sloupec III – keratinocyty (HEK). Modře značená jádra buněk, červeně buněčný cytoskelet. ....</i>	<i>80</i>
<i>Obr. 55 – snímky embryonálních kmenových buněk (ESC) na PS povrchích pořízené konfokálním mikroskopem. Vpravo – profilové řezy PS povrchů. ....</i>	<i>81</i>
<i>Obr. 56 – kvantifikace proliferace různých buněčných linií pomocí MTT testu. NIH/3T3 – fibroblasty, A549 – buňky lidského karcinomu, HEK – keratinocyty a ESC – embryonální kmenové buňky. K určení statistických rozdílů mezi vzorky byla použita ANOVA s post hoc Tukeyho testem vícenásobného srovnání; ** <math>p &lt; 0,01</math>, *** <math>p &lt; 0,001</math>. Testy buněčné kompatibility byly provedeny v laboratořích buněčné biologie na CPS UTB ve Zlíně. ....</i>	<i>83</i>
<i>Obr. 57 - hiPSC kultivované na hladkém, „Mezo/Mikro“ a „Makro/Mikro“ substrátech po čtyřech dnech, kontrastně obarvené pomocí Phalloidin-FITC. Graf zobrazuje relativní viabilitu pro všechny povrchy. Indexy * vyjadřují významné odchylky (<math>p \leq 0,05</math>). Testy provedeny na přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. ....</i>	<i>84</i>
<i>Obr. 58 – vpravo – graf zobrazující množství RNA. Vlevo – graf vyjadřující expresi genu MYH6 na jednotlivých PS povrchích. Indexy * a # vyjadřují významné odchylky (<math>p \leq 0,05</math>). Testy provedeny na přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. ....</i>	<i>85</i>
<i>Obr. 59 - záznamy intracelulárních vln iontů <math>Ca^{2+}</math> v tepu kardiomyocytů stanovené sondou Fura4. Záznam růstu hiPSC-CM na A) hladkém a B) Makro/Mikro PS substrátu. Testy provedeny na přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. ....</i>	<i>86</i>



<i>Obr. 60 – snímky leptaných povrchů hliníků získané pomocí SEM. Značení vzorků odpovídá informacím uvedeným v Tab. 7.....</i>	<i>88</i>
<i>Obr. 61 – snímky povrchu hliníku v různých stupních úpravy chemickým leptáním. ....</i>	<i>89</i>
<i>Obr. 62 – schéma přípravy superhydrofobního Al povrchu pomocí leptání a kyseliny stearové.....</i>	<i>90</i>
<i>Obr. 63 – zobrazení hliníkového povrchu před (a) a po (b,c) deponování vrstvy kyseliny stearové. Obrázky pořízeny pomocí AFM. ....</i>	<i>91</i>
<i>Obr. 64 – vliv povrchové struktury hliníku na pevnost lepeného spoje (vlevo) a schéma testovaného systému (vpravo). ....</i>	<i>91</i>

## **Seznam tabulek**

<i>Tab. 1 – přehled požadovaných vlastností scaffoldu. [26] .....</i>	<i>12</i>
<i>Tab. 2 – složení pryskyřice pro SLA tisk s označením „Clear“.....</i>	<i>33</i>
<i>Tab. 3 – složení pryskyřice pro SLA tisk s označením „Dental LT Clear“.....</i>	<i>33</i>
<i>Tab. 4 – shrnutí připravených tiskových směsí a parametrů 3D extruzního tisku. Množství jednotlivých složek uveden v hmotnostním podílu. ....</i>	<i>43</i>
<i>Tab. 5 – Výsledky prvkové analýzy vodných extraktů z farmaceutické a recyklované LDPE fólie vystavených teplotnímu gradientu.....</i>	<i>65</i>
<i>Tab. 6 – porovnání kontaktních úhlů smáčení PS povrchů vodou. ....</i>	<i>79</i>
<i>Tab. 7 – složení leptacích směsí a hodnoty drsnosti výsledných povrchů, uvedených na Obr. 60.....</i>	<i>87</i>

## Seznam použitých zkratk

TE – tkáňové inženýrství

ECM – extracelulární matrice

RP – rapid prototyping

MEW – melt electrowritingu

EPA – elektrickým polem asistovaný

SLA – stereolitografie

PCL – polykaprolakton

PLA – kyselina polyléččná

PGA – kyselina glykolová

PLGA – kopolymer kyseliny mléčné a glykolové

FDM – fused deposition modelling

CAD – computer-aided design

DLP – digital light processing

PEG – polyethylen glykol

PVA – polyvinylalkohol

PPF – polypropylen fumarát

SF – hedvábný fibroin

Gly – glycin

Ala – alanin

Ser – serin

HA – kyselina hyaluronová

SM – smart materiál

PM – piezoelektrický materiál

PVDF – poly(vinylidenfluorid)

PVDF-TrFE – poly(vinylidenfluorid-trifluorethylen)

SHM – self-healing material

FA – fokální adheze

DMSO – dimethylsulfoxid

PS – polystyren

PVDF-TrFE-CTFE – poly(vinylidenfluorid-trifluorethylen-chlortrifluorethylen)

SEM – skenovací elektronová mikroskopie

AFM – mikroskopie atomárních sil

FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

$a$  – koeficient objemové teplotní roztažnosti  
 $g$  – gravitační konstanta  
 $\Delta T$  – změna teploty  
 $d$  – tloušťka kapaliny  
 $\kappa$  – koeficient teplotní vodivosti  
 $\nu$  – kinematická viskozita kapaliny  
HFIP – hexafluoroisopropanol  
mOH – methanol  
TSSC – Time Sequenced Spin Coater  
THF – tetrahydrofuran  
ETH – ethoxyethanol  
NIH/3T3 – myší embryonální fibroblasty  
A549 – buňky lidského plicního karcinomu  
HEK – keratinocyty  
ESC – lidské embryonální kmenové buňky  
hiPSC – lidské indukované pluripotentní kmenové buňky  
iPSC-CM – diferencovaná podoba hiPSC do podoby kardiomyocytů  
MYH6 –  $\alpha$ -isoforma těžkého myozinového řetězce  
 $\text{TiO}_2$  – oxid titaničitý  
LDPE – nízkohustotní polyethylen  
MG63 – buňky lidského kostního osteosarkomu  
Al – hliník  
 $\text{H}_3\text{PO}_4$  – kyselina fosforečná  
 $\text{HNO}_3$  – kyselina dusičná  
HCl – kyselina chlorovodíková  
 $\text{H}_2\text{SO}_4$  – kyselina sírová  
 $\text{H}_2\text{O}$  – voda  
NaOH – hydroxid sodný  
 $\text{NaNO}_2$  – dusitan sodný  
 $\text{NaNO}_3$  – dusičnan sodný  
DiOx – dioxan  
CF – chloroform

## Publikační aktivity autora

### Články publikované v impaktovaných časopisech:

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

### Články připravované k recenznímu řízení:

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

## Odborný životopis autora

Jméno: **Ing. Markéta Kadlečková**  
Datum narození: 13.8.1993  
Místo narození: Znojmo  
Adresa: Ublo 99, Vizovice 763 12  
Email: m1\_kadleckova@utb.cz  
Telefon: +420 775 898 816

### Vzdělání

2017 – dosud Doktorské studium – Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav fyziky a materiálového inženýrství; doktorský studijní program: Technologie makromolekulárních látek.

Téma disertační práce: Příprava polymerních materiálových soustav pro 3D tisk v biologických aplikacích

2015 – 2017 Magisterské studium – Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav fyziky a materiálového inženýrství; magisterský studijní program: Chemie a technologie materiálů – Materiálové inženýrství.

Závěrečná práce: Příprava texturovaných povrchů na bázi hliníku

2012 - 2015 Bakalářské studium – Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav inženýrství polymerů; bakalářský studijní program: Chemie a technologie materiálů – Polymerní materiály a technologie

Závěrečná práce: Testování stability polymerních folií vystavených účinkům teplotních gradientů

2008 – 2012 Gymnázium a Jazyková škola s právem státní jazykové zkoušky Zlín

### **Zaměstnání**

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

## Zahraníční stáž

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

## Projekty

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

## Odvedené práce

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