

Experimentální metody 3D tisku biologických scaffoldů pro tkáňové inženýrství

Ing. Aleš Gregor

Vedoucí práce: Doc. Ing. Jan Hošek, Ph.D.

Abstrakt

Tkáňové inženýrství je odvětvím biomedicíny, které se primárně zabývá substitucí a regenerací poškozených tkání. Používány jsou k těmto účelům mimo jiné biodegradabilní porézní matrice (scaffoldy), vsazené do místa poškození a osazené buněčnými kulturami. Tyto buňky postupně prolifерují porézní strukturou scaffoldu a vytváří novou tkáň. Materiály užívané pro tvorbu scaffoldu podléhají v organismu biologické degradaci a postupně tak ustupují nově se tvořící tkáni.

Tato práce se zabývá možnostmi automatizované tvorby scaffoldů ze syntetických a biologických polymerů ať už separátně nebo v jejich kombinaci. Provedeny byly experimenty tvorby scaffoldu z fibrinového gelu metodou tisku vrstvy po vrstvě za využití mikrodispensoru Ultimius 2400. Fibrin je biopolymer patřící do kaskády koagulačních faktorů a ve tkáňovém inženýrství je hojně užívaným materiálem. Dále byly provedeny experimenty, při kterých byla použita 3D tiskárna Rap Man 3.1 využívající pro tvorbu modelů princip FED(Fused Deposition Modeling). V případě 3D tiskárny byl materiálem pro tvorbu scaffoldu PLA(Poly Lactic Acid), který je v medicíně často užívaným materiálem pro svou schopnost podléhat v organismu hydrolytické a enzymatické degradaci. Výsledkem práce jsou reálně vytvořené modely scaffoldů, které budou podstoupeny dalšímu výzkumu a vývoji pro oblast náhrad chrupavčité tkáně.

Klíčová slova:

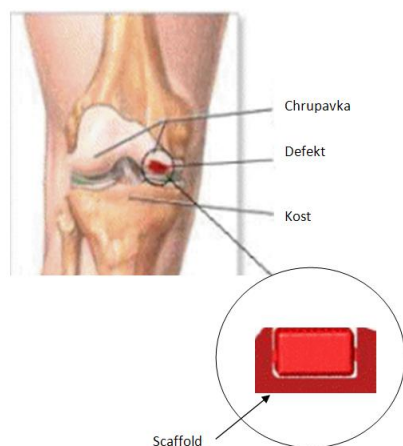
tkáňové inženýrství, scaffold, 3D printing, fibrin, polylactic acid (PLA), Rap man 3.1, Ultimius 2400

1. Úvod

Princip tzv. scaffoldingu je v současné době velice rozšířeným odvětvím tkáňového inženýrství. Scaffoldy jsou uměle vytvořené porézní struktury předem definovaných tvarů, které slouží jako nosiče buněčných kultur. V závislosti na typu poškozené tkáně je scaffold osazen vhodnými buňkami, zpravidla nejprve in vitro a poté celý implementován in vivo na místo poškození. Zde dochází k postupnému množení a prorůstání buněk porézní strukturou scaffoldu a tím k tvorbě nové tkáně. Příklad využití je uveden na obrázku 1. Vzhledem k uvedeným účelům využití musí scaffold splňovat určité podmínky. Měla by být zajištěna dostatečná pórovitost pro rovnoměrnou proliferaci buněk jak v prostoru scaffoldu, tak v čase. Zásadním požadavkem je také biodegradabilita (rozložitelnost) materiálu, tedy jeho vstřebání okolní tkání tak, aby se předešlo potřebě chirurgického odstranění. Aby byla zajištěna dokonalá substituce novou tkání, poměr rychlostí proliferace buněk a degradace materiálu by

měl být v ideálním případě rovnoměrný[1]. Materiály využívané pro tvorbu těchto podpůrných matic jsou obecně dvojího typu. V prvním případě se jedná o biologické polymery jako fibrin, kolagen, hydrogel, citosan [2]. V případě syntetických polymerů se může jednat např. o PLA (poly lactic acid) - polymer kyseliny mléčné nebo podobné materiály jako jsou PGA (poly glycolic acid) - polyglykolová kyselina a PCL (polycaprolactone) - polykaprolaktonová kyselina. Publikace zmiňují také experimenty s tvorbou scaffoldů kombinací těchto materiálů[3]. Vzhledem k tomu, že aplikace scaffoldů bude v blízké budoucnosti v medicíně často užívaným nástrojem léčby, soustředí se v posledních letech světový výzkum na možnosti automatizované tvorby těchto struktur. Jednou ze zkoumaných metod je také princip tvorby scaffoldu metodou inkoustového tisku tzv. layer by layer printing, kdy nanášení jednotlivých mikrostruktur na sebe je tvořena 3D struktura požadovaných tvarů. Problémem této technologie stále zůstává negativní vliv vysoké teploty a mechanických sil na buňky a biologické polymery, které procházejí tiskovou hlavou [4][5]. Dalším slibným automatizovaným způsobem tvorby scaffoldu se jeví využití principu FDM (Fused Deposition Modeling) a to v případech aplikace syntetických polymerů [6].

První z provedených experimentů vychází z předpokladu, zda by bylo možné pro scaffoldu vytvořeného z fibrinového gelu využít mirkodispenzoru Ultimus 2400. Zcela zásadní výhodou této technologie je předpoklad, že tlak vzduchu, který je hnacím médiem pro depozici dávek, nemá žádný negativní vliv na biologické vlastnosti použitých materiálů. Navíc přístroj sám o sobě je natolik sofistikovaný, že úprava vlastností vstřikování media se může libovolně v široké škále možností upravovat bez jakýchkoli technologických zásahů do přístroje. Tyto vlastnosti jsou nespornou výhodou oproti použití například tiskových hlav inkoustových tiskáren. Vzhledem k mému zaměření na tvorbu scaffoldu pro chrupavčitou tkáň je dále nutné zajistit určité primární mechanické vlastnosti, jako je především pevnost (i když se nepředpokládá, že by bylo místo poškození namáháno ihned po implementaci scaffoldu). Proto byly v závěru experimenty zaměřeny na možnost tvorby hybridního scaffoldu, kdy základní matici by tvořil PLA v kombinaci s fibrinovým gelem. Zkoumány byly proto také nejprve možnosti tvorby scaffoldu z PLA pomocí komerční 3D tiskárny Rap Man 3.1.

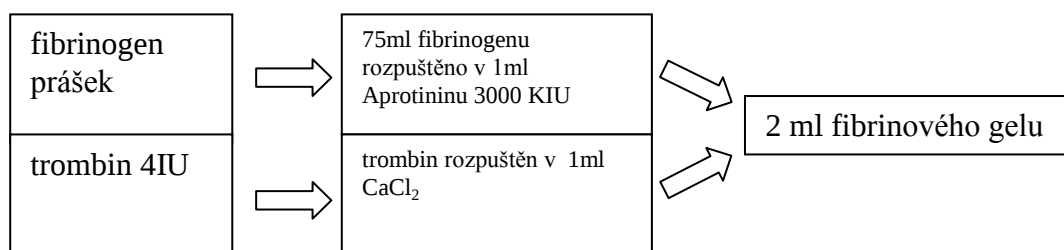


Obr. 1. Příklad implementace scaffoldu

2. Použité materiály a přístroje

Fibrin je nerozpustný protein, který „in vivo“ vzniká při koagulaci krve smícháním proteinu fibrinogen a enzymu trombin. Po smíchání těchto dvou složek dochází ke štěpení aminokyselinových řetězců fibrinogenu a vzniká tak na „nano“ úrovni vzniklého gelu síťová struktura, která slouží pro uchycení buněk. Tyto buňky se postupně množí (proliferují) a vytvářejí novou tkáň, zatímco fibrin pozvolna podléhá biodegradaci. Obě dvě složky (fibrinogen, trombin) jsou komerčně dostupné a mohou tak sloužit pro výrobu fibrinového gelu in vitro. Tento se v lékařské praxi využívá mimo jiné jako tkáňové lepidlo v rámci chirurgických zákroků, ale může být také využit pro rozvoj buněčných kultur[7]. Rychlost tuhnutí fibrinu závisí na koncentraci trombinu. Pro pomalé tuhnutí je obvykle používán trombin v koncentraci 4IU, pro rychlé až 500IU. V mém případě byl využit první případ a obě složky fibrinogen, trombin byly míchány v poměru 1:1.

Následující schéma znázorňuje postup míchání a poměr všech zúčastněných složek.



Seznam položek pro výrobu 2ml fibrinového gelu:

- Porcine Fibrinogen 75mg (Sigma-Aldrich)
- Trombin 4IU (Sigma-Aldrich)
- CaCl_2 – 4,4 mg/ml
- Aprotinin 3000KIU 1ml

Před provedením experimentů byly empiricky naměřeny některé vlastnosti fibrinového gelu. Vzhledem k tomu, že ve fibrinovém gelu po smíchání obou složek probíhají fyziologicko-chemické procesy po delší dobu, byla předpokládána změna hmotnosti vzorku v čase a tím i změna jeho hustoty. Následující měření ukazují, že předpoklad byl správný.

Tabulka 1. – Měřeno bylo 5 vzorků o objemu 200 μl – hmotnost v závislosti na čase

Čas - t (min)	0	10	15	20
1. vzorek – hmotnost (kg)	0,000199	0,000194	0,000189	0,000185
2. vzorek – hmotnost (kg)	0,000199	0,000193	0,000187	0,000182
3. vzorek – hmotnost (kg))	0,000199	0,000194	0,00019	0,000185
4. vzorek – hmotnost (kg)	0,000199	0,000195	0,00019	0,000186
5. vzorek – hmotnost (kg)	0,000199	0,000194	0,00019	0,000185

Tabulka 2. – Hustota byla vypočítána z naměřených hmotností – hustota v závislosti na čase

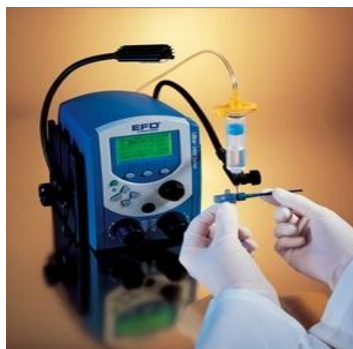
Čas - t (min)	0	10	15	20
1. vzorek – hustota (kg/ m ³)	993,5	969	945	924
2. vzorek – hustota (kg/ m ³)	997	964	936,5	910
3. vzorek – hustota (kg/ m ³)	994,5	971,5	947,5	925,5
4. vzorek – hustota (kg/ m ³)	997	972,5	951,5	927,5
5. vzorek – hustota (kg/ m ³)	993	969,5	948,5	925
Průměrná hustota (kg/ m ³)	995	969,3	945,8	922,4

Pozn. fibrinový gel vykazoval homogenní vlastnosti

Tabulka 3. – Hustota jednotlivých složek fibrinového gelu

Složka	Hustota (kg/m ³)
75ml Fibrinogenu rozpuštěno v 1ml Aprotininu 3000 KIU	1040
Trombin rozpuštěn v 1ml CaCl ₂	1002

Přístroj Ultimus 2400 je mikrodispenser od společnosti Nordson EFD. Hnacím médiem dávkování je tlak vzduchu. Svými technickými parametry se blíží parametrům inkoustového tisku. Je možné současné připojení dvou trysek s různou velikostí vnitřního průměru hrotů (nejmenší komerčně dostupný - 100μm). Vestavěný displej a ovládací prvky umožňují regulaci frekvence dávkování, tlaku vzduchu a ukládání dávkovacích programů do paměti přístroje. Dále je zde možnost nastavení vakua, které zajišťuje přesnější dávkování a odtržení dávky od hrotu trysky. Jedná se v podstatě o princip „meniskus efekt“, který je běžný u mechanismu trysek inkoustových tiskáren a slouží pro zpřesnění objemu dávky.



Základní parametry přístroje

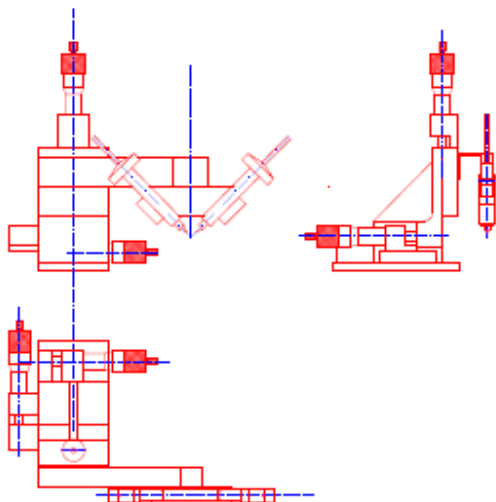
Tlak vzduchu: 0 – 1.1 bar

Frekvence dávkování: 0.0001 až 999.9999 s

Vnitřní průměr trysky (hrotu): 100μm
(při experimentech: 150μm)

Obr. 2. Mikrodispenser Ultimus 2400, zdroj: <http://www.efd-inc.com>

Pro tvorbu scaffoldu z fibrinového gelu pomocí mikrodispensoru byl zkonstruován speciální přípravek umožňující uchopení dvou trysek v úhlu 45° a jejich polohování v osách X,Y,Z. Schéma a reálné provedení jsou zobrazena na obrázcích 3 a 4. Polohování je zajištěno manuálně, pomocí mikrometrických hlavic.



Základní parametry přístroje

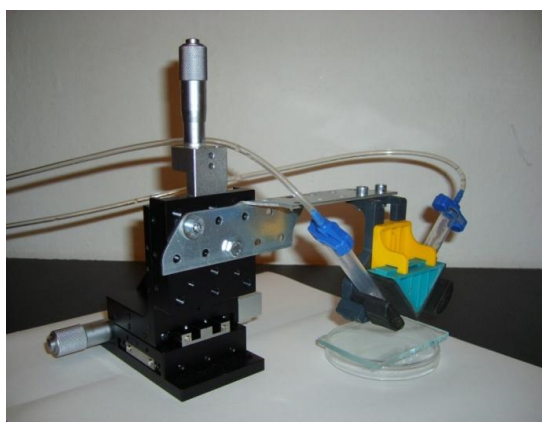
Polohování: manuální - X, Y, Z

Mikrometrické hlavice: $10\mu\text{m}$

Úhel sevření trysek: 45°

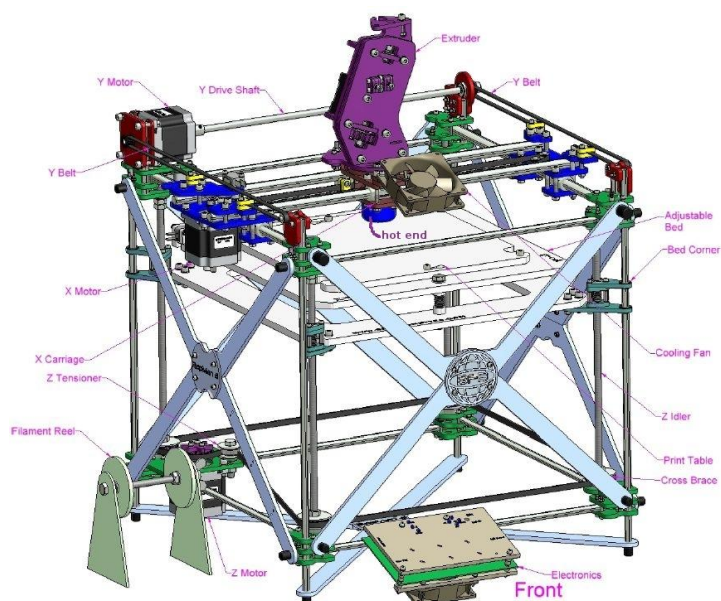
Náplň trysek: Fibrin, Thrombin

Obr. 3. Schéma přípravku pro uchopení a polohování trysek mikrodispensoru.



Obr. 4. Přípravek pro uchopení a polohování trysek mikrodispensoru.

Kromě přípravy scaffoldů z fibrinu s využitím dávkování pomocí mikrodispensoru byla testována i alternativní možnost a to tvorba scaffoldu z PLA pomocí 3D tiskárny RapMan 3.1. Jedná se o přístroj od společnosti Bits From Bytes, který je schopen vytvářet 3D modely z tavného materiálu. Materiál je nataven v extruderu a poté nanášen na tiskovou plochu, kdy vrstvením materiálu na sebe je tvořen 3D model požadovaných tvarů. Polohování přístroje v osách X,Y,Z je zajištěno ozubenými řemeny, které jsou poháněny krokovými motorky. Grafický software NetFab, dodávaný k přístroji, umožňuje snadný převod návrhu 3D modelu v některé z CAD aplikací (v mém případě byl použit program Rhinoceros 4.0) do G kódu a zároveň vykreslí grafický model a pohyb trysky při jeho tvorbě. G kód je nahrán na SD kartu, která je vložena do ovládacího panelu přístroje. Přístroj tyto data načte a následně vytvoří model v relativně krátkém čase v závislosti na jeho složitosti.



Základní parametry přístroje

Polohování: X,Y,Z

Pohon: krokové motory – ozubený řemen

Přesnost: 10 μ m

Vnitřní průměr trysky: 500 μ m

Obr. 5. 3D tiskárna RapMan 3.1, zdroj: <http://www.efd-inc.com>

Pro scaffold vytvořený pomocí 3D tiskárny RapMan 3.1 byl použit materiál PLA (Poly Lactic Acid). PLA je biodegradabilní, termoplastický, alifatický polyester odvozený z obnovitelných zdrojů. Pro mé experimenty byl využit PLA ve formě drátu o průměru 3mm, který je při tisku taven v extruderu a postupně navíjen do trysky.

Tabulka 4. – Souhrn vybraných vlastností materiálu[9]

Vlastnost	Hodnota	Jednotka
Teplota tání	150-160	°C
Hustota	1210-1430	kg/m ³
Absorbce vody	0,5-50	%
Teplota skelného přechodu	45-65	°C
Youngův modul	350 - 2800	MPa
Pevnost v tahu	10- 60	MPa
Tažnost	1,5 - 380	%
Pevnost v ohybu	0,89 – 1,03	MPa
Rázová pevnost	0,16 -1,35	J/cm

3. Teorie a metodika jednotlivých experimentů

Scaffold z Fibrinového gelu

Zkonstruovaný přípravek primárně tvořil zkušební zařízení pro zjištění vhodných parametrů dávkování fibrinu a uchopení trysek mikrodispensoru pro případ vývoje automatizované tiskové hlavy. Bylo nutné zjistit parametry vhodného dávkování a uchopení trysek v závislosti na čase, tlaku, vzdálenosti a úhlu nastavení trysek vůči dopadové (tiskové) ploše. Některé z parametrů byly stanoveny předem na základě logických předpokladů. Úhel dopadu dávky byl předem jednoznačný vzhledem k uchopení trysek v přípravku pod úhlem 45°. Vyloučení dalšího parametru bylo založeno na předpokladu, že čím menší bude dávka, tím menší bude mít hmotnost, a proto bude nutné překonat adhezní síly, aby došlo k jejímu odpoutání od hrotu trysky. Z tohoto důvodu byl tlak nastaven na maximální hodnotu 1,1 bar.

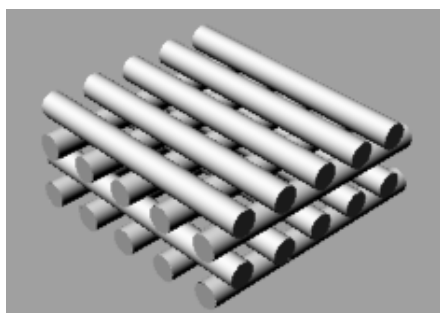
Po vyloučení těchto parametrů zbyly pouze následující tři významné parametry, které bylo nutné zjistit experimentálně:

- Doba aplikace dávky
- Hodnota vakua
- Vzdálenost trysky od plochy dopadu

Pro zjištění vhodných parametrů dávkování byla nejprve použita voda a po té komponenty fibrinového gelu. V první fázi experimentu s vodou byla použita pouze jedna tryska a hodnota vakua byla nastavena na nulu. Při maximální hodnotě tlaku 1,1 bar byla postupně navyšována doba aplikace dávky. Počáteční hodnota byla zvolena 0,0001 s a krok navýšení času také 0,0001.

Scaffold z PLA

V úvodu tohoto článku jsou zmíněny parametry, které by měl scaffold splňovat pro řádnou proliferaci buněk. Jedním z nich je zajištění dostatečné poréznosti, pravidelné velikosti pórů a jejich průchodnost mezi sebou. Z tohoto důvodu bylo pro tvar a strukturu scaffoldu zvolen systém křížně se lemujících vláken vrstvených na sebe, jak je zobrazeno na obrázku 6.



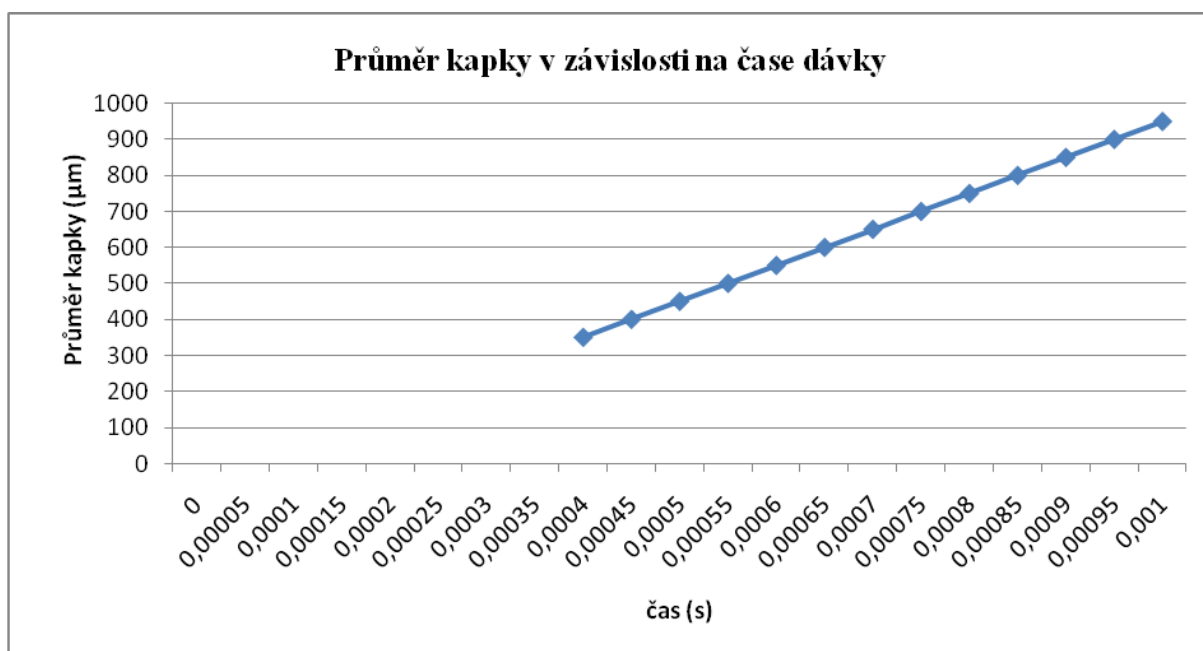
Obr. 6. Schéma struktury scaffoldu vytvořeného pomocí 3D tiskárny RapMan 3.1

Cílem prováděného experimentu bylo zjištění nejmenšího možného průměru vlákna, které je schopen RapMan 3.1 vytvořit v rámci svých výrobních technických parametrů tak, aby zachoval předem definovanou strukturu scaffoldu. Model vzorku scaffoldu byl vytvořen pomocí programu Rhinoceros. Výrobce přístroje RapMan uvádí, že vzhledem k vnitřnímu průměru trysky 500 μm je software přístroje nastaven tak, aby ignoroval stěny menší než 501 μm . Experimentálně bylo tedy potřeba zjistit skutečný nejmenší průměr vlákna, který je možné vytisknout. Bylo postupně vytvořeno několik vzorků s průměrem vlákna 500, 550, 600, 650 a 700 μm .

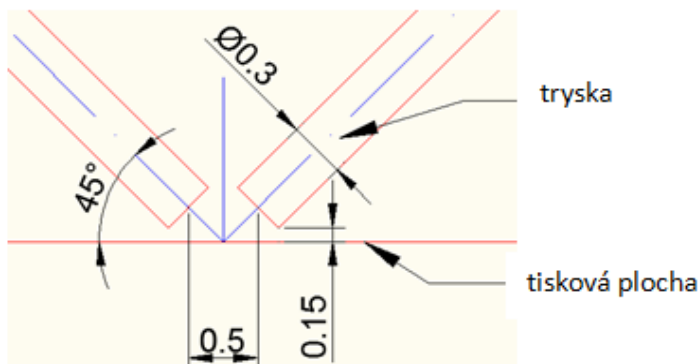
4. Výsledky experimentů

4.1 Tvorba fibrinového scaffoldu - výsledky

V první fázi experimentů bylo nutné optimalizovat polohu trysky a parametrů dávkování tak, aby bylo zajištěno „přetržení“ kapky vylétající z hrotu trysky a tím její odpoutání se od trysky. Tímto je eliminována nutnost případné manipulace s tryskou během depozice dávky. Nastavení odpovídající hodnoty vakua bylo nalezeno v rozmezí 3 až 3,5 in H₂O. Graf níže ukazuje experimentálně zjištěnou závislost průměru jednotlivé kapky na čase dávky.

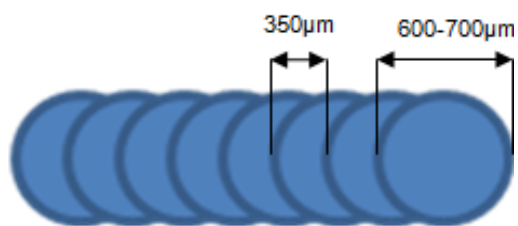


Po zjištění uvedených parametrů mohl být experiment rozšířen o použití obou trysek. Poloha trysek byla nastavena dle obrázku 7.



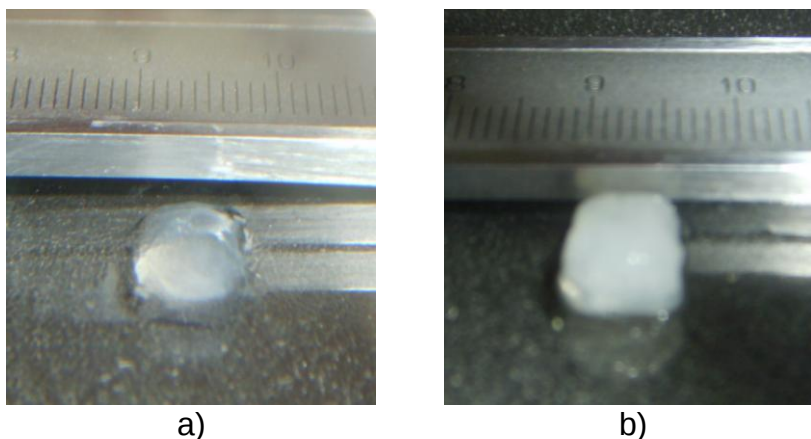
Obr. 7. Schéma polohy trysek pro vytvoření ideální dávky

Opakovanými pokusy bylo zjištěno, že průměr smíchané kapky se pohybuje v rozmezí od 600 do 700 μm . Pro vytvoření linie kapek byl zvolen posun 350 μm , aby bylo zajištěno dostatečné spojení jednotlivých kapek.



Obr. 8. Rozměrové schéma depozice jednotlivých kapek

Za stejných podmínek jako při pokusech s vodou byly provedeny experimenty s fibrinovým gelem. Na základě experimentů bylo zjištěno, že vlastnosti jednotlivých dávek mají stejné pracovní parametry, jako voda. Následoval experimenty, v nichž byly obě složky injektovány společně. Bylo pozorováno smíchání obou složek a měřena rychlost tuhnutí dávky v čase. Na závěr byl vytvořen 3D scaffold o rozměrech 7x7x3 (x, y, z) mm^3 vytvořen z 3860 jednotlivých kapek, který je zobrazen na obrázku 9.



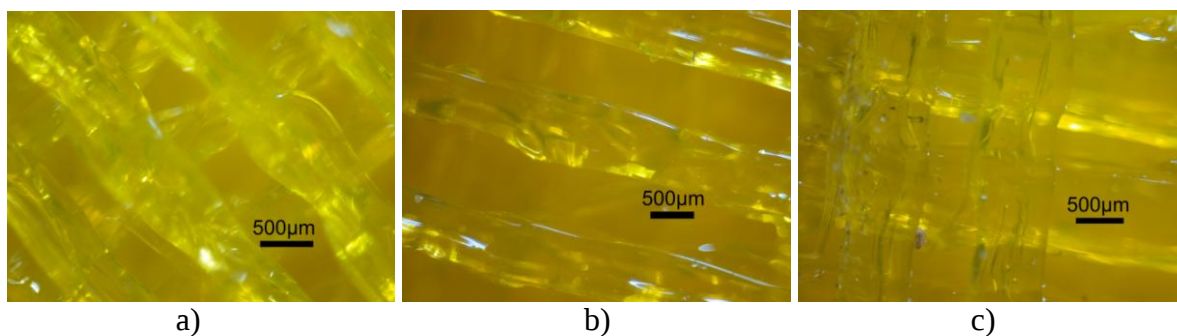
Obr. 9. Vytisknutý scaffold a) 14 vrstev – 7x7x1.5mm, b) 30 vrstev – 6x6x3mm, je patrné, že postupem času dochází k vysychání vody obsažené ve vzorku a proto je výsledný produkt menší než bylo původně plánováno.

Tabulka 5. – Souhrn parametrů ideálního dávkování za použití dvou trysek

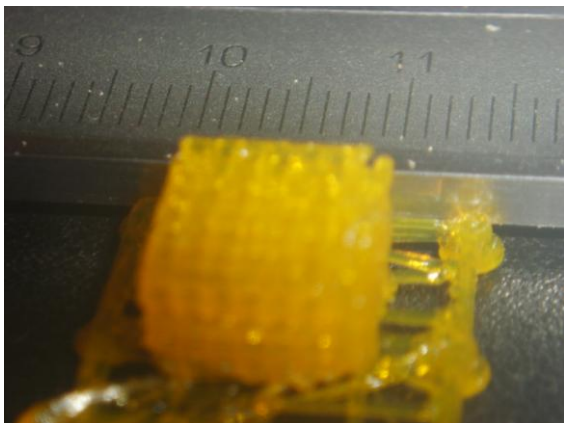
Tlak (bar)	Vakuum (in H ₂ O)	Čas dávky (s)	Vzdálenost od dopadové plochy (μm)	Vzdálenost mezi hroty trysek (μm)	Průměr výsledné kapky (μm)	Posun (μm)
1.1	3.0-3.5	0.0004	150	500	600-700	350

4.1 Scaffold z PLA - výsledky

Po vytvoření návrhů tvaru a struktury scaffoldů o průměru vlákna 500 a 550μm v programu Rhinoceros 4.0, byly tyto modely převedeny do aplikace NetFab. Bylo zjištěno, že takto tenké stěny (vlákna) program v souvislosti s defaultními parametry přístroje ignoruje a tisk tedy neumožní. V případě dalších modelů s průměrem vlákna 600, 650 a 700μm je tisk již umožněn. Ukázky reálně vytisknutých scaffoldů focených pod mikroskopem ukazuje obrázek 10.



Obr. 10. Mikroskopický pohled na scaffold z PLA o průměru vlákna, a) 600μm, b) 650μm, c) 700



Obr. 11. Celkový pohled na scaffold z PLA

5. Diskuze a závěr

Byly provedeny experimenty dvojího způsobu tvorby scaffoldu pro tkáňové inženýrství. V prvním případě byl jako stavební materiál použit fibrinový gel míchaný z komerčně dostupných složek fibrinogenu a trombinu. Tvorba scaffoldu z fibrinového gelu byl založena na principu tisku vrstvy po vrstvě, kdy jednotlivé kapičky produkované mikrodispensorem byly deponovány vedle sebe a následně vrstveny na sebe, za účelem vytvoření 3D struktury. V druhém případě byly experimenty zaměřeny na tvorbu scaffoldu z biologického polymeru kyseliny mléčné (PLA). Použitým přístrojem byla v tomto případě 3D tiskárna RapMan 3.1 a architektura 3D scaffoldu byla tvořena křížujícími se mikro vlákny vrstvenými na sebe.

Výsledky prokázaly, že způsob tvorby scaffoldu za použití mikrodispensoru se jeví jako reálný nicméně vykazuje určité zásadní negativní aspekty. Prvním z nich je fakt, že složka fibrinogen po určitém čase v řádech několika desítek minut tuhne. Bylo zjištěno, že rychlost tuhnutí je dále výrazně ovlivněna třepáním se vzorkem fibrinogenu. Tento efekt se proto projevuje i v kontejneru trysky mikrodispensoru, kde je tato složka obsažena. Rázové vlny tlaku simulují třepání a urychlují tak tuhnutí fibrinogenu. Toto má za následek ucpání trysky a nepravidelné dávkování. Dalším problémem je příliš dlouhá doba tvorby tohoto scaffoldu a nestabilita jeho struktury v čase. V případě 3D tiskárny RapMan výsledky naznačují, že při vnitřním průměru trysky 500 μm a současném defaultním nastavení přístroje je možné tisknout zvolenou strukturu scaffoldu o síle vlákna přibližně od 600 μm výše. Uspokojivé výsledky tak, aby bylo dosaženo nejmenšího možného průměru vlákna a zároveň zachovány požadované vlastnosti jako jsou rovnoměrný průměr vlákna a tvar interní struktury scaffoldu, prokazuje obzvláště vzorek s průměrem vlákna 650 μm . Naproti tomu vzorek s průměrem vlákna 600 μm vykazuje nepravidelné rozestupy a tloušťku vláken. Vzorek s průměrem vlákna 700 μm je kvalitativně pravděpodobně nejlepší, nicméně účelem je dosáhnout kompromisu mezi kvalitou a co nejmenšími rozměry. Z tohoto pohledu je proto v rámci smyslu provedeného experimentu tento vzorek hodnocen negativně.

V souvislosti s oběma experimenty se jeví slibně alternativa tvorby určitého hybridního scaffoldu, kdy by byly oba materiály a technologie kombinovány. Scaffold z PLA by tvořil matrici a v podstatě formu pro scaffold z fibrinového gelu. Následující experimenty budou proto zaměřeny na následující cíle: Konstrukční zmenšení průměru trysky extruderu 3D

tiskárny RapMan tak, aby bylo možné tisknout vlákna o průměru 100-150μm nebo případně méně. Modifikace softwaru tiskárny, aby byl tisk takto tenkých vláken umožněn systémem řízení přístroje. Celkové zmenšení rozměrů struktury scaffoldu je nutné pro zaručení vhodnějšího prostředí pro uchycení a proliferaci buněk, které dosahují rozměrů maximálně několika desítek mikrometrů. Dále, v oblasti fibrinového gelu budou provedeny experimenty určující schopnost průtoku strukturou matrice z PLA v souvislosti s tlakem a dalšími parametry dávkování mikrodispensoru. V této souvislosti bude také zkoumána možnost lepení jednotlivých vrstev scaffoldu na sebe pomocí fibrinového gelu. Výsledky těchto experimentů povedou k určení vhodného způsobu distribuce buněk do scaffoldu. Následně bude zkoumána proliferace buněk a tvorba nové tkáně, jak in vitro, tak in vivo. V konečné fázi by mělo dojít k propojení obou technologií a vytvoření prototypu přístroje, který by byl schopen zajistit automatizovaný tisk funkčního scaffoldu použitelného v medicínské praxi.

Poděkování:

Tento výzkum byl realizován za podpory grantu: SGS10/051/OHK2/1T/12

Seznam použité literatury:

- [1] P.X.Ma, J. Elisseeff, Scaffolding in Tissue Engineering, CRC Press, Taylor & Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, 2006, ISBN 1-57444-521-9
- [2] T.H. Ang, F.S.A. Sultana, D.W. Hutmacher, Y.S. Wong, J.Y.H. Fuh, X.M. Mob, H.T. Loh, E. Burdet, S.H. Teoh, Fabrication of 3D chitosan–hydroxyapatite scaffolds using a robotic dispensing system, Materials Science and Engineering C 20, 2002
- [3] S. Munirah, S.H. Kim, B.H.I. Ruzzymah, G. Khang, The use of fibrin and poly(lactic-co-glycolic acid) hybrid scaffold for articular cartilage tissue engineering: an in vivo analysis, European Cells and Materials Vol. 15, 2008
- [4] V. Mironov, T. Trusk, V Kasyanov, S. Little, R. Swaja and R. Markwald, Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm, Biofabrication 1, 2009
- [5] Ye Q, Zünd G, Benedikt P, et al., Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering, European Journal of Cardio-thoracic Surgery 17 (5), 2000
- [6] L. Moronia, J.R. de Wijna, C.A. van Blitterswijk, 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: Influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties, Biomaterials 27, 2006
- [7] <http://www.ceskamedicina.cz/cz/ceska-medicina-novinky/tkanova-lepidla>
- [8] <http://www.efd-inc.com>
- [9] <http://www.matbase.com/material/polymers/agrobased/polylactic-acid-pla/properties>