



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra biomedicínské techniky

**Stanovení přesnosti 3D biotisku a měření mechanických
vlastností hydrogelů a jejich modifikací**

**Determination of accuracy of 3D bioprinting and measurement of
mechanical properties of hydrogels and their modifications**

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínské inženýrství

Vedoucí práce: Ing. Jana Štěpanovská, Ph.D.

Bc. Eliška Malá

Kladno 2022

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Malá** Jméno: **Eliška** Osobní číslo: **474331**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra biomedicínské techniky**
Studijní program: **Biomedicínské inženýrství**

II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

Stanovení přesnosti 3D biotisku a měření mechanických vlastností hydrogelů a jejich modifikací

Název diplomové práce anglicky:

Determination of accuracy of 3D bioprinting and measurement of mechanical properties of hydrogels and their modifications

Pokyny pro vypracování:

Analyzujte přesnost 3D biotisku pro přípravu hydrogelů a jejich modifikací. Připravte kolagenové hydrogely s různou koncentrací proteinu pro použití v 3D biotiskárně s buněčnou kulturou. Na kalibračním modelu ověřte realizovatelnost biotisku a stanovte přesnost tisku při použití daného hydrogelu. Dále vytvořte model pro stanovení reologických vlastností gelů. Změřte jeho mechanické vlastnosti, a to jak čistého hydrogelu, tak i hydrogelu smíchaným s buněčnou suspenzí, příp. dalších modifikací. Měření statisticky vyhodnoťte.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Tyler K. Merceron, Sean V. Murphy, Essentials of 3D Biofabrication and Translation, ed. 1, kapitola Hydrogels for 3D Bioprinting Applications, 2015, Academic press
- [2] Jaroslav Boháček, Metrologie, ed. 3. přepracované vydání, České vysoké učení technické, 2019, ISBN 978-80-01-06612-6
- [3] Samuel Clark Ligon, Robert Liska, Jürgen Stampfl, Matthias Gurr, and Rolf Mülhaupt, Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing, Chemical reviews, ročník 15, číslo 117, 2017

Jméno a příjmení vedoucí(ho) diplomové práce:

Ing. Jana Štěpanovská, Ph.D.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) diplomové práce:

Ing. Roman Matějka, Ph.D.

Datum zadání diplomové práce: **14.02.2022**

Platnost zadání diplomové práce: **22.09.2023**

doc. Ing. Martin Rožánek, Ph.D.
vedoucí katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
děkan

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Stanovení přesnosti 3D biotisku a měření mechanických vlastností hydrogelů a jejich modifikací“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 12.5.2022

.....

Bc. Eliška Malá

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí mé práce, paní Ing. Janě Štěpanovské, Ph.D., za veškeré informace a pomoc, které mi podala a díky kterým tato práce vznikla.

Tato práce vznikla za podpory projektů Ministerstva zdravotnictví České republiky, Agentury pro zdravotnický výzkum s reg. č. NV19-02-00068; dále projektu Technologické agentury České republiky s reg. č. TM01000046 a projektů Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy České republiky, Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání, s reg. č. CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_018/0002242 a CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002244.



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

ABSTRAKT

Stanovení přesnosti 3D biotisku a měření mechanických vlastností hydrogelů a jejich modifikací

3D tisk je v současné době velmi často používaná metoda pro tvorbu struktur, nejenak je tomu i v tvorbě struktur s buňkami. Jde o snadno opakovatelný postup, který ale zároveň umožňuje modifikaci na míru zadaným požadavkům. Tisknout je možné jak z komerčně vyráběných gelů, tak z gelů připravených experimentálně. Přesnost tisku však úzce souvisí s typem tiskárny, vlastnostmi hydrogelu a parametry tisku. Cílem této práce je stanovit přesnost tisku na experimentální 3D tiskárně s použitím vlastních bioinkoustů, s buňkami a bez buněk, o koncentracích kolagenu 10 mg/ml, 20 mg/ml a 30 mg/ml a zkoumat mechanické vlastnosti těchto gelů. Pro splnění cílů práce byly vytvořeny modely čáry, čtverce, hvězdy, kolečka a mřížky pro stanovení přesnosti 2D tisku a modely mezikruží a válce pro stanovení přesnosti 3D tisku, a byly naměřeny mechanické vlastnosti bioinkoustů. Bylo zjištěno, že přesnost tisku 2D struktur je nejvyšší při použití bioinkoustu s kolagenem o koncentraci 20 mg/ml, pro 3D struktury je nejpřesnější tisk z hydrogelu s kolagenem o koncentraci 30 mg/ml. Elastický modul hydrogelů s kolagenem o koncentracích 20 mg/ml a 30 mg/ml je 0,186 MPa a 0,431 MPa, u bioinkoustů s buňkami je pro stejné koncentrace kolagenu modul 0,133 MPa a 0,443 MPa.

Klíčová slova

biotisk, hydrogel, bioinkoust, přesnost biotisku

ABSTRACT

Determination of accuracy of 3D bioprinting and measurement of mechanical properties of hydrogels and their modifications

3D printing is currently a very frequently used method for the creation of structures, this applies equally to the creation of structures with cells. It is an easily replicable procedure which at the same time allows for modification according to assigned requirements. Both commercially produced gels and experimentally prepared gels can be used for printing. However, the accuracy of the print is closely connected to the type of printer, properties of the hydrogel, and printing criteria. This thesis aims to establish the accuracy of printing on an experimental 3D printer using own bio-inks, with and without cells, with collagen concentrations of 10 mg/ml, 20 mg/ml and 30 mg/ml and to examine the mechanical properties of these gels. To fulfil the aim of this thesis, lines, squares, stars, circles, and grids have been created to determine the accuracy of 2D printing and models of an outer ring and a cylinder to determine the accuracy of 3D printing, and the mechanical properties of the bioinks were measured. It has been established, that the highest accuracy in printing 2D structures is achieved when using bio-ink with collagen concentration of 20 mg/ml, in printing 3D structures the accuracy is highest when using hydrogel with collagen concentration of 30 mg/ml. The elastic module of hydrogels with collagen concentrations of 20 mg/ml and 30 mg/ml is 0,186 MPa and 0,431 MPa, for these concentrations of collagen bio-inks with cells there are modules 0,133 MPa and 0,443 MPa.

Keywords

bioprint, hydrogel, bioink, accuracy of bioprint

Obsah

| | |
|--|-----------|
| Seznam symbolů a zkratk..... | 9 |
| 1 Úvod | 10 |
| 2 Přehled současného stavu..... | 12 |
| 2.1 Metody biotisku..... | 13 |
| 2.1.1 Stereolitografie | 13 |
| 2.1.2 Inkoustový biotisk | 13 |
| 2.1.3 Biotisk s podporou laseru | 13 |
| 2.1.4 Extruze..... | 14 |
| 2.1.5 Biotisk založený na electrospinningu | 15 |
| 2.2 Bioinkousty | 15 |
| 2.2.1 Bioinkousty na bázi kolagenu | 16 |
| 2.3 Buňky používané pro biotisk..... | 18 |
| 3 Cíle práce..... | 19 |
| 4 Metody | 20 |
| 4.1 Vytvoření modelů..... | 20 |
| 4.2 Vytvoření hydrogelu | 22 |
| 4.3 Tisk..... | 25 |
| 4.4 Zpracování obrazu..... | 28 |
| 4.5 Měření mechanických vlastností | 31 |
| 4.6 Statistické zpracování..... | 33 |
| 5 Výsledky..... | 34 |
| 5.1 Vytvořené modely | 34 |
| 5.2 Vytisknuté objekty..... | 37 |
| 5.3 Výsledky zpracování snímků | 39 |
| 5.3.1 Výtisky čar..... | 40 |
| 5.3.2 Výtisky čtverců..... | 42 |
| 5.3.3 Výtisky hvězd..... | 45 |
| 5.3.4 Výtisky koleček | 47 |
| 5.3.5 Výtisky mřížek | 49 |
| 5.3.6 Výtisky mezikruží | 50 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.3.7 | Výtisky válců..... | 52 |
| 5.3.8 | Výtisky s buňkami..... | 53 |
| 5.3.9 | Souhrn..... | 57 |
| 5.4 | Mechanické vlastnosti bioinkoustů | 57 |
| 6 | Diskuse | 61 |
| 7 | Závěr | 64 |
| | Seznam použité literatury | 65 |
| | Příloha A: Tabulky s výsledky..... | 71 |

Seznam symbolů a zkratek

Seznam zkratek

| Zkratka | Význam |
|--------------------|--|
| ABAM | Antibiotikum-antimykotikum |
| ANOVA | Analýza rozptylu |
| ddH ₂ O | dvakrát destilovaná voda |
| (d)ECM | (decelularizovaná) extracelulární matrix |
| DMEM | Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium |
| FGF2 | bazický fibroblastový růstový faktor |
| gelMA | Methakrylát želatiny |
| HA | Kyselina hyaluronová |
| PEG | polyethylenglykol |

1 Úvod

3D biotisk se v současné době rychle rozvíjí a využívá se v technice i tkáňovém inženýrství. Jedná se o snadno reprodukovatelný způsob tvorby biologických struktur a tkání. 3D vytištěné objekty mohou být podle potřeby osazeny různými buňkami, které ve vhodném prostředí vytvoří z výtisku tkáň. Takto vzniklé tkáně by se v budoucnu mohly skládat ve složitější celky, jako jsou orgány. Výhodou 3D biotisku je také to, že každá struktura je zhotovena podle předem vytvořeného modelu. Díky tomu je možné tisknout tvary na míru konkrétním požadavkům. [1; 2; 3]

Tvorbou umělých tkání s vlastnostmi co nejbližšími skutečným biologickým vzorům se zabývá obor zvaný tkáňové inženýrství. Cílem tkáňového inženýrství je tvorba a využití biomimetické tkáňové nebo orgánové náhrady pro opravy, doplnění nebo úplnou výměnu tkání či orgánů poškozených nemocemi či úrazy. [4]

Existuje již řada způsobů biotisku pro konstrukci různých typů tkáňových náhražek a modelů, jako je stereolitografie, extruze a tisk po kapičkách. Tištění je možné jak s bioinkousty s buňkami, tak někdy také s bezbuněčnými bioinkousty, do kterých jsou buňky zakomponovány až po vytištění. Pro tisk jsou často používané gely s obsahem želatiny, alginátů, agarózou, kyselinou hyaluronovou, kolagenem a dalšími látkami schopnými tuhnout. Při tisku je možné využít bioinkousty vlastní přípravy, ale i komerčně vyráběné.

Stejně jako u 3D tisku z plastů, i u biotisku musí po vytištění dojít ke ztuhnutí výrobku. U 3D biotisku jde u mnoha hydrogelů o tzv. crosslinkování, což je proces, ve kterém je roztok polymeru transformován v 3D strukturu. Crosslinkování výrazně ovlivní vlastnosti výsledné struktury a také chování buněk obsažených v hydrogelu. Síť se vytváří vazbami mezi polymerními řetězci, které mohou vzniknout několika způsoby. Způsob síťování ovlivní výsledné vlastnosti struktury, vybírá se tedy s ohledem na účel vytištěného objektu. Vytvoření vazeb mezi řetězci může být zajištěno enzymy, UV nebo IR zářením nebo přidáním tzv. crosslinkerů, což jsou například vápenaté soli kovů. [5; 3] Tyto metody zesíťování však mohou některé buňky i nenávratně poničit. Snahou je vytvořit hydrogel, který ke crosslinkování potřebuje šetrnější metodu. Takovým hydrogelem je například směs s kolagenem, který při zvýšení teploty na 37 °C po chvíli vytvoří pevnou strukturu.

Složení hydrogelu, způsob tisku i crosslinkování velmi ovlivňují přesnost tisku, není tak možné určit přesnost gelu, tiskárny nebo metody, ale pouze celé kombinace. Přesnost však závisí i na parametrech tisku, tedy na rychlosti tisku, průměru trysky a výšce vrstvy. Proto je vhodné určit přesnost tisku na konkrétní tiskárně s konkrétním hydrogelem a parametry tisku. Pro vytvoření kvalitní 3D struktury je potřeba znát vlastnosti a chování

bioinkoustu a nastavit parametry tisku tak, aby nedocházelo k rozlévání výtisku či naopak ucpávání trysky.

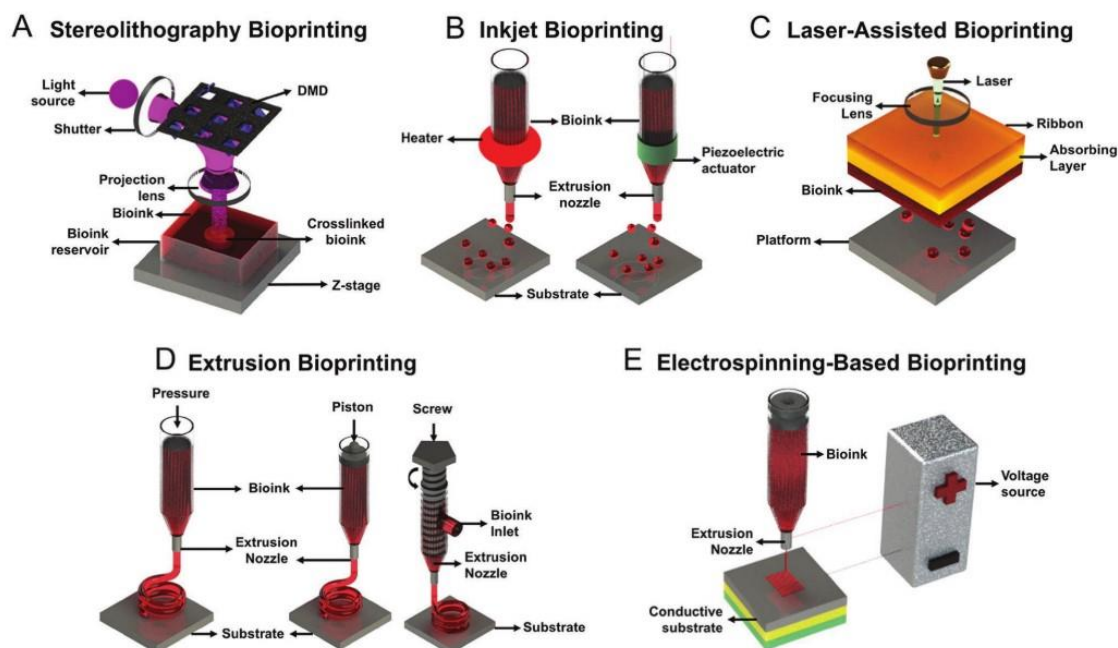
Tato práce je proto zaměřena na přesnost tisku a mechanickou odolnost vzniklých výtisků při použití kolagenových gelů s různou koncentrací kolagenu jako bioinkoustů na experimentální biotiskárně s mikroextruzí pomocí stříkačky s jehlou.

2 Přehled současného stavu

Výzkum v oblasti biokompatibilních materiálů, které je možné využít pro 3D biotisk, se v posledních letech rychle rozvíjí. Jsou objevovány nové kombinace a modifikované bioinkousty, které svými mechanickými a biologickými vlastnostmi splňují nároky tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny. [6]

Pro tisk biologických struktur je velmi důležité dobře předem rozmyslet, jaký účel má struktura mít. Podle toho je nutné vybrat způsob tisku, tedy zda půjde o tiskárnu umožňující extruzi, injekci či jinou metodu tisku. Následně je třeba podle metody tisku určit bioink, který nebude tiskem příliš poškozován. Nakonec je pak podle účelu výzkumu třeba určit typ buněk, které budou obsaženy v hydrogelu.

V současné době se používá několik metod tisku, z nichž každá má své výhody a nevýhody. Je proto vhodné seznámit se s jednotlivými metodami alespoň teoreticky. Mezi nejčastěji používané metody patří stereolitografie, inkoustový biotisk, biotisk pomocí laseru, extruze a biotisk založený na electrospinningu.



Obrázek č. 2.1: Používané metody biotisku. [6]

2.1 Metody biotisku

2.1.1 Stereolitografie

Stereolitografické biotiskárny jsou založeny na konceptu selektivního tuhnutí bioinkoustu pomocí fotopolymerizace (obrázek 2.1A). Ve stereolitografii se na nádobku bioinkoustu promítá požadovaný 2D vzor, což umožňuje generování složitých 3D struktur bez potřeby tiskové hlavy, která se pohybuje ve směru os x a y. Tato metoda biotisku je tak ve srovnání s jinými biotiskárnami na bázi trysek mnohem rychlejší. Selektivní crosslinkování bioinkoustu světlem přitom nezpůsobuje při tisku žádné smykové napětí, což u tohoto typu tisku umožňuje dosáhnout vysoké životaschopnosti buněk (> 85 %). [7] Jednou z hlavních nevýhod tohoto systému je potřeba transparentní kapaliny s omezeným rozptylem světla. Jinak by světlo nemohlo rovnoměrně procházet materiálem, což by vedlo k nestejněměrnému crosslinkování. Kvůli tomuto požadavku je hustota buněk v bioinkoustu omezena na přibližně 10^8 buněk ml^{-1} . [7]

2.1.2 Inkoustový biotisk

Inkoustový biotisk je metoda podobná konvenčnímu 2D inkoustovému tisku s tím rozdílem, že inkoust je nahrazen bioinkoustem a místo na papír se tiskne na platformu pro výrobu 3D objektů. Nanášení bioinkoustu je založeno na dočasné deformaci vnitřního prostoru v tryse, kterou bioinkoust proudí, v důsledku piezoelektrické aktivace nebo digitalizované tepelné aktivace (obrázek 2.1B). Tato deformace umožňuje dávkování kapaliny po kapkách na tiskovou podložku v určitém tvaru. Vytváření vrstev ve směru osy Z nakonec vede k vytvoření 3D objektu. Hlavní výhodou inkoustového biotisku spočívá v jednoduchosti systému a relativně nízkých nákladech. [8] Několik tiskových hlav může pracovat paralelně, což umožňuje rychlou výrobu při vysokém rozlišení ($\approx 30 \mu\text{m}$). [9] Tato technika umožňuje relativně vysokou životaschopnost buněk, a to 80 – 90 %. [8] Inkoustový biotisk ale má řadu nevýhod, jako je například relativně nízká hustota buněk ($< 10^6$ buněk ml^{-1}), kterou lze použít pro biotisk a také schopnost tisknout pouze bioinkousty s viskozitou v rozsahu kolem 3,5–12 mPa·s. [8; 10]

2.1.3 Biotisk s podporou laseru

Biotisk s podporou laseru je založen na laserovém zápisu. [11] Platformy využívající tuto techniku se obvykle skládají ze tří vrstev poskládaných odshora dolů v tomto pořadí: vrstva absorbující energii, donorová vrstva a vrstva bioinkoustu (obrázek 2.1C). Nejvýznamnější součástí systému je donorová vrstva, která reaguje na aplikovaný laserový paprsek. K této donorové vrstvě je připojena vrstva absorbující energii, která je tvořena například titanem či zlatem. Ve spodní části je tenká vrstva bioinkoustu pro

biotisk. Když je selektivní laserový paprsek aplikován na požadovaná místa vrstvy absorbující energii, odpovídající umístění donorové vrstvy pod ní se odpaří. Tím se na rozhraní mezi absorbující a donorovou vrstvou vytvoří bublina o vysokém tlaku. Tento tlak způsobí pohyb bioinkoustu, což vede k tomu, že kapka spadne na sběrnou platformu. Pohybem kolektoru podél osy Z se vytvoří 3D konstrukt. Laserový biotisk má tu výhodu, že buňky nejsou přímo vystaveny vysokému smykovému napětí. Ve skutečnosti během procesu biotisku nedochází ke kontaktu mezi dávkovačem a bioinkoustem. Díky tomu tato metoda biotisku vede k vysoké životaschopnosti buněk (>95 %) a je schopna nanášet i vysoce viskózní materiály (1–300 mPa·s).

2.1.4 Extruze

Pro biotisk založený na extruzi bylo vyvinuto několik různých systémů (obrázek 2.1D); nejčastěji používanými jsou pneumaticky a mechanicky poháněné systémy dávkování tekutin. Pneumatické systémy jsou buď s ventilem, nebo bez něj [12]. Systémy bez ventilu se snadněji vyrábějí, a proto se častěji používají. Systémy s ventily mají několik výhod, zejména kontrolu nad tlakem a frekvencí pulzů. Systém umožňuje vysokou přesnost nanášení materiálu a umožňuje biotisk s vysokým rozlišením. Mechanické systémy jsou ovládány nejčastěji pístem nebo šroubem. Systémy s pístem umožňují přímou kontrolu nad ukládáním bioinkoustu na platformu. Šroubové systémy jsou vhodnější pro bioinkousty s vyšší viskozitou, a to především díky lepší prostorové kontrole. V důsledku větších tlakových spádů na výstupu z trysky však mohou šroubové systémy poškodit buňky v bioinkoustu [12]. Ve srovnání s jinými výše uvedenými platformami má biotisk založený na extruzi několik výhod, včetně schopnosti tisknout vysoce viskózní bioinkousty (30 mPa·s až $> 6 \times 10^7$ mPa·s), stejně jako velké hustoty buněk ($> 10^8$ buněk ml⁻¹) [10]. Kromě toho mohou systémy biotisku založené na extruzi vytlačovat bioinkousty bez přerušování. Ve většině aplikací je to výhodnější ve srovnání s metodami po kapkách s ohledem na integritu biotiskovaných tkáňových konstruktů. Na druhou stranu je rychlost biotisku relativně pomalá pro vytvoření 3D struktury a rozlišení silně závisí na různých parametrech, jako je velikost trysky. Studie také ukázaly, že životaschopnost buněk po biotisku založeném na vytlačování je obvykle střední, kolem 40–80 % v důsledku vysokého smykového napětí, kterému buňky během procesu vytlačování čelí [7]. Nicméně biotisk založený na vytlačování byl dosud jednou z nejrozšířenějších forem biotisku díky své relativní jednoduchosti v přístrojovém vybavení.

2.1.5 Biotisk založený na electrospinningu

Tato metoda využívá elektrickou sílu k rychlému natažení nabitého polymerního roztoku spojeného s odpařováním a tuhnutím rozpouštědla a následným shromážděním vláken do desky. Nastavení se obvykle skládá z robotického systému x-y-z kombinovaného s běžnou sadou zařízení pro elektrostatické zvlákňování, včetně systému pro vytlačování roztoku nebo taveniny polymeru založeného na injekčním čerpadle nebo pneumatickém regulátoru a vysokonapěťovém napájecím zdroji (obrázek 2.1E). Elektrostatické zvlákňování umožňuje řídit biotisk kontinuálně nebo přerušovaně. [13]

2.2 Bioinkousty

Bioinkousty jsou jedním z nejdůležitějších aspektů úspěšného 3D biotisku. Tvoří základ téměř každého 3D vytištěného objektu. [14; 15] Obecně by bioinkousty měly mít takové mechanické a biologické vlastnosti, které zajišťují tisknutelnost a biokompatibilitu bioinkoustu. Tisknutelnost znamená, že je bioinkoust vhodný pro výrobu stabilních 3D konstrukcí s vysokou strukturální integritou, zatímco biokompatibilita znamená, že bioinkoust vytváří pro buňky vhodné prostředí a podporuje buněčnou adhezi, proliferaci a růst [16]. Zejména při výrobě biomimetických tkání ve větším měřítku je výběr správného bioinkoustu rozhodující pro úspěch biotisku. Bioinkoust musí udržovat strukturu výtisku, podporovat buněčný růst, šíření a interakci v celém objektu a také podporovat zrání do příslušných tkání.

Existuje již řada přirozeně odvozených a syntetických hydrogelů na bázi biopolymerů, které mohou sloužit jako bioinkousty pro biotisk. Mezi bioinkousty, které byly rozsáhle zkoumány, patří mezi dalšími například gely s obsahem alginátu, fibrinogenu, želatiny, kolagenu, chitosanu, agarózy, kyseliny hyaluronové (HA), methakrylátu želatiny (GelMA), polyethylen-glykolu (PEG) a decelularizované extracelulární matrix (dECM). [15]

Mezi nejčastěji používané bioinkousty patří v současné době alginát. Je používán v biotisku pro lékařské aplikace a tkáňové inženýrství. Jeho viskózní vlastnosti v kombinaci s poměrně jednoduchým crosslinkovacím mechanismem využívajícím chlorid vápenatý (CaCl_2) z něj činí atraktivní hydrogel pro biotisk. [17] Hlavní nevýhodou alginátu je jeho chemická struktura, která obvykle neumožňuje uchycení buněk. Aby došlo k buněčné adhezi a dalším biologickým aktivitám, je třeba alginát smíchat s jinými přírodními polymery, jako jsou materiály na bázi želatiny, kolagenu nebo fibrinogenu. [18]

Výroba komplexních 3D funkčních struktur v biotisku vyžaduje přesné umístění vrstvy po vrstvě a tuhnutí bioinkoustu. Během tohoto procesu si biotištěné vrstvy potřebují udržet definovanou 3D strukturu. Kromě toho by buňky v bioinkoustech neměly být negativně ovlivněny procesem biotisku, pokud jde o životaschopnost a výkon. [19;

20; 21] K dosažení tohoto cíle je klíčové vzít v úvahu reologické vlastnosti bioinkoustu, tj. mechanické účinky na buňky a funkce biotiskovaných tkání.

Pro využití biotisku ke tvorbě využitelných výrobků je nutné dosáhnout určité přesnosti tisku. Přesnost tisku úzce souvisí se složením samotného hydrogelu a také nastavením parametrů tisku. Oba tyto faktory mají významný vliv i na životaschopnost buněk ve výtisku, ať už jde o vhodnost prostředí pro buňky, nebo o schopnost buněk přežít samotný tisk.

Materiály přírodního původu jsou při tvorbě prostředí pro buňky velmi významné. Pro biotiskové aplikace jsou běžně používány bioinkousty živočišného nebo rostlinného původu. Ve srovnání s bioinkousty rostlinného původu poskytují bioinkousty živočišného původu lepší podmínky pro růst a funkci buněk. Obecně lze říci, že bioinkousty přírodního původu mají větší potenciál podpořit životaschopnost buněk, než jak je tomu u syntetických bioinkoustů. Ty však umožňují snazší přizpůsobení vlastností pro tisk, zatímco modifikace bioinkoustů přírodního původu je obtížná a omezená.

2.2.1 Bioinkousty na bázi kolagenu

Kolagen je nejhojnější protein živočišného ECM (extracelulární matrix). Skládá se ze tří polypeptidových řetězců, které tvoří trojitou šroubovici, a dále z mnoha peptidových útvarů, které zajišťují adhezi buněk na ECM [22]. Existuje asi 28 různých typů kolagenových proteinů, které jsou přítomny v lidském těle. Pro aplikace tkáňového inženýrství se díky snadné dostupnosti většinou používá kolagen typu I. Kromě toho kolagen typu I podléhá crosslinkování, když je inkubován za fyziologických podmínek.

Kolagen je odvozen z přírodního ECM, což z něj činí slibný biomateriál pro vývoj bioinkoustů. Biotisk čistého kolagenového hydrogelu je však obtížný kvůli jeho nízké viskozitě. Za účelem nalezení složení gelu s vyšší viskozitou bylo provedeno několik studií, jejichž předmětem bylo přidání příměsí (především polymerů) do hydrogelu. V těchto studiích bylo zjištěno, že smíchání s agarózou [23], chitosanem [24], fibrinem [25] a kyselinou hyaluronovou [26] zlepšuje viskozitu kolagenových bioinkoustů a směsi lze také tisknout. Kromě zvýšení viskozity se také uvádí, že míšení s polymery zvyšuje přesnost tisku. V jedné ze studií byla zkoumána směs kolagenu a agarózy, bylo zjištěno, že se výška potiskovaného válce může zvýšit z 2 mm na 4 mm po smíchání s 3% agarózou. Tento vytisknutý objekt byl schopen udržet svůj tvar po dobu 24 hodin [23]. Alternativně se také zkoušelo crosslinkování kolagenu pro zvýšení věrnosti tvaru.

Crosslinkování kolagenu je běžně prováděno dvěma způsoby. Jedním z nich je inkubace za fyziologických podmínek po natištění každé vrstvy, druhý zahrnuje neutralizaci kyselého kolagenu pomocí hydrogenuhličitanu sodného za vzniku pevného gelu [27]. Byly provedeny i studie s použitím syntetických lešení s dutinami, která byla tištěna zároveň s objekty. Lešení měla za úkol udržet tvar objektu a bylo je možné

odstranit [26]. Kolagenové bioinkousty mají navíc potenciál chránit buňky během tisku. Studie uvádějí 86% životaschopnost bovinních aortálních endoteliálních buněk v hydrogelu s kolagenem I po biotisku tryskou 25 gauge. Při zmenšení velikosti trysky z 25 na 33 gauge se životaschopnost buněk snížila na 46 % [28]. Spolu s ochranou buněk kolagenové bioinkousty podporují buněčnou funkci a životaschopnost v tištěných buněčných objektech. Studie uvádějí lepší životaschopnost buněk a migraci osteoblastů ve vytištěných buněčných konstruktech bioinkoustu kolagenu I. V návaznosti na toto zjištění tedy lze říci, že kolagenový hydrogel podporuje buňky.

Jak už bylo zmíněno, smíchání kolagenových bioinkoustů s jinými biopolymery zlepšuje tisknutelnost a viskozitu materiálu. Zároveň však narušuje buněčný růst v tištěném konstruktu. Studie uvádějí, že smíchání agarózy s kolagenem může ve srovnání s čistým kolagenem až trojnásobně snížit buněčný růst mezenchymálních stromálních buněk v biotištěných konstruktech [23]. Slabá mechanická pevnost a rychlá hydrolyza představují nesnáze při použití kolagenového gelu v biotisku. I tak ale mají bioinkousty na bázi kolagenu obrovský potenciál pro podporu růstu a funkce buněk. Existuje tak široký prostor pro vývoj bioinkoustů na bázi kolagenu pro biotisk měkkých i tvrdých tkání.

Před možným využitím kolagenových bioinkoustů v praxi však je ještě mnoho práce. Pro každý vyvinutý bioinkoust je zapotřebí individuálně optimalizovaná sada parametrů tisku pro typ buněčné linie. Každý typ buňky potřebuje jedinečnou sadu parametrů biotisku a vlastností bioinkoustu. V několika pracích již byla snaha modelovat optimalizaci biotisků, zobecněný model ale nemůže splnit potřeby všech typů buněk. Výzkum mechanických vlastností buněk, jejich chování při působení tlaku a jejich stav po odstranění síly může pomoci při vývoji biologických inkoustů specifických pro konkrétní buňky. Ve studiích zabývajících se charakteristikou buněk bylo i pomocí mikroskopie atomárních sil prokázáno, že mechanické vlastnosti různých buněk se navzájem velmi liší [29; 30; 31; 32; 33]. Bioinkousty uzpůsobené k lepší ochraně buněk při tisku jsou stále do značné míry neprozkoumané. Studie jasně prokázaly negativní účinky tlaku při tisku na růst a funkci buněk [34; 35; 36; 37; 38]. Je třeba vyvinout bioinkousty se správnou rovnováhou mezi reologickými vlastnostmi pro ochranu proti pnutí a tisknutelností.

Bylo vyvinuto několik materiálů pro 4D tisk, které mění své vlastnosti a tvar v reakci na podněty zvnějšku [39]. Taková změna vlastností s ohledem na vnitřní stimuly produkované buňkami může posílit schopnost prostředí podporovat buňky.

Je tedy možné říci, že biotisk 3D tkáňových a orgánových struktur lze dosáhnout pouze překonáním současných problémů v oblasti tisku a pochopením buněčných bioprocésů, které se odehrávají v reakci na daný bioink/ECM. Nejdůležitější výzvou je tisknutelnost bioinkoustů, protože je to první krok k výrobě složitých struktur. Přirozenou tisknutelnost bioinkoustu je třeba optimalizovat pro různé buněčné linie a vytvořit vztahy

mezi mikrostrukturou bioinkoustu a integritou buněčné struktury s jejich funkcí. Pro vývoj velkých struktur a efektivní dodávání živin je třeba vyvinout bioinkousty s lepší tisknutelností a difuzivitou. Je třeba stanovit vztahy mezi parametry biotisku a vlastnostmi biotisku, aby bylo možné určit podmínky pro vytváření konstruktů s lepší tvarovou věrností a rozlišením.

2.3 Buňky používané pro biotisk

Buňky používané pro biotisk jsou nejčastěji multipotentní buňky kostní dřene. Tyto buňky mohou diferencovat na různé kmeny, ať už jde o osteocyty, adipocyty, chondrocyty nebo ektodermální či endodermální buňky. Využívány jsou i kmenové buňky z tuku nebo plodové vody.

Multipotentní buňky však mohou diferencovat pouze do konkrétních tkání. Oproti nim pluripotentní embryonální buňky mohou diferencovat téměř do jakékoli lidské tkáně. Takto vzniklé tkáně mohou v budoucnosti sloužit například pro lepší porozumění embryonálního vývoje. [6]

Mimo pluripotentní a multipotentní buňky se používají i diferencované buňky. V takovém případě je ale důležitý výběr vhodného zdroje buněk. Strukturu s diferencovanými buňkami je možné využít například pro určení působení léčiv na určité tkáně. [6]

3 Cíle práce

Cílem této práce je stanovení přesnosti biotisku při použití vlastních kolagenových bioinkoustů obsahujících buňky i bezbuněčných, na experimentální 3D tiskárně. Tyto kolagenové hydrogely budou připraveny mj. z kolagenu o koncentracích 10, 20 a 30 mg/ml a buněčné suspenze. Budou nalezeny vhodné 2D i 3D modely pro validaci přesnosti ve všech osách výtisku a vzniklé produkty budou obrazovým zpracováním srovnány s referenčním modelem. Nakonec budou zkoumány mechanické vlastnosti bioinkoustů, a to konkrétně elastický modul hydrogelů bez obsahu buněk a s buňkami.

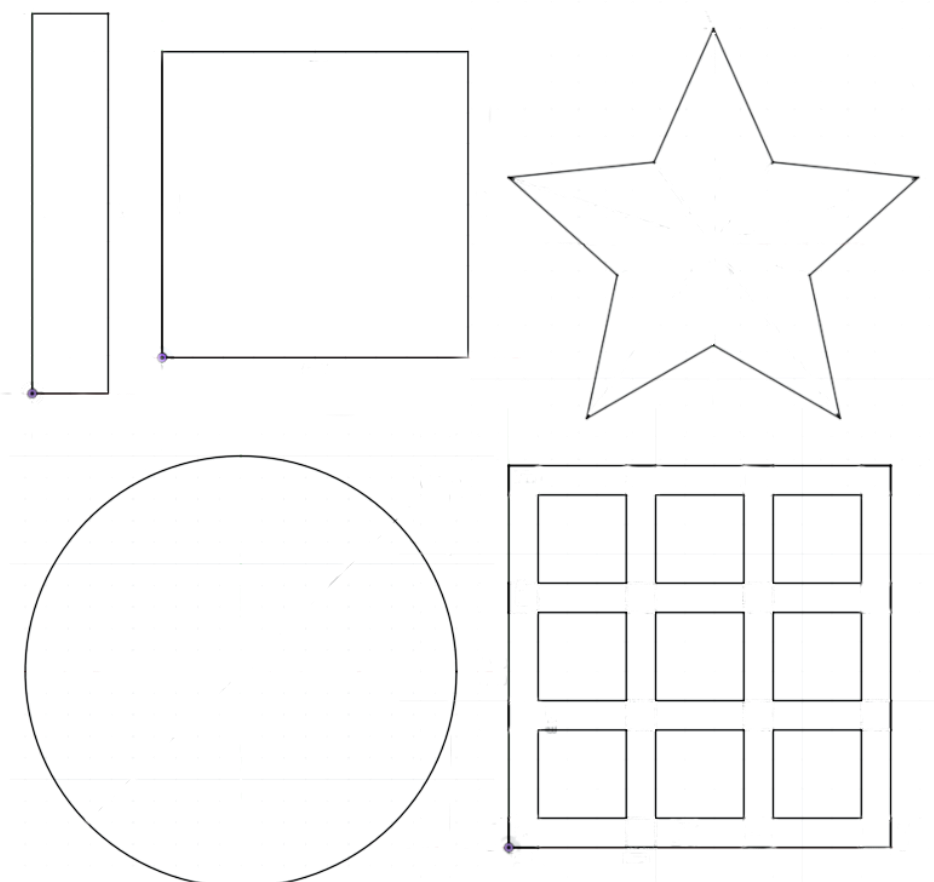
4 Metody

V této kapitole je popsán postup tvorby, měření a zpracování výsledků práce. Měření probíhalo v laboratořích Fakulty biomedicínského inženýrství ČVUT v Praze.

4.1 Vytvoření modelů

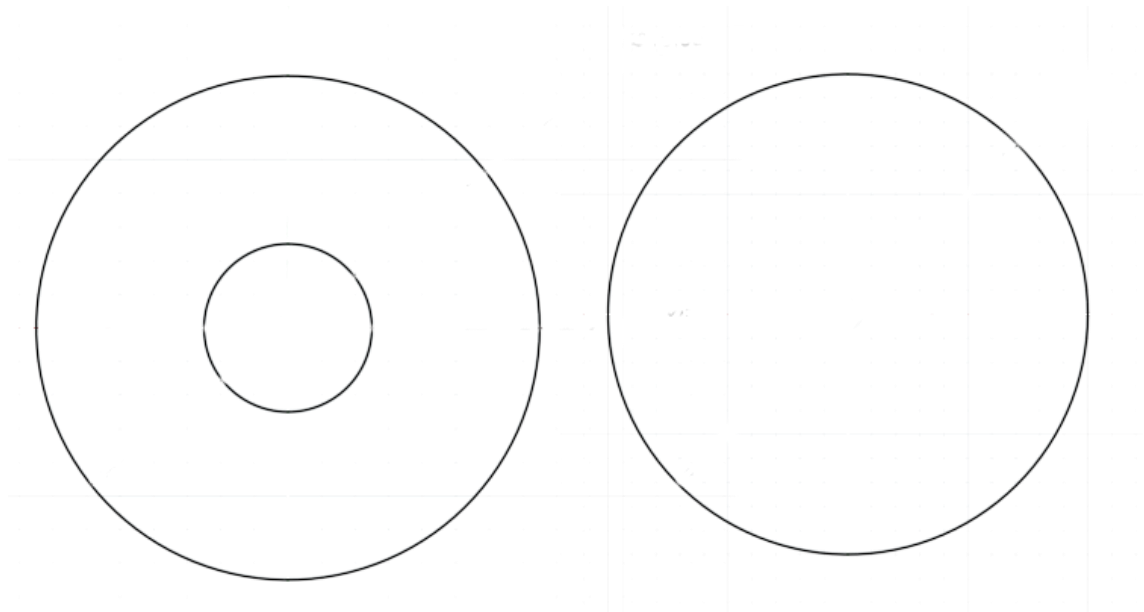
Pro účely stanovení přesnosti tisku bylo zapotřebí vytvořit 2D i 3D modely s různými tvary. Byly vytvořeny ploché modely čára, čtverce, hvězdy, kolečka a mřížky (viz obrázek č. 4.1), na kterých lze zkoumat dodržení tvaru, úhlů, kruhovitosti a otvorů v modelu. Dále byly vytvořeny prostorové modely válce a mezikruží (viz obrázek č. 4.2), které slouží pro ověření přesnosti tisku do výšky.

Tištěním čáry se ověřovala schopnost tiskárny vytisknout pouze tenkou čáru. Čára se vytiskne ve dvou průřezdech a byla vždy vytištěna šestkrát, aby bylo možné zjistit i přesnost tisku v závislosti na pořadí tisku. U čtverce byla zjišťována přesnost tisku vnitřních 90° úhlů, u hvězd naopak vnějších 120° . Na výtiscích koleček byla ověřována kruhovitost výtisků. Model mřížky byl vybrán pro ověření schopnosti gelu nezalít otvory.



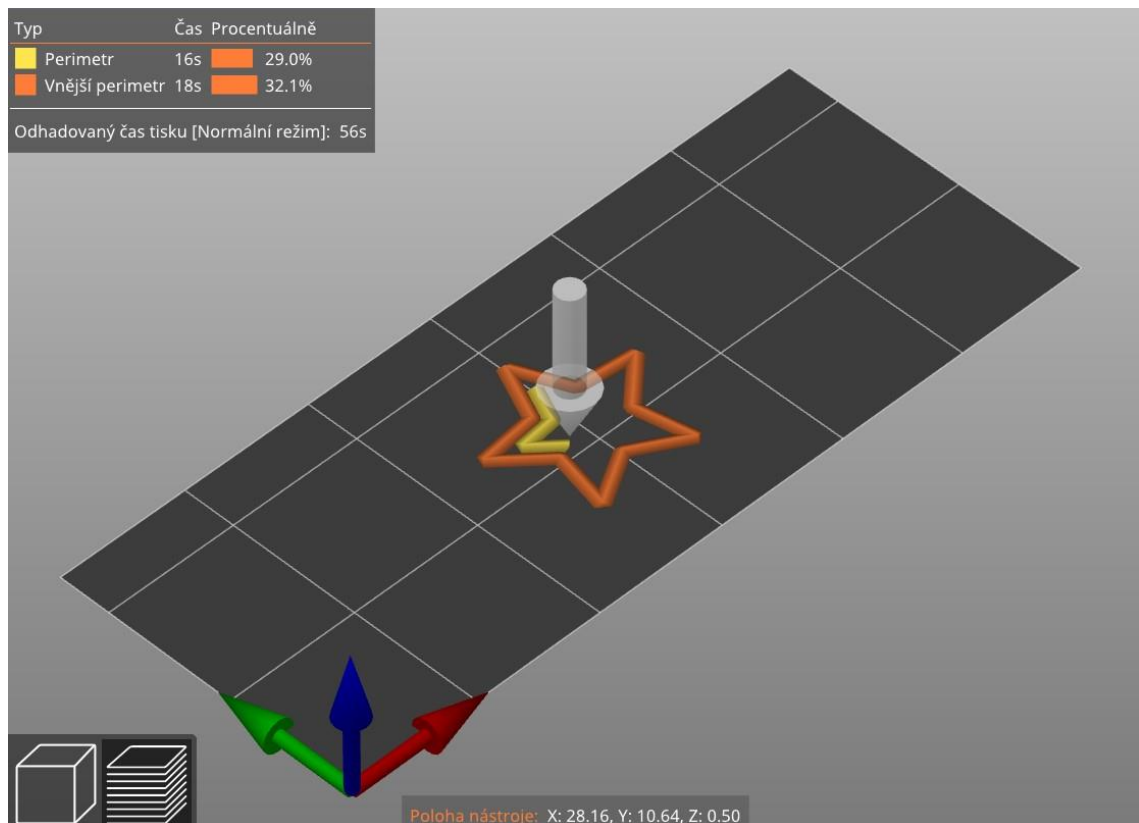
Obrázek č. 4.1: Náčrty 2D modelů.

Prostorové modely sloužily k určení přesnosti tisku do výšky, na modelu mezikruží navíc byla stejně jako na mřížkách ověřována schopnost gelu nezalít otvor.



Obrázek č. 4.2: Náčrty 3D modelů.

Modely pro tisk byly vytvořeny v prostředí Autodesk Fusion 360, odkud byly následně exportovány jako STL soubor do programu PrusaSlicer. PrusaSlicer je software, jež byl použit pro vytvoření tiskové dráhy. Dráhy tisku byly vytvořeny po jednotlivých vrstvách výtisku tak, že nakonec vznikla 3D modelace tisku. Při tvorbě dráhy tisku jsou vyznačeny i které linie jsou okrajové a které ve středu, což slouží především při tisku struktur z více materiálů, jak je patrné na obrázku č. 4.3. Postup tisku je vygenerován na základě nastavení samotného sliceru, v němž je důležité uvést všechny parametry tisku a tiskárny. Mezi tyto parametry patří zejména průměr stříkačky, rychlost tisku, velikost tiskové podložky a tloušťka jednotlivých vrstev výtisku. Výsledná dráha tisku byla exportována jako g-kód. G-kód je způsob kódování používaný pro ovládání 3D tiskáren nebo CNC. Je to kód sestavený ze souřadnic jednotlivých bodů, na které má tryska dojet. Tento kód byl načten v software Repetier, který ovládá tiskárnu.

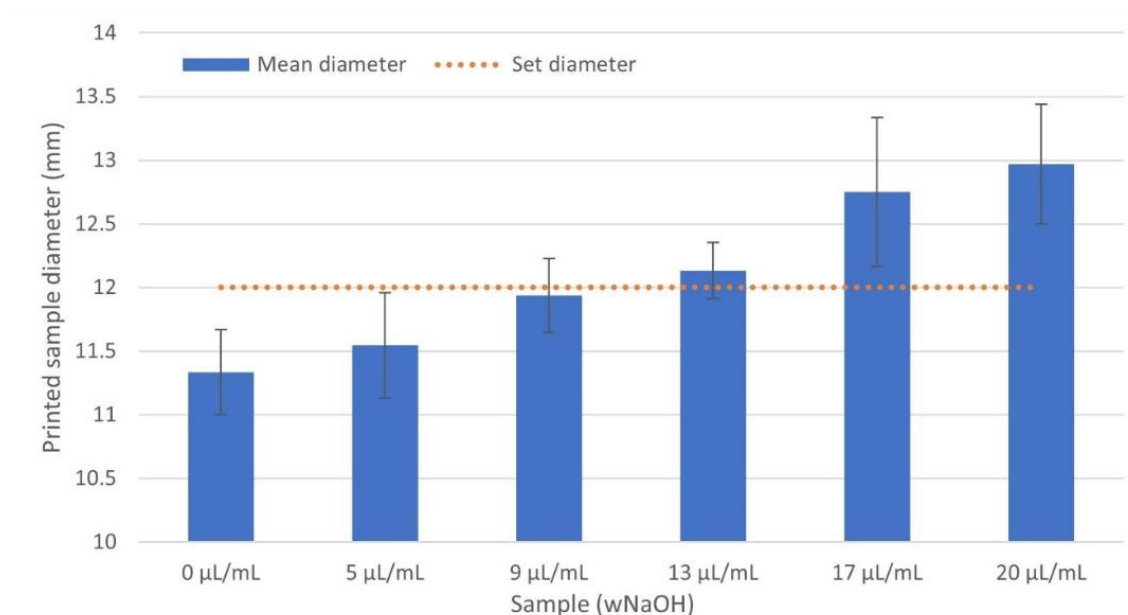


Obrázek č. 4.3: Ukázka tiskové cesty hlavičky tiskárny v prostředí PrusaSlicer. Na snímku se hlavičky nachází v první ze dvou vrstev hvězdy a tiskne druhý ze tří perimetrů.

4.2 Vytvoření hydrogelu

Gel pro 3D tisk musí splňovat určité vlastnosti, jako je dostatečně rychlé tuhnutí po vytištění, zároveň však nesmí docházet k jeho tuhnutí ve stříkačce. Přitom však jde o gel, v němž mají přežít buňky. Důležité je tedy sledovat pH výsledného gelu, které by nemělo pro tyto účely překročit 8 a klesnout pod 7. Podle literatury je optimální pH pro růst buněk mezi 7,38 a 7,87 [40; 41].

Složení gelu (viz tabulka č. 4.1) používaného v této práci bylo vytvořené na základě předchozí studie provedené týmem Bioreaktory pro tkáňové a orgánové náhrady na FBMI ČVUT [40]. Tato studie zkoumala závislost přesnosti tisku na pH hydrogelu, přičemž jedním z výstupů bylo zjištění, že největší přesnosti dosahuje tisk hydrogelu s obsahem mezi 9 a 13 μl 1M NaOH v 1 ml hydrogelu (viz graf č. 4.1). Proto byla zvolena koncentrace NaOH v připravených bioinkoustech 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$.



Graf č. 4.1: Graf závislosti velikosti průměru vytištěného kolečka na obsahu NaOH v hydrogelu. Model měl průměr 12 mm. Zdroj [40]

Pro práci byl vybrán kolagenový gel především proto, že ke crosslinkování kolagenu dochází ve fyziologických podmínkách. Vytištěné objekty je tedy nutné pouze vložit do inkubátoru a ponechat je uvnitř po dobu 30 minut [40], což je výrazně dostupnější a snazší metoda než například osvětlování UV zářením, jako je nutné u gelů s obsahem želatiny. Výhodou je také šetrnost tohoto způsobu crosslinkování vůči buňkám.

Složení hydrogelu má výsledné pH v mezích uvedených výše. Kvůli udržení vlastností všech složek hydrogelu je nutné všechny používané látky uchovávat při teplotě max. 4 °C a pracovat s nimi tak, aby nedošlo k ohřátí (např. uchování na ledu). Při vyšších teplotách ztrácí gel homogenitu, rozdělí se na tekutou a tuhou fázi a není s ním možné tisknout, neboť dochází k předčasnému tuhnutí gelu a ucpávání trysky.

Tabulka č. 4.1: Složení hydrogelu použitého pro tisk.

| Látka | Objem (μ l) |
|----------------------------|------------------|
| ddH ₂ O | 180 |
| 1M NaOH | 20 |
| 10x médium DMEM | 133 |
| 1x médium DMEM (s buňkami) | 667 |
| kolagen | 1000 |
| celkový objem | 2000 |

Hydrogel je potřeba připravit dále uvedeným způsobem, aby nedošlo k předčasnému ztuhnutí gelu nebo poškození buněčné suspenze vlivem teploty nebo pH. Pro přípravu hydrogelu je potřeba připravit látky uvedené v tabulce č. 4.1. Destilovaná voda, 1M roztok hydroxidu sodného a obě média o uvedeném objemu byly smíchány a do injekční stříkačky s koncovkou Luer Lock byl pomocí jehly nabrán 1 ml směsi. Do druhé injekční stříkačky byl nabrán 1 ml kolagenu. Tyto dvě stříkačky byly poté pomocí oboustranné spojky propojeny (viz obrázek č. 4.4) a látky byly promíchány, takže vznikla homogenní směs, kterou už je možné tisknout. S touto směsí je třeba pracovat rychle, aby se příliš neohřála a neztratila požadované vlastnosti. Pro práci byl použit kolagen o koncentraci 10 mg/ml, 20 mg/ml a 30 mg/ml. Uváděná koncentrace je koncentrací kolagenu přidávaného do hydrogelu, výsledná koncentrace kolagenu v hydrogelu je po smíchání poloviční.



Obrázek č. 4.4: Propojené stříkačky s promíchaným hydrogelem.

Pro tisk s buňkami byly použity mesenchymální kmenové buňky izolované z tuku prasete (ASC). Kultivace těchto buněk probíhala v médium DMEM s 10 % fetálního séra, 1 % antibiotik ABAM (100 IU/ml penicilinu, 100 μ g/ml streptomycinu, a 0,25 μ g/ml Amphotericinu B; vše Sigma-Aldrich (MO, USA) a 10 ng/ml FGF2. Buňky byly

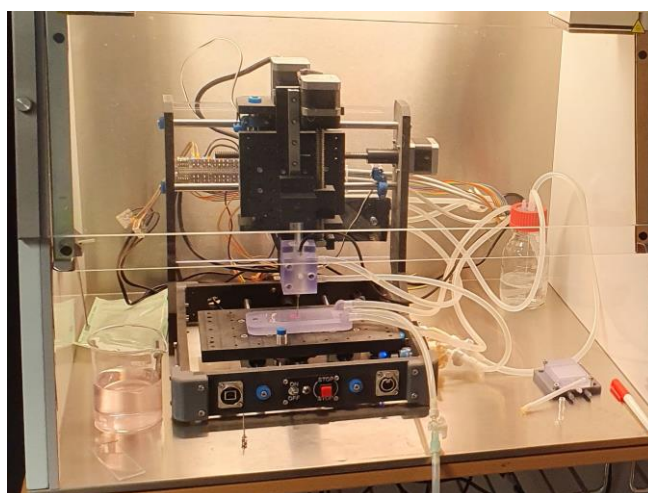
kultivovány v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂) po dobu 7 dnů, třetí a šestý den bylo kultivační médium vyměněno za nové.

Z takto vzniklé buněčné suspenze o koncentraci 40 mil. buněk/ml bylo 300 µl použito na přípravu 2 ml bioinkoustu (1 ml tekuté složky s buňkami a 1 ml kolagenu). Objem čistého 1x média DMEM byl tak pro přípravu snížen na 367 µl. Finální koncentrace buněk v bioinkoustu pak byla 6 mil. b./ml. Suspenze buněk byla rozmíchána v 1x koncentrovaném růstovém médiu o teplotě přibližně 10 °C.

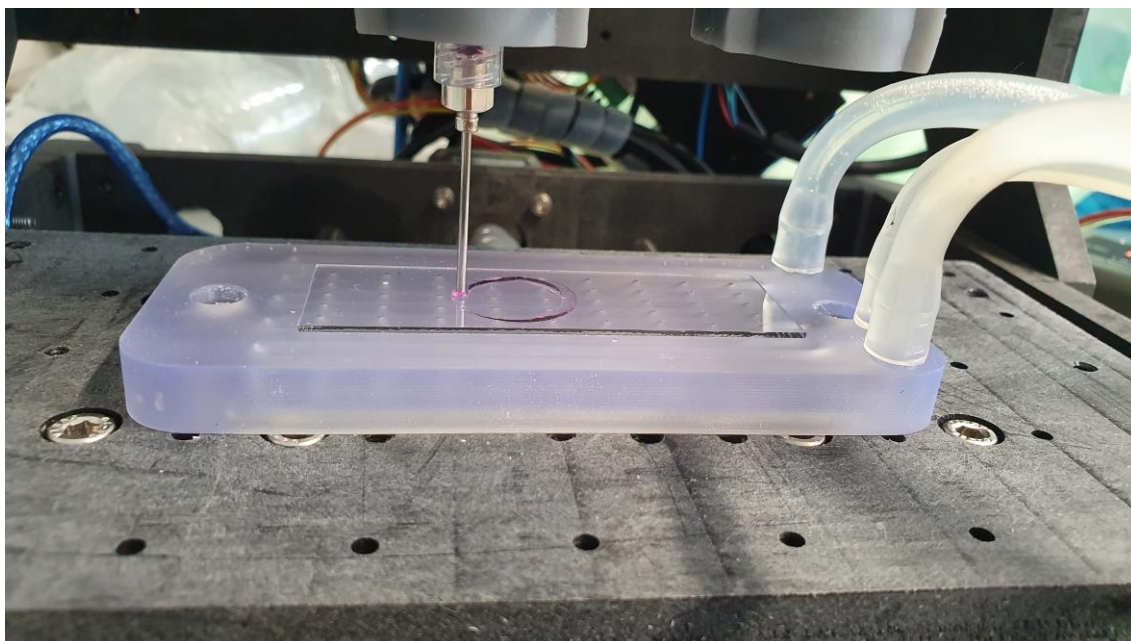
Míchání bioinkoustu bylo nutné upravit, aby nedocházelo k poškození buněk. Změna byla v přidání třetí stříkačky. V první stříkačce byl kolagenový gel, v druhé byla smíchána všechna aditiva kromě buněčné suspenze a ve třetí potom buněčná suspenze. Nejprve byly smíchány první a druhá stříkačka, kde došlo k upravení pH. Poté byl vzniklý gel smíchán s buněčnou suspenzí pomocí oboustranných spojek. Takto připravený bioinkoust bylo potřeba zpracovat cca do 1 hodiny, vzniklý výtisk pak musel být ponořen do kultivačního média, aby nedocházelo k vysychání gelu a poškození buněk.

4.3 Tisk

Tisk probíhal na experimentálně navržené 3D biotiskárně (obrázek 4.5). Tato tiskárna umožňuje tisk metodou extruze, je poháněna krokovými motory, které hýbou deskou ve směru os x a y. Ve směru osy z hýbe motor hlavicí s extrudérem, který je samotný poháněn dalším krokovým motorem. Tento naposledy zmíněný motor tlačí píst stříkačky s gelem a tím dochází k extruzi hydrogelu na tiskovou desku. Jako tisková deska bylo vybráno laboratorní sklíčko o velikosti 60x24 mm umístěné na vakuovém držáku, jak je patrné na obrázku č. 4.6. Sklo bylo vybráno proto, že z něj lze hydrogel snadno sejmout, zároveň s ním nijak nereaguje, a navíc v případě použití buněk se jedná o klasické prostředí pro kultivaci.



Obrázek č. 4.5: Tiskárna v laminárním boxu.



Obrázek č. 4.6: Tisk na laboratorní sklíčko umístěné na vakuovém držáku.

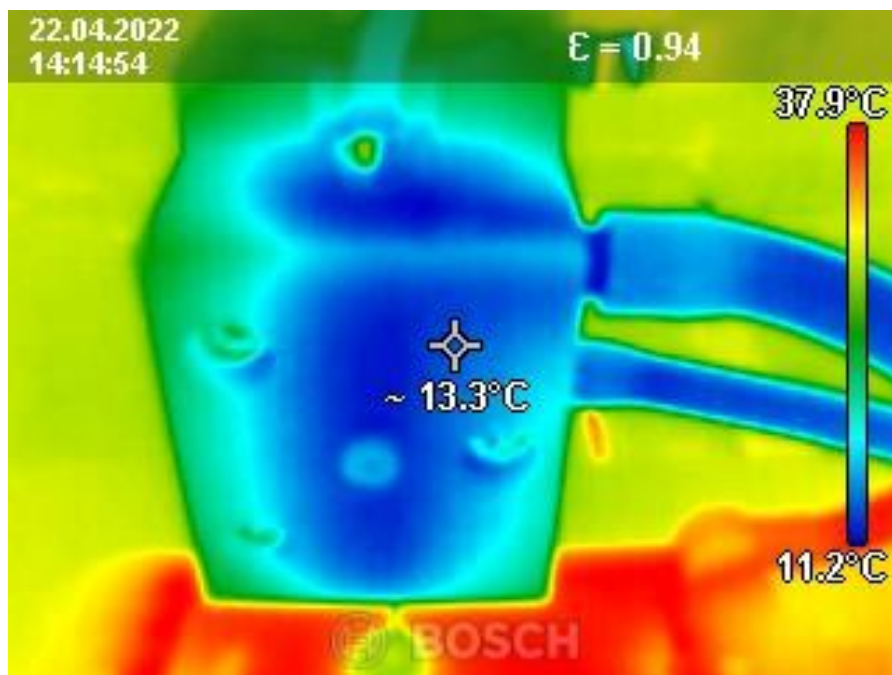
Tiskárna se ovládá pomocí aplikace Repetier. V něm je nutné před tiskem nejprve vynulovat všechny osy a načíst soubor s g-kódem pro tisk. V g-kódu už jsou ze sliceru nastavené parametry tisku, které jsou uvedené v tabulce č. 4.2. Do tiskové hlavice se vsadí injekční stříkačka s hydrogelem připraveným pro tisk. Na konci stříkačky je připevněna tryska. V této práci byla použita tryska velikosti 17G s vnitřním průměrem 1,07 mm. V tuto chvíli je již možné začít tisknout, nicméně je vhodné ještě předtím vytlačit extrudérem trochu gelu ze stříkačky. Tím se vytlačí možný vzduch z trysky stříkačky a nestane se tak, že by gel byl vytlačován až po ujetí části dráhy tisku.

Tabulka č. 4.2: Parametry tisku.

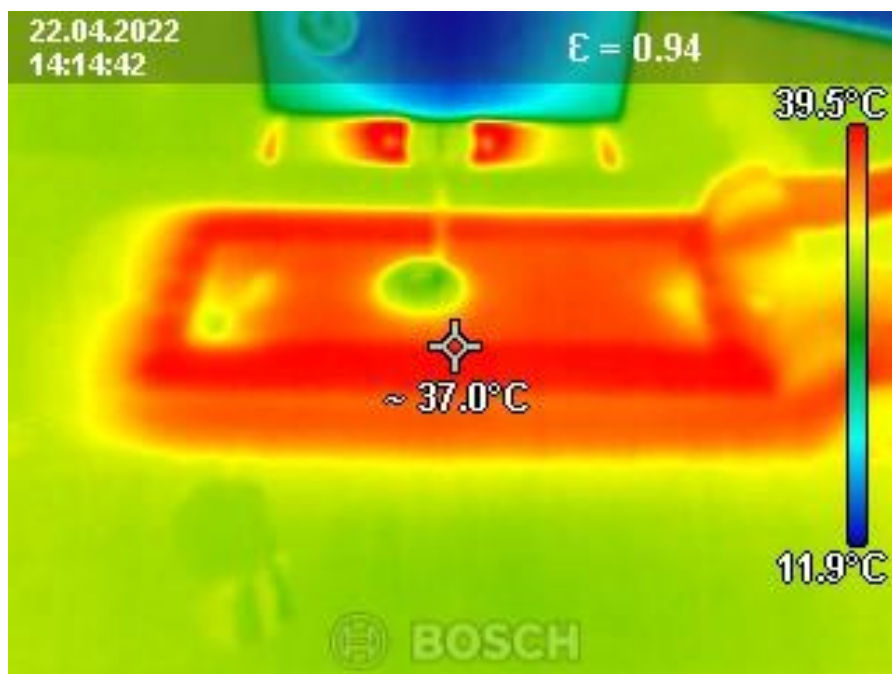
| | |
|-------------------------------|-------|
| Rychlost tisku (mm/s) | 1,25 |
| Vnitřní průměr stříkačky (mm) | 9,75 |
| Průměr trysky (mm) | 1,07 |
| Výška vrstvy (mm) | 0,5 |
| Tvar tiskové podložky (mm) | 24·60 |
| Teplota extruderu (°C) | 15±2 |
| Teplota tiskové podložky (°C) | 37±3 |

Extrudér tiskárny je po celou dobu tisku chlazen vodním systémem na teplotu kolem 15 °C, což bylo kontrolováno pomocí termokamery v průběhu tisku (viz obrázek č. 4.7). Směs ve stříkačce je tak až do vytlačení udržována v chladu a je díky tomu možné tisknout z jedné náplně více výtisků. Tisková podložka je podobným systémem vyhřívána

na 37 °C, viz obrázek č. 4.8. Ke crosslinkování hydrogelu tak dochází okamžitě po kontaktu bioinkoustu s tiskovou podložkou.



Obrázek č. 4.7: Teplota extruderu, snímek z termokamery.



Obrázek č. 4.8: Teplota tiskové podložky, snímek z termokamery.

Vytištěné objekty byly na 30 minut vloženy do inkubátoru, kde došlo k definitivnímu ztuhnutí struktury. Inkubované objekty byly poté foceny digitálním mikroskopem Dino-

Lite (AM7115MZTL, Dino-Lite Digital Microscope, CA, Spojené státy Americké). Mikroskop je připevněn na stativu a je možné jej zkalibrovat pomocí kalibrační destičky či jiného měřítka. Rozměry fotky jsou tak vždy známé a je možné určit plochu vytištěných objektů.

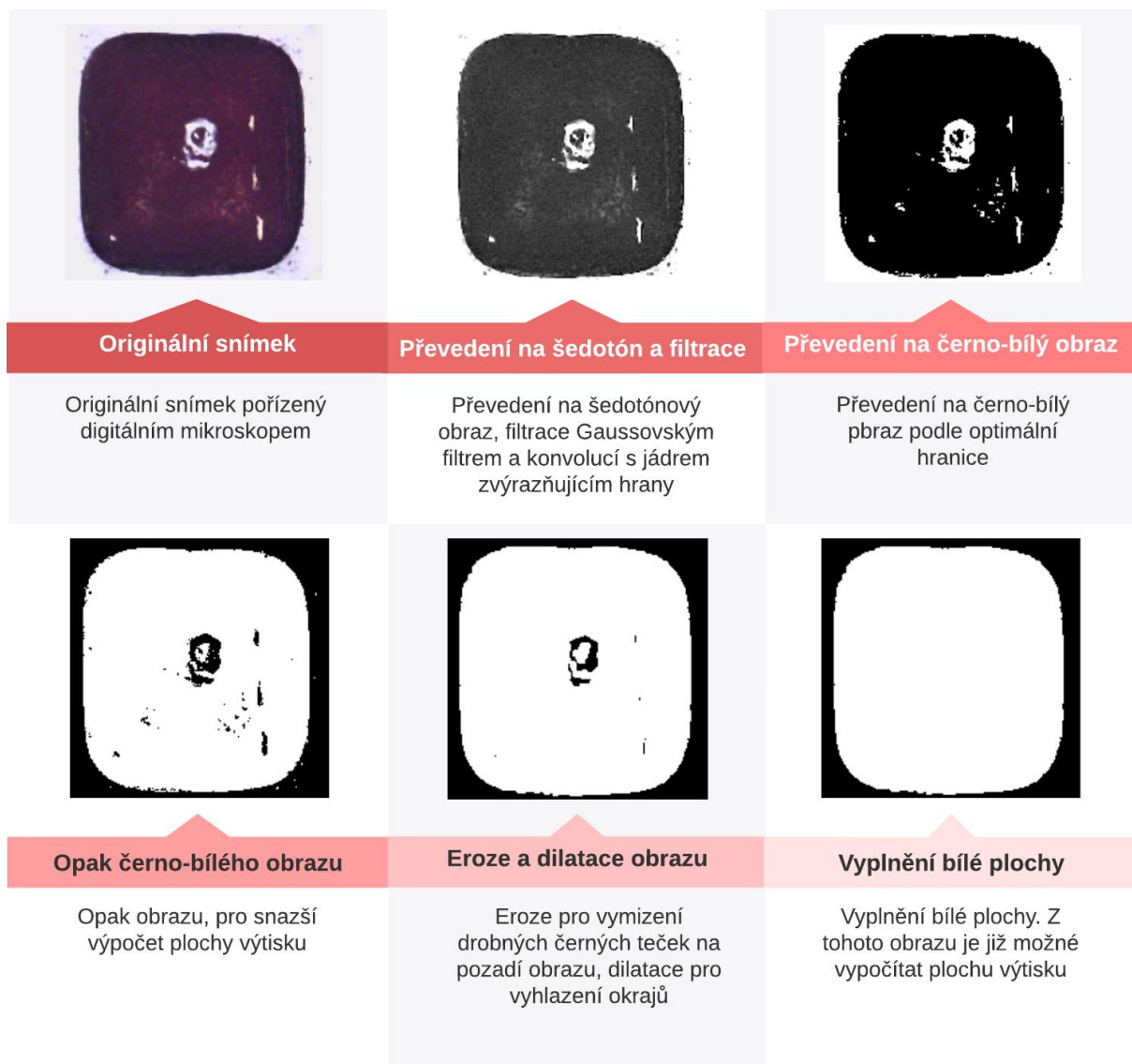
Pro stanovení závěrů práce bylo vytištěno od každého modelu 10 výtisků bez buněk v každé ze tří koncentrací kolagenu přidaného do hydrogelu. S buňkami bylo pro finanční a časovou náročnost vytištěno celkem 5 výtisků v každé ze tří koncentrací modelů čtverce, kolečka a válce.

4.4 Zpracování obrazu

Všechny snímky pořízené digitálním mikroskopem byly exportovány a dále zpracovány. U většiny snímků bylo nejprve třeba odstranit různé skvrny, které by při následném prahování obrazu vytvářely nepřesnosti. Pro odstranění skvrn byl použit program GIMP. U některých snímků byl rovněž upraven kontrast a jas tak, aby vynikl vytištěný objekt na jednobarevném pozadí. Následovalo zpracování v prostředí MATLAB pomocí vlastního skriptu, jehož blokové schéma je znázorněné na obrázku č. 4.9 níže. Nejprve byly snímky převedeny na šedotónový obraz a filtrovány pomocí Gaussova filtru a konvoluce maskou zvýrazňující hrany. Poté byla zjištěna optimální hranice, podle níž byly poté šedotónové snímky převedeny na černo-bílé. U černo-bílých obrazů byla provedena nejprve eroze obrazu, aby různé drobné bílé tečky na pozadí zmizely. Poté byla provedena dilatace za účelem sjednocení okrajů, které byly v některých případech vlivem různých odlesků nad hranicí prahu. Posledním krokem bylo pak vyplnění černých děr na bílém poli. U takto zpracovaných černo-bílých obrazů byla určena výška, šířka a plocha výtisku. Z určené plochy výtisku byl poté vypočítán poměr ploch výtisku a původního modelu pomocí vzorce (1)

$$p = \frac{A_v}{A_m} \quad (1)$$

kde p je poměr ploch, A_v je plocha výtisku, A_m je plocha modelu.

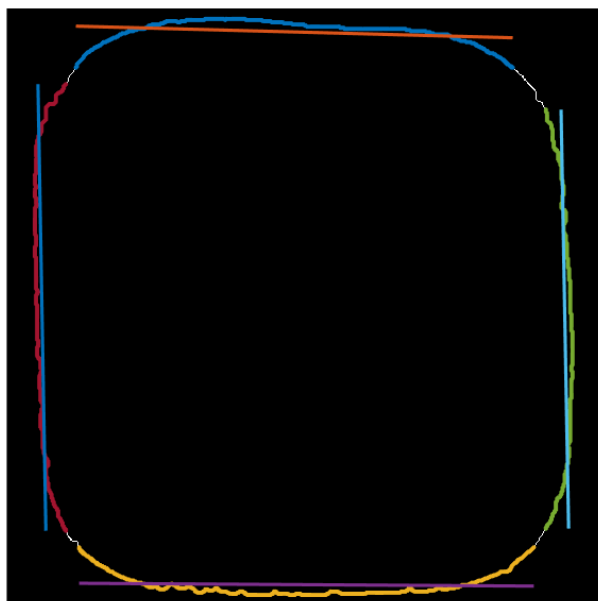


Obrázek č. 4.9: Postup zpracování obrazu.

Pro určení úhlů u čtvercových výtisků bylo dále nutné určit hranu obrazce, ta byla poté nahrazena lineární aproximací a úhel byl určen mezi směnicemi těchto aproximací pomocí vzorce (2) odvozeného ze vzorce pro tangens rozdílu úhlů. Zvýrazněné hrany a jejich směrnice je možné pozorovat na obrázku č. 4.10.

$$\alpha = \tan^{-1}\left(\frac{m_1 - m_2}{1 + m_1 \cdot m_2}\right) \quad (2)$$

kde α je úhel mezi přímkami, m_1 je směrnice jedné přímky a m_2 druhé.



Obrázek č. 4.10: Zvýrazněné hrany výtisku čtverce a jejich aproximace.

U snímků mřížek byl navíc určován počet otvorů, tedy bylo zjišťováno, kolik z devíti jamek se při tisku zalilo či nemělo správně dotištěnou hranici. Pro výtisky koleček byla určována kruhovitost pomocí vzorce (3). Ideální hodnotou kruhovitosti je 1. Čím vyšší vyjde hodnota, tím méně je tvar podobný kruhu.

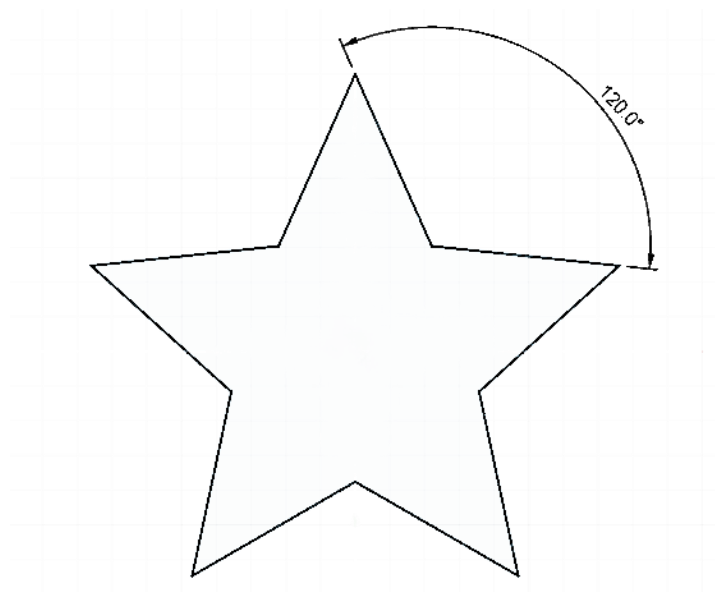
$$C = \frac{o^2}{4 \cdot \pi \cdot A} \quad (3)$$

kde C je kruhovitost, o obvod útvaru, A plocha útvaru [42]. Obvod byl určen pomocí příkazu `regionprops`, který nalezne obvod jednotné bílé plochy v černo-bílém obrazu.

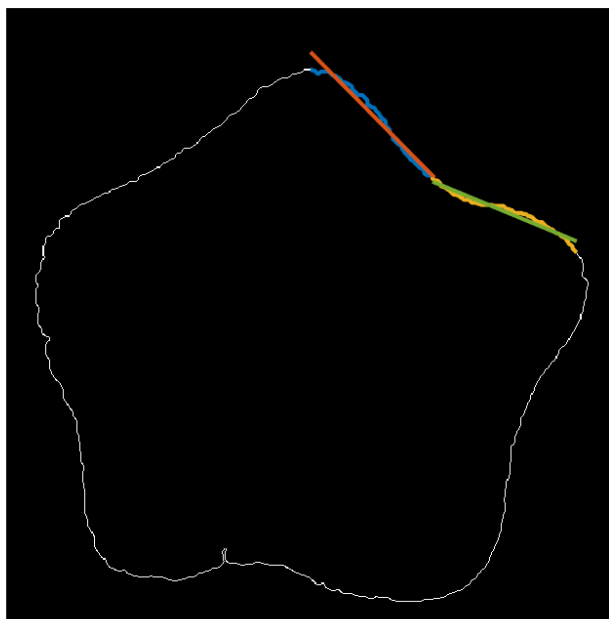
Dalším zkoumaným prvkem byl vnější úhel pěticípé hvězdy (označen na obrázku č. 4.11). Tento úhel je u modelu roven 120° . Jeho velikost byla zjišťována podobně jako u čtverců velikost 90° úhlu. Byly vytvořeny aproximace dvou hran, mezi nimiž má být úhel 120° , jak je znázorněné na obrázku č. 4.12. Pomocí směrnic těchto aproximací byl úhel určen. Pomocí vzorce (4) byl vypočítán poměr tohoto úhlu u výtisku a u modelu. Dle stejného vzorce byly určeny i poměry 90° úhlů u čtverců.

$$u = \frac{\alpha_v}{\alpha_m} \quad (4)$$

kde u je poměr úhlů, α_v je úhel ve výtisku, α_m je úhel v modelu.



Obrázek č. 4.11: Model hvězdy se zvýrazněným zkoumaným úhlem.



Obrázek č. 4.12: Zvýrazněné hrany výtisku hvězdy a jejich aproximace.

4.5 Měření mechanických vlastností

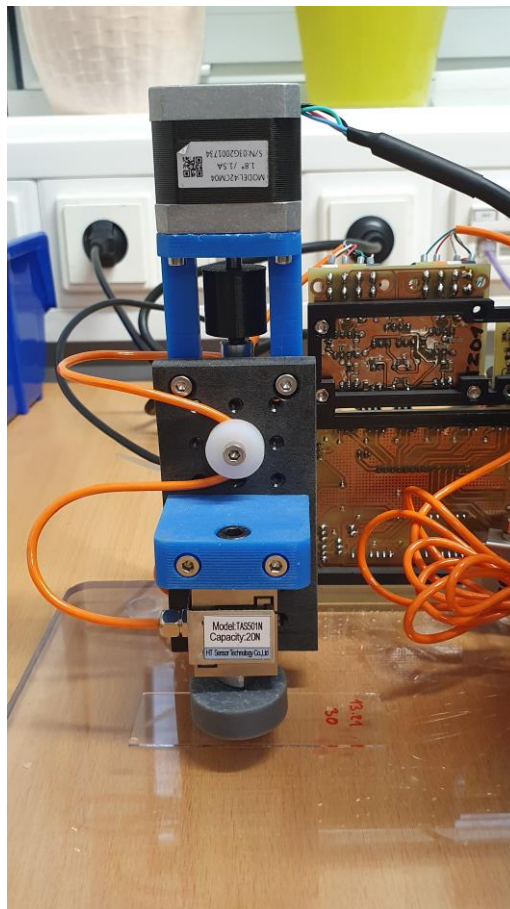
Pro měření mechanických vlastností byl vytvořen model válce o průměru 12 mm a výšce 5 mm. Tento model byl vytištěn pětkrát s každou z koncentrací kolagenu 10, 20 a 30 mg/ml, celkem tedy pro toto měření vzniklo 15 výtisků. Vytiskované objekty byly na

dobu 30 minut vloženy do inkubátoru a poté byly nafoceny digitálním mikroskopem. Snímky výtisků byly zpracovány postupem popsáným níže. Měření mechanických vlastností bylo provedeno na experimentálně navrženém přístroji vyrobeném týmem Bioreaktory pro tkáňové a orgánové náhrady na FBMI ČVUT. Tento přístroj (obrázek č. 4.13) pomocí krokového motoru pohybuje destičkou o průměru 30 mm se senzorem síly TAS501N (HT Sensor, Xi'an, Čína). Pohyb krokového motoru je ovládán pomocí desky Arduino, která zároveň i snímá signál ze senzoru. Software tohoto přístroje byl vytvořen na Qt platformě.

Výtisk byl stlačen destičkou se senzorem proti vodorovnému povrchu. Po celou dobu stlačování byla snímána a zaznamenávána síla, kterou výtisk působil proti senzoru. Z naměřených hodnot byly vytvořeny grafy závislosti síly na posunu desky po ose Z. Z lineární části grafu byla zjištěna velikost směrnice přímky trendu. Ze směrnice, plochy a výšky výtisku byl vypočítán elastický modul podle vzorce (5)

$$E = \frac{k \cdot l_0}{A} \quad (5)$$

kde k je směrnice přímky trendu, l_0 výška výtisku ve směru osy Z a A plocha výtisku [40].

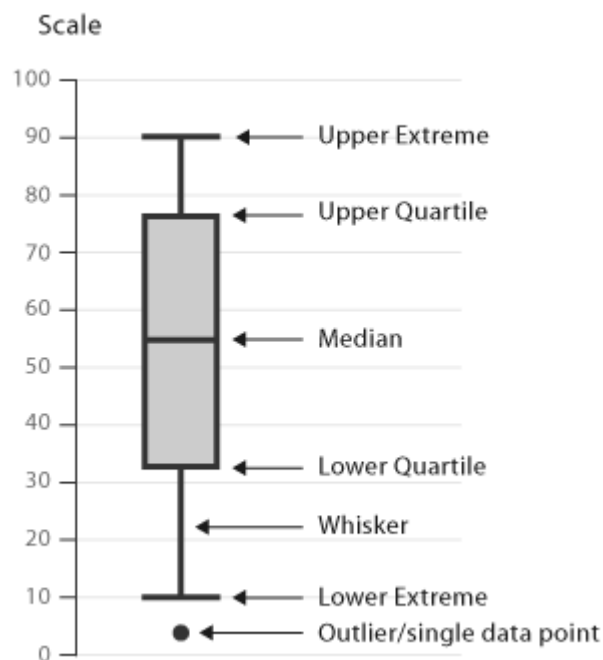


Obrázek č. 4.13: Přístroj pro měření síly výtisku působící proti senzoru.

4.6 Statistické zpracování

Statistické zpracování dat bylo stejně jako zpracování obrazu provedeno v prostředí MATLAB. Vzhledem k počtu dat, kdy každý soubor čítal celkem 10 hodnot, nebyl prováděn test normality dat. Pro zpracování tedy byl použit neparametrický Kruskalův-Wallisův test, který testuje shodu distribučních funkcí. Kruskalův-Wallisův test je neparametrickou verzí klasické jednofaktorové ANOVA, který je možné použít pro porovnání více než dvou souborů. Porovnává mediány souborů a na hladině významnosti 1 % rozhodne, zda mají stejné rozdělení. Pro výpočet testovací statistiky používá pořadí dat. Data srovná podle velikosti a přiřadí jim pořadí. V tomto testu je F-test z klasické ANOVA nahrazen chí kvadrát statistikou. Kruskalův-Wallisův test pracuje s předpokladem, že všechny soubory pochází z populací o stejných spojitých distribučních funkcích a zároveň jsou na sobě nezávislé. Nulová hypotéza tohoto testu je shoda rozdělení jednotlivých souborů dat. Alternativní hypotéza říká, že alespoň jeden soubor pochází z jiného rozdělení než ostatní soubory. Výsledkem tohoto testu je p-hodnota, která se pohybuje v intervalu od 0 do 1, kde hodnoty blízké 0 znamenají zamítnutí nulové hypotézy na hladině významnosti 1 %.

Pro znázornění výsledků statistického zpracování byly vytvořeny boxploty. Boxplot je způsob znázornění rozdělení dat, ve kterém je zvýrazněný medián nebo střední hodnota, první a třetí kvartil souboru dat, krajní hodnoty a případně odlehle hodnoty, viz obrázek č. 4.14. Mezi těmito znázorněními je pro označení statisticky významného rozdílu vytvořena svorka s hvězdičkou.

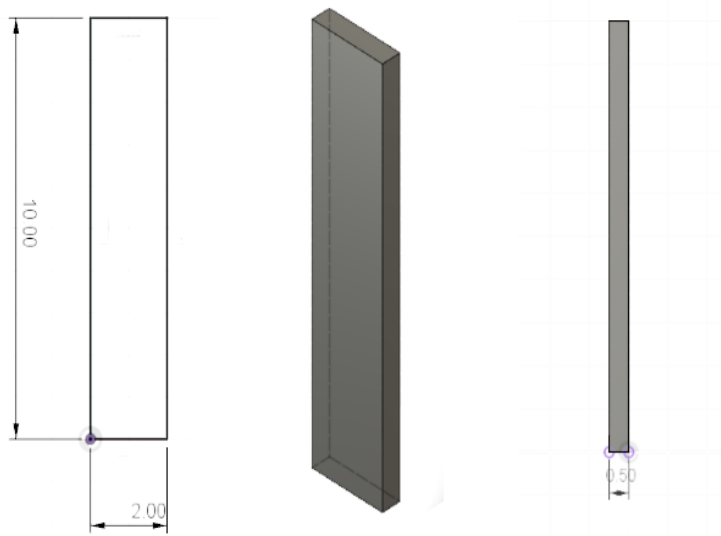


Obrázek č. 4.14: Ukázka boxplotu.

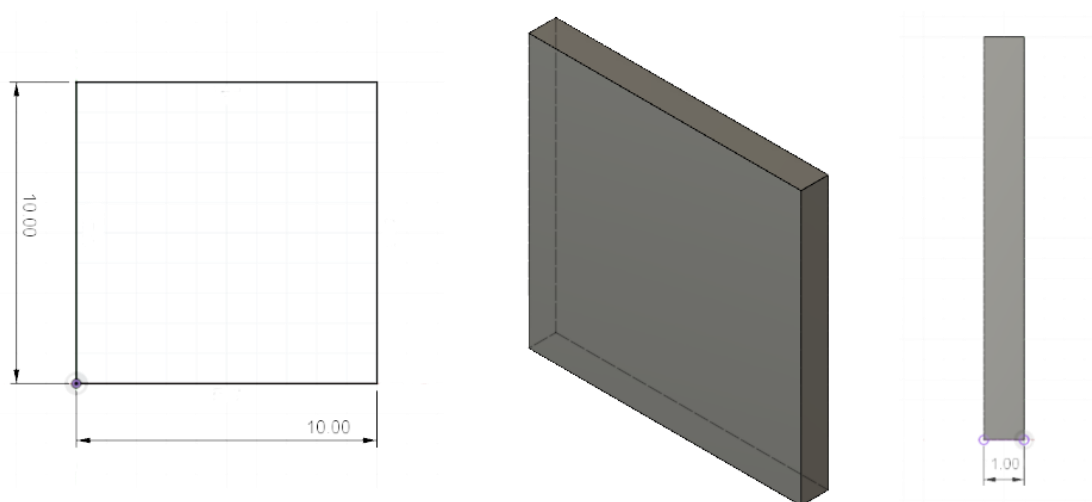
5 Výsledky

5.1 Vytvořené modely

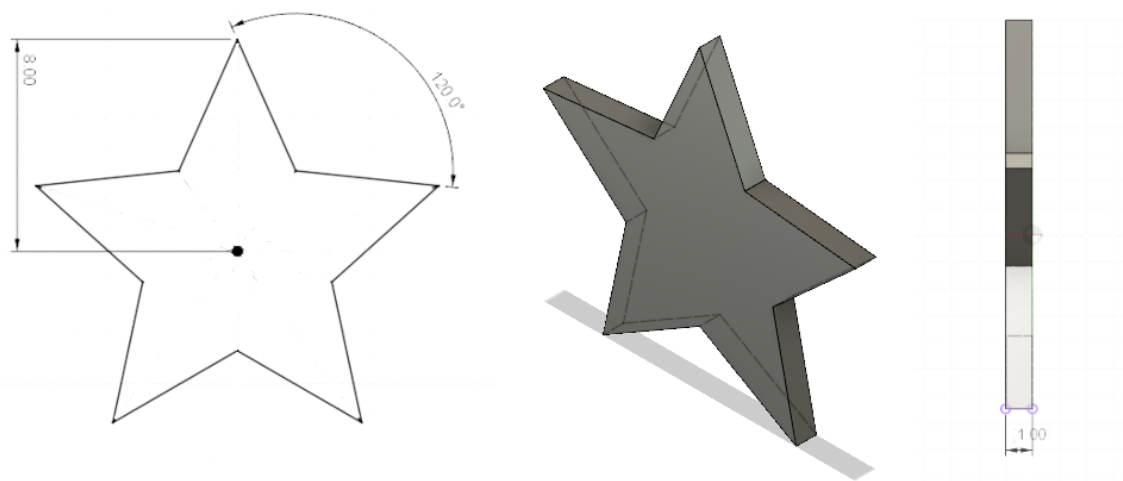
Bylo vytvořeno celkem sedm modelů pro tisk, pět pro určení přesnosti 2D tisku a dva pro určení přesnosti 3D tisku. Modely jsou zobrazeny v obrázcích 5.1 až 5.8 níže.



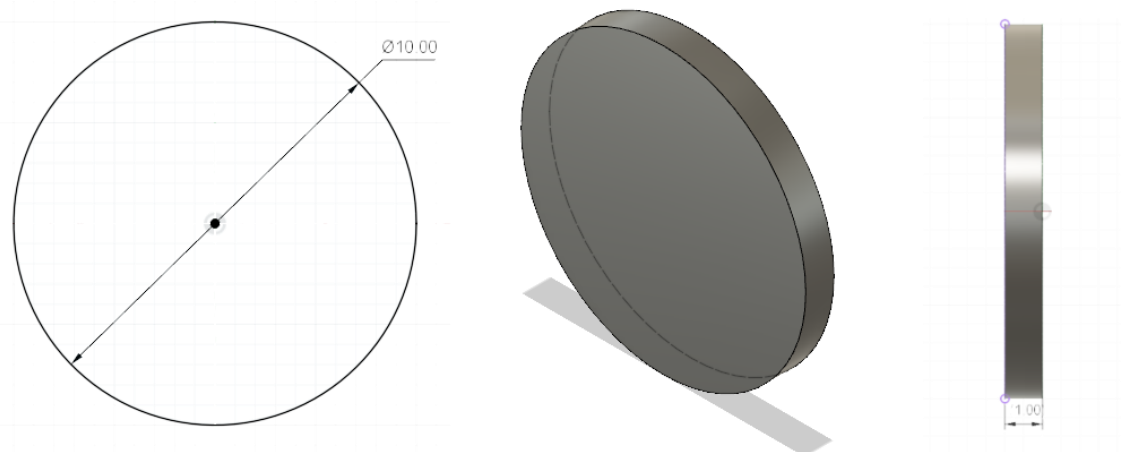
Obrázek č. 5.1: Model čáry pro určení přesnosti 2D tisku.



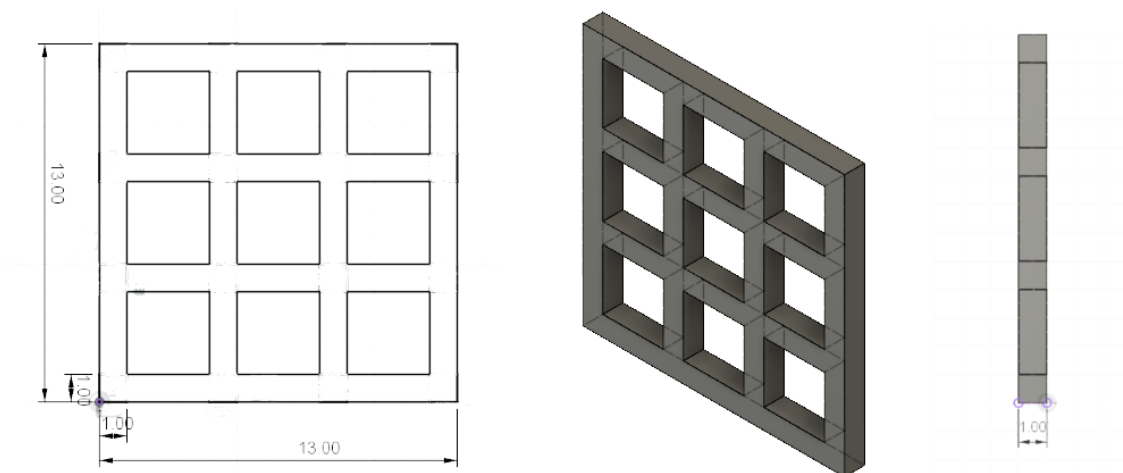
Obrázek č. 5.2: Model čtverce pro určení přesnosti 2D tisku.



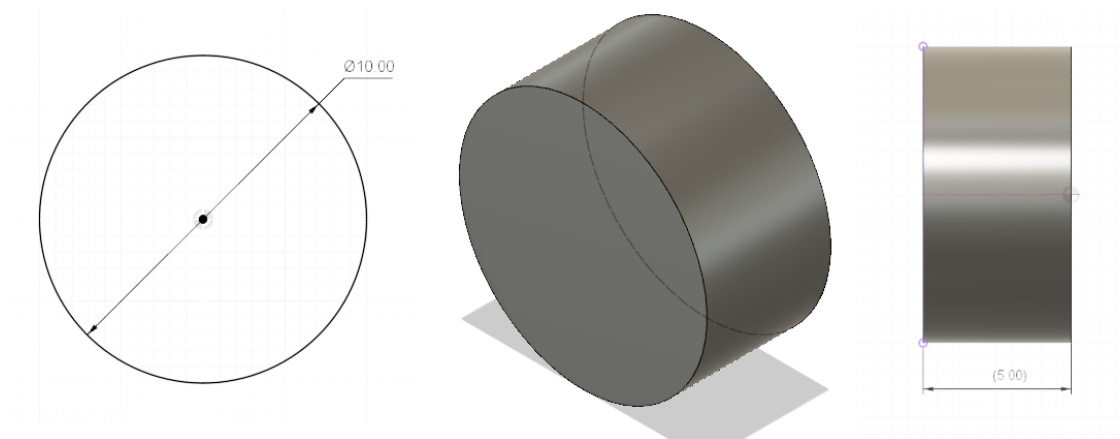
Obrázek č. 5.3: Model hvězdy pro určení přesnosti 2D tisku.



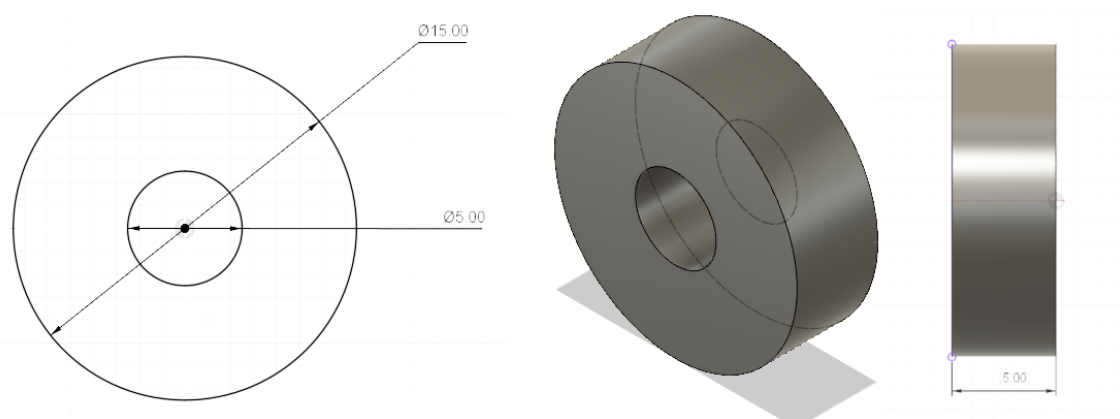
Obrázek č. 5.4: Model kruhu pro určení přesnosti 2D tisku.



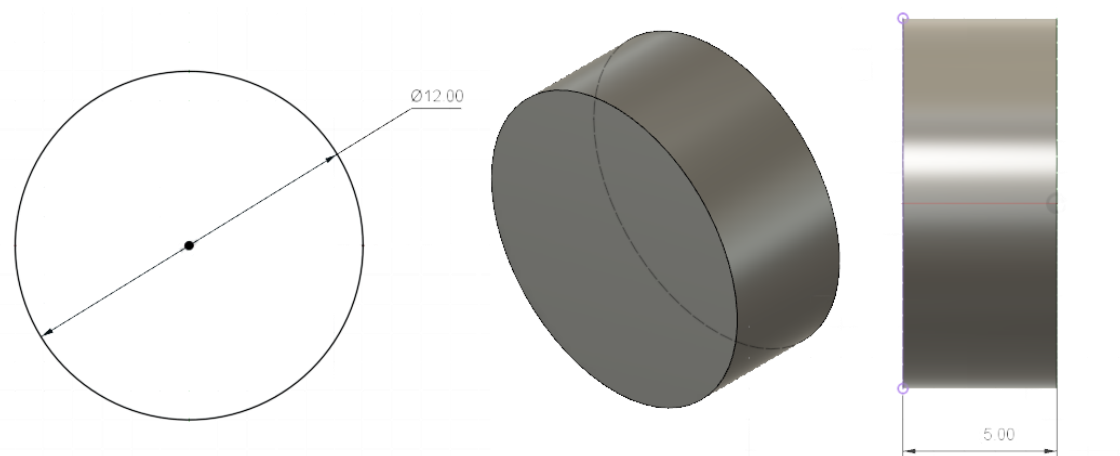
Obrázek č. 5.5: Model mřížky pro určení přesnosti 2D tisku.



Obrázek č. 5.6: Model mezikruží pro určení přesnosti 3D tisku.



Obrázek č. 5.7: Model mezikruží pro určení přesnosti 3D tisku.



Obrázek č. 5.8: Model válce pro měření mechanických vlastností hydrogelů.

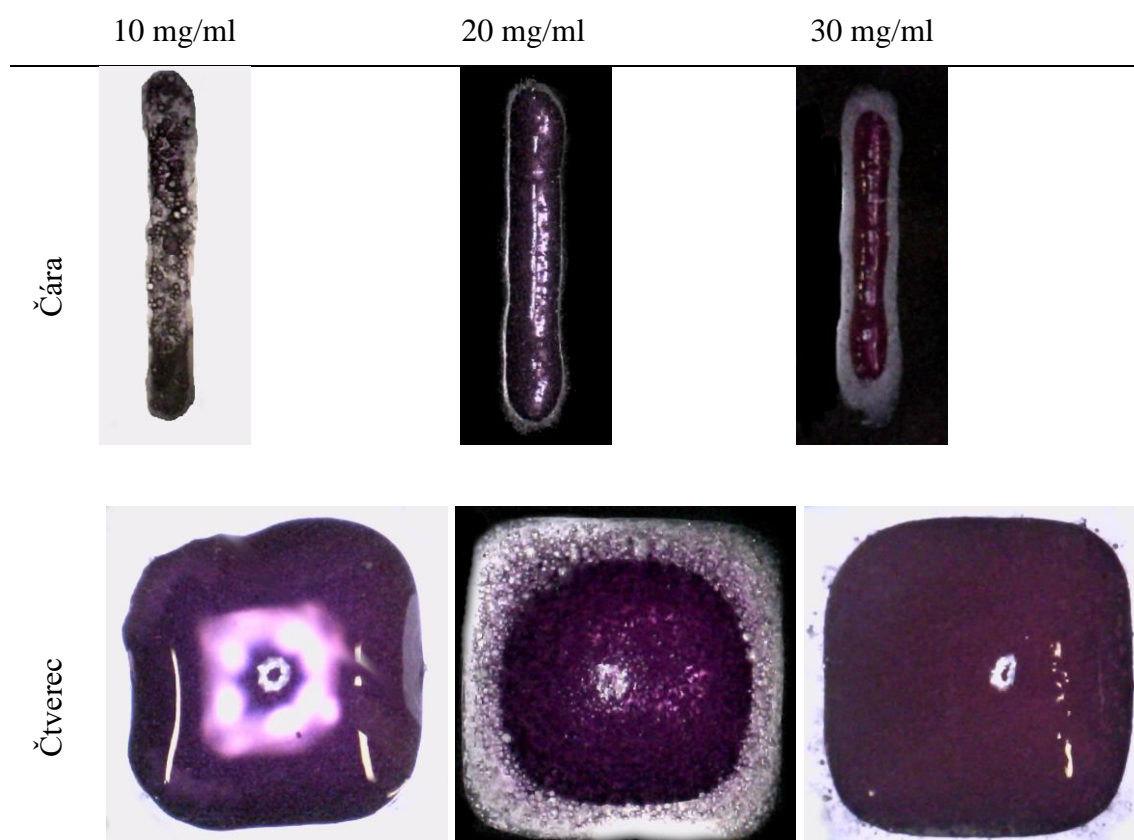
5.2 Vytištěné objekty

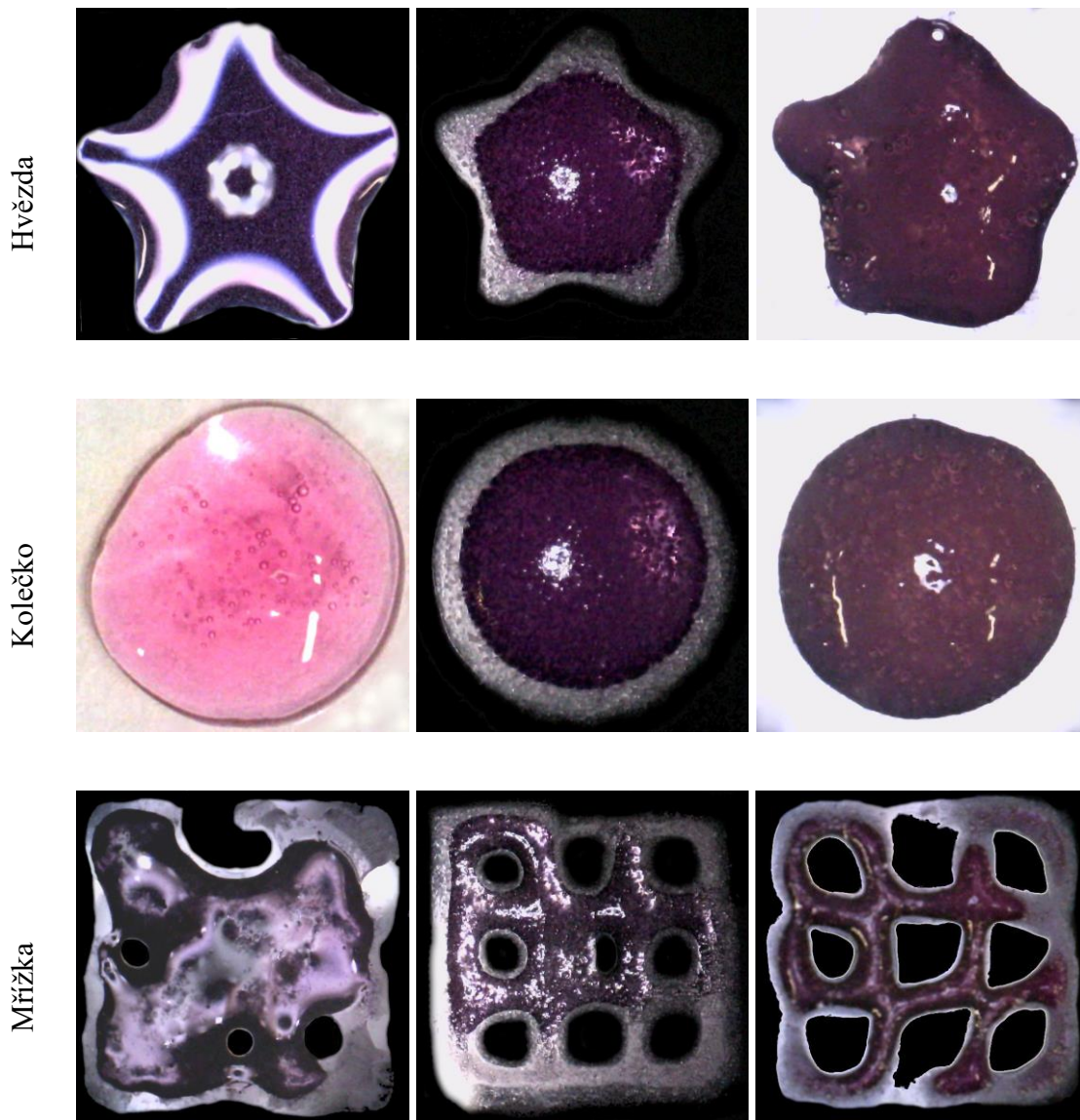
Byly vytištěny objekty z hydrogelů o složení popsaném v tabulce č. 4.1, a to s kolagenem o třech různých koncentracích, 10 mg/ml, 20 mg/ml a 30 mg/ml. Tyto vytištěné a inkubované objekty byly nafoceny digitálním mikroskopem. Na některých obrázcích v tabulce č. 5.1 je možné spatřit rozdíly v přesnosti mezi jednotlivými hydrogely.

Lze říci, že výtisky s kolagenem o nejnižší koncentraci mají obecně větší plochu, jelikož hydrogel má nižší hustotu a dochází u něj k roztékání výtisku. To je způsobené i nižší homogenitou hydrogelu, tekutá složka se i přes důkladné promíchání totiž v některých případech začala oddělovat od tuhé.

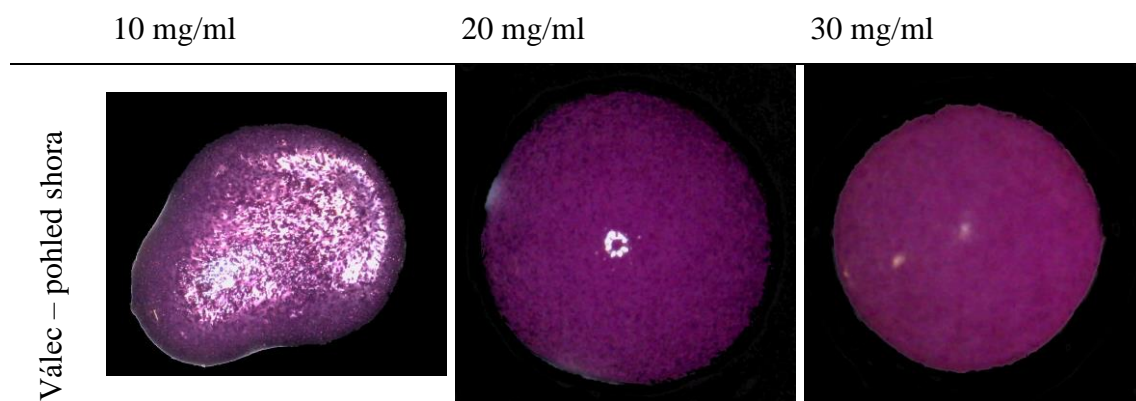
Naopak je tomu u výtisků z hydrogelu s kolagenem o nejvyšší koncentraci, kde jsou výtisky obecně menší. Zato však u této koncentrace hydrogelu dochází k vytváření sraženin, které mohou ucpat trysku stříkačky. V takovém případě pak dochází po chvíli k vytlačení většího objemu hydrogelu, což má za následek poničení výtisku.

Tabulka č. 5.1: Tabulka snímků vytištěných objektů. Některé výtisky mají černé a jiné světlé pozadí, aby byl výsledný kontrast dostatečný pro následné zpracování obrazu.

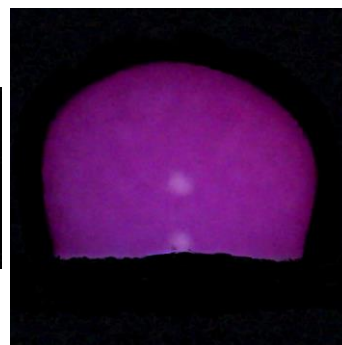
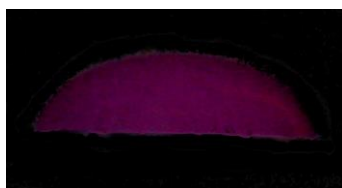




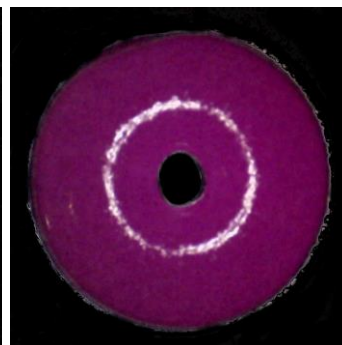
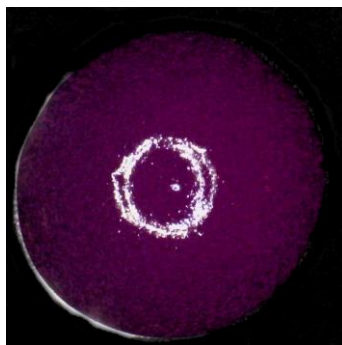
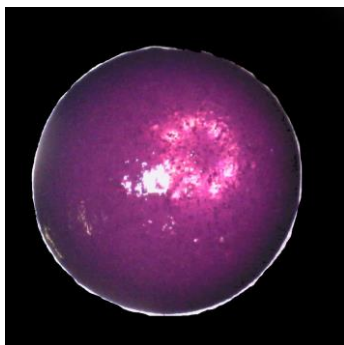
Tabulka č. 5.2: Tabulka snímků vytištěných objektů. Na prvním a třetím řádku se nachází snímky shora, na druhém a čtvrtém řádku jsou snímky z boku.



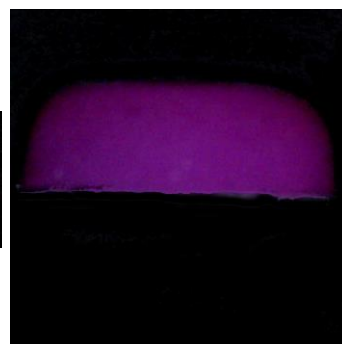
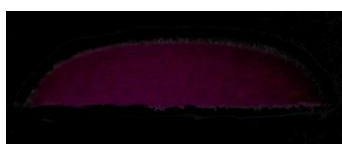
Válec – pohled zboku



Mezikruží – pohled shora



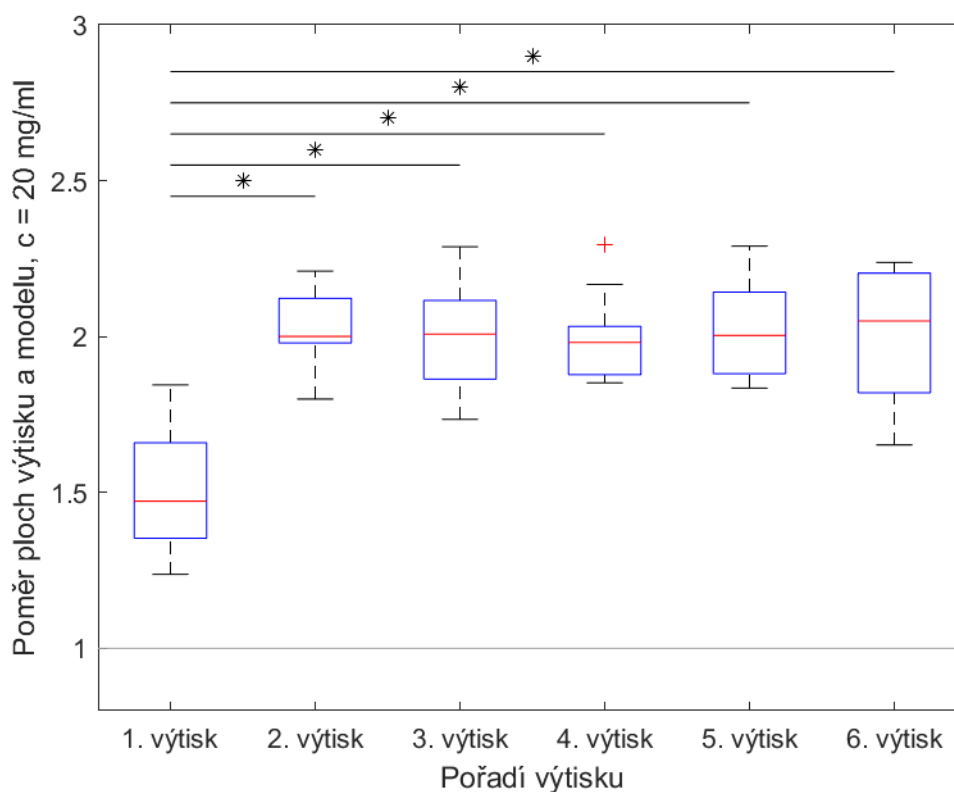
Mezikruží – pohled zboku



5.3 Výsledky zpracování snímků

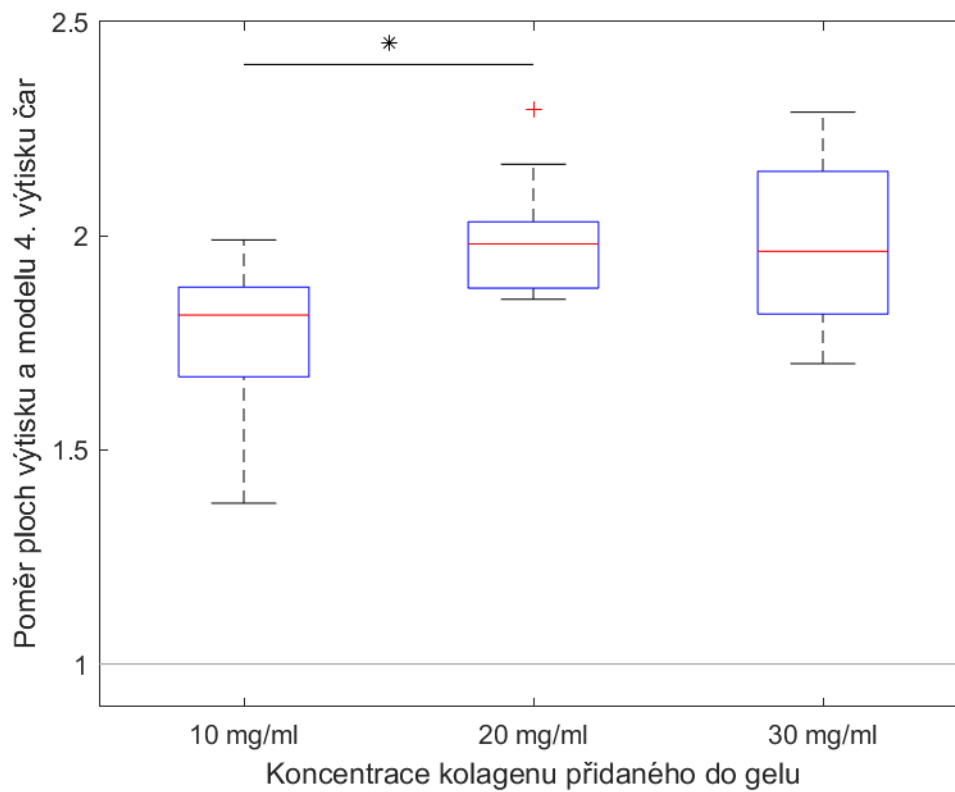
Statistické zpracování je pro přehled prezentováno ve formě boxplotů, které graficky znázorňují rozdělení hodnot v souboru.

5.3.1 Výtisky čar



Graf č. 5.1: Porovnání poměrů ploch výtisků čar s kolagenem o koncentraci 20 mg/ml.

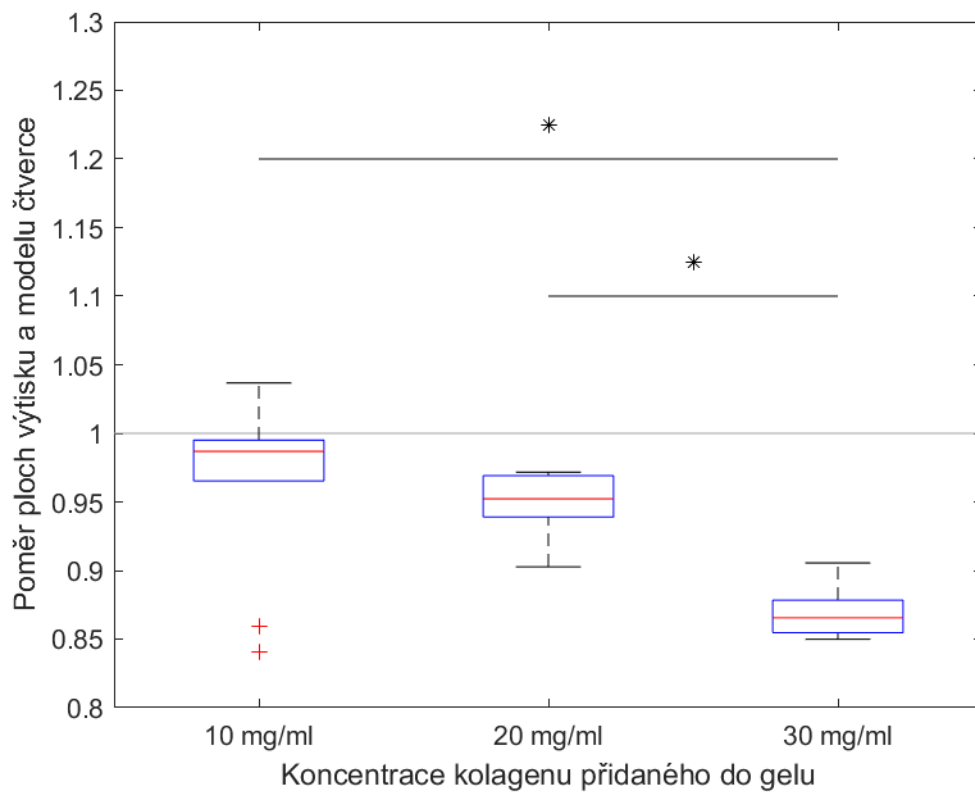
Graf č. 5.1 zobrazuje rozdělení hodnot poměrů výtisků a modelu u čar vytištěných z hydrogelu s kolagenem o koncentraci 20 mg/ml. Jak je patrné, první výtisky mají obecně značně menší plochu výtisky další. To je způsobeno tím, že u prvního výtisku docházelo k vynechávání tisku, gel nevycházel z trysky po celou dobu tisku první čáry, a to i přes vytlačení části gelu před začátkem tisku. Tento trend se opakoval i u výtisků s dalšími dvěma hydrogely. Nejmenší rozdíl mezi minimem a maximem se shodně u všech hydrogelů nacházel u čtvrtého výtisku, pro který byl vytvořen následující graf.



Graf č. 5.2: Porovnání poměrů ploch 4. výtisků čar.

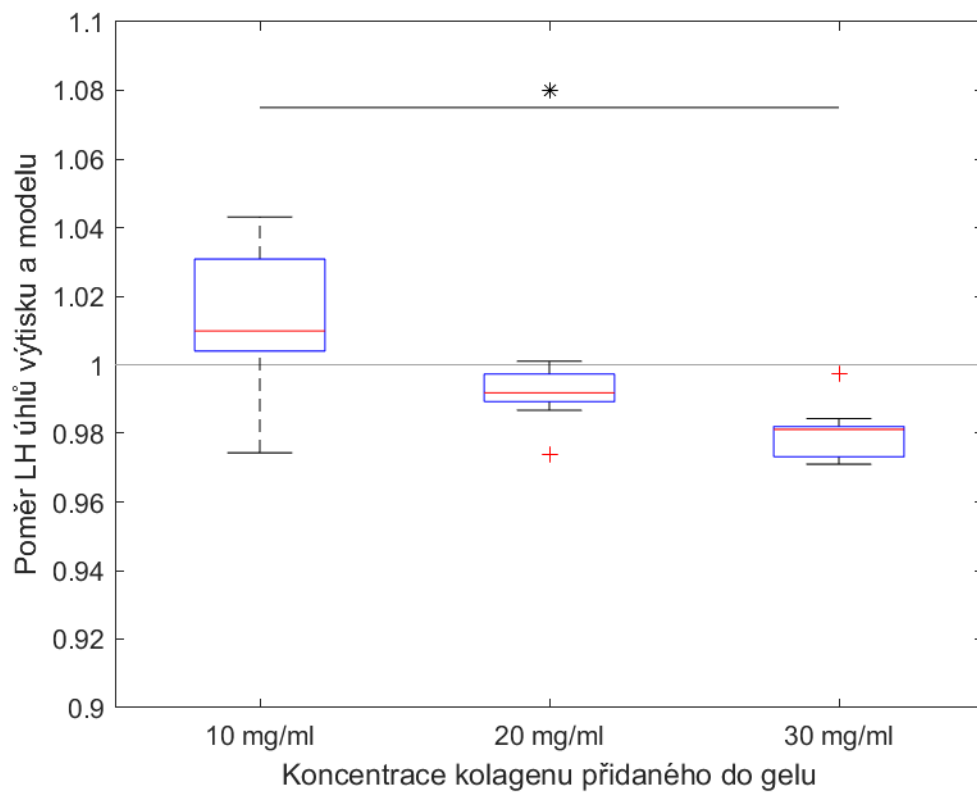
V grafu 5.2 je vyznačen statisticky signifikantní rozdíl mezi hodnotami poměrů ploch výtisků z hydrogelu s kolagenem o koncentraci 10 mg/ml a 20 mg/ml. Dále je patrné, že u výtisků čar docházelo k rozlití gelu, což má za následek zvětšení plochy výtisků.

5.3.2 Výtisky čtverců

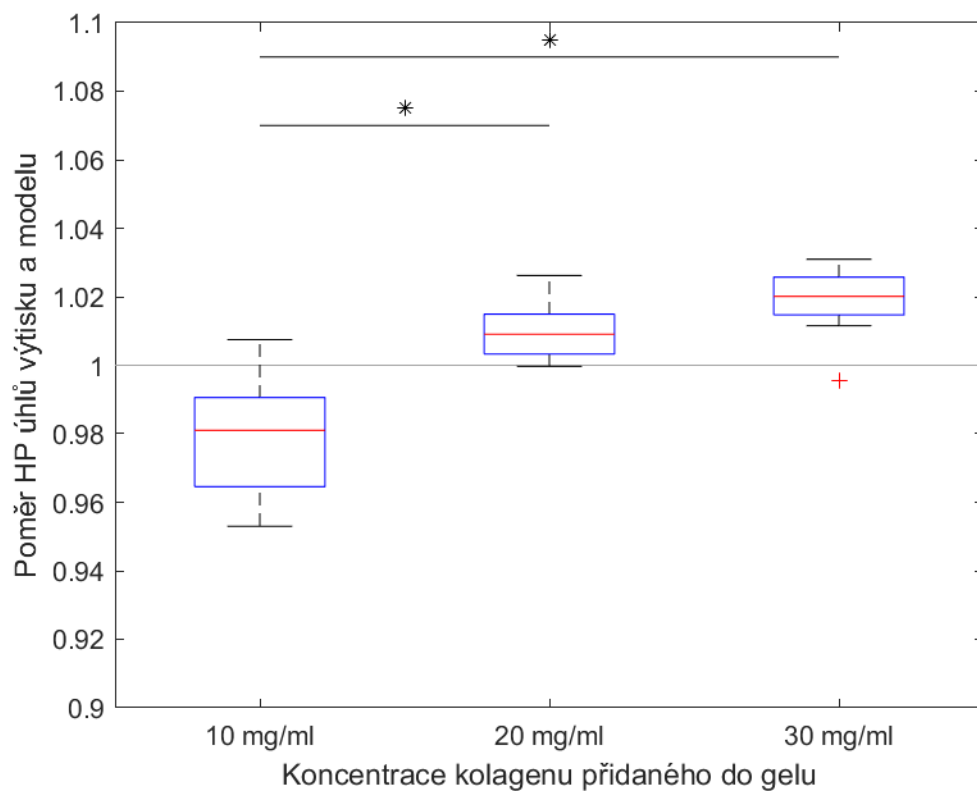


Graf č. 5.3: Porovnání poměrů ploch výtisků čtverců.

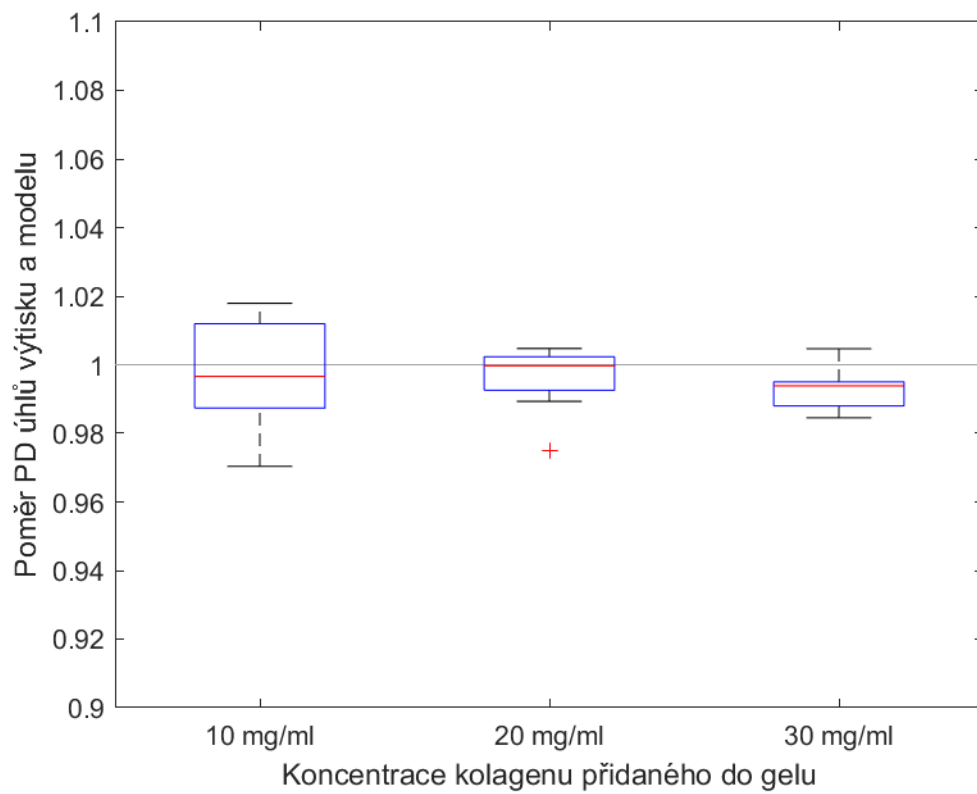
V grafu 5.3 je patrné, že výtisky s vyššími koncentracemi mají plochu menší, než je plocha modelu. Dva výtisky s koncentrací 10 mg/ml mají poměry ploch nižší než výtisky s koncentrací 20 mg/ml, což značí dva červené křížky.



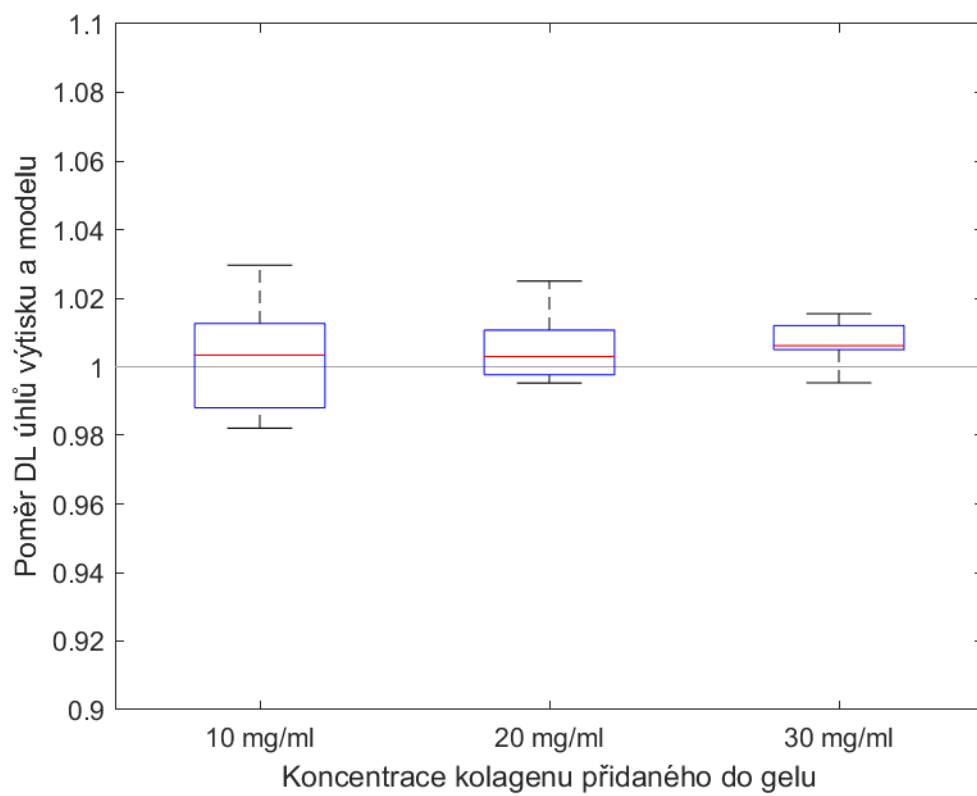
Graf č. 5.4: Porovnání poměrů levých horních úhlů výtisků a modelu čtverců.



Graf č. 5.5: Porovnání poměrů horních pravých úhlů výtisků a modelů čtverců.



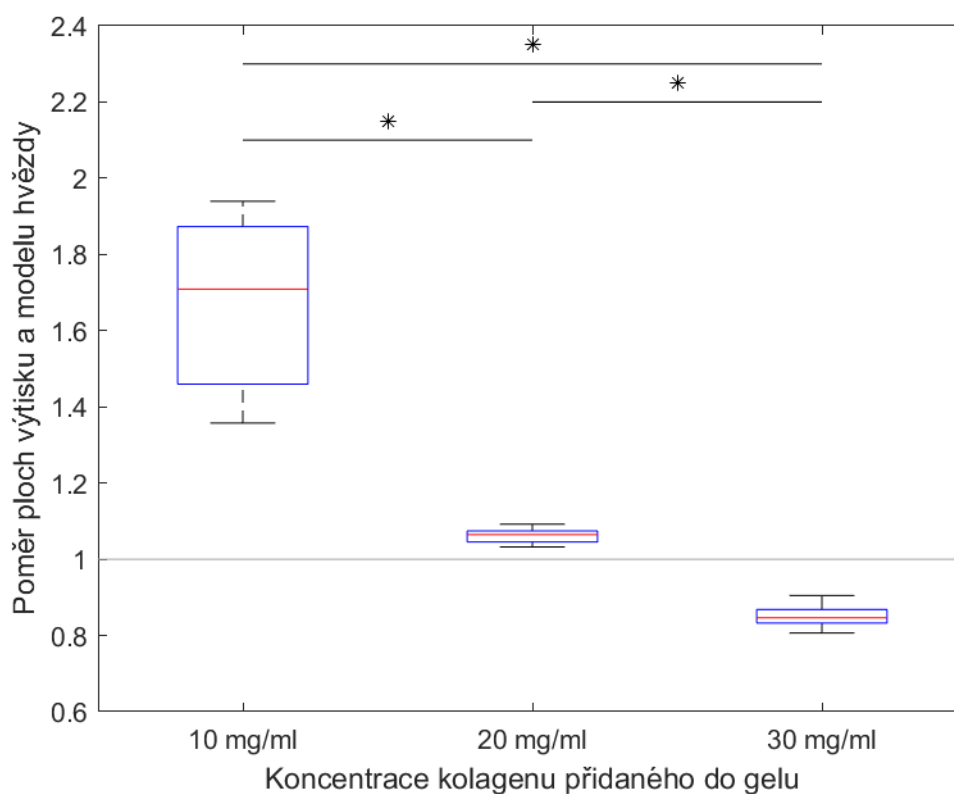
Graf č. 5.6: Porovnání poměrů pravých dolních úhlů výtisků a modelů čtverců.



Graf č. 5.7: Porovnání poměrů dolních levých úhlů výtisků a modelů čtverců.

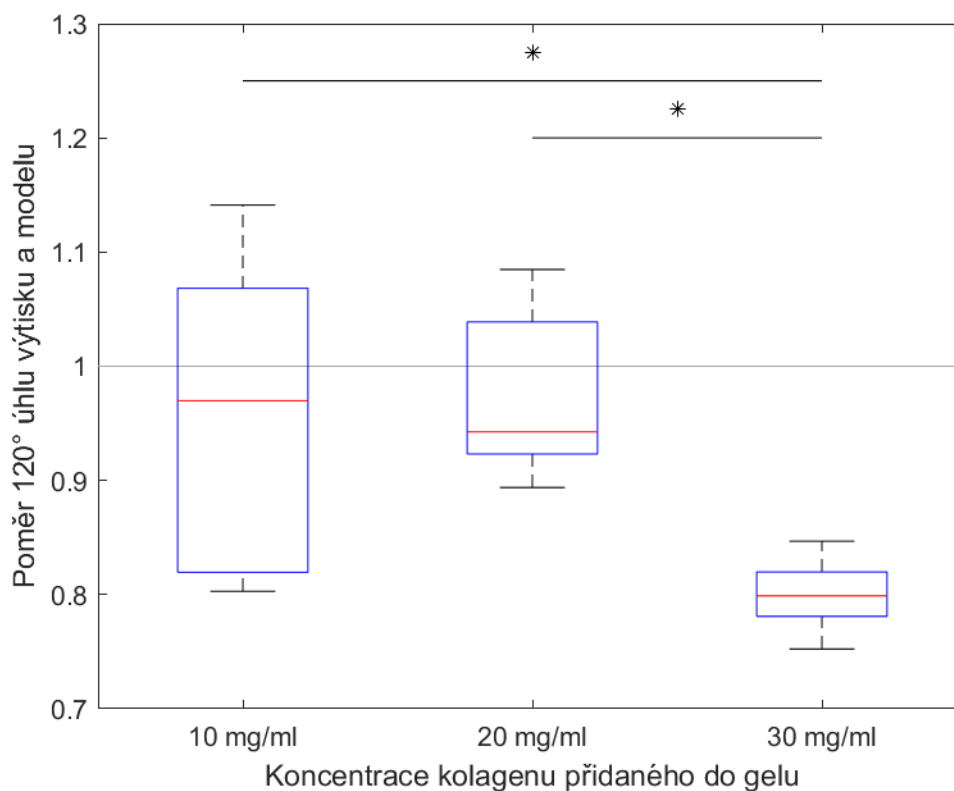
Grafy 5.4 až 5.7 zobrazují poměry úhlů ve výtiscích a modelu. Z grafů je patrné, že nejmenší odchylky od 1 mají výtisky z hydrogelu s kolagenem o koncentraci 20 mg/ml. Výtisky s koncentrací 10 mg/ml mají ve všech čtyřech úhlech největší odchylky. I tak je ale přesnost vytištění úhlů velmi dobrá, odchylka nepřesáhla 0,1 v žádném z výtisků.

5.3.3 Výtisky hvězd



Graf č. 5.8: Porovnání poměrů ploch výtisků a modelů hvězd.

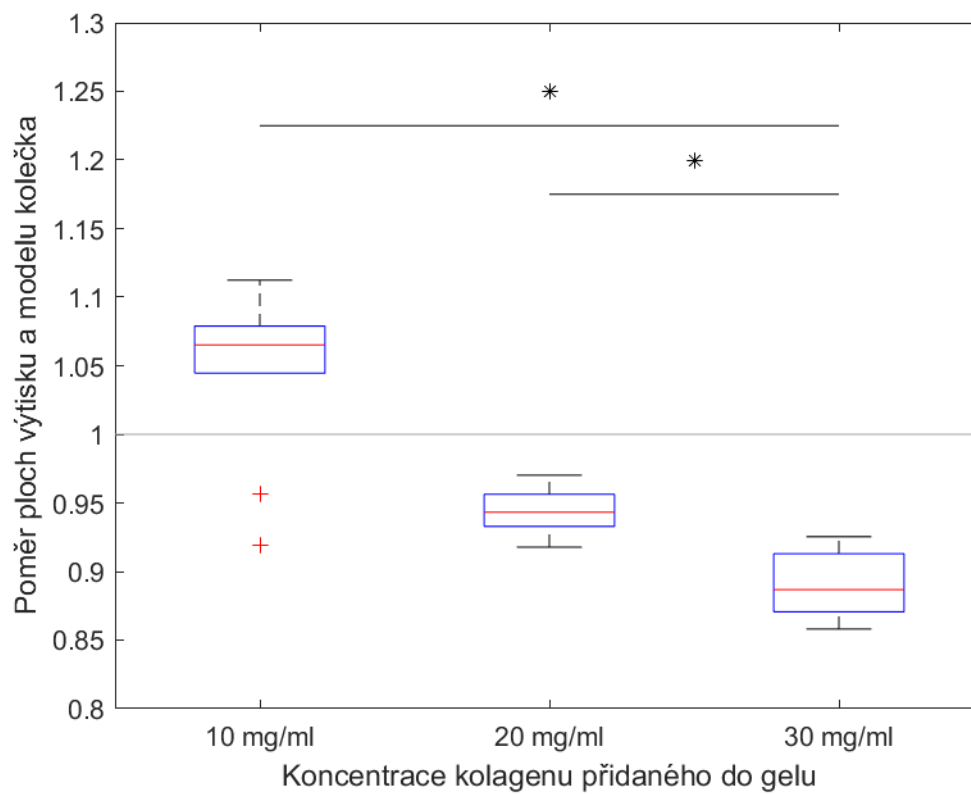
Graf č. 5.8 zobrazuje poměry ploch výtisků a modelu hvězd. Je zřejmé, že hvězdy z hydrogelu s nejnižší koncentrací kolagenu se roztékaly, jejich plocha se v mnohých případech téměř zdvojnásobila. Naopak výtisky s koncentrací kolagenu 30 mg/ml jsou dokonce menší než model, a to především kvůli tomu, že gel při tištění úzkých částí výtisku hůře přilne ke sklíčku nebo k již vytištěné části. Rohy hvězd byly u těchto výtisků značně zaoblené.



Graf č. 5.9: Porovnání poměrů 120° úhlů výtisků a modelů hvězd.

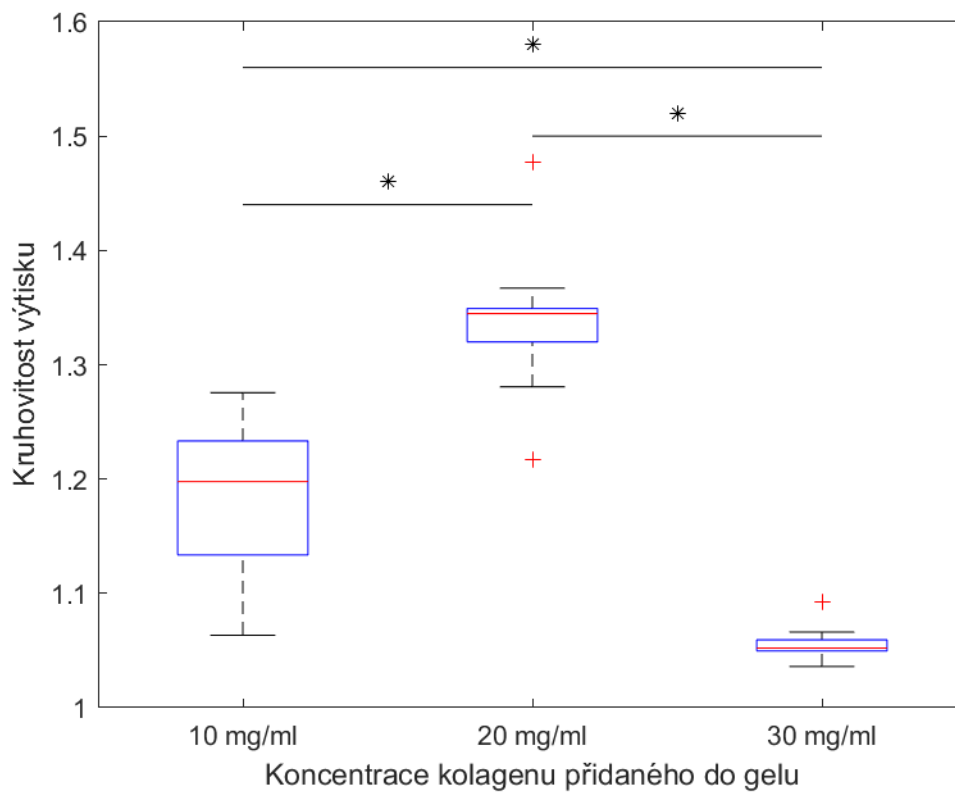
Hodnoty poměrů úhlů hvězd vykreslené v grafu č. 5.9 jsou u gelu s koncentrací kolagenu 10 mg/ml nejvíce rozptýlené. Nejméně rozptýlené jsou hodnoty poměrů úhlů u výtisků z hydrogelu s koncentrací kolagenu 30 mg/ml, tyto úhly jsou však výrazně menší. To je způsobeno výše zmíněným zaoblením rohů. Objem gelu, který měl být v rohu, se totiž usadil blíže ke středu, kde došlo k rozšíření cípu hvězdy a tím ke zmenšení úhlu. Kolem poměru 1 se nejbližše pohybovaly hodnoty poměrů úhlů u výtisků z gelu s koncentrací kolagenu 20 mg/ml.

5.3.4 Výtisky koleček



Graf č. 5.10: Porovnání poměrů ploch výtisků a modelu koleček.

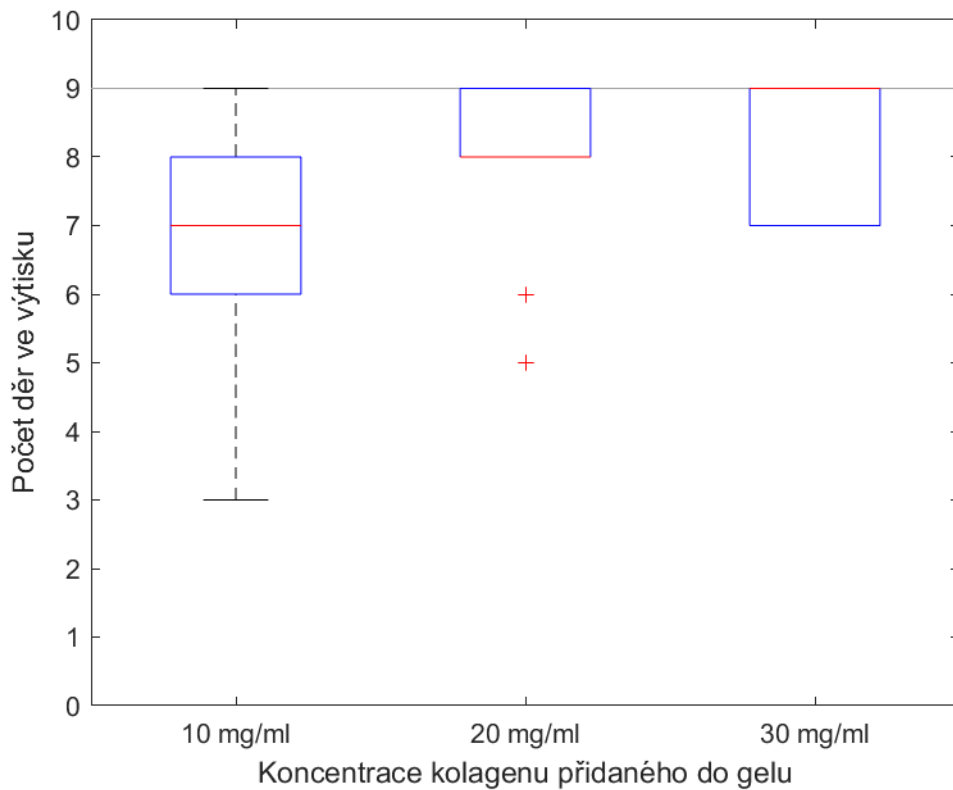
Jak je z grafu 5.10 patrné, u výtisků z gelu o koncentraci kolagenu 10 mg/ml došlo u všech výtisků s výjimkou dvou k rozlité gelu. Naopak u dalších dvou gelů jsou plochy všech výtisků menší, než je plocha modelu. Nejmenší rozdíly mezi plochami jsou u výtisků z gelu o koncentraci kolagenu 20 mg/ml.



Graf č. 5.11: Porovnání kruhovitosti výtisků koleček.

V grafu 5.11 jsou vykresleny hodnoty kruhovitosti výtisků koleček. U dokonalého kruhu je hodnota kruhovitosti rovna 1, zvětšující se hodnota značí nižší podobnost kruhu. Kruhovitost výtisků je ve všech případech menší než 1,5, tedy stále se jedná o kruhové tvary. Odchyłky od ideální hodnoty jsou způsobeny chováním gelu při tisku, zčásti také nerovnými okraji, které vznikly při prahování pro převod na černo-bílý obraz.

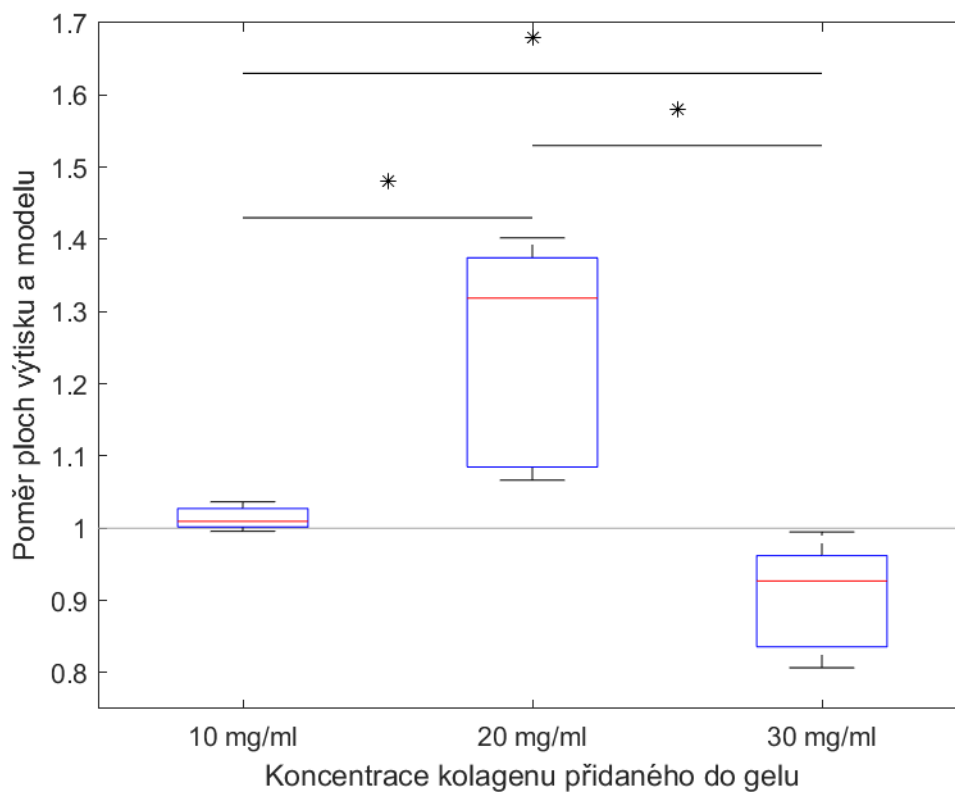
5.3.5 Výtisky mřížek



Graf č. 5.12: Porovnání počtu děr ve výtiscích mřížek.

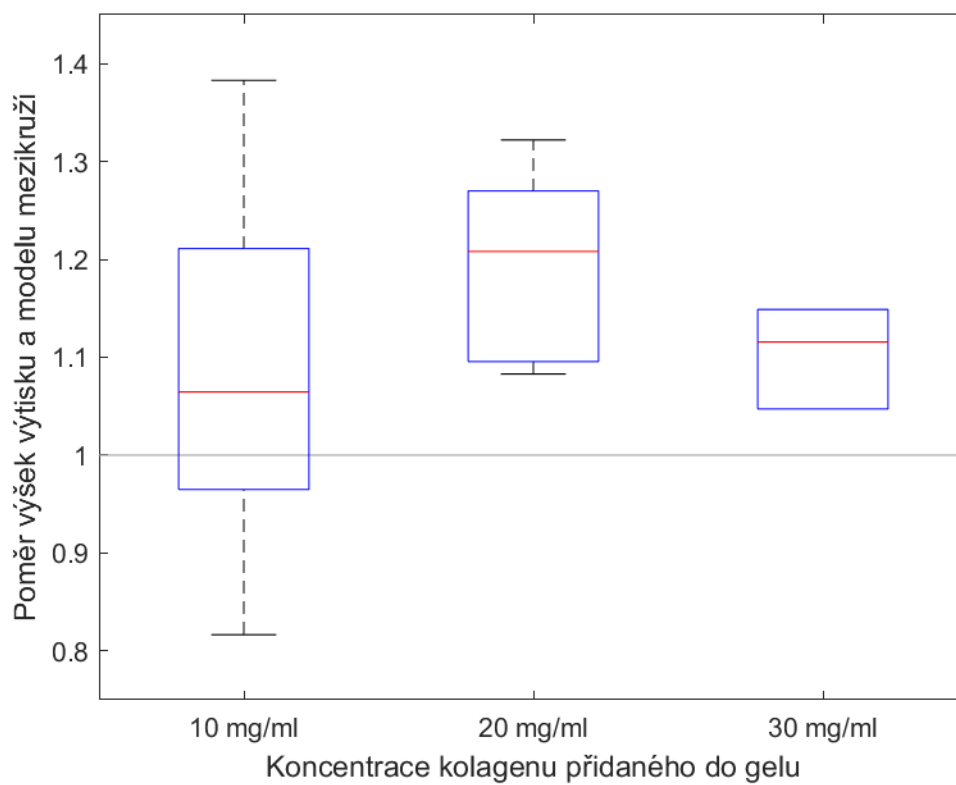
Graf 5.12 zobrazuje počet děr ve výtisku. Lze pozorovat, že u výtisků z hydrogelu s koncentrací 30 mg/ml se díry v mřížce vytiskly u více výtisků správně, jelikož medián tohoto rozdělení je 9. U gelu s obsahem kolagenu o koncentraci 10 mg/ml docházelo k zalití děr, naopak u dalších dvou gelů spíše k vytvoření jedné větší díry namísto dvou, když nedošlo k protnutí linií v rozích (viz obrázek v tabulce č. 5.2 výše).

5.3.6 Výtisky mezikruží



Graf č. 5.13: Porovnání poměrů ploch výtisků a modelů mezikruží.

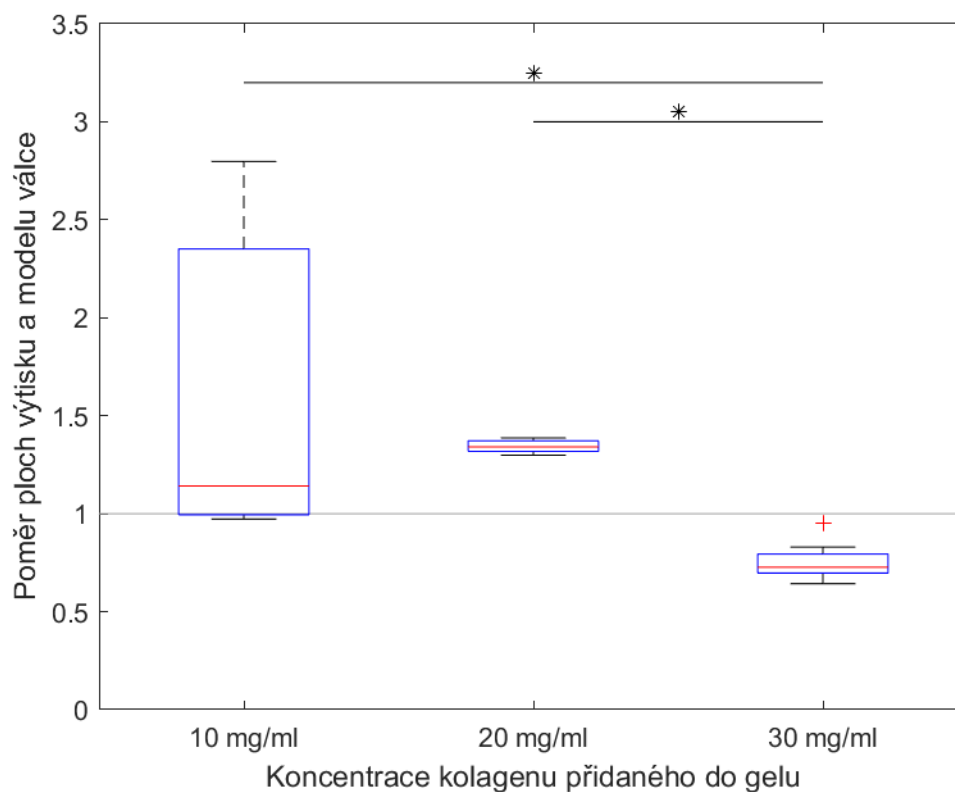
Jak je patrné v grafu č. 5.13 k nejméně přesnému tisku plochy došlo u výtisků z gelu s kolagenem o koncentraci 20 mg/ml. Zvětšení plochy je způsobené zalitím středového otvoru mezikruží, čímž plocha vzrostla. Výtisky z gelu s kolagenem o koncentraci 30 mg/ml jsou přesnější, u všech došlo k vytištění správného tvaru s otvorem uprostřed. Nejvyšší přesnosti dosáhly výtisky z hydrogelu o koncentraci kolagenu 10 mg/ml.



Graf č. 5.14: Porovnání poměrů výšek výtisků a modelu mezikruží.

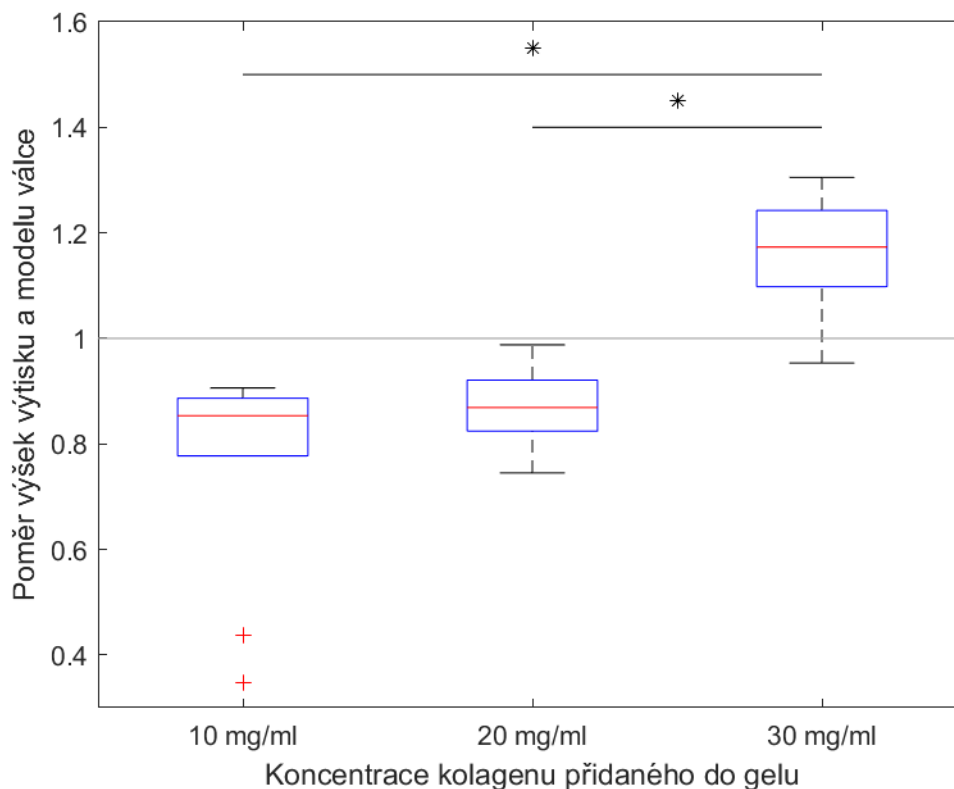
Poměry výšek zobrazené v grafu č. 5.14 jsou nejpřesnější u výtisků z gelu o koncentraci kolagenu 30 mg/ml. Největší rozdíly mezi výškami lze pozorovat u výtisků z gelu s kolagenem o koncentraci 10 mg/ml.

5.3.7 Výtisky válců



Graf č. 5.15: Porovnání poměrů ploch výtisků a modelu válce.

Poměry ploch válců se 1 blíží u výtisků z gelů s kolagenem o koncentraci 20 mg/ml a 30 mg/ml. U výtisků z gelu o koncentraci 10 mg/ml došlo k rozlití tří výtisků natolik, že se plocha více než zdvojnásobila. Ostatní výtisky se svými poměry pohybovaly mezi 0,97 a 1,15, což je považováno za přesné.



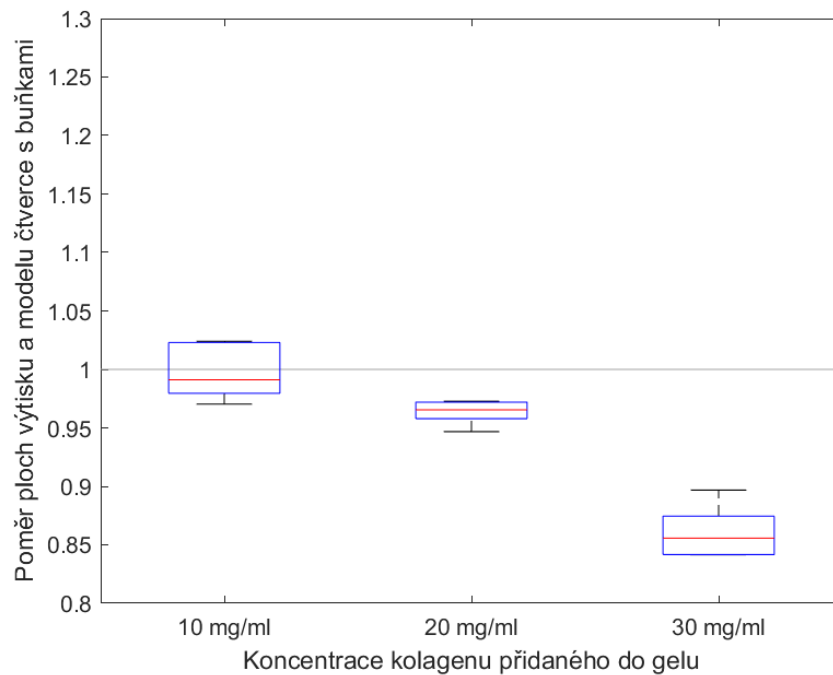
Graf č. 5.16: Porovnání poměrů výšek výtisků a modelu válce.

Výšky válců se nejpřesněji vytiskly z gelu s kolagenem o koncentraci 20 mg/ml. U koncentrace 10 mg/ml je vidět dvě odlehle hodnoty rozlitých výtisků. Naopak výtisky s kolagenem o koncentraci 30 mg/ml dosáhly výšky vyšší, než je výška modelu.

5.3.8 Výtisky s buňkami

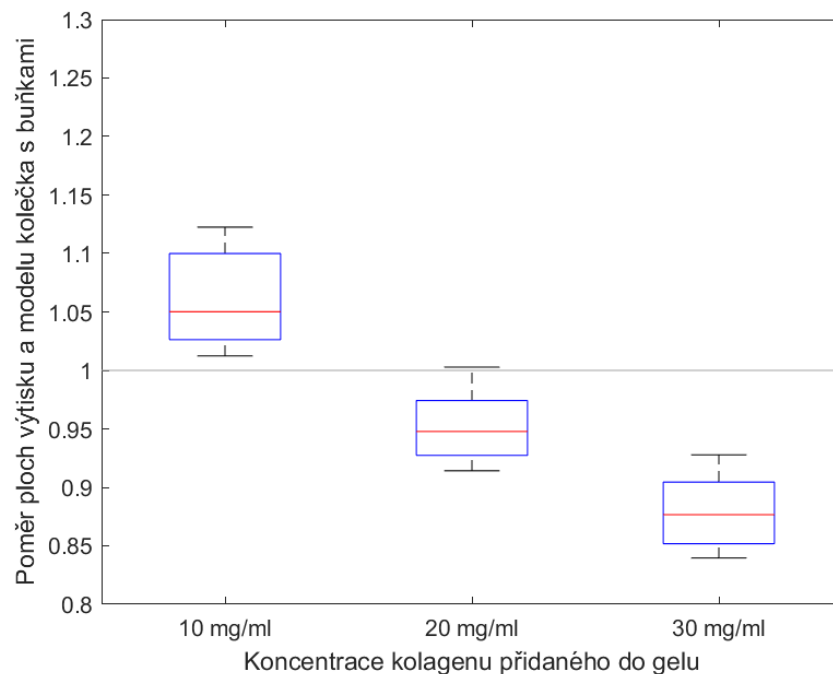
Přesnost tisku byla testována též na bioinkoustech, tedy hydrogelech s obsahem buněk. Vzhledem k množství náročnosti buněk v objemu gelu (6 mil. b./ml hydrogelu) byly vybrány pouze některé testovací modely k vyhodnocení tohoto měření. Tisk bioinkoustu byl sledován na modelech kolečka, čtverce a válce o průměru 12 mm.

Z hydrogelu každé koncentrace bylo vytvořeno pět výtisků každého modelu, tedy celkem 45 výtisků. Výsledky ukázaly, že rozdíly mezi různými koncentracemi hydrogelu byly patrné; rozdíl mezi přesností bioinkoustu a hydrogelu příslušné koncentrace byl však statisticky nesignifikantní, stejně jako u dalších obrazců. Z tohoto důvodu nebyly testovány další obrazce a pro testy byly použity pouze hydrogely bez buněk.



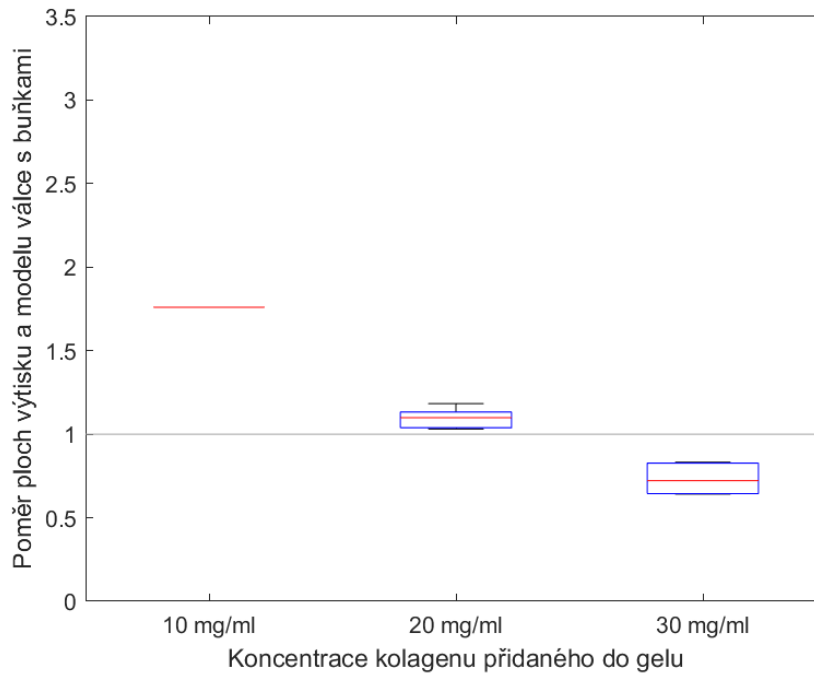
Graf č. 5.17: Porovnání poměrů ploch výtisků a modelu čtverce s buňkami.

Při porovnání dat z grafů 5.17 a 5.3 je patrné, že mezi rozděleními poměrů ploch výtisků čtverců s buňkami a bez buněk není statisticky významný rozdíl.



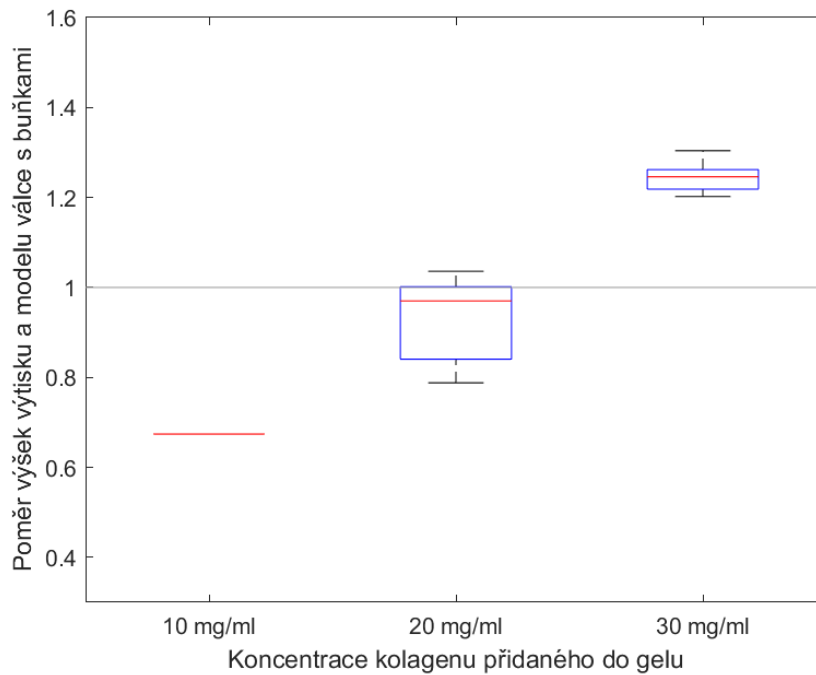
Graf č. 5.18: Porovnání poměrů ploch výtisků a modelu kolečka s buňkami.

Mezi rozděleními poměrů ploch výtisků koleček s buňkami a buněk rovněž není statisticky významný rozdíl, jak je patrné při porovnání grafu 5.18 s grafem 5.10.

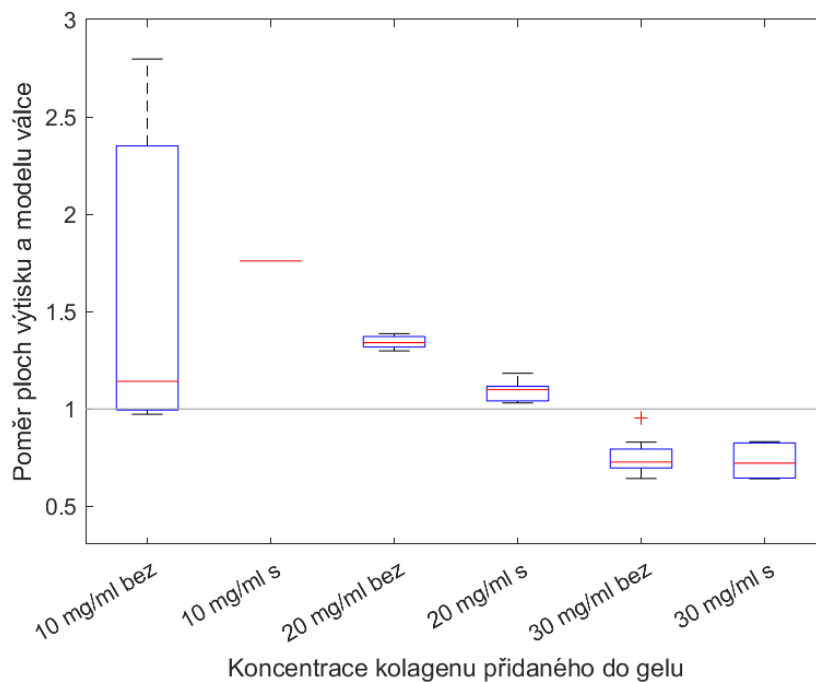


Graf č. 5.19: Porovnání poměrů ploch výtisků a modelu válce s buňkami.

V grafu č. 5.19 je patrná jediná hodnota pro tisk z hydrogelu s kolagenem o koncentraci 10 mg/ml, která dosahuje téměř k hodnotě 2. Tento výtisk se roztekl, vzhledem k ceně buněk tak nebyly tisknuty další výtisky s touto koncentrací. Rozdělení poměrů ploch u dalších dvou koncentrací je statisticky nevýznamně rozdílné od poměrů ploch výtisků z hydrogelů bez buněk. Stejně tak je to i u poměrů výšek v grafu č. 5.20.



Graf č. 5.20: Porovnání poměrů výšek výtisků a modelu válce s buňkami.



Graf č. 5.21: Porovnání poměrů ploch výtisků a modelu válce s buňkami a bez buněk.

V grafu 5.21 jsou zobrazena rozdělení výtisků bez buněk a s buňkami. U výtisků z hydrogelu o koncentraci 20 mg/ml a 30 mg/ml je patrné, že rozdíly mezi poměry výtisků s buňkami a bez buněk jsou nevýznamné.

5.3.9 Souhrn

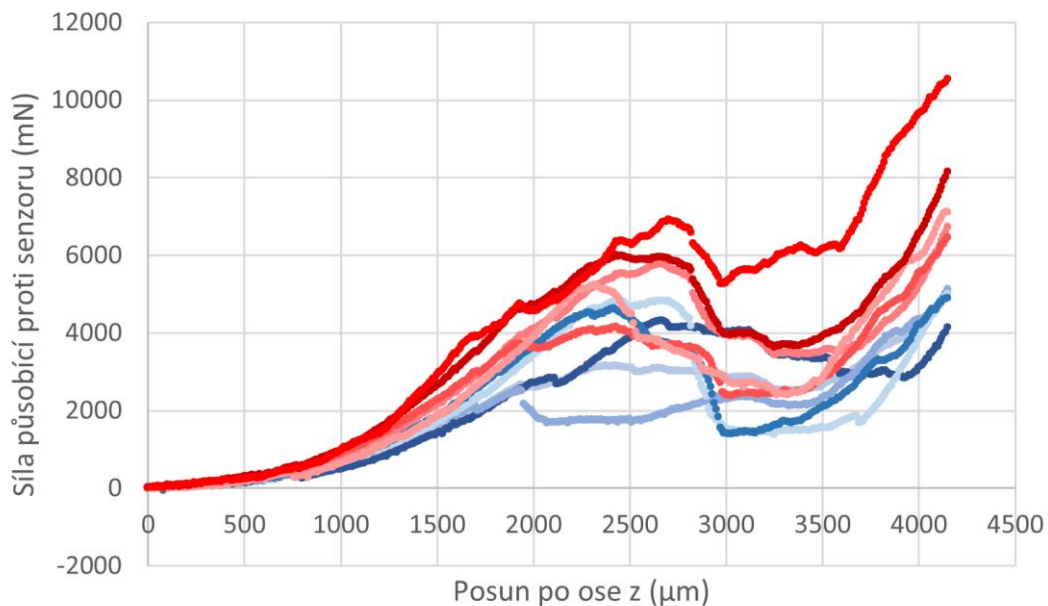
V tabulce č. jsou pro přehlednost uvedeny mediány rozdělení poměrů ploch výtisků a modelů u všech měření. Je patrné, že mediány jsou u výtisků koncentrace kolagenu 10 mg/ml ve většině případech nejblíže 1, tedy zdánlivě tyto výtisky působí jako nejpřesnější, ale zároveň mají tyto hodnoty největší rozsah, jejich velikost je proměnlivá a nelze se spolehnout, že každý z výtisků bude dosahovat určité přesnosti.

Tabulka 5.3: Shrnující tabulka s mediány rozdělení výtisků.

| | Koncentrace kolagenu 10 mg/ml | Koncentrace kolagenu 20 mg/ml | Koncentrace kolagenu 30 mg/ml |
|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Čáry – 4. výtisk – poměry ploch | 1,82 | 1,98 | 1,96 |
| Čtverce – poměry ploch | 0,99 | 0,95 | 0,87 |
| Čtverce – HP úhel | 1,01 | 1,01 | 1,02 |
| Čtverce – PD úhel | 1,00 | 1,00 | 0,99 |
| Čtverce – DL úhel | 1,00 | 1,00 | 1,01 |
| Čtverce – LH úhel | 1,01 | 0,99 | 0,98 |
| Hvězdy – poměry ploch | 1,71 | 1,06 | 0,85 |
| Hvězdy – poměry úhlů | 0,97 | 0,94 | 0,80 |
| Kolečka – poměry ploch | 1,07 | 0,94 | 0,89 |
| Kolečka – kruhovitost | 1,20 | 1,34 | 1,05 |
| Mřížky – počet děr | 7 | 8 | 9 |
| Mezikruží – poměry ploch | 1,01 | 1,32 | 0,93 |
| Mezikruží – poměry výšek | 1,06 | 1,21 | 1,12 |
| Válce – poměry ploch | 1,14 | 1,34 | 0,73 |
| Válce – poměry výšek | 0,85 | 0,87 | 1,17 |

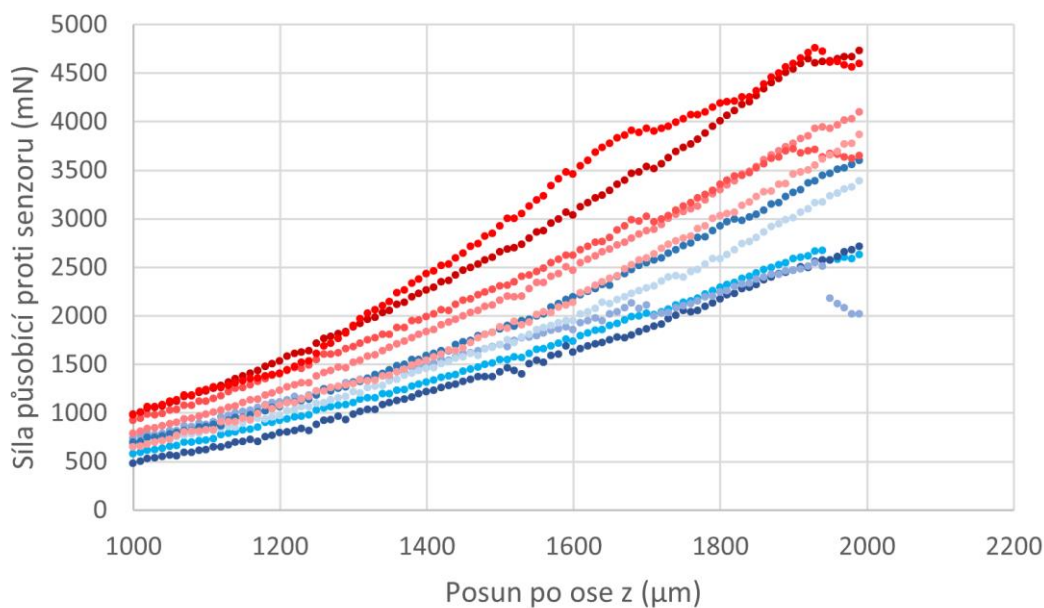
5.4 Mechanické vlastnosti bioinkoustů

Byly vytištěny modely z hydrogelů s obsahem kolagenu o koncentraci 10, 20 a 30 mg/ml. Výtisky s kolagenem o koncentraci 10 mg/ml nemohly být podrobeny měření, protože se po vytištění roztekly. Výsledky měření výtisků o koncentracích 20 a 30 mg/ml jsou zobrazeny v grafech níže.



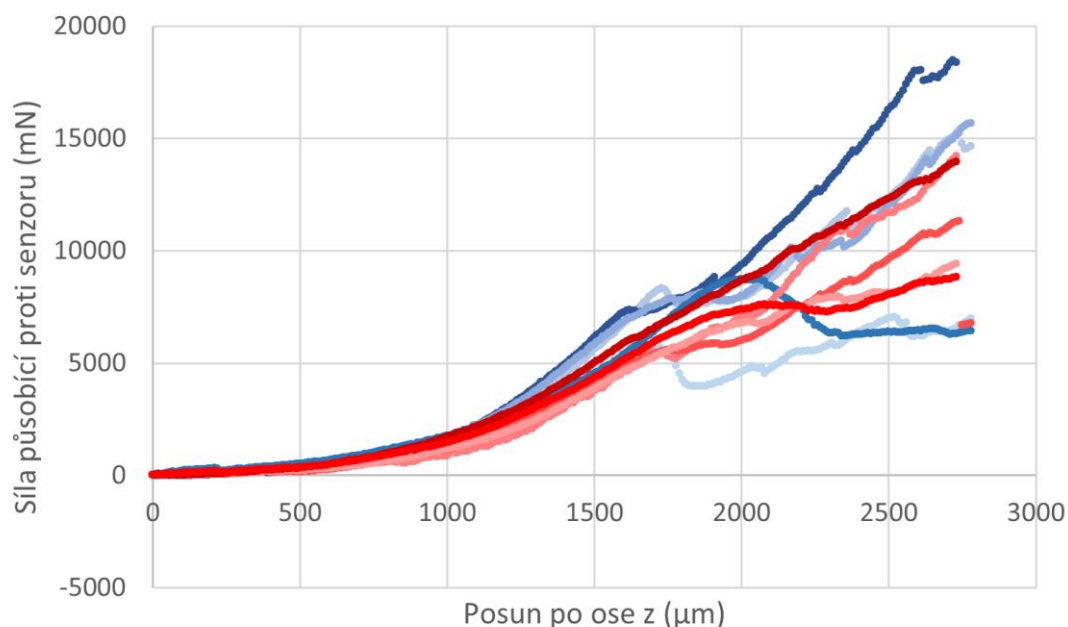
Graf č. 5.22: Závislost síly působící proti senzoru na posunu senzoru u výtisků s koncentrací 20 mg/ml.

Od bodu 0 na ose x grafu 5.22 se hodnoty síly působící proti stlačujícímu disku zvyšují přibližně do bodu 2200. V oblasti mezi 1000 μm a 2000 μm je nárůst přibližně lineární. Pokles velikosti síly za bodem 2200 je způsoben prasknutím vytištěného válce. V odstínech červené barvy jsou vykreslena měření s buňkami, v modrých odstínech pak měření bez buněk.



Graf č. 5.23: Lineární část grafu 5.22.

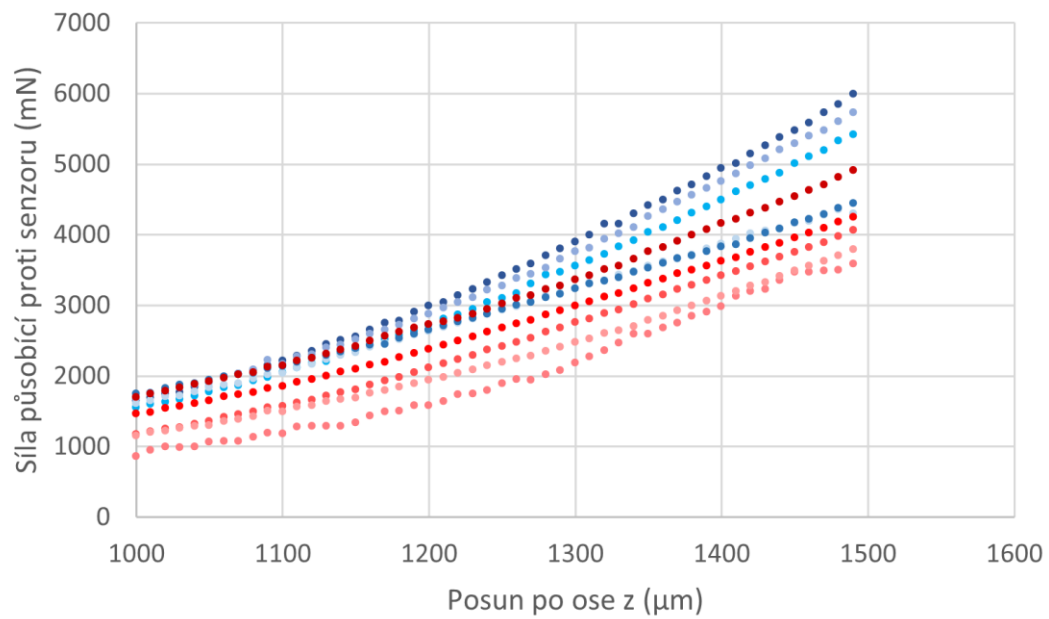
Z částí křivek zobrazených v grafu č. 5.23 byly zjištěny směrnice přímk trendů, jejichž hodnoty byly následně dosazeny do vzorce (5) pro výpočet elastického uvedeného v kapitole Metody. Z takto vypočítaných hodnot elastického modulu byla určena průměrná hodnota, která je pro hydrogel s kolagenem o koncentraci 20 mg/ml bez buněk rovna 0,186 MPa. Hodnota elastického modulu gelu s kolagenem o koncentraci 20 mg/ml s buňkami je 0,133 MPa.



Graf č. 5.24: Závislost síly působící proti senzoru na posunu senzoru u výtisků s koncentrací 30 mg/ml.

Stejně jako u hydrogelu s kolagenem o koncentraci 20 mg/ml byla v grafu 5.24 nalezena lineární část, viz graf 5.25.

Byly zjištěny směrnice přímk trendů a vypočteny hodnoty elastického modulu. Průměrná hodnota elastického modulu u hydrogelu s kolagenem o koncentraci 30 mg/ml je 0,431 MPa. Průměrná hodnota elastického modulu gelu s kolagenem o koncentraci 30 mg/ml s buňkami je 0,443 MPa.



Graf č. 5.25: Lineární část grafu 5.24.

6 Diskuse

Hlavním výsledkem práce je stanovená přesnost tisku s gely, které obsahují různé koncentrace kolagenu. Dalším výsledkem je elastický modul zmíněných kolagenových gelů po vytištění a inkubaci.

Pro tisk byla použita tryska 17G, která má vnitřní průměr 1,07 mm a délku 25,4 mm. Tato tryska byla vybrána proto, že užší trysky měly tendence se při tištění s hydrogely s vyššími koncentracemi kolagenu ucpávat, a naopak širší trysky způsobovaly samovolné vytékání hydrogelu s nižší koncentrací kolagenu.

Obecně lze říci, že přesnost tisku byla nejvyšší u výtisků z hydrogelu s kolagenem o koncentraci 20 mg/ml, kdy u výtisků hvězd a koleček byly všechny poměry ploch výtisků a modelů maximálně o 20 % od plochy modelu, jak je patrné v grafech č. 5.8 a č. 5.10. Plochy všech výtisků čtverců jsou menší než plocha modelu. Nejmenší rozdíl je u hydrogelu s koncentrací kolagenu 10 mg/ml, což může být způsobeno tím, že u méně tuhého hydrogelu docházelo k roztékání a tím se plocha zvětšila. Výtisky s hydrogelem s koncentrací kolagenu 20 mg/ml jsou nicméně též velmi přesné, maximální odchylka poměru ploch od plochy modelu činí 10 %.

U výtisků čar byla zkoumána také závislost přesnosti tisku na pořadí výtisku. V jednom g-kódu tak bylo vytištěno 6 čar vedle sebe, každá z těchto čar byla složena pouze ze dvou projetí tryskou a plocha modelu je rovna 20 mm². Tato plocha byla u všech výtisků přesažena. U výtisků z hydrogelů s koncentracemi kolagenu 10 a 20 mg/ml vychází nejmenší odchylka v poměrech ploch od 1 u prvního výtisku. To je způsobeno tím, že některé první výtisky nebyly vytištěny celé. Hydrogel nebyl vytlačován z trysky, a to i přes vytlačení části gelu těsně před začátkem tisku. Tento problém nebyl ve vyhodnocování zohledněn, a tak se první výtisky jeví jako nejpřesnější, ačkoli tomu tak není. Odchylky poměrů ploch od 1 dosahují u výtisků čar až k 2,5 u výtisků z hydrogelu s koncentrací 30 mg/ml. Pro takto malé plochy se tedy tisk jeví jako málo přesný, s odchylkou až 150 %. U těchto výtisků navíc v inkubátoru docházelo k vysychání gelu na okrajích výtisku, jak je patrné z obrázků v tabulce č. 5.1.

Co se týká přesnosti tvaru tisku, byly zkoumány všechny čtyři úhly u výtisků čtverců, jeden z vnějších tupých úhlů u výtisků hvězd, počet děr u výtisků mřížek a kruhovitost koleček. Jelikož u čtverců byly hodnoceny úhly mezi směrnicemi lineárních aproximací, jsou odchylky od 90 ° minimální, ve všech případech nižší než 0,1. I tak je ale patrné, že úhly u výtisků z hydrogelu s kolagenem o koncentraci 10 mg/ml jsou z těchto tří hydrogelů nejméně přesné, u pravého horního a levého horního se rozložení hodnot dokonce statisticky významně liší od zbylých dvou hydrogelů. Úhly výtisků z hydrogelu s kolagenem o koncentraci 20 mg/ml měly poměry úhlu výtisku a modelu nejbližší 1, odchylky byly ve všech případech menší než 0,04.

Pro určení přesnosti úhlu u hvězd byl vybrán pravý horní roh hvězdy. Protože tiskárna začíná tisknout v nejvyšším bodě hvězdy ve směru osy y, jde o první úhel, který je vytištěn. Jak je patrné v grafu č. 5.9, poměry úhlů u těchto výtisků dosahují odchylek až 0,25 od 1. U výtisků z hydrogelu s koncentrací 10 mg/ml je patrný i značný rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou poměru ploch. Největší odchylky se vyskytují u výtisků z hydrogelu s kolagenem o koncentraci 30 mg/ml, tyto hodnoty mají statisticky významný rozdíl od rozdělení výtisků dalších dvou hydrogelů.

Při tisku mřížek bylo zkoumáno rozlévání hydrogelu do děr. V modelu mřížky bylo děr 9. Takového počtu dosáhl od každého z hydrogelů nejméně dva výtisky, přičemž u hydrogelu s obsahem kolagenu 10 mg/ml to byly právě dva výtisky z deseti. U tohoto kolagenu docházelo k zalití děr v důsledku tekutosti gelu, u jednoho výtisku zůstaly nezalité pouze 3 otvory. Nejlepších výsledků dosahoval v tomto ohledu hydrogel s kolagenem o koncentraci 30 mg/ml, kde 9 jamek zůstalo nezalitých u 6 výtisků z 10. U tohoto hydrogelu nedocházelo k zalití otvorů, naopak spíše gel vlivem vyšší tuhosti nevytvořil tak ostrý úhel, aby se vytvořila jamka. Tisková dráha mřížky vzniklá v Prusasliceru objela některé jamky dvakrát v jedné vrstvě, přičemž při druhém průjezdu nebyl hydrogel vytlačován. Vzhledem k povaze gelu však nedošlo k přerušení toku. U hydrogelu s kolagenem o koncentraci 10 mg/ml bylo následkem roztékání gelu a zalití děr, u hydrogelu o koncentraci 30 mg/ml naopak nedocházelo k dotknutí čar v rozích.

Na výtiscích koleček byla určována kruhovitost, jejíž hodnota je v ideálním případě rovna 1, v takovém případě se jedná o kruh. K této hodnotě se nejvíce blížily výtisky z hydrogelu o koncentraci kolagenu 30 mg/ml. To může být způsobeno mimo jiné tuhostí gelu, který se při tisku hůře odlučuje od trysky, a tak kruhové plochy tiskne výrazně přesněji než plochy s úhly. Nejméně kruhové jsou výtisky z hydrogelu o koncentraci 20 mg/ml, kde došlo odchylkám až 0,48 od 1.

Pro stanovení přesnosti 3D tisku byly zjišťovány poměry ploch a výšek u výtisků válců a mezikruží. V případě mezikruží mají poměr ploch nejbližší 1 výtisky z hydrogelu s obsahem kolagenu o koncentraci 10 mg/ml. To může být způsobeno tím, že u všech těchto výtisků došlo k zalití otvoru uprostřed. Největší rozdíly mezi poměry ploch se objevily u výtisků z hydrogelu s kolagenem o koncentraci 20 mg/ml. I u těchto výtisků došlo k zalití všech otvorů uprostřed, na rozdíl od výtisků s kolagenem o koncentraci 10 mg/ml však vlivem zalití došlo i ke zvětšení plochy. Výtisky z hydrogelu s kolagenem o koncentraci 30 mg/ml měly všechny otvor uprostřed vytištěný správně, k zalití u nich nedošlo, ani jeden z výtisků však nedosáhl poměru ploch 1, všechny výtisky jsou menší. Výška výtisků je k zadaným 5 mm nejbližší u výtisků z hydrogelů o koncentraci 10 mg/ml a 30 mg/ml, přičemž výtisky z hydrogelů o koncentraci 10 mg/ml dosahují zároveň i největšího rozdílu mezi nejmenší a největší hodnotou poměru výšek. Nejmenší rozdíl mezi krajními hodnotami je u výtisků z hydrogelů o koncentraci 30 mg/ml.

Při tištění modelu válce došlo u tří výtisků z hydrogelu o koncentraci 10 mg/ml k roztékání tak, že se plocha více než zdvojnásobila. To má za následek vysoký rozdíl nejnižší a nejvyšší hodnoty poměru ploch výtisku a modelu, a to 1,83. Poměry ploch zbylých výtisků se pohybují v rozmezí 0,97 až 1,15. Vysoké přesnosti v poměru ploch dosáhly výtisky z hydrogelů o koncentraci 30 mg/ml, kde se hodnoty poměrů ploch vyskytují mezi 0,64 a 0,95. Výšky výtisků válců byly u hydrogelů o koncentracích 10 mg/ml a 20 mg/ml nižší než je výška modelu, u výtisků z hydrogelu o koncentraci 30 mg/ml došlo ke zvýšení výšky až na 6,53 v jednom případě. To může být způsobeno nastavenou výškou vrstvy tisku, která byla 0,5 mm. Při nižší výšce však docházelo k poničení výtisku tryskou.

Z výsledků práce vyplývá, že z použitých gelů nejvyšší přesnosti ve 2D tisku dosahuje hydrogel o koncentraci 20 mg/ml kolagenu, ve 3D tisku je přesnost srovnatelná u hydrogelů s koncentrací kolagenu 20 a 30 mg/ml.

Přesnost tisku byla určována také pro tisk s buňkami. Spotřeba buněk je však značná, a tak kvůli množstevní náročnosti byly vytištěny pouze modely čtverce, kolečka a válce. Rozdělení poměrů jejich ploch nemá statisticky signifikantní rozdíl od rozdělení poměrů ploch výtisků bez buněk, lze tak říci, že obsah buněk v bioinkoustu nemá významný vliv na přesnost tisku. Kvůli vyšší viskozitě gelu však bylo nutné zkrátit délku trysky na polovinu, aby nedocházelo k ucpávání.

Měření mechanických vlastností bylo provedeno na hydrogelech o koncentraci kolagenu 20 mg/ml a 30 mg/ml. Důvodem bylo roztékání výtisků z hydrogelu o koncentraci kolagenu 10 mg/ml, které tak nemohly být měřeny. Na experimentálním přístroji byla změřena síla výtisku působící proti tlačící desce se senzorem v závislosti na dráze, kterou po ose Z deska urazila. Z lineární části této závislosti byla zjištěna směrnice přímky trendu, která byla dále využita pro výpočet elastického modulu hydrogelů. Výsledné hodnoty elastických modulů jsou pro hydrogel o koncentraci kolagenu 20 mg/ml 0,186 MPa u výtisků bez buněk, 0,133 MPa u výtisku s buňkami. Pro hydrogel o koncentraci kolagenu 30 mg/ml je hodnota elastického modulu 0,431 MPa u výtisků bez buněk a 0,468 MPa u výtisků s buňkami. Tyto hodnoty korespondují s hodnotami naměřenými ve studiích zkoumajících podobné gely [40; 43].

7 Závěr

Byly vytvořeny 2D a 3D modely pro analýzu přesnosti tisku na experimentální 3D biotiskárně z hydrogelů s různou koncentrací kolagenu. Tyto modely byly vytištěny a snímky výtisků byly zpracovány v prostředí MATLAB. Z hlediska 2D struktur je tisk nejpřesnější při použití hydrogelu s kolagenem o koncentraci 20 mg/ml, kde poměry hodnot měly odchylku od 1 maximálně 0,2, tedy 20 % plochy modelu. Pro 3D struktury je tisk nejpřesnější z hydrogelu s kolagenem o koncentraci 30 mg/ml, je ale třeba počítat s tím, že plocha výtisku je pak menší a výška větší než u modelu. Tvar výtisku je ale přesný, včetně otvorů ve výtisku.

Přesnost tisku není významně ovlivněna obsahem buněk v bioinkoustu. Pro 2D struktury se rovněž jeví jako nejpřesnější bioinkoust o koncentraci 20 mg/ml a pro 3D struktury 30 mg/ml.

Elastický modul hydrogelů je pro gel s kolagenem o koncentraci 20 mg/ml bez buněk 0,186 MPa, s buňkami 0,133 MPa. Pro koncentraci 30 mg/ml bez buněk je hodnota elastického modulu 0,431 MPa, s buňkami 0,443 MPa. Rozdíly mezi hodnotami elastického modulu gelů s buňkami a bez buněk se liší nevýznamně. Elastický modul gelu s hydrogelem o koncentraci 10 mg/ml nebyl měřen, protože gel nebyl dostatečně tuhý, aby z něj mohl být vytvořen objekt pro měření.

Seznam použité literatury

- [1] OZBOLAT, Ibrahim. *3D Bioprinting: fundamentals, principles and applications*. 1. Elsevier Science & Technology, 2016. ISBN 9780128030103.
- [2] BISHOP, Elliot, Sami MOSTAFA, Mikhail PAKVASA et al. *3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends*. 2017, **4**(4), 185-195. ISSN 23523042. Dostupné z: doi:10.1016/j.gendis.2017.10.002
- [3] GHAVAMINEJAD, Amin, Nureddin ASHAMMAKHI, Xiao WU a Ali KHADEMHOSEINI. Crosslinking Strategies for 3D Bioprinting of Polymeric Hydrogels. *Small*. 2020, **16**(35). ISSN 1613-6810. Dostupné z: doi:10.1002/smll.202002931
- [4] SLAUGHTER, Brandon, Shahana KHURSHID, Omar FISHER, Ali KHADEMHOSEINI a Nicholas PEPPAS. Hydrogels in Regenerative Medicine. *Advanced Materials*. 2009, **21**(32-33), 3307-3329. ISSN 09359648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.200802106
- [5] WU, Dongwei, Yue YU, Jianwang TAN, Lin HUANG, Binghong LUO, Lu LU a Changren ZHOU. *3D bioprinting of gellan gum and poly (ethylene glycol) diacrylate based hydrogels to produce human-scale constructs with high-fidelity*. 2018, **160**, 486-495. ISSN 02641275. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2018.09.040
- [6] HEINRICH, Marcel, Wanjun LIU, Andrea JIMENEZ et al. 3D Bioprinting: from Benches to Translational Applications. *Small*. 2019. ISSN 1613-6810. Dostupné z: doi:10.1002/smll.201805510
- [7] MANDRYCKY, Christian, Zongjie WANG, Keekyoung KIM a Deok-Ho KIM. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*. 2016, **34**(4), 422-434. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2015.12.011
- [8] WILSON, W. a Thomas BOLAND. Cell and organ printing 1: Protein and cell printers. *The Anatomical Record*. 2003, **272**(2), 491-496. ISSN 0003-276X. Dostupné z: doi:10.1002/ar.a.10057
- [9] GAO, Guifang, Arndt SCHILLING, Karen HUBBELL, Tomo YONEZAWA, Danh TRUONG, Yi HONG, Guohao DAI a Xiaofeng CUI.

Improved properties of bone and cartilage tissue from 3D inkjet-bioprinted human mesenchymal stem cells by simultaneous deposition and photocrosslinking in PEG-GelMA. *Biotechnology Letters*. 2015, **37**(11), 2349-2355. ISSN 0141-5492. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-015-1921-2

- [10] MURPHY, Sean, Aleksander SKARDAL a Anthony ATALA. Evaluation of hydrogels for bio-printing applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2013, **101**(1), 272-284. ISSN 15493296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.34326
- [11] BOHANDY, J., B. KIM a F. ADRIAN. Metal deposition from a supported metal film using an excimer laser. *Journal of Applied Physics*. 1986, **60**(4), 1538-1539. ISSN 0021-8979. Dostupné z: doi:10.1063/1.337287
- [12] OZBOLAT, Ibrahim a Monika HOSPODIUK. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*. 2016, **76**, 321-343. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2015.10.076
- [13] ROBINSON, Thomas, Dietmar HUTMACHER a Paul DALTON. The Next Frontier in Melt Electrospinning: Taming the Jet. *Advanced Functional Materials*. 2019, **29**(44). ISSN 1616-301X. Dostupné z: doi:10.1002/adfm.201904664
- [14] ZHANG, Hong-Bo, Tian-Long XING, Rui-Xue YIN, Yong SHI, Shi-Mo YANG a Wen-Jun ZHANG. Three-dimensional bioprinting is not only about cell-laden structures. *Chinese Journal of Traumatology*. 2016, **19**(4), 187-192. ISSN 10081275. Dostupné z: doi:10.1016/j.cjtee.2016.06.007
- [15] JI, Shen a Murat GUVENDIREN. Recent Advances in Bioink Design for 3D Bioprinting of Tissues and Organs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2017, **5**. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2017.00023
- [16] KYLE, Stuart, Zita JESSOP, Ayesha AL-SABAH a Iain WHITAKER. 'Printability' of Candidate Biomaterials for Extrusion Based 3D Printing: State-of-the-Art. *Advanced Healthcare Materials*. 2017, **6**(16). ISSN 21922640. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201700264
- [17] OOI, Huey Wen, Carlos MOTA, A. Tessa TEN CATE, Andrea CALORE, Lorenzo MORONI a Matthew B. BAKER. Thiol–Ene Alginate Hydrogels as Versatile Bioinks for Bioprinting. *Biomacromolecules*. 2018, **19**(8), 3390-3400. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.8b00696
- [18] PAN, Ting, Wenjing SONG, Xiaodong CAO a Yingjun WANG. 3D Bioplotting of Gelatin/Alginate Scaffolds for Tissue Engineering: Influence of

Crosslinking Degree and Pore Architecture on Physicochemical Properties. 2016, **32**(9), 889-900. ISSN 10050302. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmst.2016.01.007

- [19] MURPHY, Sean a Anthony ATALA. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology.* 2014, **32**(8), 773-785. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.2958
- [20] ZHANG, Yu, Kan YUE, Julio ALEMAN et al. 3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication. *Annals of Biomedical Engineering.* 2017, **45**(1), 148-163. ISSN 0090-6964. Dostupné z: doi:10.1007/s10439-016-1612-8
- [21] JUNGST, Tomasz, Willi SMOLAN, Kristin SCHACHT, Thomas SCHEIBEL a Jürgen GROLL. Strategies and Molecular Design Criteria for 3D Printable Hydrogels. *Chemical Reviews.* 2016, **116**(3), 1496-1539. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.5b00303
- [22] PANWAR, Amit a Lay TAN. Current Status of Bioinks for Micro-Extrusion-Based 3D Bioprinting. *Molecules.* 2016, **21**(6). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules21060685
- [23] DUARTE CAMPOS, Daniela, Andreas BLAESER, Anne KORSTEN, Sabine NEUSS, Jörg JÄKEL, Michael VOGT a Horst FISCHER. The Stiffness and Structure of Three-Dimensional Printed Hydrogels Direct the Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells Toward Adipogenic and Osteogenic Lineages. *Tissue Engineering Part A.* 2015, **21**(3-4), 740-756. ISSN 1937-3341. Dostupné z: doi:10.1089/ten.tea.2014.0231
- [24] ZHANG, Yufeng, Xiangrong CHENG, Jiawei WANG, Yining WANG, Bin SHI, Cui HUANG, Xuechao YANG a Tongjun LIU. Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor- β 1 DNA for periodontal tissue engineering. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2006, **344**(1), 362-369. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2006.03.106
- [25] XU, Tao, Kyle BINDER, Mohammad ALBANNA, Dennis DICE, Weixin ZHAO, James YOO a Anthony ATALA. Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications. *Biofabrication.* 2013, **5**(1). ISSN 1758-5082. Dostupné z: doi:10.1088/1758-5082/5/1/015001
- [26] PARK, Ju, Jong-Cheol CHOI, Jin-Hyung SHIM, Jung-Seob LEE, Hyoungjun PARK, Sung KIM, Junsang DOH a Dong-Woo CHO. A comparative study on collagen type I and hyaluronic acid dependent cell

- behavior for osteochondral tissue bioprinting. *Biofabrication*. 2014, **6**(3). ISSN 1758-5082. Dostupné z: doi:10.1088/1758-5082/6/3/035004
- [27] LEE, Vivian, Gurtej SINGH, John TRASATTI et al. Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2014, **20**(6), 473-484. ISSN 1937-3384. Dostupné z: doi:10.1089/ten.tec.2013.0335
- [28] SMITH, Cynthia, Alice STONE, Robert PARKHILL, Robert STEWART, Mark SIMPKINS, Anatoly KACHURIN, William WARREN a Stuart WILLIAMS. Three-Dimensional BioAssembly Tool for Generating Viable Tissue-Engineered Constructs. *Tissue Engineering*. 2004, **10**(9-10), 1566-1576. ISSN 1076-3279. Dostupné z: doi:10.1089/ten.2004.10.1566
- [29] TSENG, Yiider, Thomas KOLE a Denis WIRTZ. Micromechanical Mapping of Live Cells by Multiple-Particle-Tracking Microrheology. *Biophysical Journal*. 2002, **83**(6), 3162-3176. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(02)75319-8
- [30] KILPATRICK, Jason, Irène REVENKO a Brian RODRIGUEZ. Nanomechanics of Cells and Biomaterials Studied by Atomic Force Microscopy. *Advanced Healthcare Materials*. 2015, **4**(16), 2456-2474. ISSN 21922640. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201500229
- [31] LIU, Jianwei, Ning SUN, Marc BRUCE, Joseph WU, Manish BUTTE a Daniel MULLER. Atomic Force Mechanobiology of Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *PLoS ONE*. 2012, **7**(5). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0037559
- [32] KUZNETSOVA, Tatyana, Maria STARODUBTSEVA, Nicolai YEGORENKOV, Sergey CHIZHIK a Renat ZHDANOV. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*. 2007, **38**(8), 824-833. ISSN 09684328. Dostupné z: doi:10.1016/j.micron.2007.06.011
- [33] DOCHEVA, Denitsa, Daniela PADULA, Cvetan POPOV, Wolf MUTSCHLER, Hauke CLAUSEN-SCHAUMANN a Matthias SCHIEKER. Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2008, **12**(2), 537-552. ISSN 1582-1838. Dostupné z: doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00138.x
- [34] CHANG, Robert, Jae NAM a Wei SUN. Direct Cell Writing of 3D Microorgan for In Vitro Pharmacokinetic Model. *Tissue Engineering Part C:*

Methods. 2008, **14**(2), 157-166. ISSN 1937-3384. Dostupné z: doi:10.1089/ten.tec.2007.0392

- [35] CHANG, Robert, Jae NAM a Wei SUN. Effects of Dispensing Pressure and Nozzle Diameter on Cell Survival from Solid Freeform Fabrication–Based Direct Cell Writing. *Tissue Engineering Part A*. 2008, **14**(1), 41-48. ISSN 1937-3341. Dostupné z: doi:10.1089/ten.a.2007.0004
- [36] NAIR, Kalyani, Milind GANDHI, Saif KHALIL, Karen YAN, Michele MARCOLONGO, Kenneth BARBEE a Wei SUN. Characterization of cell viability during bioprinting processes. *Biotechnology Journal*. 2009, **4**(8), 1168-1177. ISSN 18606768. Dostupné z: doi:10.1002/biot.200900004
- [37] OUYANG, Liliang, Rui YAO, Xi CHEN, Jie NA a Wei SUN. 3D printing of HEK 293FT cell-laden hydrogel into macroporous constructs with high cell viability and normal biological functions. *Biofabrication*. 2015, **7**(1). ISSN 1758-5090. Dostupné z: doi:10.1088/1758-5090/7/1/015010
- [38] SNYDER, Jessica, Ae RIN SON, Qudus HAMID, Chengyang WANG, Yigong LUI a Wei SUN. Mesenchymal stem cell printing and process regulated cell properties. *Biofabrication*. 2015, **7**(4). ISSN 1758-5090. Dostupné z: doi:10.1088/1758-5090/7/4/044106
- [39] KHOO, Zhong, Joanne TEOH, Yong LIU, Chee CHUA, Shoufeng YANG, Jia AN, Kah LEONG a Wai YEONG. 3D printing of smart materials: A review on recent progresses in 4D printing. *Virtual and Physical Prototyping*. 2015, **10**(3), 103-122. ISSN 1745-2759. Dostupné z: doi:10.1080/17452759.2015.1097054
- [40] STEPANOVSKA, Jana, Martin OTAHAL, Karel HANZALEK, Monika SUPOVA a Roman MATEJKA. PH Modification of High-Concentrated Collagen Bioinks as a Factor Affecting Cell Viability, Mechanical Properties, and Printability. *Gels*. 2021, **7**(4). ISSN 2310-2861. Dostupné z: doi:10.3390/gels7040252
- [41] MACKENZIE, Cosmo G., Julia B. MACKENZIE a Paul BECK. THE EFFECT OF pH ON GROWTH, PROTEIN SYNTHESIS, AND LIPID-RICH PARTICLES OF CULTURED MAMMALIAN CELLS. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 1961, **9**(1), 141-156. ISSN 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.9.1.141
- [42] ScienceDirect. Circularity. In: *ScienceDirect*. [online]. [cit. 2022-05-11]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/circularity>

- [43] CZERNER, Marina, Lucas Sanchez FELLAY, María P. SUÁREZ, Patricia M. FRONTINI a Laura A. FASCE. Determination of Elastic Modulus of Gelatin Gels by Indentation Experiments. *Procedia Materials Science*. 2015, **8**, 287-296. ISSN 22118128. Dostupné z: doi:10.1016/j.mspro.2015.04.075

Příloha A: Tabulky s výsledky

Tabulka č. 1: Výsledky zpracování snímků čar.

| c10 | | | | | c20 | | | | |
|-----|------------|------------|---------------------------|-----------------|-----|------------|------------|---------------------------|-----------------|
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) |
| 1-1 | 6,40 | 5,90 | 25,95 | 1,30 | 1-1 | 7,93 | 5,97 | 36,90 | 1,85 |
| 1-2 | 9,18 | 5,97 | 35,72 | 1,79 | 1-2 | 8,31 | 6,22 | 42,45 | 2,12 |
| 1-3 | 8,86 | 5,80 | 37,35 | 1,87 | 1-3 | 8,31 | 6,25 | 42,57 | 2,13 |
| 1-4 | 8,09 | 5,82 | 33,42 | 1,67 | 1-4 | 7,98 | 6,28 | 43,34 | 2,17 |
| 1-5 | 7,65 | 5,81 | 31,01 | 1,55 | 1-5 | 8,31 | 6,28 | 41,03 | 2,05 |
| 1-6 | 7,27 | 5,76 | 31,79 | 1,59 | 1-6 | 8,20 | 6,21 | 40,52 | 2,03 |
| 2-1 | 9,29 | 6,52 | 33,68 | 1,68 | 2-1 | 7,65 | 6,11 | 34,64 | 1,73 |
| 2-2 | 9,57 | 6,27 | 34,33 | 1,72 | 2-2 | 8,20 | 6,12 | 40,80 | 2,04 |
| 2-3 | 7,11 | 5,79 | 30,17 | 1,51 | 2-3 | 8,20 | 6,12 | 42,32 | 2,12 |
| 2-4 | 7,27 | 5,75 | 30,06 | 1,50 | 2-4 | 8,04 | 6,05 | 40,22 | 2,01 |
| 2-5 | 7,98 | 5,20 | 33,09 | 1,65 | 2-5 | 7,82 | 6,09 | 40,83 | 2,04 |
| 2-6 | 7,93 | 5,80 | 35,85 | 1,79 | 2-6 | 9,07 | 6,37 | 44,75 | 2,24 |
| 3-1 | 7,33 | 6,31 | 30,00 | 1,50 | 3-1 | 7,87 | 5,71 | 33,11 | 1,66 |
| 3-2 | 7,87 | 5,82 | 35,15 | 1,76 | 3-2 | 9,18 | 6,05 | 44,20 | 2,21 |
| 3-3 | 8,69 | 5,63 | 37,12 | 1,86 | 3-3 | 8,91 | 6,03 | 40,53 | 2,03 |
| 3-4 | 7,98 | 5,56 | 34,58 | 1,73 | 3-4 | 9,24 | 6,14 | 45,89 | 2,29 |
| 3-5 | 7,87 | 5,65 | 34,50 | 1,73 | 3-5 | 9,13 | 5,83 | 44,40 | 2,22 |
| 3-6 | 8,36 | 5,16 | 34,86 | 1,74 | 3-6 | 8,86 | 6,04 | 44,12 | 2,21 |
| 4-1 | 10,71 | 6,23 | 36,96 | 1,85 | 4-1 | 8,04 | 5,27 | 28,83 | 1,44 |
| 4-2 | 7,71 | 6,48 | 39,47 | 1,97 | 4-2 | 8,25 | 6,22 | 44,10 | 2,21 |
| 4-3 | 7,93 | 6,36 | 40,66 | 2,03 | 4-3 | 8,80 | 6,21 | 45,76 | 2,29 |
| 4-4 | 7,49 | 6,35 | 39,81 | 1,99 | 4-4 | 8,47 | 6,03 | 40,65 | 2,03 |
| 4-5 | 8,36 | 6,26 | 41,13 | 2,06 | 4-5 | 9,07 | 6,26 | 45,80 | 2,29 |
| 4-6 | 9,13 | 6,22 | 40,30 | 2,01 | 4-6 | 8,36 | 6,14 | 41,49 | 2,07 |
| 5-1 | 6,72 | 6,16 | 32,02 | 1,60 | 5-1 | 7,98 | 5,57 | 33,19 | 1,66 |
| 5-2 | 6,34 | 6,11 | 32,27 | 1,61 | 5-2 | 8,25 | 5,88 | 39,59 | 1,98 |
| 5-3 | 6,72 | 6,26 | 32,90 | 1,64 | 5-3 | 8,20 | 5,83 | 40,43 | 2,02 |
| 5-4 | 8,42 | 6,06 | 36,41 | 1,82 | 5-4 | 8,36 | 5,72 | 39,50 | 1,98 |
| 5-5 | 8,80 | 6,04 | 36,88 | 1,84 | 5-5 | 9,07 | 5,55 | 39,31 | 1,97 |
| 5-6 | 9,18 | 6,25 | 39,17 | 1,96 | 5-6 | 8,64 | 6,15 | 44,07 | 2,20 |
| 6-1 | 7,43 | 6,35 | 29,69 | 1,48 | 6-1 | 7,16 | 5,69 | 30,06 | 1,50 |
| 6-2 | 6,51 | 6,27 | 34,14 | 1,71 | 6-2 | 8,15 | 6,02 | 39,63 | 1,98 |
| 6-3 | 7,54 | 6,12 | 34,19 | 1,71 | 6-3 | 8,47 | 6,13 | 39,88 | 1,99 |
| 6-4 | 8,12 | 6,22 | 36,19 | 1,81 | 6-4 | 8,20 | 6,05 | 39,36 | 1,97 |
| 6-5 | 7,87 | 6,26 | 37,40 | 1,87 | 6-5 | 7,65 | 5,89 | 37,62 | 1,88 |
| 6-6 | 9,51 | 6,55 | 45,98 | 2,30 | 6-6 | 7,65 | 5,96 | 36,40 | 1,82 |
| 7-1 | 7,27 | 5,97 | 28,71 | 1,44 | 7-1 | 6,78 | 5,76 | 26,03 | 1,30 |

| | | | | | | | | | |
|------|-------|------|-------|------|------|-------|------|-------|------|
| 7-2 | 7,33 | 6,25 | 36,94 | 1,85 | 7-2 | 7,16 | 5,93 | 36,25 | 1,81 |
| 7-3 | 7,00 | 5,97 | 32,89 | 1,64 | 7-3 | 7,98 | 6,05 | 34,69 | 1,73 |
| 7-4 | 7,82 | 6,32 | 37,58 | 1,88 | 7-4 | 7,43 | 6,26 | 39,74 | 1,99 |
| 7-5 | 7,65 | 6,02 | 37,29 | 1,86 | 7-5 | 7,33 | 6,17 | 37,88 | 1,89 |
| 7-6 | 8,64 | 6,18 | 41,13 | 2,06 | 7-6 | 7,38 | 6,07 | 35,14 | 1,76 |
| 8-1 | 6,18 | 6,23 | 29,24 | 1,46 | 8-1 | 6,67 | 5,39 | 27,72 | 1,39 |
| 8-2 | 7,93 | 6,08 | 35,40 | 1,77 | 8-2 | 8,36 | 5,90 | 39,76 | 1,99 |
| 8-3 | 7,65 | 6,23 | 36,96 | 1,85 | 8-3 | 7,87 | 5,83 | 37,27 | 1,86 |
| 8-4 | 8,58 | 6,31 | 37,60 | 1,88 | 8-4 | 8,20 | 5,74 | 37,55 | 1,88 |
| 8-5 | 8,25 | 6,21 | 37,83 | 1,89 | 8-5 | 8,09 | 5,55 | 36,71 | 1,84 |
| 8-6 | 7,82 | 6,19 | 33,29 | 1,66 | 8-6 | 7,98 | 6,13 | 41,58 | 2,08 |
| 9-1 | 6,67 | 6,11 | 26,94 | 1,35 | 9-1 | 6,34 | 5,71 | 27,06 | 1,35 |
| 9-2 | 6,45 | 6,11 | 32,57 | 1,63 | 9-2 | 7,27 | 5,88 | 35,99 | 1,80 |
| 9-3 | 6,94 | 5,87 | 33,67 | 1,68 | 9-3 | 7,22 | 5,92 | 36,19 | 1,81 |
| 9-4 | 7,76 | 6,18 | 39,14 | 1,96 | 9-4 | 12,03 | 6,32 | 37,04 | 1,85 |
| 9-5 | 7,71 | 5,97 | 35,97 | 1,80 | 9-5 | 7,27 | 6,00 | 36,69 | 1,83 |
| 9-6 | 7,87 | 6,29 | 36,79 | 1,84 | 9-6 | 7,60 | 6,04 | 33,05 | 1,65 |
| 10-1 | 12,30 | 6,22 | 24,74 | 1,24 | 10-1 | 7,49 | 5,21 | 24,75 | 1,24 |
| 10-2 | 8,36 | 6,53 | 33,49 | 1,67 | 10-2 | 7,82 | 5,97 | 40,26 | 2,01 |
| 10-3 | 9,40 | 6,27 | 36,74 | 1,84 | 10-3 | 12,30 | 6,30 | 39,08 | 1,95 |
| 10-4 | 7,38 | 5,48 | 27,51 | 1,38 | 10-4 | 7,76 | 5,92 | 37,47 | 1,87 |
| 10-5 | 7,65 | 5,74 | 36,70 | 1,83 | 10-5 | 8,69 | 6,32 | 42,85 | 2,14 |
| 10-6 | 6,23 | 6,33 | 33,66 | 1,68 | 10-6 | 7,98 | 6,11 | 39,56 | 1,98 |

| c30 | | | | |
|-----|---------------|---------------|------------------------------|-----------------------|
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) |
| 1-1 | 5,69 | 4,74 | 21,93 | 1,10 |
| 1-2 | 8,58 | 6,05 | 38,73 | 1,94 |
| 1-3 | 7,93 | 6,04 | 40,41 | 2,02 |
| 1-4 | 12,19 | 5,95 | 38,72 | 1,94 |
| 1-5 | 8,20 | 5,97 | 38,87 | 1,94 |
| 1-6 | 7,93 | 5,96 | 38,17 | 1,91 |
| 2-1 | 8,20 | 6,40 | 43,63 | 2,18 |
| 2-2 | 8,47 | 6,25 | 45,66 | 2,28 |
| 2-3 | 8,64 | 6,39 | 47,42 | 2,37 |
| 2-4 | 8,20 | 6,28 | 44,89 | 2,24 |
| 2-5 | 9,35 | 6,41 | 48,05 | 2,40 |
| 2-6 | 10,06 | 6,33 | 48,15 | 2,41 |
| 3-1 | 8,91 | 6,39 | 48,78 | 2,44 |

| | | | | |
|------|-------|------|-------|------|
| 3-2 | 9,02 | 6,46 | 49,96 | 2,50 |
| 3-3 | 9,18 | 6,18 | 47,16 | 2,36 |
| 3-4 | 8,53 | 6,28 | 45,77 | 2,29 |
| 3-5 | 8,36 | 6,46 | 47,17 | 2,36 |
| 3-6 | 8,31 | 6,30 | 46,10 | 2,31 |
| 4-1 | 7,82 | 5,89 | 33,52 | 1,68 |
| 4-2 | 8,58 | 5,65 | 36,55 | 1,83 |
| 4-3 | 7,71 | 5,56 | 35,99 | 1,80 |
| 4-4 | 7,43 | 5,89 | 36,35 | 1,82 |
| 4-5 | 8,15 | 5,71 | 37,47 | 1,87 |
| 4-6 | 8,53 | 5,90 | 41,89 | 2,09 |
| 5-1 | 9,07 | 5,20 | 31,50 | 1,57 |
| 5-2 | 8,64 | 4,93 | 33,04 | 1,65 |
| 5-3 | 8,64 | 5,43 | 36,35 | 1,82 |
| 5-4 | 8,64 | 5,54 | 35,70 | 1,79 |
| 5-5 | 8,69 | 5,35 | 35,54 | 1,78 |
| 5-6 | 7,98 | 5,64 | 34,48 | 1,72 |
| 6-1 | 8,25 | 5,91 | 38,59 | 1,93 |
| 6-2 | 7,87 | 5,95 | 39,54 | 1,98 |
| 6-3 | 8,47 | 6,14 | 40,74 | 2,04 |
| 6-4 | 7,98 | 5,87 | 39,83 | 1,99 |
| 6-5 | 8,53 | 6,00 | 41,34 | 2,07 |
| 6-6 | 8,15 | 5,76 | 37,03 | 1,85 |
| 7-1 | 7,76 | 5,43 | 33,03 | 1,65 |
| 7-2 | 10,71 | 5,48 | 40,78 | 2,04 |
| 7-3 | 8,97 | 5,63 | 39,28 | 1,96 |
| 7-4 | 8,75 | 5,55 | 37,13 | 1,86 |
| 7-5 | 8,42 | 5,81 | 38,23 | 1,91 |
| 7-6 | 8,47 | 5,65 | 37,47 | 1,87 |
| 8-1 | 7,93 | 5,83 | 33,54 | 1,68 |
| 8-2 | 7,93 | 5,80 | 37,89 | 1,89 |
| 8-3 | 7,60 | 5,59 | 33,14 | 1,66 |
| 8-4 | 7,60 | 5,87 | 34,03 | 1,70 |
| 8-5 | 7,43 | 5,73 | 34,82 | 1,74 |
| 8-6 | 7,16 | 5,85 | 33,54 | 1,68 |
| 9-1 | 8,31 | 6,41 | 41,10 | 2,05 |
| 9-2 | 8,42 | 6,18 | 43,54 | 2,18 |
| 9-3 | 8,53 | 6,20 | 42,40 | 2,12 |
| 9-4 | 9,40 | 6,10 | 43,01 | 2,15 |
| 9-5 | 8,20 | 6,20 | 43,55 | 2,18 |
| 9-6 | 8,75 | 6,25 | 44,17 | 2,21 |
| 10-1 | 8,25 | 6,23 | 40,62 | 2,03 |
| 10-2 | 10,50 | 6,18 | 41,65 | 2,08 |
| 10-3 | 8,58 | 5,34 | 35,77 | 1,79 |

| | | | | |
|------|------|------|-------|------|
| 10-4 | 8,42 | 6,13 | 39,90 | 1,99 |
| 10-5 | 8,31 | 6,22 | 42,00 | 2,10 |
| 10-6 | 8,97 | 6,17 | 43,17 | 2,16 |

Tabulka č. 2: Výsledky zpracování snímků čtverců.

| c10 | | | | | | | | |
|-----|------------|------------|---------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Poměr úhlu LH (-) | Poměr úhlu HP (-) | Poměr úhlu PD (-) | Poměr úhlu DL (-) |
| 1 | 10,61 | 10,39 | 99,51 | 1,00 | 1,00 | 0,99 | 0,98 | 1,02 |
| 2 | 10,80 | 11,31 | 103,67 | 1,04 | 1,02 | 0,99 | 0,99 | 1,01 |
| 3 | 10,59 | 10,88 | 101,70 | 1,02 | 1,04 | 0,95 | 0,99 | 1,01 |
| 4 | 10,67 | 10,65 | 98,51 | 0,99 | 1,01 | 0,96 | 1,02 | 0,98 |
| 5 | 10,47 | 10,86 | 97,73 | 0,98 | 1,03 | 0,96 | 1,01 | 0,99 |
| 6 | 10,45 | 11,13 | 99,19 | 0,99 | 0,97 | 1,01 | 0,97 | 1,03 |
| 7 | 10,74 | 10,67 | 98,86 | 0,99 | 1,01 | 0,98 | 1,01 | 0,99 |
| 8 | 10,06 | 10,43 | 85,98 | 0,86 | 1,04 | 0,97 | 1,00 | 1,00 |
| 9 | 10,22 | 9,84 | 84,06 | 0,84 | 1,00 | 0,99 | 1,02 | 0,98 |
| 10 | 10,45 | 10,53 | 96,53 | 0,97 | 1,01 | 0,99 | 0,99 | 1,01 |
| c20 | | | | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Poměr úhlu LH (-) | Poměr úhlu HP (-) | Poměr úhlu PD (-) | Poměr úhlu DL (-) |
| 1 | 9,77 | 9,98 | 90,88 | 0,91 | 0,99 | 1,01 | 1,00 | 1,00 |
| 2 | 10,14 | 10,24 | 96,99 | 0,97 | 0,99 | 1,02 | 0,99 | 1,01 |
| 3 | 10,02 | 10,06 | 95,23 | 0,95 | 0,99 | 1,01 | 1,00 | 1,00 |
| 4 | 10,08 | 10,02 | 95,23 | 0,95 | 1,00 | 1,01 | 0,99 | 1,01 |
| 5 | 10,24 | 10,32 | 97,17 | 0,97 | 0,97 | 1,03 | 1,00 | 1,00 |
| 6 | 10,02 | 10,04 | 94,10 | 0,94 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 7 | 9,91 | 9,77 | 90,27 | 0,90 | 0,99 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 8 | 10,22 | 10,28 | 96,91 | 0,97 | 1,00 | 1,00 | 0,98 | 1,02 |
| 9 | 10,16 | 10,04 | 95,94 | 0,96 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 10 | 9,94 | 10,08 | 93,90 | 0,94 | 0,99 | 1,01 | 0,99 | 1,01 |
| c30 | | | | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Poměr úhlu LH (-) | Poměr úhlu HP (-) | Poměr úhlu PD (-) | Poměr úhlu DL (-) |
| 1 | 9,57 | 10,04 | 86,34 | 0,86 | 0,97 | 1,02 | 0,99 | 1,01 |
| 2 | 9,42 | 10,16 | 85,03 | 0,85 | 0,98 | 1,02 | 1,00 | 1,00 |
| 3 | 9,75 | 10,02 | 87,43 | 0,87 | 0,98 | 1,02 | 1,00 | 1,00 |

| | | | | | | | | |
|----|------|-------|-------|------|------|------|------|------|
| 4 | 9,67 | 10,20 | 86,76 | 0,87 | 0,97 | 1,03 | 0,99 | 1,01 |
| 5 | 9,77 | 10,41 | 90,56 | 0,91 | 0,98 | 1,03 | 0,99 | 1,01 |
| 6 | 9,63 | 10,18 | 84,99 | 0,85 | 0,98 | 1,02 | 1,00 | 1,00 |
| 7 | 9,30 | 10,00 | 85,91 | 0,86 | 0,98 | 1,01 | 0,99 | 1,01 |
| 8 | 9,48 | 10,16 | 87,84 | 0,88 | 0,97 | 1,03 | 0,98 | 1,02 |
| 9 | 9,50 | 9,98 | 85,47 | 0,85 | 0,98 | 1,01 | 0,99 | 1,01 |
| 10 | 9,75 | 10,04 | 88,06 | 0,88 | 1,00 | 1,00 | 0,99 | 1,01 |

Tabulka č. 3: Výsledky zpracování snímků hvězd.

| c10 | | | | | | |
|-----|------------|------------|---------------------------|-----------------|----------|----------------|
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Úhel (°) | Poměr úhlu (-) |
| 1 | 15,40 | 15,91 | 152,93 | 1,73 | 128,19 | 1,07 |
| 2 | 15,29 | 12,93 | 128,95 | 1,46 | 108,05 | 0,90 |
| 3 | 15,53 | 16,43 | 167,99 | 1,90 | 133,16 | 1,11 |
| 4 | 15,36 | 15,67 | 149,02 | 1,69 | 125,28 | 1,04 |
| 5 | 15,34 | 12,60 | 119,91 | 1,36 | 96,73 | 0,81 |
| 6 | 15,71 | 15,53 | 158,98 | 1,80 | 96,35 | 0,80 |
| 7 | 16,02 | 15,62 | 165,46 | 1,87 | 98,35 | 0,82 |
| 8 | 16,32 | 16,32 | 171,32 | 1,94 | 136,94 | 1,14 |
| 9 | 15,36 | 15,58 | 144,00 | 1,63 | 124,71 | 1,04 |
| 10 | 15,36 | 12,91 | 128,66 | 1,46 | 99,45 | 0,83 |
| c20 | | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Úhel (°) | Poměr úhlu (-) |
| 1 | 12,69 | 12,39 | 95,85 | 1,09 | 114,01 | 0,95 |
| 2 | 12,37 | 12,05 | 94,51 | 1,07 | 112,99 | 0,94 |
| 3 | 12,19 | 11,90 | 91,21 | 1,03 | 110,79 | 0,92 |
| 4 | 13,48 | 12,59 | 96,47 | 1,09 | 113,22 | 0,94 |
| 5 | 12,91 | 11,97 | 92,67 | 1,05 | 125,71 | 1,05 |
| 6 | 12,74 | 12,41 | 94,39 | 1,07 | 107,26 | 0,89 |
| 7 | 12,64 | 12,19 | 92,34 | 1,05 | 130,17 | 1,08 |
| 8 | 12,29 | 12,01 | 94,90 | 1,07 | 111,76 | 0,93 |
| 9 | 12,74 | 12,31 | 93,72 | 1,06 | 124,66 | 1,04 |
| 10 | 11,74 | 11,88 | 91,44 | 1,04 | 109,92 | 0,92 |
| c30 | | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Úhel (°) | Poměr úhlu (-) |
| 1 | 10,59 | 10,20 | 75,08 | 0,85 | 101,58 | 0,85 |
| 2 | 10,84 | 11,02 | 79,07 | 0,90 | 98,38 | 0,82 |
| 3 | 10,82 | 9,77 | 75,99 | 0,86 | 96,29 | 0,80 |
| 4 | 10,51 | 10,22 | 76,69 | 0,87 | 92,07 | 0,77 |

| | | | | | | |
|----|-------|-------|-------|------|--------|------|
| 5 | 9,53 | 10,72 | 71,96 | 0,81 | 96,38 | 0,80 |
| 6 | 10,45 | 10,00 | 73,54 | 0,83 | 95,44 | 0,80 |
| 7 | 9,98 | 11,15 | 74,47 | 0,84 | 90,28 | 0,75 |
| 8 | 10,04 | 10,00 | 71,25 | 0,81 | 93,71 | 0,78 |
| 9 | 10,37 | 10,06 | 74,02 | 0,84 | 95,28 | 0,79 |
| 10 | 10,82 | 11,21 | 79,94 | 0,90 | 101,62 | 0,85 |

Tabulka č. 4: Výsledky zpracování snímků koleček.

| c10 | | | | | |
|-----|------------|------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Kruhovitost (-) |
| 1 | 9,94 | 9,20 | 72,21 | 0,92 | 1,23 |
| 2 | 10,39 | 10,20 | 83,54 | 1,06 | 1,20 |
| 3 | 10,53 | 10,28 | 86,32 | 1,10 | 1,24 |
| 4 | 10,37 | 10,28 | 84,04 | 1,07 | 1,28 |
| 5 | 10,57 | 10,32 | 87,37 | 1,11 | 1,06 |
| 6 | 10,45 | 10,49 | 83,74 | 1,07 | 1,13 |
| 7 | 10,32 | 10,57 | 84,74 | 1,08 | 1,13 |
| 8 | 10,45 | 9,12 | 75,15 | 0,96 | 1,20 |
| 9 | 10,00 | 10,57 | 83,58 | 1,06 | 1,22 |
| 10 | 10,06 | 10,57 | 82,05 | 1,04 | 1,15 |
| c20 | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Kruhovitost (-) |
| 1 | 9,92 | 9,91 | 76,20 | 0,97 | 1,34 |
| 2 | 9,87 | 9,87 | 75,66 | 0,96 | 1,48 |
| 3 | 9,55 | 9,61 | 72,08 | 0,92 | 1,35 |
| 4 | 9,73 | 9,61 | 74,24 | 0,95 | 1,35 |
| 5 | 9,65 | 9,73 | 73,27 | 0,93 | 1,35 |
| 6 | 9,85 | 9,69 | 73,49 | 0,94 | 1,28 |
| 7 | 9,67 | 9,83 | 75,11 | 0,96 | 1,22 |
| 8 | 9,85 | 9,59 | 73,92 | 0,94 | 1,32 |
| 9 | 9,79 | 9,83 | 74,24 | 0,95 | 1,37 |
| 10 | 9,61 | 9,53 | 72,16 | 0,92 | 1,34 |
| c30 | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Kruhovitost (-) |
| 1 | 9,51 | 9,65 | 72,68 | 0,93 | 1,04 |
| 2 | 9,38 | 9,40 | 67,39 | 0,86 | 1,05 |
| 3 | 9,83 | 9,48 | 71,70 | 0,91 | 1,05 |
| 4 | 9,08 | 9,38 | 67,99 | 0,87 | 1,05 |
| 5 | 9,67 | 10,26 | 69,92 | 0,89 | 1,05 |
| 6 | 9,42 | 9,36 | 68,38 | 0,87 | 1,05 |

| | | | | | |
|----|------|------|-------|------|------|
| 7 | 9,44 | 9,69 | 71,01 | 0,90 | 1,06 |
| 8 | 9,77 | 9,26 | 72,19 | 0,92 | 1,05 |
| 9 | 9,18 | 9,55 | 69,38 | 0,88 | 1,07 |
| 10 | 9,32 | 9,44 | 68,90 | 0,88 | 1,09 |

Tabulka č. 5: Výsledky zpracování snímků mřížek.

| c10 | | | | | |
|-----|------------|------------|---------------------------|-----------------|---------------|
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Počet děr (-) |
| 1 | 13,65 | 13,43 | 155,97 | 1,77 | 6 |
| 2 | 13,81 | 13,91 | 158,82 | 1,80 | 7 |
| 3 | 13,96 | 13,74 | 152,60 | 1,73 | 8 |
| 4 | 14,09 | 14,24 | 142,29 | 1,62 | 9 |
| 5 | 14,13 | 14,16 | 134,61 | 1,53 | 9 |
| 6 | 14,20 | 14,11 | 139,59 | 1,59 | 8 |
| 7 | 14,05 | 13,46 | 140,24 | 1,59 | 5 |
| 8 | 13,83 | 13,87 | 165,57 | 1,88 | 3 |
| 9 | 14,13 | 13,67 | 148,08 | 1,68 | 7 |
| 10 | 13,94 | 13,46 | 143,87 | 1,63 | 7 |
| c20 | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Počet děr (-) |
| 1 | 13,50 | 14,11 | 133,01 | 1,51 | 5 |
| 2 | 14,46 | 14,40 | 166,50 | 1,89 | 8 |
| 3 | 14,82 | 14,88 | 173,52 | 1,97 | 9 |
| 4 | 14,84 | 15,19 | 176,16 | 2,00 | 8 |
| 5 | 14,55 | 14,42 | 171,39 | 1,95 | 8 |
| 6 | 14,61 | 14,28 | 168,74 | 1,92 | 9 |
| 7 | 13,69 | 13,65 | 139,96 | 1,59 | 9 |
| 8 | 14,15 | 14,00 | 158,54 | 1,80 | 8 |
| 9 | 13,71 | 13,48 | 127,61 | 1,45 | 6 |
| 10 | 13,78 | 13,96 | 143,77 | 1,63 | 9 |
| c30 | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Počet děr (-) |
| 1 | 13,87 | 13,83 | 139,07 | 1,58 | 9 |
| 2 | 13,65 | 14,02 | 135,54 | 1,54 | 9 |
| 3 | 13,61 | 13,70 | 128,30 | 1,46 | 9 |
| 4 | 14,05 | 14,13 | 158,14 | 1,80 | 7 |
| 5 | 14,00 | 14,11 | 150,64 | 1,71 | 7 |
| 6 | 14,09 | 14,05 | 150,29 | 1,71 | 9 |
| 7 | 13,96 | 14,16 | 145,02 | 1,65 | 9 |
| 8 | 14,07 | 14,13 | 142,92 | 1,62 | 7 |

| | | | | | |
|----|-------|-------|--------|------|---|
| 9 | 13,76 | 13,81 | 129,50 | 1,47 | 8 |
| 10 | 14,07 | 14,13 | 141,63 | 1,61 | 9 |

Tabulka č. 6: Výsledky zpracování snímků mezikruží.

| c10 | | | | | |
|-----|------------|------------|---------------------------|-----------------|------------------|
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Výška zboků (mm) |
| 1 | 13,99 | 14,01 | 156,40 | 1,00 | 4,08 |
| 2 | 13,81 | 14,04 | 161,37 | 1,03 | 4,71 |
| 3 | 13,97 | 13,89 | 160,83 | 1,02 | 5,43 |
| 4 | 13,63 | 13,95 | 162,83 | 1,04 | 5,68 |
| 5 | 13,95 | 14,08 | 156,98 | 1,00 | 4,82 |
| 6 | 14,04 | 14,02 | 157,35 | 1,00 | 4,86 |
| 7 | 14,08 | 13,95 | 157,79 | 1,00 | 5,22 |
| 8 | 13,87 | 14,22 | 158,42 | 1,01 | 6,76 |
| 9 | 13,73 | 14,12 | 158,70 | 1,01 | 6,91 |
| 10 | 13,97 | 13,63 | 161,84 | 1,03 | 6,06 |
| c20 | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Výška zboků (mm) |
| 1 | 16,68 | 16,68 | 219,23 | 1,40 | 6,35 |
| 2 | 14,67 | 14,92 | 171,37 | 1,09 | 5,41 |
| 3 | 16,43 | 16,66 | 214,48 | 1,37 | 6,61 |
| 4 | 15,69 | 16,62 | 170,38 | 1,08 | 5,48 |
| 5 | 16,31 | 16,33 | 209,65 | 1,33 | 6,03 |
| 6 | 16,45 | 16,80 | 220,25 | 1,40 | 6,38 |
| 7 | 14,67 | 14,73 | 169,88 | 1,08 | 5,48 |
| 8 | 16,47 | 16,80 | 215,90 | 1,37 | 6,35 |
| 9 | 16,15 | 16,12 | 204,63 | 1,30 | 6,05 |
| 10 | 14,47 | 14,79 | 167,52 | 1,07 | 5,43 |
| c30 | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Výška zboků (mm) |
| 1 | 13,25 | 13,44 | 129,75 | 0,83 | 5,74 |
| 2 | 14,05 | 13,95 | 151,10 | 0,96 | 5,74 |
| 3 | 14,77 | 14,67 | 150,76 | 0,96 | 9,14 |
| 4 | 13,25 | 13,31 | 131,27 | 0,84 | 5,61 |
| 5 | 13,91 | 13,75 | 145,96 | 0,93 | 5,51 |
| 6 | 13,70 | 13,85 | 145,06 | 0,92 | 5,24 |
| 7 | 14,20 | 13,91 | 152,83 | 0,97 | 5,55 |

| | | | | | |
|----|-------|-------|--------|------|------|
| 8 | 13,21 | 13,05 | 126,71 | 0,81 | 5,24 |
| 9 | 14,18 | 14,16 | 156,26 | 0,99 | 5,74 |
| 10 | 13,68 | 13,89 | 145,22 | 0,92 | 5,24 |

Tabulka č. 7: Výsledky zpracování snímků válců.

| c10 | | | | | |
|-----|------------|------------|---------------------------|-----------------|------------------|
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Výška zbokou (-) |
| 1 | 9,94 | 9,98 | 78,13 | 0,99 | 4,53 |
| 2 | 10,76 | 10,59 | 89,95 | 1,15 | 4,35 |
| 3 | 9,88 | 9,86 | 76,40 | 0,97 | 4,30 |
| 4 | 10,59 | 10,72 | 89,41 | 1,14 | 4,47 |
| 5 | 9,92 | 10,04 | 79,21 | 1,01 | 4,24 |
| 6 | 9,92 | 9,84 | 76,99 | 0,98 | 4,43 |
| 7 | 10,61 | 10,65 | 89,95 | 1,15 | 4,16 |
| 8 | 14,61 | 18,57 | 204,18 | 2,60 | 3,89 |
| 9 | 13,16 | 18,57 | 184,64 | 2,35 | 2,19 |
| 10 | 16,26 | 17,42 | 219,70 | 2,80 | 1,74 |
| c20 | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Výška zbokou (-) |
| 1 | 11,76 | 11,87 | 107,75 | 1,37 | 4,12 |
| 2 | 11,64 | 11,85 | 106,38 | 1,35 | 3,81 |
| 3 | 11,74 | 11,50 | 102,79 | 1,31 | 4,34 |
| 4 | 11,29 | 11,91 | 104,24 | 1,33 | 4,71 |
| 5 | 11,48 | 11,78 | 103,52 | 1,32 | 4,55 |
| 6 | 11,29 | 11,89 | 103,93 | 1,32 | 4,94 |
| 7 | 11,70 | 12,03 | 108,93 | 1,39 | 4,35 |
| 8 | 11,81 | 11,85 | 108,43 | 1,38 | 3,73 |
| 9 | 11,46 | 11,40 | 101,99 | 1,30 | 4,60 |
| 10 | 12,58 | 12,91 | 107,73 | 1,37 | 4,21 |
| c30 | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Výška zbokou (-) |
| 1 | 9,92 | 9,73 | 74,90 | 0,95 | 4,77 |
| 2 | 8,79 | 8,95 | 59,76 | 0,76 | 6,11 |
| 3 | 8,54 | 8,40 | 54,93 | 0,70 | 6,29 |
| 4 | 8,48 | 8,23 | 54,75 | 0,70 | 6,53 |
| 5 | 8,32 | 7,97 | 50,52 | 0,64 | 6,06 |
| 6 | 8,26 | 8,03 | 50,92 | 0,65 | 6,21 |
| 7 | 9,05 | 9,32 | 65,18 | 0,83 | 5,67 |
| 8 | 9,16 | 8,89 | 62,37 | 0,79 | 5,49 |
| 9 | 8,52 | 8,73 | 57,41 | 0,73 | 5,44 |

| | | | | | |
|----|------|------|-------|------|------|
| 10 | 8,67 | 8,52 | 56,80 | 0,72 | 5,57 |
|----|------|------|-------|------|------|

Tabulka č. 8: Výsledky zpracování snímků čtverců s buňkami.

| c10 | | | | |
|-----|------------|------------|---------------------------|-----------------|
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) |
| 1 | 9,78 | 10,16 | 98,26 | 0,98 |
| 2 | 9,99 | 9,84 | 102,26 | 1,02 |
| 3 | 10,25 | 10,06 | 99,11 | 0,99 |
| 4 | 10,46 | 9,64 | 102,41 | 1,02 |
| 5 | 10,34 | 10,31 | 97,03 | 0,97 |
| c20 | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) |
| 1 | 9,66 | 9,52 | 97,28 | 0,97 |
| 2 | 10,09 | 9,72 | 97,17 | 0,97 |
| 3 | 10,2 | 10,39 | 96,54 | 0,97 |
| 4 | 9,65 | 9,76 | 94,68 | 0,95 |
| 5 | 9,74 | 10,41 | 96,16 | 0,96 |
| c30 | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) |
| 1 | 9,28 | 9,67 | 84,15 | 0,8415 |
| 2 | 9,49 | 9,96 | 84,17 | 0,8417 |
| 3 | 9,75 | 9,26 | 85,57 | 0,8557 |
| 4 | 9,96 | 9,54 | 89,68 | 0,8968 |
| 5 | 9,84 | 9,52 | 86,71 | 0,8671 |

Tabulka č. 9: Výsledky zpracování snímků koleček s buňkami.

| c10 | | | | | |
|-----|------------|------------|---------------------------|-----------------|-----------------|
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Kruhovitost (-) |
| 1 | 9,81 | 9,98 | 79,51 | 1,01 | 1,22 |
| 2 | 9,91 | 9,28 | 88,16 | 1,12 | 1,09 |
| 3 | 9,13 | 9,55 | 82,48 | 1,05 | 1,05 |
| 4 | 9,91 | 9,92 | 85,80 | 1,09 | 1,11 |
| 5 | 9,63 | 9,97 | 80,97 | 1,03 | 1,16 |
| c20 | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Kruhovitost (-) |
| 1 | 9,75 | 9,84 | 71,80 | 0,91 | 1,18 |

| | | | | | |
|-----|---------------|---------------|------------------------------|--------------------|--------------------|
| 2 | 9,41 | 9,95 | 78,76 | 1,00 | 1,02 |
| 3 | 9,92 | 9,65 | 73,18 | 0,93 | 1,06 |
| 4 | 9,79 | 9,91 | 75,77 | 0,96 | 1,12 |
| 5 | 9,57 | 9,67 | 74,44 | 0,95 | 1,08 |
| c30 | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Kruhovitost (-) |
| 1 | 9,20 | 9,32 | 68,85 | 0,88 | 1,08 |
| 2 | 9,09 | 9,35 | 72,87 | 0,93 | 1,13 |
| 3 | 9,17 | 9,43 | 65,94 | 0,84 | 1,07 |
| 4 | 9,26 | 9,16 | 70,43 | 0,90 | 1,06 |
| 5 | 9,53 | 9,35 | 67,22 | 0,86 | 1,10 |

Tabulka č. 10: Výsledky zpracování snímků válců s buňkami.

| | | | | | |
|-----|---------------|---------------|------------------------------|--------------------|----------------------|
| c10 | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Výška z боку (mm) |
| 1 | 15,46 | 16,42 | 198,87 | 1,76 | 3,37 |
| 2 | | | | | |
| 3 | | | | | |
| 4 | | | | | |
| 5 | | | | | |
| c20 | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Výška z боку (mm) |
| 1 | 11,12 | 11,54 | 126,25 | 1,12 | 4,95 |
| 2 | 11,16 | 11,31 | 124,29 | 1,10 | 5,18 |
| 3 | 11,06 | 11,23 | 117,82 | 1,04 | 4,85 |
| 4 | 11,45 | 11,61 | 116,6 | 1,03 | 3,94 |
| 5 | 11,28 | 11,04 | 128,85 | 1,18 | 4,29 |
| c30 | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm ²) | Poměr ploch (-) | Výška z боку (mm) |
| 1 | 11,56 | 11,38 | 72,58 | 0,64 | 6,52 |
| 2 | 10,87 | 11,09 | 94,09 | 0,83 | 6,23 |
| 3 | 11,61 | 10,88 | 72,98 | 0,65 | 6,24 |
| 4 | 11,32 | 11,29 | 81,67 | 0,72 | 6,12 |
| 5 | 10,94 | 11,05 | 93,38 | 0,83 | 6,01 |

Tabulka č. 11: Výsledky Kruskal-Wallisova testu.

| | p-hodnota |
|-------------------------------|-----------|
| Čáry 10 mg/ml – poměry ploch | 0,006012 |
| Čáry 20 mg/ml – poměry ploch | 0,000432 |
| Čáry 30 mg/ml – poměry ploch | 0,706052 |
| Čáry 4. výtisk – poměry ploch | 0,022300 |
| Čtverce – poměry ploch | 0,000779 |
| Čtverce – HP úhel | 0,541776 |
| Čtverce – PD úhel | 0,541776 |
| Čtverce – DL úhel | 0,541776 |
| Čtverce – LH úhel | 0,000352 |
| Hvězdy – poměry ploch | 0,000002 |
| Hvězdy – poměry úhlů | 0,000489 |
| Kolečka – poměry ploch | 0,000017 |
| Kolečka – kruhovitost | 0,000005 |
| Mřížky – počet děr | 0,124024 |
| Mezikruží – poměry ploch | 0,000002 |
| Mezikruží – poměry výšek | 0,243613 |
| Válce – poměry ploch | 0,000037 |
| Válce – poměry výšek | 0,000060 |

Tabulka č. 12: Výsledky měření elastického modulu.

| c20 | | | | | | | |
|--------------------------|------------|------------|-------------|--------------|------------------|-----------|---------|
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm) | Výška Z (mm) | Směrnice (mN/um) | E (Pa) | E (Mpa) |
| s 1 | 11,12 | 11,54 | 126,25 | 4,95 | 3,40 | 133303,01 | 0,1333 |
| s 2 | 11,16 | 11,31 | 124,29 | 5,18 | 3,08 | 128214,27 | 0,1282 |
| s 3 | 11,06 | 11,23 | 117,82 | 4,85 | 3,21 | 132138,01 | 0,1321 |
| s 4 | 11,45 | 11,61 | 116,6 | 3,94 | 4,00 | 135095,37 | 0,1351 |
| s 5 | 11,28 | 11,04 | 133,85 | 4,29 | 4,24 | 135946,69 | 0,1359 |
| Průměr E (Mpa) s buňkami | | | | | | | 0,1329 |
| 1 | 11,38 | 11,14 | 95,01 | 6,57 | 2,64 | 182219,94 | 0,1822 |
| 2 | 11,16 | 11,04 | 94,90 | 6,75 | 2,26 | 160626,01 | 0,1606 |
| 3 | 10,35 | 9,87 | 79,38 | 6,73 | 1,77 | 150395,62 | 0,1504 |
| 4 | 11,26 | 10,94 | 92,52 | 6,93 | 2,71 | 202936,25 | 0,2029 |
| 5 | 11,06 | 10,80 | 91,30 | 7,18 | 2,98 | 234685,33 | 0,2347 |
| Průměr E (Mpa) bez buněk | | | | | | | 0,1862 |
| c30 | | | | | | | |
| | Výška (mm) | Šířka (mm) | Plocha (mm) | Výška Z (mm) | Směrnice (mN/um) | E (Pa) | E (Mpa) |
| s 1 | 11,56 | 11,38 | 72,58 | 6,52 | 5,72 | 514170,90 | 0,5142 |
| s 2 | 10,87 | 11,09 | 94,09 | 6,23 | 5,958 | 394498,25 | 0,3945 |
| s 3 | 11,61 | 10,88 | 72,98 | 6,24 | 5,3024 | 453370,46 | 0,4534 |
| s 4 | 11,32 | 11,29 | 81,67 | 6,12 | 6,4748 | 485193,78 | 0,4852 |

| | | | | | | | |
|--------------------------|-------|-------|-------|------|-------|-----------|--------|
| s 5 | 10,94 | 11,05 | 93,38 | 6,01 | 5,736 | 369172,84 | 0,3692 |
| Průměr E (Mpa) s buňkami | | | | | | | 0,4433 |
| 1 | 10,33 | 10,80 | 86,60 | 5,05 | 7,95 | 463195,57 | 0,4632 |
| 2 | 11,34 | 11,02 | 96,61 | 4,69 | 8,83 | 428793,09 | 0,4288 |
| 3 | 11,06 | 11,06 | 93,60 | 5,10 | 8,29 | 451964,99 | 0,4520 |
| 4 | 10,07 | 10,57 | 79,12 | 6,27 | 5,80 | 459904,01 | 0,4599 |
| 5 | 11,02 | 11,16 | 94,69 | 6,05 | 5,51 | 352567,70 | 0,3526 |
| Průměr E (Mpa) bez buněk | | | | | | | 0,4313 |