



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ 3D TISKU K PŘÍPRAVĚ HYDROGELOVÝCH SYSTÉMŮ

UTILIZATION OF 3D PRINTING FOR THE PREPARATION OF HYDROGEL SYSTEMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Eliška Polánková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2025

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK2078/2024 Akademický rok: 2024/25
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Eliška Polánková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití 3D tisku k přípravě hydrogelových systémů

Zadání bakalářské práce:

- 1) vypracovat literární rešerši zaměřenou na 3D tisk hydrogelových systémů
- 2) seznámit se s experimentálními možnostmi 3D tisku hydrogelů
- 3) na základě literární rešerše, a s ohledem na pracovišti dostupných experimentálních technik 3D tisku, navrhnout pilotní experimenty vedoucí k přípravě hydrogelů
- 4) zhodnotit výsledky pilotních experimentů a zmínit možnosti, kam by se mohl výzkum v oblasti 3D tisku hydrogelů, dále ubírat

Termín odevzdání bakalářské práce: 26.5.2025:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Eliška Polánková
studentka

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2025

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá využitím 3D tisku k přípravě hydrogelových systémů. Hlavním cílem bylo seznámit se s tématem 3D tisku hydrogelů, jakožto úplně novou metodu přípravy hydrogelů na FCH VUT, a navrhnout pilotní experimenty vedoucí k jejich přípravě na *RepRap (Replicating Rapid Prototyper)* 3D tiskárně. Zaměřuje se především na využití přírodních polymerů a iontové gelace. Experimentálně byly optimalizovány metody pro vnitřní a vnější síťování alginátového hydrogelu, a spolu s nimi optimalizovány parametry tisku. Ve vytištěném vzorku bylo gravimetrickým sušením zpětně provedeno zjištění koncentrace biopolymeru. Tato kalibrační křivka umožnila vyhodnotit efektivitu směšování složek ve směšovači a odhalit nedostatky metodiky. Výsledky ukázaly, že tiskový proces je výrazně ovlivněn rozdílnou viskozitou jednotlivých složek a konstrukčním řešením směšovače, což vedlo k nerovnoměrnému promíchání. Přes tyto komplikace se podařilo navrhnout funkční tiskový protokol, který umožňuje reprodukovatelný tisk základních hydrogelových struktur. V závěru práce jsou diskutovány možnosti dalšího vývoje systému, včetně potenciálu pro tisk gelů s koncentračními gradienty.

ABSTRACT

This bachelor's thesis explores the use of 3D printing for the preparation of hydrogel systems. The main objective was to gain familiarity with the topic of hydrogel 3D printing as a brand-new preparation method at FCH VUT and to design pilot experiments for their preparation using a RepRap (Replicating Rapid Prototyper) 3D printer. The work focuses primarily on the application of natural polymers and ionotropic gelation. Experimentally, methods for both internal and external crosslinking of alginate hydrogels were optimized, along with the corresponding printing parameters. In the printed samples, the actual polymer concentration was retrospectively determined through gravimetric drying. The resulting calibration curve enabled the evaluation of the efficiency of component mixing in the mixer and helped identify methodological shortcomings. The findings showed that the printing process is significantly influenced by the viscosity differences between the individual components and by the structural design of the mixing system, which led to uneven blending. Despite these complications, a functional printing protocol was successfully developed, enabling the reproducible printing of basic hydrogel structures. The thesis concludes by discussing possibilities for further development of the system, including the potential for printing hydrogels with concentration gradients.

KLÍČOVÁ SLOVA

3D biotisk, hydrogel, alginát sodný, iontová gelace, reologie

KEYWORDS

3D bioprinting, hydrogel, sodium alginate, ionotropic gelation, rheology

POLÁNKOVÁ, Eliška. *Využití 3D tisku k přípravě hydrogelových systémů*. Online, bakalářská práce. Brno, 2025. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/161991>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jiří Smilek.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje byly správně a úplně citovány. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce, Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D., za jeho vstřícný, přátelský a motivující přístup. Velmi si vážím jeho podpory, trpělivosti a optimismu, který mi pomáhal překonávat i méně úspěšné momenty a udržet si motivaci po celou dobu práce. Dále děkuji svým konzultantům, Ing. Janě Fojtíkové a Ing. Přemyslu Menčíkovi, Ph.D., za odbornou pomoc a čas věnovaný experimentální části mé práce. Poděkování patří také mé rodině, přátelům a blízkým za jejich podporu během celého studia.

Obsah

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 HYDROGELY	8
2.1.1 Definice a obecné vlastnosti	8
2.1.2 Přírodní hydrogely	9
2.1.3 Syntetické hydrogely	10
2.2 TECHNOLOGIE 3D BIOTISKU	12
2.2.1 Inkjet.....	14
2.2.2 Stereolitografie	14
2.2.3 Laserový tisk	14
2.2.4 Extruzivní tisk	14
2.3 REOLOGIE.....	16
2.3.1 Elastické chování.....	16
2.3.2 Viskózní chování.....	16
2.3.3 Viskoelastická	16
2.3.4 Reometrie	16
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	18
3.1 <i>RepRap</i> 3D biotiskárny	18
3.2 Hydrogely využívané v medicínských aplikacích.....	18
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
4.1 Použité chemikálie	21
4.2 Použité přístroje	21
4.3 Použitý software.....	21
4.4 Příprava alginátového hydrogelu	21
4.4.1 Přímé síťování prostřednictvím soli obsahující dvojmočné ionty kovu	21
4.4.2 Oddálená metoda gelace s použitím D-(+)-glukano- δ -laktonu	21
4.5 Měření mechanických vlastností.....	22
4.6 Práce s 3D tiskárnou	23
4.6.1 Optimalizace tiskového podloží	28
5 DISKUZE A VÝSLEDKY	30
5.1 Kompatibilita hliníkového směšovače s alginátovými gely.....	30
5.2 Úprava metod gelace před tiskem.....	32

5.3	Optimalizace 3D tisku.....	34
5.4	Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace tištěného hydrogelu	36
5.5	Srovnání gelu připraveného laboratorně a gelu z 3D tiskárny	37
5.6	Návrh budoucích experimentů a úprav	38
6	ZÁVĚR.....	40
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	46

1 ÚVOD

Téma 3D tisku se v posledních letech stalo výrazně diskutovaným nejen v oblasti průmyslové výroby, ale i v biomedicínských aplikacích. Technologie nachází uplatnění například v tkáňovém inženýrství, farmacii nebo při vývoji biosenzorů. Zvláštní pozornost je v tomto směru věnována hydrogelům – materiálům schopným zadržovat značné množství vody, které zároveň vykazují mechanické vlastnosti podobné měkkým biologickým tkáním. Právě tyto vlastnosti činí hydrogely atraktivními pro využití v personalizované medicíně, kde by 3D tisk mohl významně přispět k individuálnímu přístupu léčby.

Ačkoliv má 3D biotisk značný potenciál, jeho přímé klinické využití je zatím omezené. Důvodem je především technická náročnost přesného formování živých nebo bioaktivních struktur a vysoké finanční náklady spojené s profesionálními biotiskovými systémy. Z toho důvodu se diskutují alternativy a cenově dostupnější řešení, jako jsou například modifikované extruzní tiskárny.

Cílem této bakalářské práce bylo ověřit možnosti 3D tisku hydrogelových systémů na bázi alginátu sodného pomocí upravené extruzní tiskárny systému *RepRap*. Práce zahrnuje literární rešerši zaměřenou na současné metody 3D biotisku, možnosti dostupného *software* a různé strategie přípravy tisknutelných hydrogelů. V experimentální části byly testovány dva základní přístupy k iontové gelaci: přímá metoda difuzí vápenatých iontů z roztoku chloridu vápenatého (CaCl_2) a oddálená metoda využívající nerozpustný uhličitán vápenatý (CaCO_3) v kombinaci s glukono- δ -laktosem (GDL), který postupně snižuje pH a umožňuje pozvolné uvolňování iontů vápníku a tím i síťování polymerní struktury.

Součástí práce bylo také ověření funkčnosti navrženého směšovacího systému. První experimenty vycházely z poznatků získaných v rešerši a z laboratorní praxe. Následně byly parametry laděny iterativně na základě předběžně získaných výsledků. Tiskový proces je citlivý na řadu vzájemně provázaných proměnných, které nelze hodnotit izolovaně. V případě extruzního tisku sehrávají klíčovou roli zejména rychlost tisku, poměr dávkovaných složek a jejich objemová rychlost.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 HYDROGELY

2.1.1 Definice a obecné vlastnosti

Hydrogely jsou trojrozměrné sítě polymerů, které prostupují celým disperzním prostředím. Jedná se o koloidní soustavy, v nichž jsou disperzním podílem řetězce polymerů a disperzním prostředím voda. Jejich objem tvoří až z 90 % voda, což jim umožňuje bobtnat (samovolně zvětšovat objem pohlcováním vody). Specifické jsou tím, že je spojitě disperzní prostředí i disperzní podíl. Síťovaná struktura je zajištěna kovalentními i nekovalentními vazbami, mezi které patří hydrofobní interakce, vodíkové vazby nebo vazby iontové. Navázáním funkčních skupin na hlavní řetězec se dá měnit jejich polarita a rozpustnost ve vodě. Hydrofilní skupiny obsahují polární vazby, které způsobují nerovnoměrnou distribuci elektronů v molekule a pro molekuly vody je jednodušší tvořit vodíkové vazby. Hydrofilita je zajištěna přítomností funkčních skupin: hydroxylová ($-\text{OH}$), karboxylová ($-\text{COOH}$), amino ($-\text{NH}_2$), amid ($-\text{CONH}$, $-\text{CONH}_2$) a sulfonová ($-\text{SO}_3\text{H}$) skupina. [1] [2]

Připravují se pomocí fázového přechodu sol-gel. Sol je koloidní systém obsahující volně pohyblivé polymerní řetězce, mezi nimiž působí pouze slabé vazebné interakce a netvoří pevnou strukturu. Oproti tomu gel tvoří pevnou trojrozměrnou strukturu, v níž se polymerní řetězce nepohybují samovolně. Hydrogely lze rozdělit na chemické a fyzikální. Chemické síťování probíhá mezi molekulami prostřednictvím kovalentních vazeb a je nevratné. Tyto hydrogely bývají stabilní, mají laditelné struktury a dobré mechanické vlastnosti [3] [4]. Fyzikální síťování tvoří slabé vazebné interakce (Van der Waalovy síly, vodíkové můstky, hydrofobní interakce). Ve většině případů vykazují reverzibilní přeměnu sol-gel, protože k přerušení fyzikálních interakcí mezi molekulami je zapotřebí velmi nízké energie. Fyzikální podněty zahrnují elektrická a magnetická pole, teplotu, složení rozpouštědla nebo intenzitu světla. Dále se uplatňují vazby iontové. Používanými síťovacími činidly bývají vícesytné ionty kovů, které jsou dodány v podobě roztoku soli. [4] [5]

Vykazují viskoelastické vlastnosti, působí jako pevné látky, ale také mají určitou fluiditu. Obecně platí, že vodný hydrofilní polymerní roztok s nízkou koncentrací bez provázaných struktur má Newtonovské mechanické chování. Zesíťované struktury se vyznačují extrémně vysokou komplexní viskozitou ($>10^5 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) a vysokou elasticitou (mez kluzu ve smyku $>2000 \text{ Pa}$), podobně jako u pevných látek. [6]

Gely jsou klasifikovány podle jejich disperzního prostředí. Pokud je kapalné, jsou to obecně lyogely. Dle povahy média dále dělíme na hydrogely a organogely. U xerogelu bylo kapalné disperzní prostředí odstraněno a vyplňuje jej vzduch. Vratné hydrogely mohou po vysušení na xerogel opět nabobtnat vložением do vody a obnovit strukturu. To je typické pro fyzikální síťování. Nevratné neumí plně obnovit strukturu, což lze pozorovat u chemicky síťovaných.

Stářím gelu nebo jiným mechanickým či teplotním namáháním může docházet k synerezi. Jedná se o proces kontrakce objemu gelu doprovázený vypuzením rozpouštědla, které bylo původně zachyceno uspořádanou sítí. Synereze je pozorována i v živých systémech, například při uvolňování krevního séra během procesu srážení. [7]

Mechanickými vlastnostmi jsou hydrogely podobné měkkým tkáním. Vysoký obsah vody snižuje tření s okolními tkáněmi. Většina hydrogelů, které mají neutrální nebo mírně polární funkční skupinu a neobsahují toxické skupiny (např. aldehydy), je biokompatibilních (snášlivost materiálu v biologickém systému) a biodegradabilních (schopnost kompletního biologického rozložení). Je důležité, aby pro medicínské využití ani meziproducty degradace nebyly toxické.

Aplikují se v oborech jako je tkáňové inženýrství, tvorba kontaktních čoček, regenerativní medicína a ve farmacii pro uvolňování terapeutických látek. Základní metodu tkáňového inženýrství představuje výroba tzv. *scaffoldu*, který tvoří podpůrnou vrstvu („lešení“) pro regeneraci a obnovení tkáně. Příprava probíhá například louhováním soli, elektrostatickým zvlákněním a dalšími technikami. Používaným materiálem je hydrogel. *Scaffold* je osázen buňkami a ty postupně prolifерují v požadovanou tkáň. Potřebnou vlastností hydrogelů je jejich pórovitost, která umožňuje přístup živin a kyslíku k buňkám. Z tohoto důvodu jsou vhodné jako bioinkousty, tedy materiály používané v 3D tisku k vytváření biologických struktur. [8] [9] [10]

2.1.2 Přírodní hydrogely

Přírodní hydrogely jsou tvořeny biopolymery. Tento typ ve srovnání se syntetickými lépe napodobuje extracelulární matrix (ECM) a podporuje buněčnou adhezi a proliferaci. Nejsou toxické pro biologickou tkáň, a proto jsou plně využitelné pro medicínské i farmaceutické účely. Často se jedná o materiály rostlinného a živočišného původu (případně řasy), tudíž jsou ekologické a udržitelné. Naproti tomu je s nimi složitější pracovat. Mají omezené mechanické vlastnosti, nelze u nich efektivně měnit gradient tuhosti (rozdílné složení závislé na původu), vyžadují citlivější podmínky tisku a mohou být náchylné např. k odbourávání enzymy. [11] [12] [13]

Kyselina hyaluronová (HA)

Polysacharid, strukturně se jedná o nesulfátovaný glykosaminoglykan. V těle najdeme HA v ECM a je podstatnou složkou synoviální tekutiny (viskózní ochranný film na povrchu chrupavky a částečně její výživa). To jen potvrzuje, že se jedná o velmi viskózní látku s lubrikačními účinky a Nenevtonovskými tokovými vlastnostmi. Původní metody izolace byly založeny na extrakci například z pupečnickové šňůry, dokud se nepřišlo na způsob, při němž HA produkují bakterie (rod *Streptococcus*). Správně se označuje jako hyaluronan sodný/draselný, protože se ve většině případů vyskytuje v podobě soli. [14] [15] [16]

HA má špatné mechanické vlastnosti (se zvyšující se smykovou rychlostí dochází k poklesu viskozity, chová se tedy pseudoplasticky) a rychle podléhá degradaci (při fyzickém zatížení, kdy se rozplétají dlouhé řetězce, ale i při chemickém působení enzymů nebo volných radikálů). Proto není sama o sobě vhodná pro extruzivní tisk. Případně se dá upravit vytvrditelným methakrylátem a fotopolymerizovat, což ovšem snižuje její biokompatibilitu. Impozantní je schopnost zadržet vodu v až tisíci násobku své hmotnosti. Je neimunogenní a dobře hydratuje, proto se používá do kosmetických přípravků a v regenerativní medicíně. [14] [17] [18]

Želatina

Tento *in vivo* (v živém organismu) biodegradabilní polypeptid vzniká spojením přibližně 20 aminokyselin prostřednictvím peptidických vazeb. Vyrábí se hydrolýzou kolagenu. Existuje několik typů kolagenu, 80–90 % jich v lidském těle tvoří typy I, II a III. Klasický kolagen typu I je trojitá šroubovice složená ze dvou α -řetězců a jednoho β -řetězce. Má vysokou schopnost absorbovat vodu, je tepelně reverzibilní, ale je citlivý na metaloproteinázy. Gelovatění probíhá při nízké teplotě (cca 20–30 °C) a jedná se o přechod sol-gel. [14] [19]

Hydrolytickými procesy a úpravou v kyselém nebo zásaditém prostředí se získává želatina typu A a B. Typ A má izoelektrický bod 9,0 a je získán kyselou hydrolýzou a typ B má izoelektrický bod 5,0 a vyráběn je naopak alkalickou hydrolýzou. Z toho vyplývá, že je ve fyziologickém prostředí nestabilní, a proto se upravuje kovovými ionty nebo navázáním glutaraldehydů. Přídavkem metakrylamidových skupin na postranní řetězce je možné dosáhnout fotopolymerizovatelného hydrogelu. I zkapalněná želatina v sobě ponechává malé kanálky, což usnadňuje průtok kultivačního média a přístup kyslíku. Je vhodná

pro použití jako *scaffold*. Často se experimentuje se směsí želatiny a alginátu v různých poměrech pro usnadnění tisku. [14] [19]

Chitosan (CHT)

Jedná se o deacylovaný derivát chitinu a spolu se řadí mezi polysacharidy. Je to kyselý polyelektrolyt, jehož hustota náboje závisí na stupni acylace a pH. Je rozpustný ve vodném kyselém prostředí, ovšem ne při fyziologických podmínkách a fyziologickém pH, takže se používají jeho deriváty. Má hodně reaktivních funkčních skupin. Pro praktické účely jsou nejvyužitelnější skupiny: amino ($-NH_2$) a hydroxylové ($-OH$). Zesítuje se fyzikálně změnou pH nebo iontovými činidly. Díky glykosidickým vazbám je možné redukovat molekulovou hmotnost chitosanu (lepší rozpustnost nebo snížení viskozity). V přírodě se moc nevyskytuje, ale chitin je součástí exoskeletu korýšů nebo buněčné stěny hub. Používá se pro modely kůže, kostí a chrupavek. Jeho nedostatkem je, že pomalu přechází v gel a pouze koncentrovanější vzorky jsou schopné držet tvar. [14] [20]

Agaróza (AG)

Polysacharid s termoreverzibilními vlastnostmi. Lze ji kontrolovaně přeměnit na gel. Absorpční kapacita polysacharidu je modulovatelná úpravou síťové hustoty nebo změnou prostředí (pH, iontová síla). Agaróza je viskoelastická a neimunogenní. Kromě vody se rozpouští i v organických rozpouštědlech jako DMSO, DMF. Mechanické vlastnosti jsou srovnatelné s kloubní chrupavkou. Vynikající porézní struktura a iontová vodivost umožňuje kvalitní přívod a odvod látek. Využívají toho regenerační tkáně. Přirozeně je součástí agarů, který je získáván z mořských řas. [14] [21] [22]

Alginát (ALG)

Kyselina alginová je polysacharid dobře rozpustný ve formě soli (v různém pH) a má záporný náboj. Struktura se skládá s lineárních bloků M a G, které tvoří kopolymer. G bloky přispívají k tvorbě gelu a M bloky zajišťují flexibilitu. Okamžitě gelovatí v přítomnosti vícevalentních iontových solí, a to za fyziologických podmínek. [14]

Je cenově dostupným bioinkoustem a podporuje životaschopnost buněk (zajištěné vysokou pórovitostí), takže bývá často zkoumán a využíván. Chybí u něj funkční skupiny podporující buněčnou adhezi a buňky špatně diferencují, tudíž musí projít chemickou úpravou. Bývá modifikován oxidačními procesy. Získává se z buněčných stěn hnědých řas. Prakticky se využívá i pro enkapsulaci buněk, vaskulární tisk a ve směsi s želatinou i tisku kostní tkáně. [14] [23]

2.1.3 Syntetické hydrogely

Syntetické hydrogely jsou připravovány laboratorně, mají přesné chemické složení a laditelné mechanické vlastnosti. Nicméně problém nastává u snížené bioaktivity a biokompatibility, a také nebývají biodegradabilní. [5]

Polyethylenglykol (PEG)

Je to syntetický polymer vznikající polymerací ethylenoxidu. Není cytotoxický a imunogenní. PEG je biokompatibilní a udržuje pevnou konstrukci. Začal se hojně využívat pro fotopolymeraci, přičemž iniciátory fotopolymerace většinou biokompatibilní nejsou. PEG gely jsou vhodné pro biotisk chrupavčitých tkání. Stabilizují se díky vlastním kohezním silám. Bohužel jsou bioinertní a osázet je buňkami je náročné. Pracuje se s nimi ve formě směsi s dalšími hydrogely, které zvyšují bioaktivitu gelu (například polysacharidy). Používají se jako pomocná látka v léčivech. [14] [24] [25]

Methylcelulóza (MC)

Celulóza je nejhojnější polysacharid v přírodě a tvoří ji (1→4) β-D-glukopyranosylové jednotky. MC je amfifilním derivátem celulózy. Byla připravena se snahou zvýšit citlivost na pH. Je termoreverzibilní a při gelovatění vznikají nejprve hydrofobní vazebné interakce a poté dojde k separaci fází.

Tisknou se s ní osteogenní a chondrogenní tkáň, ovšem nedá se použít pro dlouhodobou kultivaci, protože hned po implementaci buněk částečně degraduje. Není jediným využívaným derivátem celulózy pro bioinkousty, patří mezi ně hydroxypropylmethylcelulóza (HPMC), hydroxyethylcelulóza (HEC) a karboxymethylcelulóza (CMC). [14] [26]

2.2 TECHNOLOGIE 3D BIOTISKU

3D tisk¹ je v dnešní moderní době velmi rozšířenou výrobní technologií, a to nejen z důvodu automatizace výroby, ale i precizního nastavení parametrů (teplota, výška vrstvy, viskozita). Jeho výhodou je flexibilní využití. 3D tiskárny lze nakonfigurovat v závislosti na požadovaných podmínkách a použitých materiálech. Je to aditivní metoda (úprava vlastností přidáváním zásobního materiálu), kde je trojrozměrný model vytvářen nanášením jednotlivých vrstev. S rozvojem 3D tisku se začalo uvažovat i o jeho využití v biomedicině.

Původní myšlenka měla řešit problémy orgánové transplantace, protože počet pacientů každý rok převyšuje počet dárců orgánů. Bylo by možné nahradit poškozené tkáně nebo orgány na míru upravenými modely, které jsou anatomicky i fyziologicky podobné nativní tkáni pacienta. [8] [9]

Pojí se s tím jisté komplikace. U orgánů je nezbytné správně orientovat cévy a zajistit funkční přívod živin. Také tisk by trval poměrně dlouho a jelikož se jedná o živé systémy, musí se jim zajistit fyziologické podmínky, než se transplantují do těla pacienta. Pořád ještě nejsme schopni nahrazovat velké orgány, nicméně pokroky jsou zaznamenány u tisku částí pojivových tkání (chrupavky), umělé kůže, kostních náhrad apod. Všechny slouží pro podporu a regeneraci vlastní tkáně. Dále lze tištěné tkáně použít jako *in vitro* modely a testovat na nich farmaka. Například napodobeniny tumoru výrazně přispěly ke studiu jeho průběhu a screeningu účinku cytostatik. [27]

Pro vytvoření funkčního bioinkoustu je potřeba splnit několik faktorů. Nejzřejmější je biokompatibilita a biodegradabilita. Je potřeba brát v úvahu, že materiál nesmí být toxický a má současně podněcovat proliferaci a diferenciaci buněk.

Nejproblematictější jsou mechanické vlastnosti. Mnoho tkání (např. svaly, kosti) podléhá neustálým změnám mechanického zatížení, a proto je důležité, aby materiály používané v tkáňovém inženýrství vykazovaly dynamické mechanické vlastnosti, které napodobují skutečné chování živé tkáně. Implementovanou tkáň je potřeba pevně přichytit a zajistit životaschopnost buněk a jejich vzájemnou komunikaci. Transport živin, kyslíku do buněk nebo degradovaných látek z buněk ovlivňuje morfologie *scaffoldu*. Proto je snaha v modelech zajistit optimální pórovitost. Při tisku může docházet k narušení bioinkoustu a proto musí být dostatečně odolný. [8] [28]

Dělí se podle obsahu částic. Jedny jsou čistě buněčné a tvoří je agregáty nebo suspenze buněk. Druhé jsou na bázi hydrogelů. Jsou vysoce hydratované, splňují biokompatibilitu, mají dobré reologické vlastnosti, jsou lepkavé, vodivé, mohou mít paměť tvaru. Struktura se stabilizuje zesíťováním. Momentálně neexistuje jednotný způsob, jakým porovnávat metody a materiály použité při 3D biotisku, jelikož zde hraje roli hodně parametrů. [8] [12]

Software

Podobně jako je tomu u klasického 3D tisku, často se používá digitální model vytvořený v programu *CAD* (*Computer-aided design*). Pouze některé jsou vhodné pro modelování tkání. *Software* pro biologické modely jsou speciálně uzpůsobené, třeba aby nanášené vrstvy nebyly příliš tenké. Pracuje se za jiných teplot a mnohem jemnější a preciznější kontroly tlaku. Pokud se tiskne přímo s implementovanými buňkami, musí jim odpovídat velikost trysky, což se zohlední i v nastavení tisku. Bohužel technologický pokrok v oblasti biotisku je rychlejší než vývoj odpovídajícího *software*. Zde jsou příklady používaných *software*:

¹ Pro jednotlivé názvy komponent a využívané programy a jejich příslušenství budou použity původní výrazy z technické praxe.

TinkerCAD

Velmi jednoduchý na ovládání, hodně se využívá pro tisk primitivních geometrických modelů. Nicméně nezvládá sofistikovanější tvary a kombinace více materiálů. Je dobrým nástrojem pro manipulaci s již vytvořenými tkáněmi a použit byl například pro mikrofluidní čipy. [29]

Blender

Open-source, který není primárně určený pro 3D tisk, ale s přidáním nových funkcí (např. *Meshmixer*) se stal v tomto odvětví hodně oblíbeným. Umožňuje vytváření složitější geometrie v závislosti na zkušenostech uživatele. Je velmi versatilní a poskytuje modely vhodné pro kryogenní 3D tisk nebo modely cév. Nevýhodou je, že pracuje s formátem STL a ten nemusí podporovat definici materiálu (ukládá pouze informaci o geometrii, ne o materiálech nebo vlastnostech objektu), takže neumožní tisknout heterogenní struktury. [29]

Fusion 360

Jedná se o *cloudový software* vyvinutý společností *AutoDesk*, která se specializuje na *software* pro inženýrství a průmyslovou výrobu. Umožňuje vytvářet simulace, provádět parametrické návrhy, analyzuje strukturní a tepelné chování modelů. Má uživatelsky přívětivé rozhraní. Ale opět jsou pro biotisk úskalím STL formáty. [29]

Rhinoceros

Jeho hlavní předností je detailnost, lze v něm vytvářet složité modely a využívá se toho v průmyslovém designu a strojírenství. Pracuje s technikou *NURBS*, čímž efektivně vytváří hladké křivky, což je příhodné pro biologické modely. Podporuje různé formáty souborů pro *import* a *export*, takže se dá používat koordinovaně s jiným *software*. [29]

Slicer

Většina 3D tiskáren má svůj *software* zajišťující převod modelu na sadu instrukcí zvanou G-kód. *Slicer* rozdělí objekt na jednotlivé vrstvy, u kterých je třeba upravit konkrétní parametry. V náhledu simulace je možné si dané vrstvy prohlédnout. Je to program, který převádí 3D model do podoby, kterou tiskárna dokáže interpretovat. Příklady *slicers*:

CuraEngine

Je součástí *open-source* projektu *Cura* a plně využitelný u vícero typů tiskáren s technologií FDM. Poměrně jednoduše optimalizuje parametry, takže je vhodný i pro začátečníky. [29]

Slic3r

Open-source software s pokročilými funkcemi jako je sekvenční tisk a generování nosných struktur. Manipulace se složitými geometrickými objekty je náročnější a méně intuitivní. [29]

Simplify3D

Prémiový *software* nabízející analýzu a opravy sítě, opět také generování nosných struktur. Dobře se s ním tiskne souběžně více filament. [30]

Materialise Magics

Slicer používaný třeba pro biokompatibilní implantáty a *scaffoldy*. U materiálového tisku detekuje potenciální problémy a nabízí možná řešení. [31]

Metody pro biotisk většinou vycházejí z materiálového 3D tisku plastu nebo kovu. Liší se podle způsobu nanášení a v případě bioinkoustů v podobě hydrogelů i způsobem zesíťování. Použitelnými metodami jsou: Extruzivní tisk, Inkjet, Stereolitografie (SLA) a Laserový tisk (SLS, LAD).

2.2.1 Inkjet

Biotisk, který simuluje postup v klasických stolních tiskárnách. Tryska vytváří nanokapky hydrogelu a dává je na podložku. Bioinkousty musí mít nízkou viskozitu a specifické elektromagnetické vlastnosti. Rozlišuje se tepelný inkjet a piezoelektrický. [32]

U prvního typu je použit tepelný prvek, který rozstříkuje kapičky. Prudké rychlé ohřevy způsobí zplynění inkoustových kapek. Vytvořený tlak jim umožní překonat povrchové napětí a vtáhne je do trysky, kterou jsou kontrolovaně vytlačeny a dopadají na určené místo. Druhý typ využívá piezoelektrický aktuátor. Při působení napětí na obou koncích se prohne a inkoust je rychle vytlačen tryskou ven. [27] [32]

Je to rychlá metoda s vysokou účinností, ale strádá na nesouměrnosti kapek, takže nelze tisknout strukturně složité modely. Tryska se při dlouhodobějším používání zahřívá, a to by případně mohlo poškodit buňky. Na druhou stranu je výhodou integrace více trysek k synchronnímu tisku. Není problém tisknout heterogenní tkáň. Bezkontaktní proces také brání křížové kontaminaci. [32]

2.2.2 Stereolitografie

Metoda založená na selektivním síťování bioinkoustu pomocí UV záření. Je to velmi efektivní a rychlá metoda, přičemž hydrogely musí být vhodné pro fotopolymeraci. Ozařování se provádí zvlášť pro každou nanášenou vrstvu. Umožňuje vytvářet i velmi složité objekty, jelikož zesíťování probíhá plošně rovnoměrně. [14] [32]

2.2.3 Laserový tisk

Je sestavený ze tří vrstev. Jedna z vrstev musí absorbovat energii, další je donorová a na ní vrstva bioinkoustu. Používá se efekt optické pinzety a tepelného šoku. Působením laseru na konkrétní bod donorové vrstvy se odpaří kapka a vytvoří se bublina bioinkoustu s vysokým tlakem. Je nesena k vrstvě substrátu, kde se přichytí a dojde k zesíťování. Nepřítomností trysky se minimalizují komplikace spojené s jejím ucpáním nebo jinou kontaminací. [32]

Laserem asistovaný biotisk (LAD) dokáže velmi přesně umístit kapku a zajišťuje tak uspořádanost potřebnou pro biologické systémy. Tisknou se i vysoce viskózní materiály. Bioinkoust není mechanicky tolik namáhán. Při vytváření modelu se musí dbát na to, že existuje omezení tisku v třetím rozměru. Je to časově náročný proces. Parametry laseru musí vyhovovat fyziologickým podmínkám buněk a odpařování nejde urychlit zvýšením teploty nebo jde jen do jisté míry. Nutno zmínit, že lasery jsou finančně náročná záležitost. [27]

2.2.4 Extruzivní tisk

Jedná se o extruzivní biotisk, přičemž tato kategorie zahrnuje více technologií včetně *Fused Deposition Modeling* (FDM) a *Direct Ink Writing* (DIW). FDM je určen pro tisk termoplastických polymerů z tuhých filamentů, zatímco DIW využívá viskózní bioinkousty (gely, pasty) a umožňuje tisk za laboratorní teploty. Obě metody pracují na principu vytlačování semi-kontinuálního vlákna, liší se však podobou zásobního materiálu a způsobem jeho zpracování. Jedná se o nejpoužívanější technologii vzhledem k cenové dostupnosti a flexibilitě konstrukce. Extruzivní tiskárna může být poměrně detailní a dobře se s ní pracuje ve všech třech osách. Hlavice 3D biotiskárny se skládá z extrudéru a trysky, případně mixovacího elementu. [27]

Extrudér je součástka, která dávkuje bioinkoust ze zásobníku trysce, koordinuje rychlost tisku. Může být pneumatický, mechanický nebo na bázi solenoidu. U pneumatického extrudéru je hnací silou stlačený vzduch, který nebývá dostatečně přesný a počítá s časovou odmlkou při stlačení plynu. Taky podporuje materiály různé viskozity. [14] [32]

Mechanické extrudéry rozlišují píst nebo šroubovici (tzv. šnek), přičemž použití pístu zajišťuje precizní ovládní extruze, ale u šroubovice je větší prostorová kontrola. Pracuje se i za synergického použití obou mechanických extrudérů. Lze tisknout i bez přístupu vzduchu. [32]

Solenoidová mikroextruze využívá elektrické impulsy, jimiž zruší magnetické pole tvořené mezi feromagnetickým pístem a prstencovým magnetem. Tím se otevře ventil. [14]

Při DIW metodě je bioinkoust mnohem víc vystaven mechanickému stresu, a to hlavně vlivem rychlosti proudění, depozičním tlakem a geometrií trysky (konkrétně smykové napětí vznikající na hrotu trysky). Tisk se provádí pro hydrogely poměrně velké škály různých viskozit a hustoty buněk. Limitací, kterou je nutno optimalizovat, je ucpávání trysky. K tomu může dojít v případě příliš rychlého zesíťování nebo vysycháním gelu, koagulací částic nebo příliš malým průměrem trysky (nutnost vyššího tlaku potřebného k extruzi). Obvykle je průměr trysky v rozsahu od 100 μm do 1 mm. [27] [33]

Pro porovnání s ostatními metodami, je DIW 3D biotisk rychlý, cenově dostupný a momentálně jediný, který umožňuje tisknout hydrogely s vysokou buněčnou hustotou. Umožňuje anatomicky správné porézní struktury, ale musí se počítat s biologickými ztrátami. Pro tisk *scaffoldu* jsou tyto parametry dostačující. [14]

2.3 REOLOGIE

Reologie je vědní obor, který se zabývá studiem deformace a toku látek, zejména kapalných látek, které vykazují jak vlastnosti pevných, tak kapalných látek. Tyto látky jsou charakteristické svými viskoelastickými vlastnostmi.

Reologie zkoumá chování materiálů, jako jsou polymery, gely, emulze, suspenze a jiné, které vykazují komplexní chování při deformaci. Cílem reologie je porozumět vztahům mezi napětím, deformací a časem u těchto látek a predikovat a hodnotit jejich chování v různých podmínkách.

Reologie má široké uplatnění v mnoha oblastech, jako jsou chemie, fyzika, materiálové vědy, inženýrství, farmacie, potravinářství a další. Používá se například při vývoji nových materiálů, zlepšování výrobních procesů, optimalizaci produktů a předpovědi jejich chování v různých podmínkách. [34]

2.3.1 Elastické chování

Elasticita je vlastnost materiálu, která popisuje jeho schopnost vrátit se do původního tvaru po jeho deformaci vnější silou (tedy schopnost ukládat energii). Elastické vlastnosti jsou popisovány elastickými moduly (Youngův modul, smykový modul atd.) a rychlostmi elastických vln (kompresními a smykovými). Youngův modul neboli modul pružnosti v tahu je definován jako poměr mezi napětím a deformací materiálu a je specifický pro dané materiály. Pokud je při mechanickém namáhání překročena elastická mez, dochází k nevratným změnám struktury. [35] [36]

2.3.2 Viskózní chování

Viskozita je míra odporu látky vůči proudění a je projevem vnitřního tření (tedy schopnost pohlcovat energii). Dává informaci o kapalných vlastnostech látky. Vysoce viskózní látky mají větší odpor a tečou pomaleji. Rozlišujeme Newtonovské látky, u kterých při stoupající smykové rychlosti zůstává viskozita konstantní a Nenevtonovské látky, které namáháním podléhají deformaci a mění se jejich viskozita. U polymerních tavenin při nízkých smykových rychlostech je tok Newtonovský, protože jsou polymerní řetězce náhodně uspořádané. Při středních smykových rychlostech je tok pseudoplastický, v tomto stavu se řetězce začínají rozplétat. Při vysokých smykových rychlostech je tok opět Newtonovský, protože jsou polymerní řetězce rozpletené a orientované ve směru toku. [37]

2.3.3 Viskoelasticita

Většina materiálů vykazuje kombinaci viskozitního a elastického chování. Vykazují okamžitou i zpožděnou odezvu na aplikované napětí a jejich deformace závisí na čase. Materiály umožňují ukládat energii a disponovat jí, což se projeví *creep* efektem a relaxací napětí. *Creep* efekt je časově závislá deformace materiálu při konstantním zatížení a způsobuje pomalou deformaci, která je většinou nevratná. [38]

Tyto jevy jsou důsledkem kombinace schopnosti materiálu ukládat energii (elastická složka) a disipovat ji (viskózní složka). Matematicky lze viskoelastické chování modelovat pomocí mechanických analogií, jako jsou Maxwellův model (pružina a tlumič v sérii) a Kelvin–Voigtův model (pružina a tlumič paralelně), které pomáhají popsat časově závislé odezvy materiálů. [38]

2.3.4 Reometrie

Reometrie měří a zkoumá reologické vlastnosti. Přístroje, které jsou k tomu používány, se nazývají reometry. Pomocí vybrané geometrie je vzorek řízeně mechanicky namáhán a sleduje se jeho odezva. Kapilární reometry jsou zařízení k měření smykové viskozity. Kapalina protéká kapilárou a klade viskózní odpor vůči stěně kapiláry. Ten způsobuje pokles tlaku kolem kapiláry, který je měřen. Kuželo-deskové

reometry se skládají z pevné desky a kužele s vyklenutou podstavou, který rotuje a vytváří homogenní smykovou deformaci. V mezeře mezi nimi je vzorek. Měří se viskozita a primární a sekundární koeficienty normálového napětí. Reometr s dvěma soustřednými deskami má jednu statickou a druhá rotuje nebo kmitá. Mezera mezi deskami je laditelná oproti kuželo-deskovému uspořádání. Umožňuje měřit vzorky o větších částicích. Pro zkoumání látek s nízkou viskozitou je vhodný válcový reometr. Vzorek je vmezeřen mezi statický spodní válec a do něj je ponořen vrchní rotující válec. Výběr vhodné geometrie je klíčový, závisí na množství vzorku, požadovaných výstupech, velikosti částic, povrchovém napětí a viskozitě vzorku. [39]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 REPRAP 3D BIOTISKÁRNY

Nejjednodušší metodou pro vytvoření 3D tiskárny upravené na míru je použít již existující tiskárnu s otevřeným *hardware*, a na jiné 3D tiskárně vytisknout potřebné díly pro úpravu metodiky. Tyto tiskárny se nazývají *RepRap* (*Replicating Rapid Prototyper*) a nejčastěji obsahují především plastové díly.

Autoři článku [40] se rozhodli použít extrusivní tiskárnu *RepRap Arduino Mega Polulu Shield 1.4.*, která byla poháněna *Arduino Mega 2560 R3* a A4988 krokovými motory. Modelování i *slicing* (převedení modelu na jednotlivé tištěné vrstvy) byl proveden v *open-source software Matter Control 2.0.* a G-kód zpracován *Utilimakerem Cura*, který je kompatibilní s tímto typem tiskárny.

Cílem studie bylo najít způsob, jak vytvořit nízkonákladovou biotiskárnu s jednoduchým uživatelským rozhraním. Zároveň optimalizovat parametry tisku pro tuto tiskárnu, která byla přestavěna z tisku plastových filamentů na tisk hydrogelových materiálů. Především se jednalo o rychlost tisku, rychlost vytlačování gelu z extrudérů a koncentrace gelů. Použitými materiály byly agaróзовé a alginátové gely o různých koncentracích. Extrudérem byla 1 ml injekční stříkačka pro uchování gelu a k ní napojená PTFE hadička, která vedla gel do trysky. Byly připraveny alginátové gely o koncentracích 1,5 hm.%, 3 hm.% a 5 hm.%. Tento pokus měl zhodnotit kvalitu síťování, při tisku alginátu v podobě solu do roztoku 1 mM CaCl₂, který měl poskytnout vápenaté ionty pro zesílení. Byly pozorovány problémy při tisku, výsledná struktura nebyla optimální ani použitelná.

Perzistentní struktura byla vytvořena až při tisku 5 % alginátu sodného do 5ml 1mM CaCl₂. Testována byla i viabilita buněk *Escherichia coli* na těchto tištěných vzorcích, které byly naneseny po zaschnutí živného média křížovým roztěrem. Byla použita 3 média pro kultivaci. První ve složení 5 % alginát sodný a želatina (5 g na 100 ml deionizované vody), jako druhý 5% agaróza a posledním vzorkem 5% alginát. Po 24 hodinách proběhla mikroskopická analýza vzorků, jejíž výsledek byl, že 5% alginát poskytl zřetelné kolonie s ostrými okraji. Obecně se 5% alginát tiskl nejlépe při pokojové teplotě a v kombinaci s želatinou se vůbec nepodařilo vytisknout kompaktní vzorky. Jako nejlepší materiál pro tisk se ukázala 5% agaróza, která při pokojové teplotě dobře tuhnula. Pokus se povedl i při změně z trysky o průměru 0,1 mm na 0,4 mm, pouze nebyl tak detailní a časově úspěšnější. [40]

3.2 HYDROGELY VYUŽÍVANÉ V MEDICÍNSKÝCH APLIKACÍCH

Ruberu et al. [41] optimalizovali parametry extrusivního tisku pomocí Bayesovské statistické metody. Optimalizace 3D biotisku zahrnuje spoustu parametrů, a tudíž velkou spotřebu materiálu a je časově náročná. Byla vyvinuta snaha o minimalizování nutných pokusů, při zohlednění fyzikálně-chemických vlastností, parametrů tisku a *post-processing* úprav. Použit byl bioinkoust na bázi methakrylované želatiny o koncentracích 10 %, 7,5 % a 5 % (GelMA) a spolu s methakrylátem kyseliny hyaluronové (GelMA/HAMA) o koncentracích 10:2 %, 7,5:2 % a 5:2 %. Vybrány byly kvůli schopnosti napodobovat extracelulární matrix o vysoké viskozitě. Obecně se lépe tisknou látky s vyšší viskozitou. Porovnávána byla morfologie filamentů a architektura tištěných pórů. Použita byla komerční tiskárna *EnvisionTEC bioplotter*. Koncentrace a řada nastavení tisku byla zadána do vypracovaného algoritmu, který vyhodnotil výstupní doporučení pro počet experimentů a zúžil laditelné parametry na ty, které poskytnou výraznější změnu. Bayesovská optimalizace výrazně snížila počet potřebných experimentů (např. z 6000–10000 možností stačilo jen 19–47 pokusů). [41]

Experiment vědeckého týmu z Univerzity Saskatchewan [42] se zabýval tvorbou alginátových *scaffoldů*, které vznikají chemickým síťováním v procesu 3D tisku. Cílem bylo zjistit, jak množství a doba expozice síťovacího činidla (CaCl_2) ovlivňují elasticitu *scaffoldů*. Alginát je látka, která má spoustu vhodných vlastností pro tvorbu *scaffoldů*, ovšem není dostatečně mechanicky stabilní a směsi s jinými polymery, které by tuto kvalitu zlepšily, mohou naopak snížit jeho rozsah použití. Autoři studie pracovali s *EnvisionTEC GmbH* tiskárnou při laboratorní teplotě, tudíž hydrogelovou strukturu ovlivňovali pouze síťovací činidlem. *Scaffoldy* byly vytištěny a ponořeny do různých objemů 50 mM CaCl_2 po různou dobu (až 24hodinové intervaly). Poté byla měřena závislost viskoelastických modulů na amplitudě deformace a porovnávány elastické moduly. Pro důkladnější zkoumání morfologie byla použita rastrovací elektronová mikroskopie (SEM).

Vzorky byly ponořeny do 3 ml 50 mM CaCl_2 a hodnoty modulu pružnosti po jedné hodině vykazovaly $39,8 \pm 6,4$ kPa, po dvou hodinách $99,3 \pm 1,8$ kPa, po čtyřech hodinách tisku $153,6 \pm 16,1$ kPa a po dvaceti čtyřech hodinách $273,4 \pm 5,6$ kPa. Takže závěrem je, že s časovým odstupem je alginát více síťován a mnohonásobně se zvyšuje jeho elasticita s rostoucím množstvím Ca^{2+} iontů potřebných pro síťování. Stejný pokus proběhl i s menším množstvím roztoku CaCl_2 (1ml) a bylo potvrzeno, že elastické moduly se při stejných časových intervalech snížily. Významný rozdíl srovnání byl v elastických modulech změřených ihned po tisku, kde SEM analýza potvrdila poréznější strukturu. Mechanické vlastnosti *scaffoldů* zkoušeli předpovědět za pomoci numerických modelů. Použili lineární elastický model (*Finite Element Model* – FEM), software *ABAQUS*, kde modelovali *scaffold*. Vstupními parametry bylo Poissonovo číslo (pro alginát), experimentálně získaný elastický modul a reálné rozměry vláken a pórů. Pro oblasti větší deformace použili nelineární analytický model, který vycházel z mocninné závislosti napětí na deformaci. Modely zkombinovali a dokázali tak předpovědět reálné chování *scaffoldu* při nízkém i vysokém zatížení. Výsledky modelů se shodovaly s experimentálními výsledky, takže lze říct, že jsou využitelné a mohou pomoci optimalizovat proces. [42]

Cílem autorů publikace [43] bylo najít efektivní a méně invazivní metodu regenerace chrupavky pomocí biotisku na tiskárně 3D *Discovery*. Akutní poškození chrupavky mohou způsobit problematickou sekundární osteoartrózu. Testovali možnost vytvoření funkční chrupavky pomocí 3D biotisku indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC) v kombinaci s bioinkoustem obsahujícím nanocelulózu a alginát (NFC/A) a nanocelulózu a kyselinu hyaluronovou (NFC/HA) ke společné kultivaci s ozařovanými chondrocyty. 3D tiskem se snažili o co nejpreciznější uspořádání buněk, upravovali pouze složení směsi, ne parametry tisku. Síťování probíhalo pomocí 0,1 M CaCl_2 .

Vyšší koncentrace nanocelulózy výrazně podporovaly strukturní vlastnosti, ale ne růst buněk. Nejvhodnější podmínky pro buňky a tvorbu chrupavčité tkáně poskytl bioinkoust na bázi NFC a alginátu (v poměru 60/40 hmotnostních %), který poskytoval lepší diferenciaci buněk. Po 5 týdnech diferenciaci tvořily vzorky hyalinní chrupavku, což prokázalo histologické barvení a imunohistochemie kolagenu typu II. Po ozařování prováděli histologické analýzy, RT-PCR a pozorovali vzorky pod mikroskopem. Bylo zjištěno, že faktory jako $\text{TGF}\beta 1$, $\text{TGF}\beta 3$, GDF5 a BMP2 jsou rozhodující při produkci důležité složky matrix hyalinní chrupavky kolagen typu II, IX a XI a aggrekan 21–23. Celkově se ukázalo, že 3D biotisk iPSCs v NFC/A je vhodnou metodou pro regeneraci chrupavky, jelikož zajišťuje buněčnou podporu a povzbuzuje efektivní diferenciaci a vylepšuje biofyzikální vlastnosti *scaffoldu*. [43]

Následující studie [44] řešila proces tvorby gradientových *scaffoldů*, jelikož přirozené tkáně nejsou jednoduté a jejich složení a vlastnosti jsou v rámci tkáně proměnlivé. 3D tisk se nabízí jako precizní metoda. Pracovali s tiskárnou *3D Discovery Evolution* s koaxiálním extrudérem. Bioinkoustem byly směsi hydrogelů na bázi alginátu, želatiny a chitosanu. Gradient vznikal při plynulé změně poměru materiálů přímo během tisku, bez nutnosti měnit tiskové hlavy. Rychlost tisku nastavili na 5 mm/s, průměr trysky

410 μm a tlak 0,2–0,4 MPa. Tisk probíhal při laboratorní teplotě. Sítování vzorků bylo za pomoci CaCl_2 (20g/l) pro alginát a glutaraldehydu (25ml/l) pro želatinu a chitosan. Experimentálně zkoumali morfologii (pomocí SEM), mechanické vlastnosti, pórovitost a bobtnací schopnosti *scaffoldů*. Dle předpokladu byla zjištěna se změnou gradientu i plynulá změna struktury a s ní i změna mechanických vlastností. Například pevnost v tahu se lišila mezi vrstvami – od 4,7 MPa (chitosan/želatina) po 1,8 MPa (alginát/želatina). Pórovitost se pohybovala od 55 % do 75 %, v závislosti na složení. Vyšší koncentrace želatiny a chitosanu prokazovaly dobrou životaschopnost buněk, gradient umožňoval i jejich migraci. Výsledky tak potvrdily, že tento přístup umožňuje vytvořit funkční *scaffolds*, které se lépe přizpůsobí různým typům tkání. [44]

Z rešerše byla zvolena jako neadekvátnější metoda k tisku hydrogelů extrusivní tisk. Díky možné flexibilitě a finanční stránce byl vybrán volně modifikovatelný typ *RepRap* 3D tiskárny a standardně používaný typ trysky. Alginátové gely jsou vhodným a snadno dostupným materiálem, vykazují široké možnosti úprav, a především iontové sítování je rychlou a šetrnou metodou. Pro sítování byla nakonec použita vyšší koncentrace CaCl_2 , protože mělo docházet k míchání sítovacího činidla před tiskem a bylo potřeba zajistit efektivnější gelaci.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

- alginát sodný, čistota neuvedena (*ROTH*, CAS No. 9005-38-3)
- D-(+)-glukano- δ -lakton, čistota $\geq 99,5$ % (*Sigma-Aldrich*, CAS No. 50-99-7)
- uhličitan vápenatý, čistota ≥ 98 % (*Lach-Ner*, CAS No. 471-34-1)
- chlorid vápenatý bezvodý granulovaný, $\geq 97,8$ % p.a. (*Lach-Ner*, CAS No. 10043-52-4)
- methylenová modř

4.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

- reometr (*Discovery HR-2*, *TA Instruments*)
- geometrie
 - 20 mm deska–deska se zdrsňeným povrchem 0,2 mm – sériové číslo: 115802
 - 30 mm soustředné koncentrické nerezové válce – sériové číslo: 118102
- hustoměr (*Anton Paar*, DMA 4500)
- viskozimetr (*Anton Paar*, AMVn)
- proudová sušárna (*Ecocell 111*)
- analytické váhy (*Denver Instruments*, S-603)
- analytické váhy (*Denver Instruments*, 224A)
- magnetická míchačka (*VELP Scientifica*, *AREX Digital*)
- 3D tiskárna *GeeTech* (*Shenzhen Getech Technology Co., Ltd.*, A20T)

4.3 POUŽITÝ SOFTWARE

- *TRIOS* (*TA Instruments*)
- *MS Excel* (*Microsoft*)
- *Slicer RepetierHost V2.3.2*
- *Autodesk Fusion 360 Student*

4.4 PŘÍPRAVA ALGINÁTOVÉHO HYDROGELU

4.4.1 Přímé síťování prostřednictvím soli obsahující dvojmocné ionty kovu

V této bakalářské práci byly připraveny alginátové gely z alginátu sodného o různých hmotnostních koncentracích. Navážky čistých látek byly provedeny na analytických vahách a množství solu pro tvorbu gelu bylo dávkováno plastovou stříkačkou a odváženo.

Byl připraven 2 hm.% sol rozpuštěním 2 g alginátu sodného v 100 ml destilované vody do zásobní lahve. Alginát se vždy připravoval aspoň 24 hodin před použitím, přibližně půl dne se míchal na magnetické míchače při laboratorní teplotě a 250–300 RPM. Uchovával se v lednici. Síťování proběhlo přidáním chloridu vápenatého s molární koncentrací 0,1 M. Poměr těchto složek byl optimalizován v předešlých pracích na 5 ml solu alginátu ku 2 ml CaCl_2 . V průběhu experimentu byl tento poměr optimalizován, protože hydrogely nevstřebávaly veškeré množství vody z roztoku CaCl_2 , což by způsobilo komplikace při 3D tisku.

4.4.2 Oddálená metoda gelace s použitím D-(+)-glukano- δ -laktonu

Při této metodě byl namíchán sol stejným způsobem. Rozdílem je způsob gelace, která probíhá pomaleji a je oddálená. Alginát je smíchán s uhličitanem vápenatým s koncentrací 1–2 g uhličitanu vápenatého na litr alginátu. Uhličitan vápenatý je nerozpustný ve vodě a pro jeho lepší dispergaci v solu alginátu byl nejprve rozmíchán v malém množství destilované vody (do 0,2 ml) a poté na magnetické míchače míchán

s alginátem, dokud nevznikla homogenní směs. K alginátu je přidáván D-(+)-glukano- δ -laktón (GDL) o koncentraci 0,1mM a v molárním poměru GDL: CaCO_3 2:1. Metoda spočívá v tom, že GDL pomalu uvolňuje z CaCO_3 vápenaté ionty a ty síťují polymerní řetězce. Tyto gely vstřebávají větší množství vody, protože proces probíhá pomalu a molekuly vody se snáze uchytávají ve vznikající struktuře hydrogelu. Součástí předložené bakalářské práce bylo vybrat, která z těchto metod bude vhodnější pro 3D tisk a optimalizovat ji. [45]

4.5 MĚŘENÍ MECHANICKÝCH VLASTNOSTÍ

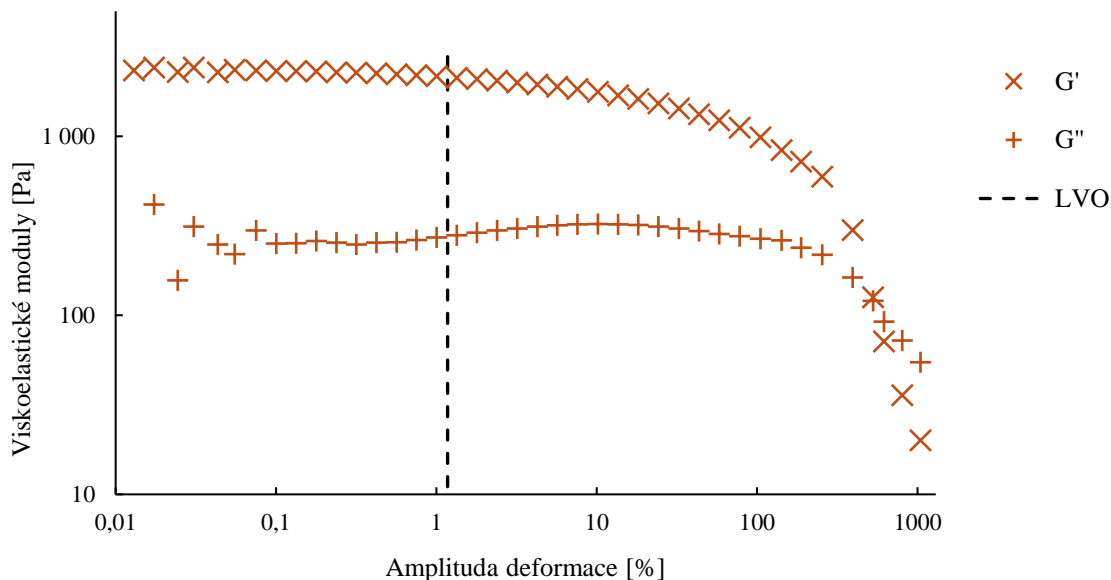
Pro zkoumání mechanických vlastností hydrogelů a jejich porovnávání je vhodným nástrojem reometrie. Měření probíhalo na reometru (*Discovery HR-2, TA Instruments*) a jednalo se o oscilační amplitudové testy s řízenou smykovou deformací a konstantní frekvencí, za použití zdrsněné geometrie deska-deska o průměru 20 mm (Obr. 1). Měření bylo realizováno vždy minimálně v duplikátu, aby byla zaručena reprodukovatelnost. V systému *TRIOS (TA Instruments)* byla nastavena výška štěrbinu vždy na 1000 μm , vzorek byl po celou dobu měřen na Peltierové desce temperované na 25 °C, doba relaxace před měřením byla nastavena na 120 s, frekvencí oscilace 1 Hz. Měření probíhalo v logaritmickém módu se vzestupnou tendencí v amplitudách deformace 0,01–1000 % s počtem 8 bodů na dekádu. Z gelu byl vyřezán celistvý plát co nejbližší výšce štěrbinu a průměru geometrie. Ten byl vložen mezi oscilační a statický senzor. Po uchycení vzorku mezi geometrie byly odstraněny přebytečné části, spuštěno měření a zaznamenávána odezva materiálu v podobě viskoelastických modulů.



Obr. 1: Ukázka měření amplitudových testů na reometru s geometrií deska–deska

Výsledky byly interpretovány pomocí grafu logaritmické závislosti paměťového a ztrátového modulu na amplitudě deformace. Byla vypočítána a graficky znázorněna lineární viskoelastická oblast (LVO). Udává rozmezí mechanického namáhání, kterému materiál odolává bez trvalé deformace nebo poškození struktury. Zjišťuje se pro další manipulaci s materiálem a výběr jeho použití. Konec této oblasti je znázorněn v grafu čárkovanou čarou kolmou na vodorovnou osu (Obr. 2). Určí se jeden modul a mezi daty se vyhledá část, kterou lze považovat za lineární a vypočítá se z ní průměr. Poté se pro jednotlivé hodnoty určí jejich odchylka od průměru. Odchylkou nad 5 % končí LVO. U alginátových gelů, které byly měřeny pro tuto práci, se amplituda deformace pro hranici LVO pohybovala mezi 1-3 % (v závislosti na koncentraci hydrogelu). Dále lze z grafu vyčíst bod křížení, kde se protíná paměťový G' a ztrátový G'' modul a značí oblast, za kterou probíhají nevratné změny struktury. Při velkých odchylkách v měření bylo provedeno

opakované měření s více vzorky o stejném způsobu přípravy. Tato měření byla statisticky zredukována pomocí Dean Dixonova testu pro hraniční hodnoty (s 95% spolehlivostí) a následně z nich počítán průměr.

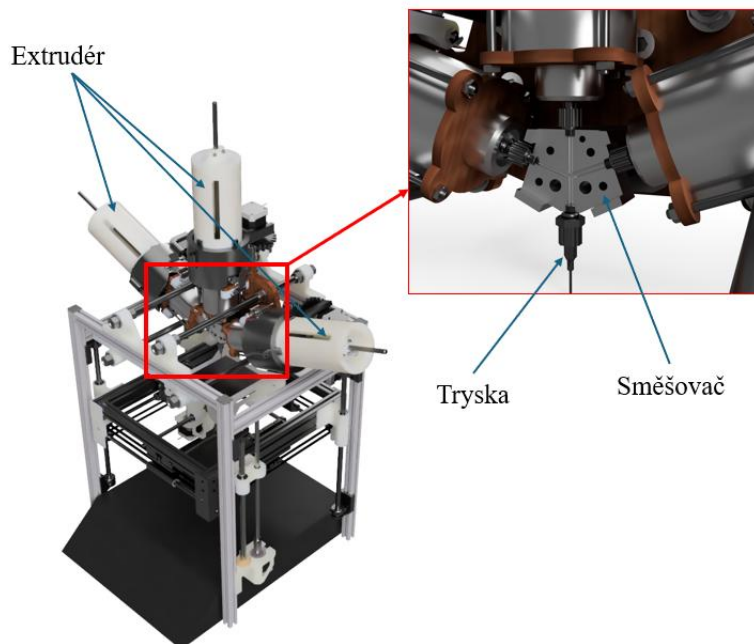


Obr. 2: Příklad vyhodnocení amplitudových testů, graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace s vyznačeným mezním bodem LVO

Na reometru bylo provedeno také měření tokových testů ve dvou soustředných válcích (30 mm), do kterých bylo nadávkováno 18 ml solu (objem alginátu, při kterém byla geometrie zaplněna, byl použit pro všechna měření). Vnější válec je statický a vnitřní rotuje, čímž zvyšuje smykovou rychlost a zaznamenává smykové napětí a dynamickou viskozitu. Měření probíhalo při laboratorní teplotě 25 °C, rozsahu smykových rychlostí 0,01–100 1/s a při 6 bodech na dekádu. Opět probíhala dvě měření a výsledky byly průměrovány. Vyhodnocením byla viskozitní křivka (závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti). Informace o vlastnostech solu při mechanickém namáhání byla klíčová pro následnou práci s tiskárnou a nastavení počáteční rychlosti vytlačování solu ze zásobníků a rychlosti tisku.

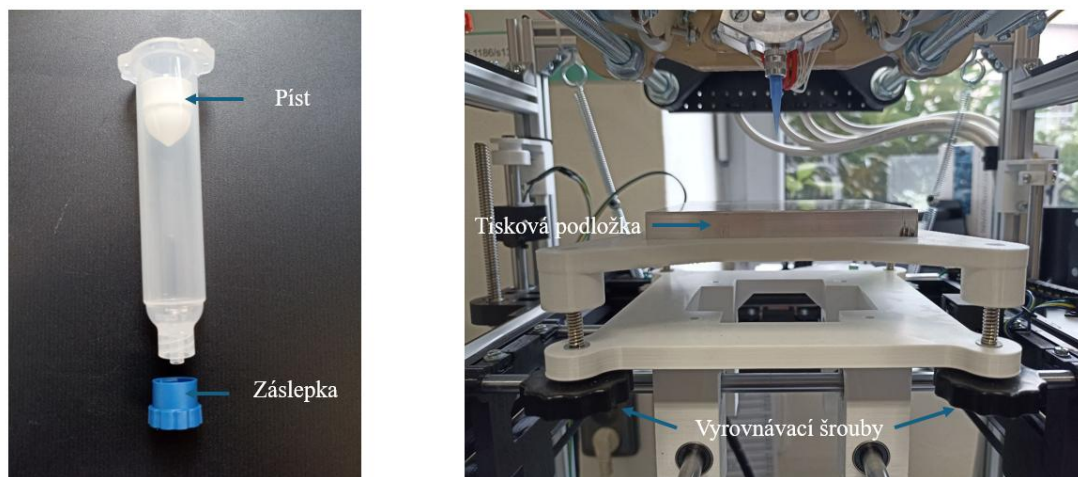
4.6 PRÁCE S 3D TISKÁRNOU

Pro 3D tisk hydrogelů byla zvolena RepRap tiskárna GeeTech A20T, která slouží k tisku plastových filamentů a bylo nutné ji modifikovat. Výběr tiskárny podpořila nízká cena a především vhodný firmware (založený na Marlinu, což je open source software, který řídí veškeré funkce tiskárny a je vhodný pro tiskárny pracující na systému Arduino). Vizí do budoucna je tisk gradientových gelů, takže byla potřeba tiskárna, která je schopna míchat směsi z jednotlivých extrudérů současně a tisknout je v různých poměrech. Tato tiskárna má nosnou konstrukci pro 3 extrudéry, momentálně se pracovalo se dvěma, ovšem opět to zvyšuje možnosti následného využití (Obr. 3).



Obr. 3: Model 3D tiskárny s přiblíženým pohledem na směšovač

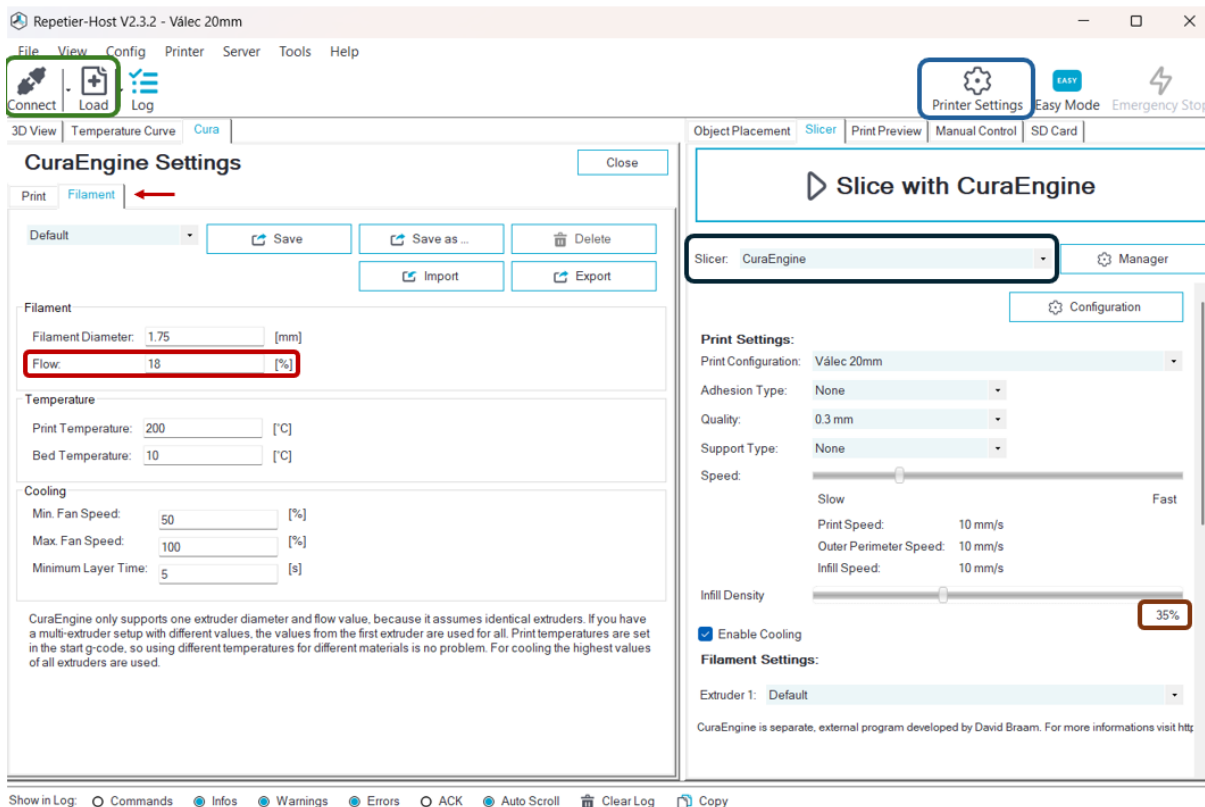
Tiskárna byla přestavována na Fakultě chemické v laboratoři Bioplastů. Byla vyměněna velká část *hardware*, ale do *firmware* nebylo zasahováno. Pro dávkování gelu byly jako zásobník použity EFD kartuše 10 ml. Kartuše byly zasazeny do topné fólie (12 V, 5 W). Každý zásobník může být samostatně vyhříván až na 80 °C (např. pro tisk fyzikálně síťovaných gelů změnou teploty). Pohon extrudéru byl vyměněn z původního krokového motoru na motor bez mechanického uchycení s průchozím trapézovým šroubem TR8. Pro mísení jednotlivých složek byl navržen hliníkový směšovač s možností vyhřívání dvojicí topných patron (12 V) do 80 °C. Směšovač pracuje s jednoduchým mísením 3 proudů. Při používání pouze 2 extrudérů je do třetího zasazena slepá kartuše a přívod do směšovače ucpán. Z něj jde směs ihned do polypropylenové trysky o průměru 0,4 mm. Tisková podložka je hliníková, lze ručně manipulovat s vyrovnávacími šrouby (Obr. 4).



Obr. 4: Fotografie zásobníku materiálů (vlevo) a tiskové podložky

Tiskárnu je možné ovládat přes ovládací panel. Dále lze nastavit požadovanou teplotu pro extrudéry a směšovač. Chlazení tiskárna aktuálně neumožňuje, na laboratorní teplotu se extrudéry chladí kartužemi se studenou vodou. Pro samotný tisk je tiskárna připojená přes USB k počítači a ovládána *software RepetierHost V2.3.2*, který provádí *slicing*, umožňuje kalibraci a zároveň je komunikačním kanálem k tiskárně. Díky tomu se dají měnit parametry tisku v průběhu. Byl použit integrovaný *slicer CuraEngine*, nicméně tento *software* podporuje i další jako *PrusaSlicer* a *Slic3r*. 3D modely jsou nahrávány ve formátu STL, mohou být vytvořeny v libovolném CADu. Používali jsme *Fusion 360*.

Po spuštění programu *RepetierHost* je potřeba spojit *software* s tiskárnou a nahrát požadovaný objekt (levý horní roh *Connect* a *Load file*, Obr. 5). Prvotní nastavení je provedeno v záložce *Printer Settings* → Extrudér (pravý horní roh, Obr. 5) kde se nastavuje průměr trysky (*diameter*). Parametry, které zde nebudou zmíněny byly ponechány beze změny dle přednastavených hodnot. Dále už se pracuje se *slicer*, kde se konfigurují podrobnější parametry tisku pro daný objekt. Vpravo nahoře je záložka *Slicer*, kde se vybírá daný typ. Přes *Configuration* se otevře *CuraEngine Settings* se dvěma 2 záložkami: *Print* a *Filament* (Obr. 5). V záložce *Filament* byla většina parametrů neměněna. Experimentálně byl odvozen parametr *Flow*. Tímto má tiskárna napočítané, kolik filamentu vytlačí pohyb na krokovém motoru. Jelikož byly změněny i motory extrudérů i materiál, byl parametr *Flow* pokusem stanoven na 18 %. Nastavení *Temperature* zůstalo neměnné. *Firmware* tiskárně umožňuje tisknout pouze, když je vyhřívána na 200 °C. Nebylo v plánu ho přeprogramovat, takže aby se tiskárna nezačala vyhřívat, byl přidán dodatečný odpor k teplotním článkům.



Obr. 5: Program RepetierHost s nastavenými hodnotami

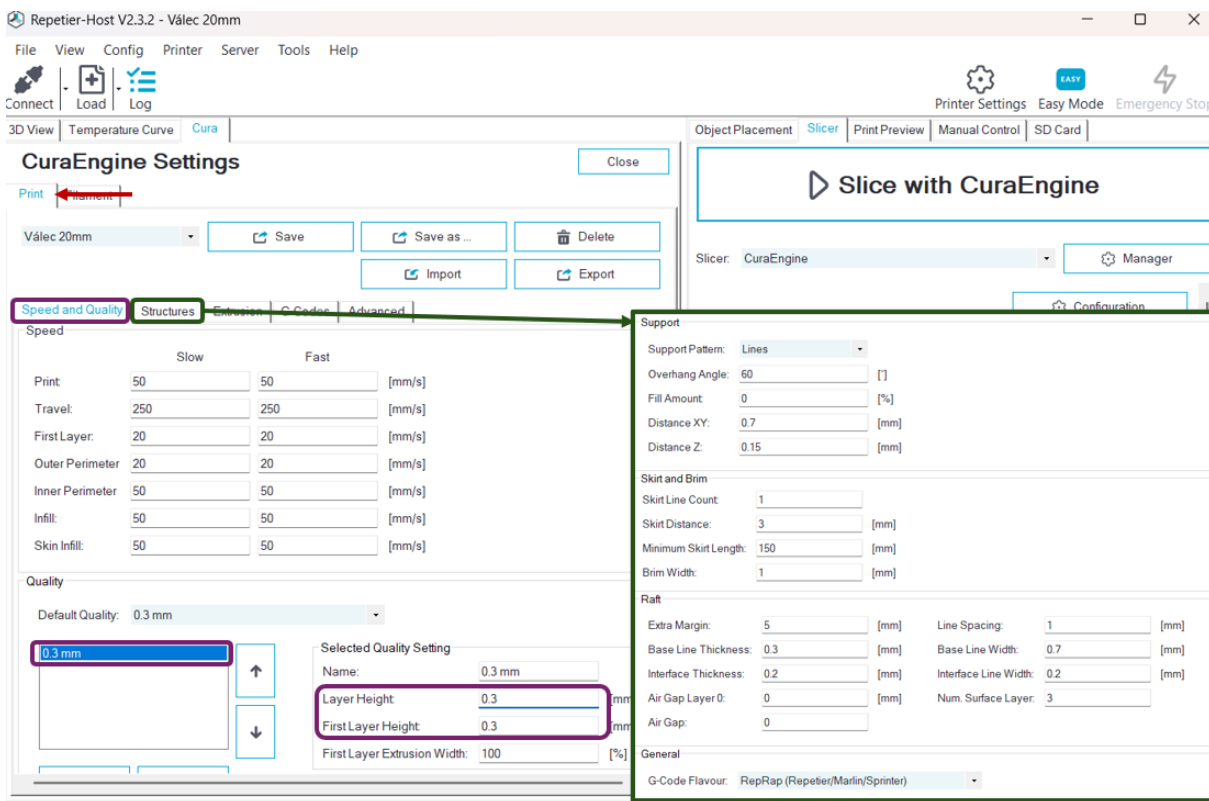
Na listu *Print* je několik záložek. Ve *Speed and Quality* je důležité dávat pozor na *Default Quality* a výšku vrstvy, která musí být menší než průměr trysky (Obr. 6). V záložce *Structures* byla použita *Skirt line*, což je

několik čar kolem výtisku, které nejsou součástí samotného objektu. Je to z důvodu ustálení koncentrací a tlaku v systému.

Při zasazení zásobníků a jejich opáření extrudéry je potřeba manuálně pootočit šnekový píst, dokud látka nevyteče z trysky, aby se ověřil bezproblémový průchod. Takže před tiskem objektu není ve směšovači koncentrace v požadovaném poměru a musí se teprve ustálit. *Raft*, který slouží jako podpůrná síťová struktura pod modelem pro zajištění optimální přilnavosti první vrstvy k podložce a stabilizaci tisku, nebyl použit.

V záložce *Extrusion* je vypnutá *Retraction* (dočasná zadrž a hystereze), která pomáhá při přesunu hlavy s tryskou na další vrstvu a malým poklesem tlaku nasaje trochu materiálu a tisknout začne opět až na správném místě. Funguje dobře u plastových filamentů, ale u hydrogelových materiálů pracuje s jinými tlaky a hysterezí, takže spíš působí komplikace. Záložky *G-codes* a *Advanced* nebyly měněny.

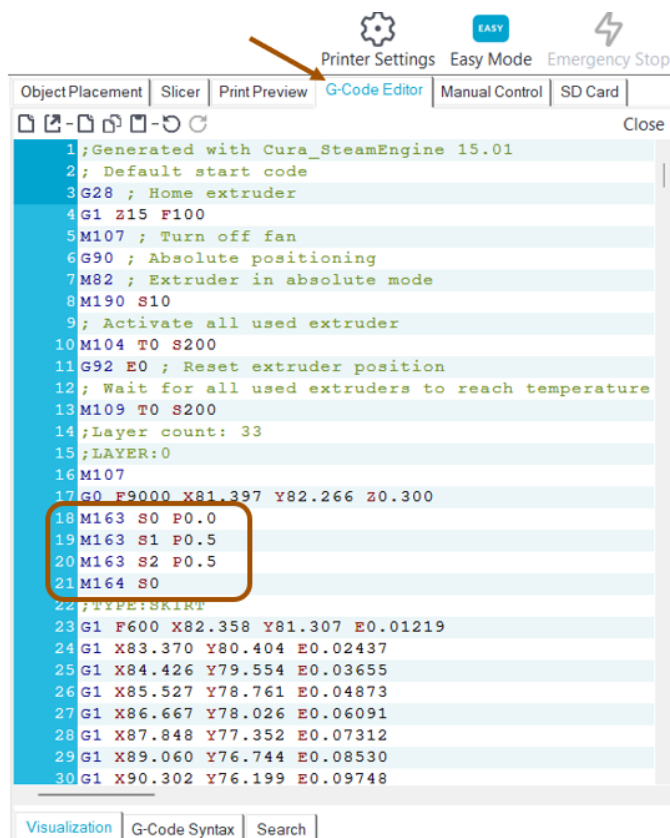
V pravém panelu v záložce *Slicer* je potřeba už jenom nastavit *Print Settings* (Obr. 5). *Speed* (rychlost tisku) není konstantní v průběhu tisku a mění se dle potřeby. V základním nastavení je 10 mm/s. *Infill Density* (hustota výplně) nejlépe tiskla při 35 %, jelikož gelové materiály se mírně roztékají a slévají než kompletně zesítují. Po tomto nastavení je použito tlačítko *Slice with CuraEngine* a systém v závislosti na nastavených parametrech rozdělí objekt na vrstvy a vygeneruje G-kód pro tiskárnu. *Print Preview* poskytuje informace uživateli o době tisku, počtu vrstev apod.



Obr. 6: Program RepetierHost s nastavenými hodnotami

G-kód byl editován v záložce *G-Code Editor*. U alginátových gelů byly použity dva extrudéry a pilotní experimenty probíhaly s mícháním v objemovém poměru 1:1. Na Obr. 7 je vyznačena dopsaná kódová sekvence, v níž je možné zvolit poměrové zastoupení složek. Záložka *Manual Control* potom umožňuje

nastavit *Home position*, pohyby tiskové platformy a základní manipulaci s tiskárnou, kterou najdeme i na ovládacím panelu.



```
1;Generated with Cura_SteamEngine 15.01
2; Default start code
3G28 ; Home extruder
4G1 Z15 F100
5M107 ; Turn off fan
6G90 ; Absolute positioning
7M82 ; Extruder in absolute mode
8M190 S10
9; Activate all used extruder
10M104 T0 S200
11G92 E0 ; Reset extruder position
12; Wait for all used extruders to reach temperature
13M109 T0 S200
14;Layer count: 33
15;LAYER:0
16M107
17G0 F9000 X81.397 Y82.266 Z0.300
18M163 S0 P0.0
19M163 S1 P0.5
20M163 S2 P0.5
21M164 S0
22;TYPE:SKIRT
23G1 F600 X82.358 Y81.307 E0.01219
24G1 X83.370 Y80.404 E0.02437
25G1 X84.426 Y79.554 E0.03655
26G1 X85.527 Y78.761 E0.04873
27G1 X86.667 Y78.026 E0.06091
28G1 X87.848 Y77.352 E0.07312
29G1 X89.060 Y76.744 E0.08530
30G1 X90.302 Y76.199 E0.09748
```

Obr. 7: G-kód s dopsanou kódovou sekvencí (běží 2 extrudéry ze tří a na 50 % výkon)

Tímto je připravený *software* pro tisk a optimalizace jeho parametrů. Používané koncentrace složek a jejich příprava bude popsána níže v sekci 5.3 Optimalizace 3D tisku. Tisk probíhal za použití oddálené metody gelace alginátu sodného s uhličitánem vápenatým a GDL v destilované vodě. Zásobníky materiálů byly vždy naplněny na 10 ml. Jsou to plastové kartuše, které se ze spodní strany zajistí modrou záslepkou, aby se dobře plnily (Obr. 4). Do kartuší je nadávkována látka a musí se v horní části očistit. Poté je velmi pomalu stlačena bílým pístem tak, aby v zásobníku vznikl podtlak. Zásobník se otočí záslepkou nahoru a ta se oddělá. Píst se dál stlačuje zespodu, dokud nedostaneme ze zásobníku všechen vzduch. Správné nadávkování zásobníku je v případě, že látka neprotéká kolem pístu. V opačném případě je potřeba nadávkovat znovu nebo může být manuálně opotřebovaný píst a je potřeba jej vyměnit. Zásobníky, píсты, trysky a záslepky jsou navrženy jako jednorázový materiál, ale jsou recyklovatelné a použitelné, dokud na nich není známka mechanického poškození. Nejrychleji se opotřebovávají píсты.

Jakmile je zásobník naplněn, odstraní se záslepka a může se vložit do komory pro zásobník (Obr. 8). Opatří se extrudérem a po zajištění je nutné provést kontrolu správného upevnění (gel nikde neprotéká) a bezproblémový průchod směšovačem a tryskou. Na vrchní části extruderu se dá manuálně pohybovat pístem. Je třeba utahovat šroubovici do té doby, než látka poteče z trysky. To samé se musí provést i s druhým zásobníkem a extrudérem. Protože bylo velmi obtížné odlišit, zda z trysky vytéká mléčně bílý gel (způsobeno uhličitánem vápenatým) nebo průhledná voda s GDL, byla k roztoku GDL přidávána methylenová modř. Nejprve bylo laboratorně ověřeno, že nereaguje se složkami. Methylenová modř hodně barví, tudíž jí bylo přidáváno velmi malé množství (přibližně 0,005 g do 10 ml roztoku s GDL) pouze

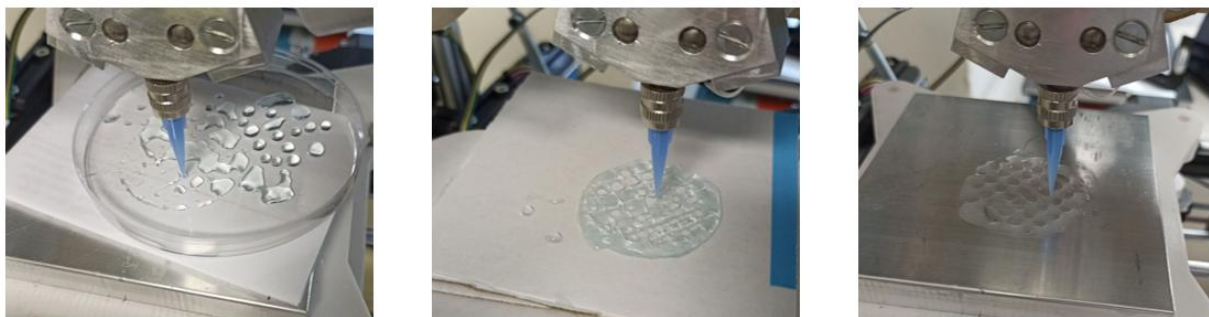
pro vizualizaci, zdali je výsledný výtisk opravdu směsí obou látek. Hlavním problémem při tisku bylo zjistit, jakým způsobem a jak kvalitně se míchají látky ve směšovači. GDL je sloučenina, která s časovým odstupem rychle degraduje. Bylo potřeba pracovat precizně a rychle. Jakmile se alginát s GDL střetnou ve směšovači při kontrole průtoku, tak začíná docházet k pomalé gelaci. V ideálním případě je nutné mít nastavení softwaru a vše připravené, aby bylo možné po zajištění zásobníků ihned tisknout. Mohlo by se stát, že s velkou časovou prodlevou se směšovač ucpe ještě před tiskem. Po spuštění tisku tato část gelu, který byl použit na kontrolu průtoku systémem, není problémová, protože se odstraní při tisku *Skirt line* (zkušební vrstva okolo objektu), kde se ustálí koncentrace a objekt už je tištěný podle výchozího nastavení.



Obr. 8: Zásobník se nejprve vloží do tiskové komory (vlevo). Poté se nasadí extrudér povolený na minimum a následně se postupně přitahuje tak, aby došlo ke kontaktu šnekového mechanismu s pístem (uprostřed). Nakonec je systém zajištěn pomocí stabilizační objímky (vpravo).

4.6.1 Optimalizace tiskové platformy

Ideální výška trysky je přibližně 0,5–1,0 mm nad povrchem tiskové podložky a zároveň nesmí být výše, než je průměr trysky, jak již bylo zmíněno. Při počátečních pokusech jsme experimentovali s různými povrchy tisku. U plastových i skleněných Petriho misek docházelo k tomu, že gel nebyl schopen dobře přilnout a špička trysky ho tahala po povrchu. Nejlépe držel na kartonu, pravděpodobně kvůli drsnějšímu povrchu. Na hliníkové tiskové podložce držel gel lépe než na Petriho misce, takže jsme pokračovali s tiskem přímo na ní (Obr. 9). Nicméně i při optimalizaci poměrů a koncentrací se první vrstva roztékala výrazněji než vrstvy následující a gelovala moc pomalu. Vyzkoušeli jsme potřít před tiskem tiskovou podložku 0,1 M CaCl_2 , aby rychleji zasíťovala a další vrstvy měly pevný základ. Další výtisky měly ostřejší okraje.



Obr. 9: Zkouška tisku na různé povrchy (Petriho miska, karton, hliníková podložka)

Při tisku je komplikací doba prodlení gelace materiálu, která by udržela další vrstvy tisku. S konstantní experimentálně zjištěnou průměrnou rychlostí tisku první vrstvy nestíhají zesítovat a tlakem dalších vrstev se rozlévají. Poslední vrstvy, které se dobře přichytávají k hydrogelu pod nimi, síťují poměrně rychle v kompaktní gel a neprobíhá efektivně gelace na podložce, která dotváří jednotlivý objekt. Z toho vyplývá, že se musí měnit parametry v průběhu tisku. Ponechali jsme konstantní směšovací poměry (ALG+CaCO₃:GDL = 1:1), laboratorní teplotu, stejné koncentrace látek i průměr trysky a měnili pouze parametr *Flow rate* a *Speed*.

U prvních 2–3 vrstev byla snaha co nejvíc urychlit gelaci. Zvýšením parametru *Flow rate* (množství materiálu vytlačovaného extrudérem do směšovače) jsme přesytili systém oběma složkami, takže byl donucen k rychlejšímu síťování. *Flow rate* 100 % znamená standardní napočítaný tok materiálu pro nastavenou výšku vrstvy. My jsme se pohybovali u hodnoty 300 %. Naopak rychlost tisku byla snížena třeba na 80 % (takže 80% rychlosti výchozího nastavení 10 mm/min), aby se první vrstvy lépe přichytávaly k povrchu a tryska je při tisku tolik nerozmažávala. Tím bylo dosaženo kvalitnější základní vrstvy, která se neroztékala při tisku následujících. Po těchto pár vrstvách je možné začít snižovat *Flow rate* na původních 100 % a zvyšovat rychlost tisku (na 250–300 %). Je potřeba pozorovat tisk a měnit dle potřeby. Když tryska začne strhávat zesítované oblasti, je potřeba urychlit tisk. Pokud gel tuhne moc pomalu, zvýší se *Flow rate*. Lze dělat i velké skokové rozdíly při změně, klidně o 100 %, systém většinu času stíhá reagovat. Po ukončení tisku se vzorek nechá pár minut v klidu na podložce (stačí 10 minut), aby se v něm dostatečně ustálila struktura a poté jde špachtlí jednoduše sundat z hliníkové podložky.

Po každém tisku se musí tiskárna ihned vyčistit, protože spolu látky uvnitř celého systému neustále reagují a po kompletním zesítování ve směšovači se musí celý rozebrat. Prvním krokem čištění je umístění odpadní nádoby pod trysku a vyndání zásobníků. Do dvou ze tří komor se umístí slepé kartuše, a do třetí zásobník s destilovanou vodou. Není potřeba zapínat tiskárnu, ručně lze stlačovat píst a pročistí se tímto způsobem každá z přívodových drah do směšovače (minimálně dvakrát). Zároveň se částečně pročistí sám směšovač a tryska. Tu je možné také odšroubovat a promýt. Zbytky gelu se z ní odstraní dobře pomocí tenké jehly. Pro další tisk se nemusí směšovač kompletně vysoušet.

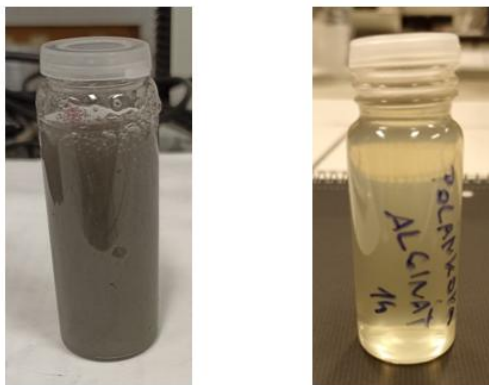
5 DISKUZE A VÝSLEDKY

Experimentům s 3D tiskárnou a optimalizací parametrů předcházely experimenty pro vyladění vhodné konstrukce a materiálů pro hardwarové vybavení tiskárny. Z tohoto důvodu se zkoumaly reologické vlastnosti alginátových gelů a jejich kompatibilita s materiálem, z něhož byly navrženy součástky 3D tiskárny. Zásobníky a trysky jsou z polypropylenu, což je materiál neinteragující s těmito gely [46]. Účelem tiskárny je možnost tisku různých hydrogelů, tudíž i různé způsoby síťování. Mezi ně patří i tepelně indukovaná gelace (např. agaróza). Komory pro zásobníky byly upraveny pro vyhřívání a s tím se pojilo zajistit vyhřívání směšovače. Nejedná se o komerční součást, byla specificky konstruována pro používaný typ tiskárny. Navrhovaným materiálem byl hliník, především kvůli výborným tepelným vlastnostem a jeho dostupnosti a bezproblémové manipulaci. Hliník může na svém povrchu za určitých podmínek uvolňovat ionty Al^{3+} , které mají vysokou schopnost iniciovat iontovou gelaci alginátu (dokonce výrazněji než běžně používané dvoumocné ionty, například Ca^{2+}). Z tohoto důvodu bylo nutné ověřit jeho možný vliv na síťování alginátu. Hliník tvoří kubickou strukturu a za normálních podmínek (neutrálním nebo mírně kyselém prostředí) ionty neuvolňuje a chrání se proti korozi vrstvou oxidu hlinitého. Sol alginátu je slabě kyselý, takže byl navržen ověřovací experiment, pro potvrzení této hypotézy [47].

5.1 KOMPATIBILITA HLINÍKOVÉHO SMĚŠOVAČE S ALGINÁTOVÝMI GELY

Předpokládaná maximální doba setrvání solu ve směšovači, než dojde k jeho tisku, byla stanovena na 5 minut (dle dráhy průchodu a předpokládané rychlosti tisku z rešerše). Pokud by docházelo k iontové gelaci hlinitými ionty, musela by se nutně měnit i viskozita solu. Zvolenou metodou bylo reologické měření tokových testů a tím pádem stanovení viskozity. Model směšovače představovala hliníková odpařovací miska. Proudění ve směšovači bylo simulováno na magnetické míchačce pomocí míchadla za nízkých otáček (150 RPM) při laboratorní teplotě. Porovnávány byly celkem 4 vzorky: samotný sol 2% alginátu sodného, sol 2% alginátu sodného míchaný v hliníkové nádobě v intervalu 5 minut, 1 hodinu a 24 hodin. Cílem bylo zjistit rozdíl viskozity vzorků při konstantně rostoucí smykové rychlosti.

Při prvním pozorování bylo možné vidět rozdíly mezi vzorky. Sol vystaven nejdelší expozici hliníku se zabarvil do šeda, jak můžeme pozorovat na fotografii (Obr. 10). První graf ukazuje, že viskozita všech vzorků klesá s rostoucí smykovou rychlostí, což je typické chování pro pseudoplastické látky (Obr. 11).

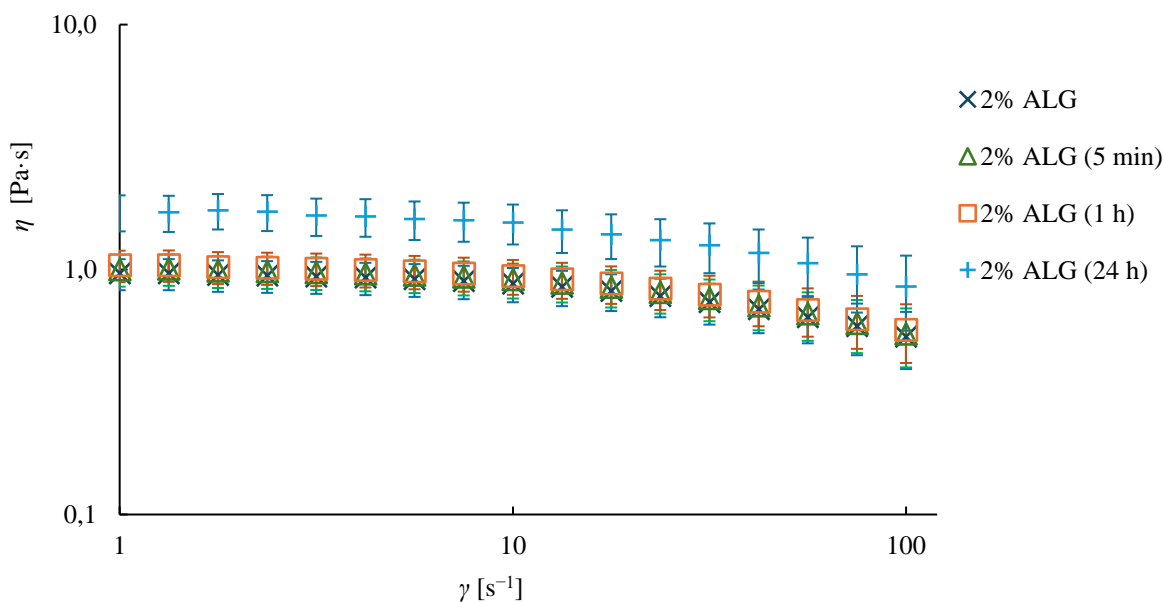


Obr. 10: Vzorek alginátu po expozici hliníku (vlevo po dobu 24 hodin a vpravo 1 hodinu)

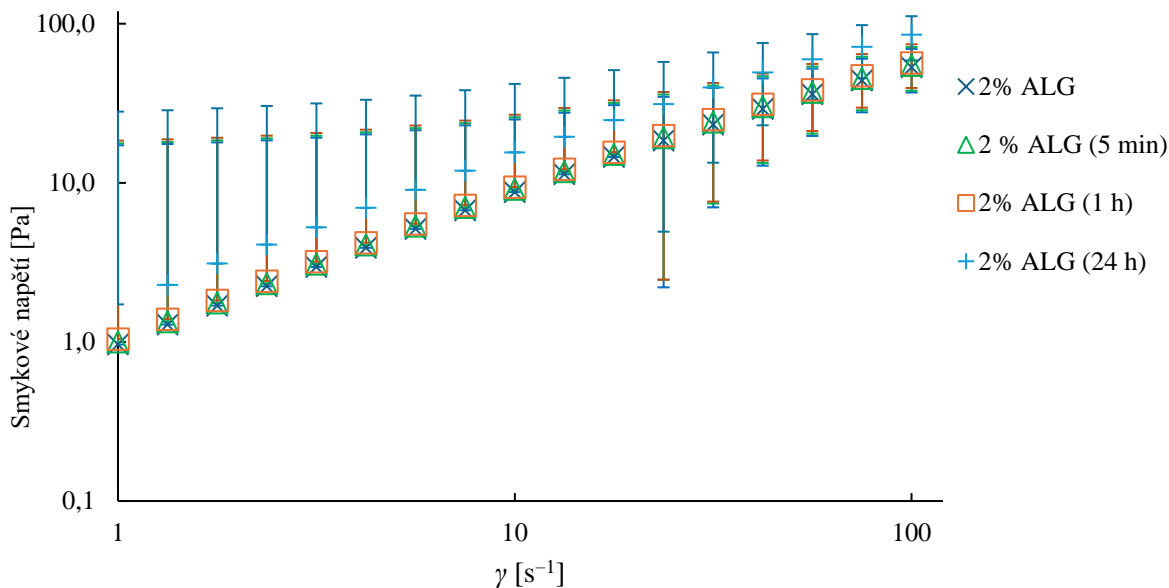
Vzorek míchaný 24 hodin v hliníkové misce, vykazuje vyšší viskozitu než ostatní vzorky, což naznačuje změnu vnitřní struktury po delším kontaktu s hliníkovým povrchem. Vzorky ALG (5 min) a ALG (1 h) jsou viskozitně téměř identické se samotným ALG bez kontaktu s hliníkem, což ukazuje, že během prvních 5 minut ani po 1 hodině nedochází k významné změně viskozity. Rozdíly byly minimální a v rámci odchylek

měření. Viskozita se u nich pohybuje v nižších smykových rychlostech okolo 1 Pa·s se směrodatnou odchylkou 0,14 Pa·s (Obr. 11). Smykové napětí ukazuje podobný trend, kdy vzorek s nejvyšší expozicí hliníku vykazuje vyšší hodnoty (Obr. 12).

Míchání vzorku 24 hodin v hliníkové misce pravděpodobně umožnilo uvolnění stopových množství hliníkových iontů, které reagovaly s alginátem sodným. To bylo pravděpodobně způsobeno mechanickou prací míchadla než samovolným uvolňováním iontů. Z toho vyplývá, že během 5 minut setrvání solu ve směšovači k významné gelaci nedochází, a tudíž není struktura výsledného hydrogelu ovlivněna – což bylo cílem ověřit. Z hlediska aplikace je výsledek pozitivní: sol zůstává zpracovatelný v potřebném časovém rámci.



Obr. 11: Graf závislosti viskozity vzorků solu alginátu na rostoucí smykové rychlosti



Obr. 12: Graf závislosti smykového napětí vzorků solu alginátu na rostoucí smykové rychlosti

5.2 ÚPRAVA METOD GELACE PŘED TISKEM

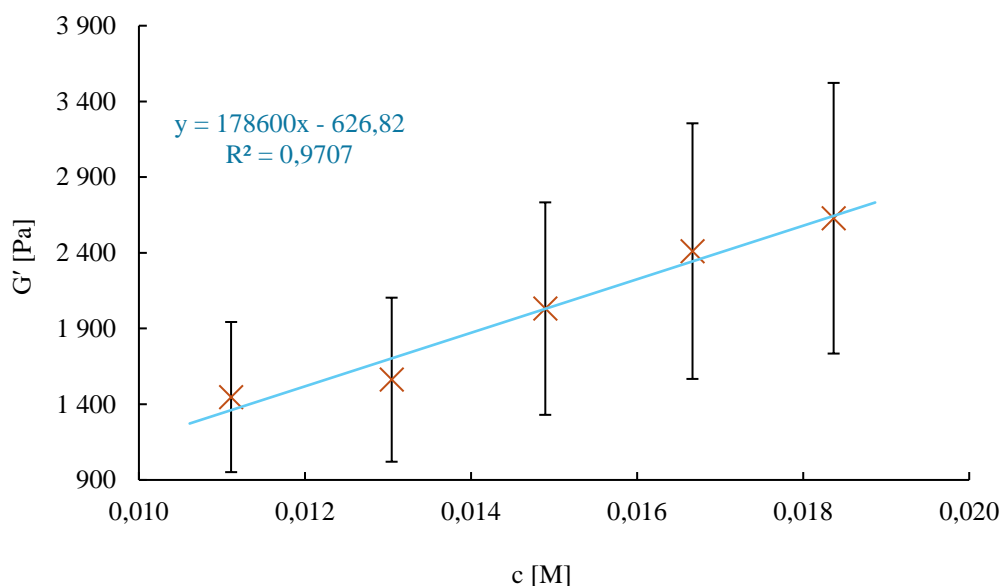
K dispozici se nabízí dvě metody síťování alginátu sodného, a to metodou vnější (0) a vnitřní (4.4.1) gelace. Pokud bychom měli porovnat tyto gely, tak při síťování chloridem vápenatým metodou vnější gelace obecně vznikají hydrogely s mnohem vyššími viskoelastickými moduly než gely tvořené metodou vnitřní gelace pomocí $CaCO_3$ a GDL. Ovšem tyto vnitřně síťované hydrogely vykazují rychlejší gelační dobu (při konstantní doporučené koncentraci 0,1 M $CaCl_2$ v poměru 2 ml ku 5 ml solu alginátu) [45]. Také se agregují do kompaktního shluku sférických tvarů, který do své struktury nepojme všechno množství vody z roztoku chloridu vápenatého. Tohle by byla velká komplikace při 3D tisku. Protože tyto hydrogely vykazují vyšší viskoelastické moduly, byl navržen pokus pro optimalizaci množství 0,1 M $CaCl_2$. Cílem bylo zjistit nejmenší množství chloridu vápenatého, při němž dojde ke gelaci v celém objemu bez zbytkové vody. Pracovalo se s 2% alginátem sodným. Sadou systematických pokusů byl nalezen poměr, při kterém hydrogely nevykazovaly synerezi.

Bylo připraveno 12 vzorků o 4 ml 2% alginátu s přidavkem 0,5 až 1,6 ml 0,1 M $CaCl_2$ s krokem 0,1 ml do mikrotitrační destičky (Obr. 13). Všechny vzorky byly v jamce krátce promíchány špachtlí. Z této řady vzorků byly vybrány pro sestavení kalibrační křivky pouze ty, které kompletně zgelovaly v celém objemu bez přebytečné vody. Byly to gely s přidavkem 0,5–0,9 ml $CaCl_2$. Zkušební gel s 0,4 ml $CaCl_2$ netvořil stabilní síť a vzorek s 1 ml $CaCl_2$ zanechával malé množství vody na dně mikrotitrační destičky. Z toho důvodu byly z dalšího testování vyloučeny.



Obr. 13: Mikrotitrační destička se vzorky alginátu s různým přidavkem sířovicího činidla

Zmíněných 5 vybraných vzorků bylo podrobena amplitudovým testům na reometru. Pro každou koncentraci byla provedena minimálně 4 měření. Aby se předešlo chybě, byly naměřené hodnoty elastických modulů zpracovány Dean Dixonovým testem, který eliminoval odlehle hodnoty. Pro každou koncentraci byla určena lineární viskoelastická oblast a z ní průměrováno prvních 10 hodnot. Tyto hodnoty elastického modulu byly použity pro sestavení kalibrační křivky závislosti elastického modulu na výsledné koncentraci hydrogelu (Obr. 14). Hmotnostní koncentrace alginátu byla přepočtena na molární koncentraci, v níž je započítán objem vody z roztoku chloridu vápenatého.



Obr. 14: Kalibrační křivka závislosti elastického modulu na koncentraci hydrogelu

Tato kalibrační křivka byla vytvořena pro případné porovnání gelů z 3D tiskárny. Plánované bylo vyzkoušet obě metody gelace, tudíž tímto byla optimalizována metoda vnitřní gelace. Metoda oddálená

se ukazovala jako vhodnější z hlediska preciznějšího a pomalejšího síťování v celém objemu a vytváří čiré a průhledné gely.

5.3 OPTIMALIZACE 3D TISKU

V úvodním experimentu byly optimalizovány tiskové parametry *Flow* a *Speed* pro extruzi 2% hm. roztoku alginátu sodného. Tisk byl proveden za laboratorních podmínek ze standardního zásobníku přímo do Petriho misky obsahující 0,1 M roztok chloridu vápenatého, který sloužil jako síťovací činidlo, výška hladiny v Petriho misce činila 2 mm. Cílem tohoto kroku bylo ověřit průchodnost materiálu celým systémem a potvrdit funkčnost tiskového zařízení. Během pozorování bylo patrné, že gelace probíhá bezprostředně po kontaktu s CaCl_2 , přičemž za tiskovou hlavicí bylo možné sledovat tvorbu souvislých vláken gelu, což potvrzuje účinnou iontovou gelaci.

Ve druhé fázi byl testován způsob simultánního dávkování síťovacího činidla prostřednictvím dvou zásobníků a míchání komponent ve statickém směšovači. Pro síťování byl použit 2% roztok alginátu sodného, přičemž koncentrace chloridu vápenatého byla stanovena na 0,015 M dle předchozí kalibrační křivky. Experiment však vedl k předčasné gelaci přímo ve směšovacím systému, což vedlo k jeho ucpání a znemožnění další extruze materiálu. V důsledku gelace došlo k zanesení směšovače, který nebylo možné vyčistit pouhým propláchnutím vodou, a bylo nutné jej demontovat a vyčistit manuálně. Na základě těchto zjištění bylo následně od simultánního míchání upuštěno a v dalších experimentech byla použita oddálená metoda.

Na základě předchozích experimentů s alginátem sodným byla pro pilotní tiskové experimenty zvolena koncentrace 2,5 %, a to z důvodu, že při oddálené metodě síťování dochází ke vzniku hydrogelů s nižšími viskoelastickými vlastnostmi. Vyšší počáteční koncentrace solu tak měla zajistit dostatečnou mechanickou integritu výsledného gelu i po očekávaném zředění (1:1) během síťovacího procesu. Tato koncentrace byla současně stanovena jako maximální, se kterou bude během dalších experimentů v systému pracováno (s ohledem na viskozitu, průměr trysky a viskoelastické vlastnosti zkoumaných koncentrací). Před zahájením experimentu byly nastaveny výchozí tiskové parametry uvedené v kapitole (0).

V prvním pokusu s oddáleným dávkováním síťovacích složek byl jeden ze zásobníků naplněn 2,5% roztokem alginátu sodného obsahujícím uhličitan vápenatý v koncentraci 1 g/l solu. Druhý zásobník obsahoval roztok GDL v koncentraci 17,8 g/l, odpovídající stechiometrickému poměru $\text{GDL}:\text{CaCO}_3 = 1:2$. Komponenty byly smíchávány ve statickém směšovači v objemovém poměru 1 ml roztoku GDL na 4 ml alginátového roztoku.

Během tisku bylo na začátku pozorováno pouze vytlačování vysoce viskózní kapaliny, která morfologicky odpovídala solu alginátu sodného, bez známek tvorby koherentního hydrogelu bez zjevných známek gelace. Následně došlo k úplnému zastavení tisku. Analýza systému odhalila proběhlou gelaci uvnitř směšovače i zpětný tok roztoku GDL směrem k jeho zásobníku. Za pravděpodobnou příčinu byla identifikována výrazná rozdílnost viskozit obou složek – alginátový roztok s vyšší viskozitou a větším objemovým průtokem pravděpodobně vytlačoval méně viskózní GDL proti směru proudění, čímž došlo k porušení funkce směšování a předčasné gelaci v systému.

Na základě předchozího experimentu byl upraven směšovací poměr mezi alginátovým solem a roztokem GDL z původního objemového poměru 4:1 na 1:1, přičemž koncentrace obou složek zůstaly zachovány. Výsledný gel vykazoval pouze viskózní kapkovité formace bez dostatečné míry gelace. Za účelem zvýšení stupně zesíťování bylo proto navýšeno množství uhličitanu vápenatého v alginátovém roztoku na 1,5 g/l při zachování molárního poměru $\text{GDL}:\text{CaCO}_3 = 1:2$, což vedlo i ke zvýšení koncentrace GDL. Nicméně výsledný hydrogel byl i nadále relativně tekutý a nevykazoval požadovanou mechanickou integritu.

Proto bylo přistoupeno k navýšení koncentrace alginátu sodného (3 %) za jinak identických podmínek (1,5 g CaCO₃/l, GDL:CaCO₃ = 1:2, směšovací poměr 1:1). Tento roztok však vykazoval příliš vysokou viskozitu a nebylo možné jej vytlačit skrze tiskovou trysku. Proto byla opět zvolena 2,5% koncentrace alginátu, přičemž byl experimentálně zkoumán vliv zrychlení gelace pomocí úpravy poměru síťovacích složek.

Za zásadní problém se ukázala nemožnost kontroly účinnosti směšování ve statickém směšovači. Alginátový roztok s dispergovaným uhličitánem vápenatým má bělavé zabarvení, zatímco roztok GDL je čirý a bezbarvý, což ztěžuje ověření jejich skutečného promíchání. Tisknuté vzorky zároveň nevykazovaly dostatečnou soudržnost, aby bylo možné je podrobit dalšímu hodnocení.

Za účelem rychlé vizualizace směšování byl do roztoku GDL přidán barvicí marker – methylenová modř. V laboratorních podmínkách bylo ověřeno, že přírůstek methylenové modři neovlivňuje kvalitu síťování ani čas gelace a díky své výrazné barvě umožňuje jednoduché rozpoznání, zda z trysky vytéká směs obou složek, nebo pouze samotný alginát.

Při zachování směšovacího poměru 1:1 (alginát:GDL) byly dále testovány různé poměry GDL:CaCO₃, konkrétně 3:1 a 10:1, které však stále nevedly k dostatečné gelaci. Až při poměru 20:1, při současném zvýšení množství CaCO₃ na 2 g/l v alginátovém roztoku, bylo dosaženo gelu, který vizuálně odpovídal hydrogelům připraveným standardní laboratorní metodou.

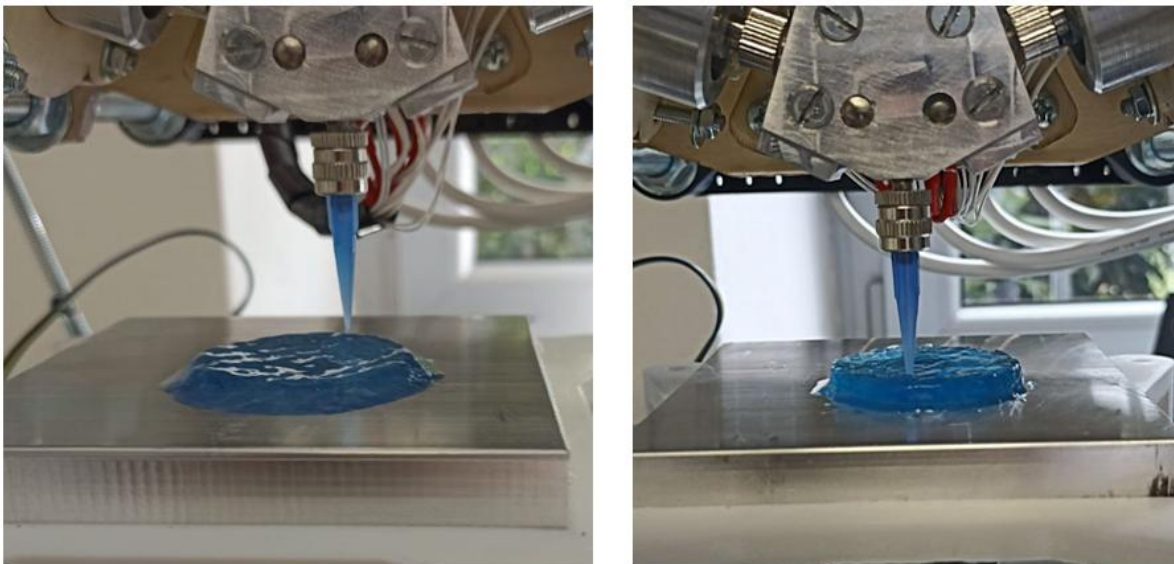
V rámci experimentální části byl realizován další pokus zaměřený na minimalizaci rozdílu viskozit mezi dvěma složkami vstupujícími do statického směšovače. V obou zásobnících byl použit 2,5% roztok alginátu sodného. První zásobník obsahoval 2,5% alginát s přírůstkem uhličitánu vápenatého (2 g/l), zatímco druhý zásobník obsahoval 2,5% alginát s rozpuštěným GDL v poměru GDL:CaCO₃ = 10:1. Tento poměr byl zvolen s ohledem na předpoklad nižšího ředění při směšování. GDL byl do alginátového roztoku dispergován pomocí magnetického míchání po dobu přibližně dvou minut. Mísící poměr obou roztoků byl udržován na hodnotě 1:1.

Přestože použití stejných koncentrací alginátu v obou složkách mělo vést ke snížení rozdílu ve viskozitě, výsledný hydrogel tuhnul velmi pomalu. Vizualizací výtoků z trysky bylo patrné, že dochází k nedostatečnému promíchání obou složek uvnitř směšovače.

Následně byla testována varianta s odlišnými koncentracemi alginátu v jednotlivých zásobnících. První zásobník obsahoval 2,5% alginát s 2 g/l CaCO₃, druhý zásobník 2% alginát s GDL (v poměru GDL:CaCO₃ = 17:1). Směšovací poměr zůstal opět 1:1. I přes tuto úpravu vykazoval výstupní gel opět velmi pomalý nástup gelace. Na základě těchto výsledků byla formulována hypotéza, že GDL částečně iniciuje síťování již během jeho dispergace v alginátovém roztoku, čímž snižuje schopnost výsledné směsi efektivně se promíchat ve směšovači.

Na základě uvedených výsledků bylo upuštěno od dalších pokusů o optimalizaci viskozit jednotlivých složek vstupujících do směšovače. Experimentální práce následně pokračovala s původním složením prekurzoru a oddělenou metodou gelace. Důraz byl poté kladen na úpravu tiskových parametrů popsaných v kapitole 4.6.1 Optimalizace tiskové platformy.

Při použití směsi s poměrem GDL:CaCO₃ = 20:1 se sice podařilo realizovat tisk hydrogelu, avšak výsledné výtisky vykazovaly nedostatečnou koherenci, přičemž první vrstvy měly tendenci k rozlévání po povrchu podložky. Tento problém byl následně částečně eliminován optimalizací parametrů tisku a úpravou tiskové podložky, která byla ošetřena 0,1 M roztokem chloridu vápenatého. Tato modifikace výrazně přispěla ke zlepšení přilnavosti tištěného materiálu k podkladu a celkové stabilitě tištěných struktur (Obr. 15).



Obr. 15: Ukázka rozdílu mezi vzorkem při konstantních parametrech tisku (vlevo), který se roztéká při tisku a vzorkem s optimalizovanými parametry tisku (vpravo) na tiskové podložce ošetřené 0,1 M CaCl₂

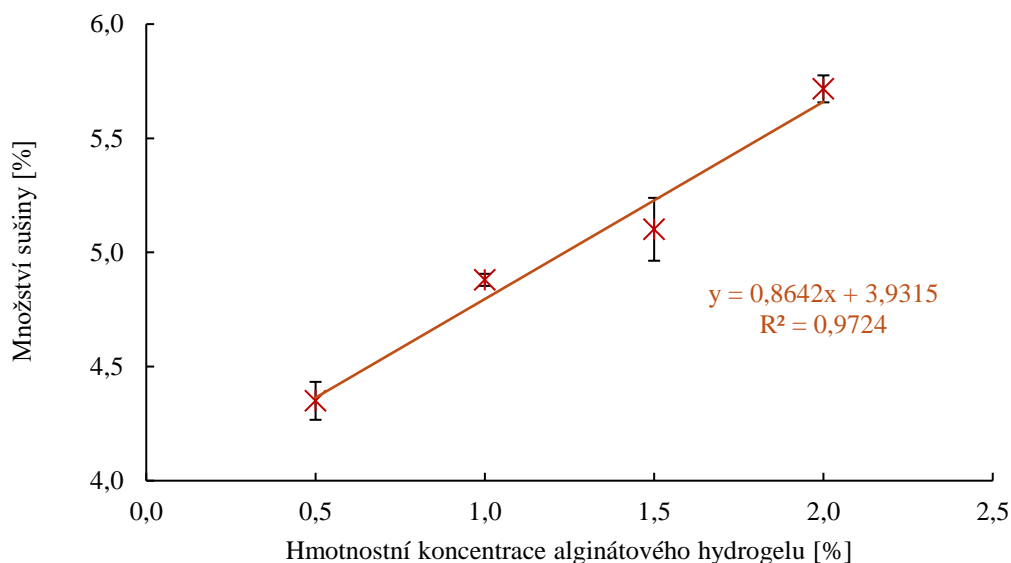
5.4 KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO STANOVENÍ KONCENTRACE TIŠTĚNÉHO HYDROGELU

Za účelem kvantitativního stanovení koncentrace alginátu sodného ve finální kompozici hydrogelu po tisku byla vytvořena kalibrační křivka založená na gravimetrickém stanovení sušiny (xerogelu). Ačkoli bylo vizuálně potvrzeno účinné míchání složek ve směšovači, výsledná koncentrace polymerní složky v tištěném hydrogelu zůstává neznámá. Reologické měření nebylo v tomto případě zvoleno jako primární metoda kvantifikace, jelikož hodnoty viskoelastických modulů u vzorků se stejnou koncentrací vykazují vysokou variabilitu, což by mohlo vést k zavádějícím závěrům, a proto byla zvolena gravimetrická analýza.

Pro přípravu kalibrační křivky byly připraveny vzorky hydrogelu o koncentracích 0,5 %, 1,0 %, 1,5 % a 2,0 % (hmotnostních). Od každé koncentrace byly připraveny dva paralelní vzorky. Gely byly připraveny oddálenou metodou gelace, přičemž sol s obsahem CaCO₃ byl smíchán s roztokem GDL v objemovém poměru 1:1. Poměr GDL:CaCO₃ byl u všech vzorků stanoven na 20:1. Vzhledem k následnému ředění při smíchání byly výchozí koncentrace solů dvojnásobné oproti požadovaným cílovým koncentracím.

Celkový objem každého vzorku činil 10 ml. Smíchání jednotlivých složek proběhlo manuálně pomocí špachtle. Pro účely vizuální kontroly směšování byla do každého vzorku přidána methylenová modř v množství 0,005 g. Následně byly vzorky ponechány 24 hodin v exsikátoru s vodou pro dosažení úplné gelace.

Po zesíťování byly z každého vzorku odebrány přibližně 4 g gelu, které byly následně vysušeny v laboratorní sušárně při teplotě 50 °C po dobu 72 hodin. Po vysušení byla zvážena zbývající sušina a na základě těchto hodnot byla sestavena kalibrační křivka znázorňující závislost hmotnostní koncentrace polymeru na procentuálním zastoupení sušiny v původním hydrogelu (Obr. 16). Kalibrační křivka má velmi dobrou korelaci a lze tedy kvantitativně určit koncentraci polymeru v hydrogelu v rozmezí 0,5–2 % hm.



Obr. 16: Graf závislosti procentuálního množství sušiny ve vzorku hydrogelu alginátu sodného na jeho hmotnostní koncentraci

5.5 SROVNÁNÍ GELU PŘIPRAVENÉHO LABORATORNĚ A GELU Z 3D TISKÁRNY

Za účelem ověření efektivity směšování v tiskovém systému a hodnocení výsledných mechanických vlastností byl na 3D tiskárně vytištěn vzorek hydrogelu na bázi alginátu sodného. Výchozím materiálem byl 2,5% (hm.) alginátový sol obsahující 2 g/l uhličitanu vápenatého (CaCO_3). Směšování s roztokem GDL probíhalo v objemovém poměru 1:1, přičemž byl dodržen molární poměr CaCO_3 :GDL = 1:20. Za těchto podmínek by teoretická hmotnostní koncentrace výsledného gelu měla odpovídat 1,25 %, protože směšování předpokládá rovnoměrné zředění výchozího solu.

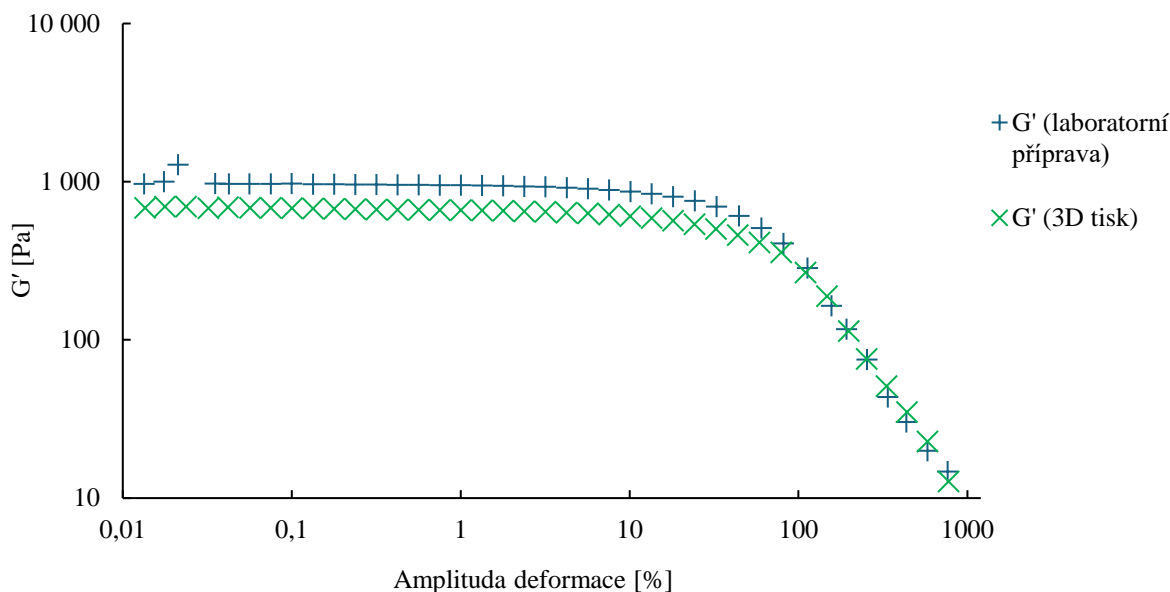
Vzorek byl tištěn na hliníkovou podložku upravenou 0,1 M roztokem CaCl_2 za účelem zlepšení adheze první vrstvy a urychlení počáteční gelace. Parametry tisku byly v průběhu procesu upravovány, což vedlo k celkovému času tisku přibližně 17 minut. I přes tuto dobu došlo ke zgelování i nejrvechnější vrstvy, což naznačuje, že nedošlo k výrazné degradaci GDL během tisku.

Jako kontrolní vzorek byl připraven další hydrogel za konstantních tiskových podmínek. Tento vzorek však vykazoval výrazné rozlévání na podložce, což potvrzuje význam průběžné optimalizace tiskových parametrů (Obr. 15). Z vytištěného vzorku bylo odebráno přibližně 4 g hydrogelu, který byl následně vysušen při 50 °C po dobu 72 hodin. Na základě hmotnosti výsledné sušiny byla určena skutečná hmotnostní koncentrace polymerní složky ve vzorku, která činila 1,9 %. Tato hodnota výrazně převyšuje teoreticky očekávanou koncentraci (1,25 %), což indikuje nerovnoměrné směšování ve směšovači tiskového systému. Předpokládanou příčinou je výrazný rozdíl ve viskozitě obou složek: pro 2,5% alginátový sol s CaCO_3 byla naměřena viskozita 1134,92 mPa·s a hustota 1,0083 g·cm⁻³, zatímco GDL roztok (0,1 mol·dm⁻³) vykazoval viskozitu pouze 1,02 mPa·s a hustotu 1,0243 g·cm⁻³.

Pro objektivní porovnání byl připraven laboratorní referenční vzorek hydrogelu o koncentraci 1,9 %, odpovídající koncentraci stanovené ve vytištěném vzorku. Tento vzorek byl připraven oddálenou metodou gelace za dodržení tiskových poměrů a použit pro reologické měření.

Z grafu na Obr. 17 vyplývá, že laboratorně připravený hydrogel vykazuje přibližně dvojnásobnou hodnotu elastického (paměťového) modulu G' ve srovnání se vzorkem z tiskárny. Tento rozdíl může být způsoben časovým průběhem tisku, během něhož může docházet k postupné degradaci GDL a tím i k méně efektivní síťovací reakci. Laboratorně připravený vzorek, u kterého probíhalo směšování rovnoměrně a bez časové prodlevy, si zachoval vyšší míru elasticity a strukturální integrity. Naproti tomu vzorek připravený tiskem, kde bylo směšování ovlivněno rozdílnými viskozitami složek a delším časem tisku, vykazuje horší mechanické vlastnosti.

Je však třeba zdůraznit, že pro vzorek z tiskárny byla provedena pouze dvě reometrická měření. Pro potvrzení této hypotézy bude nezbytné provést další experimenty a opakovaná měření.



Obr. 17: Graf závislosti elastického modulu na amplitudě deformace pro porovnání vzorku připraveného laboratorně a 3D tiskem

5.6 NÁVRH BUDOUCÍCH EXPERIMENTŮ A ÚPRAV

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že současný způsob směšování složek ve směšovači bez aktivního mechanického zásahu není dostatečný pro zajištění homogenní struktury směsi ani přesného poměrového dávkování jednotlivých komponent. Pro zlepšení kvality tištěných hydrogelů by bylo vhodné navrhnout a zkonstruovat nový směšovací systém vybavený mechanickým mícháním, který by umožnil důslednější dispergaci reaktantů a současně zajišťoval kontrolu nad poměrem složek.

Po úpravě směšovacího zařízení by bylo dále žádoucí zopakovat experimenty s různými koncentracemi polymerního nosiče a provést reologická měření na větším počtu vzorků, aby bylo možné statisticky ověřit rozdíly v mechanických vlastnostech mezi laboratorně připravenými a tištěnými vzorky. V průběhu experimentální práce bylo pozorováno, že většina tisků nebyla opakovatelná bez komplikací – často docházelo k zatuhnutí gelu uvnitř trysky nebo jiných částech systému. Předpokládanými příčinami jsou jednak časová prodleva mezi vložením zásobníků a samotným zahájením tisku, jednak nedostatečné dispergování uhličitanu vápenatého v alginátu, což mohlo vést ke vzniku hrudek a následnému ucpání trysky.

Z praktického hlediska se jako efektivní řešení ukázala výměna trysky s průměrem 0,4 mm za trysku o průměru 0,8 mm, při které proběhl tisk bez komplikací. Z tohoto důvodu by bylo vhodné do budoucna systematicky otestovat různé průměry trysek a jejich vliv na kvalitu a reprodukovatelnost tisku.

Tato práce se nezabývala vlivem teploty na viskozitu jednotlivých složek, nicméně se jedná o relevantní parametr, jehož změna by mohla přispět ke snížení rozdílu viskozit mezi složkami a tím ke zlepšení homogenizace směsi. V tomto směru by bylo vhodné navrhnout experiment s teplotní rampou, během níž by se zaznamenávala viskozitní křivka obou složek, a dále provést časové testy ke zjištění případné teplotní degradace systému.

Další možností optimalizace je také změna typu tiskové podložky. Vzhledem k pozorované horší přilnavosti u vzorků s nižší viskozitou by bylo přínosné experimentovat s drsnějšími materiály tiskové plochy, které by mohly zajistit lepší fixaci první vrstvy.

Teprve po úspěšném zvládnutí opakovatelného tisku hydrogelů o známé a ověřené koncentraci bude možné přistoupit k vývoji pokročilých struktur s koncentračními gradienty, které by mohly být řízeny objemovým poměrem přidaného GDL v reálném čase.

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala problematikou přípravy a 3D tisku alginátových hydrogelů s využitím modifikované *RepRap* tiskárny. Hlavním cílem bylo vyhodnotit vhodnost alginátu sodného jako materiálu pro 3D biotisk, optimalizovat metody gelace přímou (vnitřní) nebo oddálenou (vnější), provést reologické charakterizace připravených vzorků a ověřit funkčnost tiskového systému včetně směřovacího zařízení.

Oddálená metoda gelace se ukázala být výhodnější pro zmíněnou 3D tiskárnu. Vhodnou směsí pro tisk je sol alginátu sodného s uhličitanem vápenatým o koncentraci 2 g/l solu a roztok GDL o koncentraci 0,1 mM. Obě tyto složky jsou doporučeny míchat v ekvivalentním objemovém množství. Byl sestaven směšovací systém umožňující slévání obou složek těsně před tiskem, avšak ukázalo se, že rozdílné viskozity obou roztoků vedou k nerovnoměrnému směřování, což se následně odrazilo na výsledné konzistenci a homogenitě vytištěného hydrogelu.

V průběhu práce byl proto postupně optimalizován samotný tiskový proces z hlediska technických parametrů tisku, jako je průměr trysky (lépe se pracuje s průměrem 0,8 mm), rychlost tisku (10 mm/s) nebo úprava povrchu tiskové podložky. Byla vytvořena kalibrační křivka na základě xerogelů, která umožnila zpětně stanovit skutečnou koncentraci polymeru ve vytištěném vzorku a tím zhodnotit účinnost směřování. I přes dílčí technické komplikace, jako bylo časté ucpávání trysky nebo nepravidelné gelování, se podařilo ověřit funkčnost tiskového systému a nastínit konkrétní úpravy, které v budoucnu umožní realizaci pokročilých struktur, například gradientových hydrogelů s definovaným rozložením síťovací látky. Optimalizovaný tiskový postup je podrobně popsán v kapitole 4 Experimentální část.

V budoucnu by bylo vhodné zaměřit se na konstrukci směšovače s aktivním mechanickým mícháním, který by zajistil rovnoměrnější distribuci síťovací látky a lepší kontrolu nad výslednou koncentrací polymeru. Dále se nabízí možnost sledovat vliv teploty na viskozitu jednotlivých složek, případně testovat různé povrchy tiskové podložky pro zlepšení přilnavosti. Výsledky této práce tak představují prvotní kroky k vývoji přizpůsobitelného systému pro 3D tisk hydrogelů s možností dalšího rozšíření například na struktury s koncentračními gradienty.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HAIDER, Sajjad a HAIDER, Andan. *Hydrogels*. Online. Rijeka: IntechOpen, 2018. ISBN 978-1-78923-369-8. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/intechopen.68817>.
- [2] GUL, Khalid; GAN, Ren-You; SUN, Cui-Xia; JIAO, Ge; WU, Ding-Tao et al. Recent advances in the structure, synthesis, and applications of natural polymeric hydrogels. Online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021, roč. 62, č. 14, s. 3817-3832. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1870034>.
- [3] MATSUMOTO, Keigo; SHUNDO, Atsuomi; OHNO, Masashi a SARUHASHI, Kowichiro. Sol-gel transition accelerated by the co-assembly of two components in supramolecular hydrogels. Online. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015, roč. 17, č. 40, s. 26724-26730. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C5CP04800A>.
- [4] BAHRAM, M.; MOHSENI, N.; MOGHTADER, M. a MAJEE, S.B. An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. Online. In: *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*. IntechOpen, 2016. ISBN 978-953-51-2510-5. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/chapters/51535>.
- [5] DAYONG, Yang. Recent Advances in Hydrogels. Online. *American Chemical Society*. 2022, roč. 34, č. 5. ISSN 0897-4756. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.2c00188>.
- [6] CHEN, Yu. Properties and development of hydrogels. Online. *Hydrogels Based on Natural Polymers*. 2020, s. 3-16. ISSN 978-0-12-816421-1. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816421-1.00001-X>.
- [7] PANJA, Santanu; DIETRICH, Bart a ADAMS, Dave J. Controlling Syneresis of Hydrogels Using Organic Salts. Online. *Angewandte Chemie International Edition*. 2022, roč. 61, č. 4, s. e202115021. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.202115021>.
- [8] SHEN, Ji a MURAT, Guvendiren. Complex 3D bioprinting methods. Online. *APL Bioengineering*. 2021, roč. 5, č. 1, s. 011508. ISSN 2473-2877. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1063/5.0034901>.
- [9] MA, Yue; DENG, Bo; HE, Runbang a HUANG, Pengyu. Advancements of 3D bioprinting in regenerative medicine: Exploring cell sources for organ fabrication. Online. *Heliyon*. 2024, roč. 10, č. 3, s. e24593. ISSN 2405-8440. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24593>.
- [10] CHAMKOURI, Hossein. A Review of Hydrogels, Their Properties and Applications in Medicine. Online. *American Journal of Biomedical Science & Research*. 2021, roč. 11, č. 6, s. 485-493. ISSN 2642-1747. Dostupné z: <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2021.11.001682>.
- [11] KAROYO, Abdalla H. a WILSON, Lee D. A Review on the Design and Hydration Properties of Natural Polymer-Based Hydrogels. Online. *Materials*. 2021, roč. 14, č. 5, article 1095. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma14051095>.

- [12] SÁNCHEZ, Enrique Mancha; GÓMEZ-BLANCO, J. Carlos; LÓPEZ, Esther Nieto; CASADO, G. Javier; MACÍAS-GARCÍA, Antonio et al. Hydrogels for Bioprinting: A Systematic Review of Hydrogels Synthesis, Bioprinting Parameters, and Bioprinted Structures Behavior. Online. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020, roč. 8. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00776>.
- [13] GARCIA-GARCIA, A.; MUÑANA-GONZÁLEZ, S.; LANCEROS-MENDEZ, S.; RUIZ-RUBIO, L.; ALVAREZ, L. P. et al. Biodegradable Natural Hydrogels for Tissue Engineering, Controlled Release, and Soil Remediation. Online. *Polymers*. 2024, roč. 16, č. 18, s. 2599. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym16182599>.
- [14] OZBOLAT, Ibrahim T. a HOSPODIUK, Monika. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. Online. *Biomaterials*. 2016, vol. 76, s. 321-343. ISSN 0142-9612. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.076>.
- [15] LAPCÍK, Lubomir Jr; LAPCÍK, Lubomir; DE SMEDT, Stefan; DEMEESTER, Joseph a CHABRECEK, Peter. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. Online. *Chem Rev*. 1998, vol. 98, no. 8. ISSN 1520-6890. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/cr941199z>.
- [16] COWMAN, Mary K; SCHMIDT, Tannin A; RAGHAVAN, Preeti a STECCO, Antonio. Viscoelastic Properties of Hyaluronan in Physiological Conditions. Online. *F1000Research*. 2015, vol. 4, s. 622. ISSN 2046-1402. Dostupné z: <https://doi.org/10.12688/f1000research.6885.1>.
- [17] LAW, Nicholas; DONEY, Brandon; GLOVER, Hayley; QIN, Yahua; AMAN, Zachary M. et al. Characterisation of hyaluronic acid methylcellulose hydrogels for 3D bioprinting. Online. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2018, vol. 77, s. 389-399. ISSN 1751-6161. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.09.031>.
- [18] PRIETO, J. G.; PULIDO, M. M.; ZAPICO, J.; MOLINA, A. J.; GIMENO, M. et al. Comparative study of hyaluronic derivatives: rheological behaviour, mechanical and chemical degradation. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2005, roč. 35, č. 1, s. 63-69. ISSN 0141-8130. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2004.12.003>.
- [19] WANG, Xiaohong; AO, Qiang; FAN, Jun; TIAN, Xiaohong; TONG, Hao et al. Gelatin-Based Hydrogels for Organ 3D Bioprinting. Online. *Polymers (Basel)*. 2017, roč. 9, č. 9. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym9090401>.
- [20] ARANAZ, Inmaculada; ALCÁNTARA, Andrés R; CIVERA, Maria Concepción a ARIAS, Concepción. Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. Online. *Polymers (Basel)*. 2021, roč. 13, č. 19. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym13193256>.
- [21] FERNÁNDEZ, Emiliano; LÓPEZ, Daniel; MIJANGOS, Carmen; DUSKOVA-SMRCKOVA, Miroslava; ILAVSKY, Michal et al. Rheological and thermal properties of agarose aqueous solutions and hydrogels. Online. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 2008, vol. 46, no. 3, s. 322-328. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/polb.21370>.
- [22] SALATI, Mohammad Amin; KHAZAI, Javad; TAHMURI, Amir Mohammad; SAMADI, Ali; TAGHIZADEH, Ali et al. Agarose-Based Biomaterials: Opportunities and Challenges in Cartilage

- Tissue Engineering. Online. *Polymers (Basel)*. 2020, vol. 12, no. 5. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym12051150>.
- [23] AXPE, Eneko a OYEN, Michelle L. Applications of Alginate-Based Bioinks in 3D Bioprinting. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, roč. 17, č. 12. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms17121976>.
- [24] XIN, Shangjing; CHIMENE, David; GARZA, Jay E.; GAHARWAR, Akhilesh K. a ALGE, Daniel L. Clickable PEG hydrogel microspheres as building blocks for 3D bioprinting. Online. *Biomater. Sci.* 2019, roč. 7, č. 3, s. 1179-1187. ISSN 2047-4830. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C8BM01286E>.
- [25] GUNGOR-OZKERIM, P Selcan; INCI, Ilyas; ZHANG, Yu Shrike; KHADEMHOSEINI, Ali a DOKMECI, Mehmet Remzi. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. Online. *Biomater Sci.* 2018, roč. 6, č. 5, s. 915-946. ISSN 2047-4849. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/c7bm00765e>.
- [26] NASATTO, Pauline L.; PIGNON, Frédéric; SILVEIRA, Joana L. M.; DUARTE, Maria Eugênia R.; NOSEDA, Miguel D. et al. Methylcellulose, a Cellulose Derivative with Original Physical Properties and Extended Applications. Online. *Polymers*. 2015, vol. 7, no. 5, s. 777-803. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym7050777>.
- [27] ZHANG, Bin; LUO, Yichen; MA, Liang; GAO, Lei; LI, Yuting et al. 3D bioprinting: an emerging technology full of opportunities and challenges. Online. *Bio-Design and Manufacturing*. 2018, roč. 1, č. 1, s. 2-13. ISSN 2522-8552. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s42242-018-0004-3>.
- [28] PARAK, Azraa; PRADEEP, Priyamvada; DU TOIT, Lisa C.; KUMAR, Pradeep; CHOONAR, Yahya E. et al. Functionalizing bioinks for 3D bioprinting applications. Online. *Drug Discovery Today*. 2019, roč. 24, č. 1, s. 198-205. ISSN 1359-6446. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.09.012>.
- [29] PAKHOMOVA, Catherine; POPOV, Dmitry; MALTSEV, Eugenii; AKHATOV, Iskander a PASKO, Alexander. Software for Bioprinting. Online. *PubMed-not-MEDLINE*. 2020, vol. 6, no. 3, s. 279. ISSN 2424-8002. Dostupné z: <https://doi.org/10.18063/ijb.v6i3.279>.
- [30] ŠLJIVIC, M.; PAVLOVIC, A.; KRAIŠNIK, M. a ILIČ, J. Comparing the accuracy of 3D slicer software in printed enduse parts. Online. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2019, vol. 659, no. 1, s. 012082. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/659/1/01208>.
- [31] WYSOCKI, Bartłomiej; IDASZEK, Joanna; SZŁĄZAK, Karol; STRZELCZYK, Karolina; BRYNK, Tomasz et al. Post Processing and Biological Evaluation of the Titanium Scaffolds for Bone Tissue Engineering. Online. *Materials (Basel)*. 2016, vol. 9, no. 3, s. 197. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma9030197>.
- [32] MANDRYCKY, Christian; WANG, Zongjie; KIM, Keekyoung a KIM, Deok-ho. 3D bioprinting for engineering complex tissues. Online. *Biotechnology Advances*. 2016, vol. 34, no. 4, s. 422-434. ISSN 0734-9750. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>.

- [33] PUZA, Fatih a LIENKAMP, Karen. 3D Printing of Polymer Hydrogels—From Basic Techniques to Programmable Actuation. Online. *Advanced Functional Materials*. 2022, roč. 32, č. 39, s. 2205345. ISSN 1616-301X. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adfm.202205345>.
- [34] COOKE, Megan E. a ROSENZWEIG, Derek H. The rheology of direct and suspended extrusion bioprinting. Online. *APL Bioengineering*. 2021, roč. 5, č. 1, s. 011502. ISSN 2473-2877. Dostupné z: <https://doi.org/10.1063/5.0031475>.
- [35] SCHÖN, Jürgen H. Elastic Properties. Online. *Physical Properties of Rocks*. 2015, roč. 65, s. 167-268. ISSN 0376-7361. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100404-3.00006-8>.
- [36] ISHIYAMA, C. a HIGO, Y. Effects of humidity on Young's modulus in poly(methyl methacrylate). Online. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 2002, roč. 40, č. 5, s. 460-465. ISSN 0887-6266. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/polb.10107>.
- [37] BANERJEE, Ritima a RAY, Suprakas Sinha. Role of Rheology in Morphology Development and Advanced Processing of Thermoplastic Polymer Materials: A Review. Online. *ACS Omega*. 2023, roč. 8, č. 31, s. 27969-28001. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03310>.
- [38] CHEN, Dao-Long; YANG, Ping-Feng a LAI, Yi-Shao. A review of three-dimensional viscoelastic models with an application to viscoelasticity characterization using nanoindentation. Online. *Microelectronics Reliability*. S. 541-558. ISSN 0026-2714. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microrel.2011.10.001>.
- [39] GHANBARI, Abbas; MOUSAVI, Zeinab; HEUZEY, Marie-Claude; PATIENCE, Gregory S. a CARREAU, Pierre J. Experimental methods in chemical engineering: Rheometry. Online. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 2020, roč. 98, č. 7, s. 1456-1470. ISSN 0008-4034. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cjce.23749>.
- [40] RAZA, M.H.; ABDULLAH, M. a V, M.U. Development of An Extrusion 3D Bioprinter for Bioprinting of Hydrogel Based Biomaterials. Online. *2019 International Conference on Robotics and Automation in Industry (ICRAI)*. 2019, s. 1-6. Dostupné z: <https://doi.org/10.1109/ICRAI47710.2019.8967361>.
- [41] RUBERU, Kalani; SENADEERA, Manisha; RANA, Santu a GUPTA, Sunil. Coupling machine learning with 3D bioprinting to fast track optimisation of extrusion printing. Online. *Applied Materials Today*. 2021, s. 100914. ISSN 2352-9407. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100914>.
- [42] NAGHIEH, Saman; KARAMOOZ-RAVARI, M.R.; SARKER, MD; KARKI, Eva a CHEN, Xiongbiao. Influence of crosslinking on the mechanical behavior of 3D printed alginate scaffolds: Experimental and numerical approaches. Online. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2018, no. 80, s. 111-118. ISSN 1751-6161. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.01.034>.

- [43] NGUYEN, D.; HÄGG, D.A. a FORSMAN, A. Cartilage Tissue Engineering by the 3D Bioprinting of iPS Cells in a Nanocellulose/Alginate Bioink. Online. *Scientific reports*. 2017. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-017-00690-y>.
- [44] PATTNAIK, Ananya; SWAROOP SANKET, A. a PRADHAN, Sanghamitra. Designing of gradient scaffolds and their applications in tissue regeneration. Online. *Biomaterials*. 2023, no. 296, s. 122078. ISSN 0142-9612. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122078>.
- [45] KOUŘILOVÁ, Ludmila. Alternativní způsoby síťování alginátu sodného vedoucí k hydrogelům s vhodnými aplikačními vlastnostmi. Diplomová práce, 2024, Brno: Vysoké učení technické v Brně. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156927>.
- [46] ZHANG, Yue; ZHAO, Kongyin a ZHANG, Zhijian. Polypropylene non-woven supported calcium alginate hydrogel filtration membrane for efficient separation of dye/salt at low salt concentration. Online. *Desalination*. 2021, s. 114845. ISSN 0011-9164. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.desal.2020.114845>.
- [47] CABRERA, F. a TALIBUDEEN, O. The Release of Aluminum from Aluminosilicate Minerals. II. Acid-Base Potentiometric Titrations. Online. *Clays and Clay Minerals*. 1979, roč. 27, s. 113–118. Dostupné z: <https://doi.org/10.1346/CCMN.1979.0270206>.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AG	Agaróza
ALG	Alginát
CAD	Computer-aided design
CHT	Chitosan
CMC	Karboxymethylcelulóza
DIW	Direct Ink Writing
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extracelulární matrix
EFD	Engineered Fluid Dispensing
FDM	Fused Deposition Modeling
GDL	D-(+)-glukano- δ -laktón
GelMA	Methakrylát želatiny
HA	Kyselina hyaluronová
HAMA	Methakrylát kyseliny hyaluronové
HEC	Hydroxyethylcelulóza
HPMC	Hydroxypropylmethylcelulóza
iPSC	Indukované pluripotentní kmenové buňky
LAD	Laser Assisted 3D printing
LVO	Lineární viskoelastická oblast
MC	Methylcelulóza
NFC	Nanocelulosa
NURBS	Non-Uniform Rational B-Splines
PEG	Polyethylenglykol
RepRap	Replicating Rapid Prototyper
RPM	Otáčky za minutu
RT-PCR	Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SLA	Stereolithography

SLS

Selective Laser Sintering