



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSVÍ
Katedra biomedicínské techniky

**Optimalizace řízení průtočného bioreaktoru pro
cévní náhrady**

**Optimization of control of a flow-through bioreactor
for vascular replacements**

Bakalářská práce

Studijní program: Biomedicínská technika

Vedoucí práce: doc. Ing. Roman Matějka, Ph.D.

Zdeněk Kukla

Kladno 2023

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Kukla** Jméno: **Zdeněk** Osobní číslo: **499914**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra biomedicínské techniky**
Studijní program: **Biomedicínská technika**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Optimalizace řízení průtočného bioreaktoru pro cévní náhrady

Název bakalářské práce anglicky:

Optimization of control of a flow-through bioreactor for vascular replacements

Pokyny pro vypracování:

Navrženou sestavu pneumatického perfuzního okruhu rozšířte o pulzní režim s možností nastavení průtoku, délky a středy pulzu. Charakterizujte průtočné parametry systému a průtočného okruhu. Laboratorně ověřte stabilitu navrženého systémů. Měření statisticky vyhodnoťte. Sestavu systému propojte s kultivační komorou pro decelularizované tkáně a ověřte při buněčném experimentu s endotelem nebo kmenovými buňkami.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Chlupac, J.; Matejka, R. et al., Vascular Remodeling of Clinically Used Patches and Decellularized Pericardial Matrices Recellularized with Autologous or Allogeneic Cells in a Porcine Carotid Artery Model, *Int. J. Mol. Sci.*, ročník 23, číslo 3310, 2022
- [2] Matějka, R. et al., Bioreactor Processed Stromal Cell Seeding and Cultivation on Decellularized Pericardium Patches for Cardiovascular Use, *Applied Sciences*, ročník 10, číslo 5473, 2020, <https://doi.org/10.3390/app10165473>
- [3] Bacakova L. et al., Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field, ed. 1, IntechOpen, 2018, kapitola Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs) in Blood Vessel Tissue Engineering: The Use of Differentiated Cells or Stem Cells as VSMC Precursors
- [4] Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field, Bacakova L. et al., ed. 1, Intech Open, 2018, kapitola The role of vascular smooth muscle cells in the physiology and pathophysiology of blood vessels

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

doc. Ing. Roman Matějka, Ph.D.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Ing. Karel Hanzálek

Datum zadání bakalářské práce: **14.02.2023**

Platnost zadání bakalářské práce: **20.09.2024**

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

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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „Optimalizace řízení průtočného bioreaktoru pro cévní náhrady“ vypracoval samostatně a použil k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k bakalářské 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

.....

Zdeněk Kukla

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu semestrální práce doc Ing. Romanu Matějkovi, Ph.D. za cenné rady, vstřícnost a čas, který mi věnoval při řešení dané problematiky. Dále bych rád poděkoval svému konzultantovi Ing. Karlovi Hanzálkovi za pomoc při výrobě potřebných součástí. Tato práce vznikla za podpory projektů Ministerstva zdravotnictví České Republiky, Agentury pro zdravotnický výzkum s reg. č. NV19-02-00068; grantu Studentské grantové soutěže ČVUT s číslem SGS22/201/OHK4/3T/17 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

Optimalizace řízení průtočného bioreaktoru pro cévní náhrady

Při kultivaci buněk v bioreaktoru za dynamických podmínek dochází k lepším výsledkům než za statických. Řízená perfuze kultivačního media může být realizována peristaltickou pumpou. Takovéto řešení vytváří nekontrolovatelné rázové vlny, které jsou nežádoucí při kultivaci tubulární tkáně. Proto bylo zvoleno řešení pomocí vzduchového tlakového řízení. Cílem této práce je vytvoření a charakterizace okruhu pro řízenou perfuzi s tlakovou vlnou pro tubulární tkáň v kultivační komoře. Dalším cílem je navržení vhodného řešení pro sterilní monitorování tlaku a průtoku. Okruh se skládá ze dvou stříkaček značky BBraun, které jsou střídavě plněny kultivačním mediem. Směr průtoku je řízen pomocí trojcestných kohoutů, které jsou ovládány servo motory. Řízení tlaku je zajištěno implementací platformy z projektu Motorizované ovládání stimulačního tlaku v kultivačním reaktoru. Vychytání průtoku je založeno na rozdílné intenzitě svitu LED diod skrze naplněnou a prázdnou stříkačku. Ovládání servo motorů a zpracování signálu z fotodiód bylo realizováno na platformě Arduino. Celá sestava je upevněna na maximálně odlehčenou konstrukci o dostatečné pevnosti. Sestavený okruh byl otestován v laboratorním prostředí a následně použit při kultivačním experimentu s imortalizovanými buňkami myší endoteliální linie MS-1.

Klíčová slova

Bioreaktor, buněčná kultivace, ovládání stimulačního tlaku, Arduino, řízená perfuze, tubulární tkáň, servo

ABSTRACT

Optimization of control of a flow-through bioreactor for vascular replacements

Cultivation of cells in a bioreactor under dynamic conditions leads to better results than under static conditions. Controlled perfusion of the culture medium can be achieved by peristaltic pump. Such a solution creates uncontrollable shock waves, which are undesirable in tubular tissue culture. Therefore, an air pressure pump solution was chosen control. The aim of this work is to design and characterize a pressure wave controlled perfusion circuit for tubular tissue in the culture chamber. Another objective is to design a suitable solution for sterile pressure and flow monitoring. The circuit consists of two BBraun syringes that alternately filled with culture medium. The flow direction is controlled by three-way valves which are controlled by servo motors. Pressure control is provided by the implementation of platform from the project Motorised control of the stimulation pressure in the culture reactor. The flow reading is based on the differential intensity of the LEDs through the filled and empty syringe. Servo motor control and signal processing from the photodiodes was implemented on the Arduino platform. The whole assembly is mounted on a lightweight structure of sufficient strength. The assembled circuit was tested in a laboratory environment and subsequently used in a culture experiment with immortalised cells of the mouse endothelial line MS-1.

Key words

Bioreactor, cell tissue culture, stimulation pressure control, Arduino, controlled perfusion, tubular tissue, servo

Obsah

Seznam symbolů zkratk	8
1 Úvod	9
2 Přehled současného stavu	10
2.1 Bioreaktory a princip kultivačních experimentů	10
2.2 Smykové napětí v kultivačních experimentech	12
2.3 Současné systémy pro dynamickou kultivaci	13
3 Cíle práce	16
4 Metody	17
4.1 Princip systému	18
4.2 Motorizované řízení tlakové platformy	20
4.3 Návrh konstrukce	21
4.4 Návrh hardwaru	23
4.4.1 Návrh desky plošných spojů pro LED	23
4.4.2 Návrh desky plošných spojů s fotodiodami	24
4.5 Návrh desky plošných spojů pro mikrokontroler	25
4.6 Návrh softwaru	26
4.7 Laboratorní experiment	27
4.8 Pulzní režim	29
4.9 Buněčný experiment	30
5 Výsledky	32
5.1 Výroba sestavy	32
5.2 Sestavení hardwaru a implementace softwaru	33
5.3 Laboratorní experiment	35
5.3.1 Ověření správnosti průtoků segmentů	35
5.3.2 Ověření tlakových gradientů	38
5.4 Pulzní režim	40
5.5 Buněčný experiment	42
6 Diskuse	44
7 Závěr	46
Seznam použité literatury	47
Příloha A: Technické výkresy	50
Příloha B: Schémata a návrh desek plošných spojů	56

Příloha C: Tabulky měřených a zpracovaných dat	63
Příloha D: Zdrojový kód softwaru	70

Seznam symbolů a zkratek

Seznam symbolů

Symbol	Jednotka	Význam
U	V	Napětí
I	A	Proud
R	Ω	Odpor
l	m	Délka
d	m	Průměr
V	ml	Objem
t	s	Čas
q	ml·min ⁻¹	Průtok
σ	dyn·cm ⁻²	Smykové napětí

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
CNC	Stroje řízené počítačem (<i>Computer numerical control</i>)
MCU	Mikroprocesor (<i>Microcontroller unit</i>)
PCB	Deska plošných spojů (<i>Printed circuit board</i>)
PPFC	Parallel plate flow chamber
LED	Light-emitting diode
USB	Universal serial bus
GND	Zemění (<i>Ground</i>)
PLA	kyselina polyléčná (<i>polylactid acid</i>)
CGS	centimetr-gram-second

1 Úvod

Kultivace buněčných tkání může probíhat za statických nebo dynamických podmínek. Studie [1, 2] prokázaly, že při dynamických podmínkách dochází k lepšímu růstu buněk a homogennímu rozložení po decelularizované matici. Bioreaktor je zařízení, které umožňuje simulaci fyziologických podmínek, jako je například mikroperfuze a pulzující tlaková stimulace.

Kultivace za dynamických podmínek je nezbytná pro správné diferencování buněk cévní hladké svaloviny. Při statických podmínkách buňky ztrácejí své diferenciální markery. Pro správný růst buněk je nutné zajistit vhodnou matici, specifické složení kultivačního media, pulzující mechanické napětí, cyklickou deformaci a změnu tlaku.

Kultivační bioreaktory umožňují vytvoření simulovaných fyziologických podmínek např. pomocí řízené cirkulace s generováním pulzních vln, což ovšem vyžaduje vhodné čerpadlo. Nejjednodušší možností představují peristaltické pumpy, které díky konstrukci generují tlakové rázy je nutné je kompenzovat tlumiči, resp. není možné pulzní vlnu řídit. Lineární čerpadla umožňují generování jak neměnného průtoku, tak při modulaci řízení i generování pulzů [1] ovšem dochází k opotřebenosti pístů při dlouhodobé kultivaci.

Pro minimalizaci těchto negativních byla navržena sestava s pneumatickým pohonem média, ke které bylo vytvořeno řízení s monitorováním stavu média. [3] Pro správné nastavení řídicích parametrů systému je nutné charakterizovat průtočný odpor použitých prvků v průtočném okruhu, který je závislý na průtoku a tlaku.

2 Přehled současného stavu

Tato kapitola se zabývá rešerší aktuálních poznatků ohledně bioreaktorů, kultivačních metodách a materiálů a postupů při nich využívaných. Dále je zde uveden přehled možností vyčítání hladiny kapaliny. V poslední části je uvedený přehled současných systémů pro dynamické kultivační experimenty.

2.1 Bioreaktory a princip kultivačních experimentů

Bioreaktor je zařízení, které umožňuje kultivaci buněčných tkání in vitro. Jako matrice pro vývoj tkáňových štěpů se používají decelularizované tkáně. Následně na těchto tkáních probíhá recelularizace stromálními buňkami, která by měla zajistit lepší remodelaci in vivo a menší riziko vzniku krevní sraženiny. Bioreaktor umožňuje simulaci fyziologických podmínek, jako je mikroperfuze a pulzující tlaková stimulace. Kultivace tkání při simulaci fyziologických podmínek vede k lepšímu a rychlejšímu vrůstání buněk do decelularizované tkáně a větší diferenciaci buněk, a tedy zajištění homogenní osídlení kultivační matrice. [1]

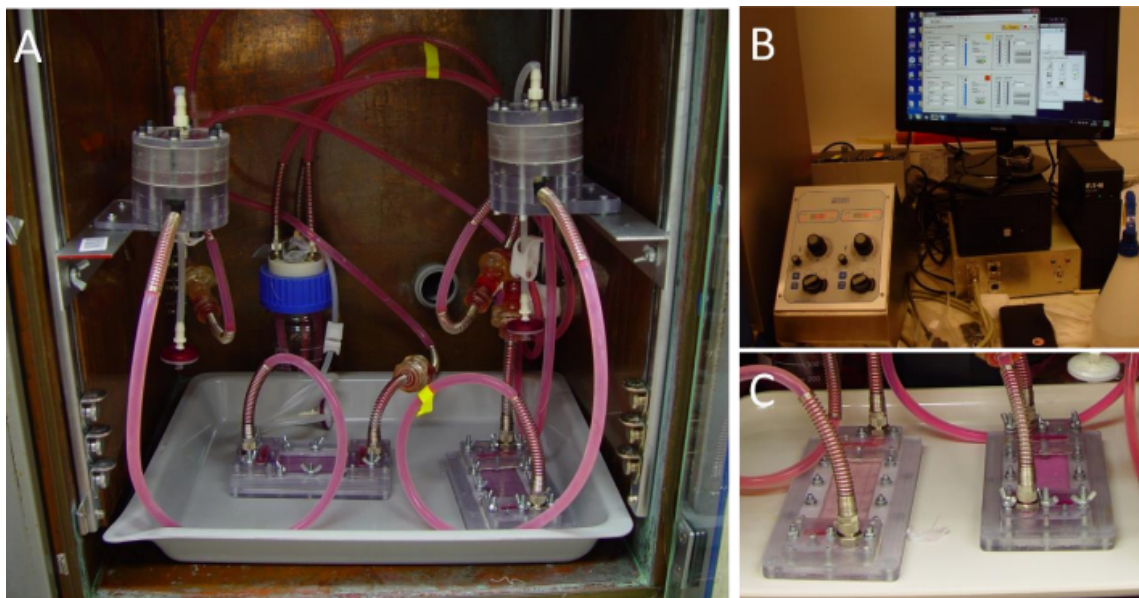
Decelularizované tkáně nejsou jedinou možností matrice pro kultivaci tkání. Strukturu pro vývoj buněk lze vytvořit i pomocí biotisku. V této metodě se využívá široká škála materiálů, které napodobují vlastnosti živých tkáních, jako například přírodní, syntetické a kolagenové polymery. Důležité je zajistit, aby použité materiály měly vhodné vlastnosti, a to mechanická a chemická stabilita, nerozpustnost v médiu buněčné kultury, rozklad odpovídající rychlosti regenerované tkáně, netoxičnost a neimunogenost, a v neposlední řadě schopnost adheze buněk. Z těchto důvodů jsou optimálním materiálem pro tvorbu 3D struktur pomocí biotisku gely obsahující vysokou koncentraci kolagenu a buněk. Přežití buněk v těchto gelech je ovlivněno jak cytotoxicitou a složením gelu, tak parametry při samotném biotisku (teplota, tlak, hustota atd.). [4]

Další materiály používané pro kultivaci buněk jsou nanocelulózy a nanouhlíkové kompozity. Tyto materiály mají jedinečné vlastnosti, jako je například mechanická pevnost, tvarová paměť, fotodynamická a fototermální aktivita, elektrická a tepelná vodivost, vysoká adsorbční a filtrační kapacita. Velkou výhodou těchto materiálů je snadná příprava z vodných emulzí, naopak nevýhoda je možná cytotoxicita a imunogenicita. Aplikace materiálů zahrnují například podávání léčiv, biosenzorika, elektrická stimulace poškozených tkání a podpůrné účinky na adhezi a růst lidských buněk při dynamické kultivaci v bioreaktoru. Studie prokázala, že při dynamické kultivaci se zvyšuje adheze a růst buněk. Rozdíly v růstu za statických a dynamických podmínek byly pozorovány zejména u vzorků na tenkém povlaku celulózy a nanofibril v kombinaci s vícečetnými uhlíkovými nanotrubičkami. U vzorků se stejnou

kombinací materiálů byly buňky tenké i silné vrstvy rozmístěny homogenně, narozdíl od čistých celulózových nanofibril, kde vytvářely shluky. [5, 6]

Cévní hladké svalové buňky jsou hojně zastoupeny v lidském těle. Při konstrukci cévních náhrad jsou jejich nepostradatelnou složkou. Při rekonstrukci tuniky medii v cévních náhradách, mohou být hladké svalové buňky odebrány jako diferencované nebo kmenové. Tyto buňky se mohou dále kultivovat in vitro, nicméně nastává zde problém, neboť odebrané buňky ztrácejí své diferenciační markery. Aby tyto markery neztratily, je nezbytnou podmínkou, aby cévní hladké svalové buňky byly nasazeny na vhodnou matrici a dále byly kultivovány za dynamických podmínek, při specifickém složení kultivačního média a za mechanické stimulace generující pulzující napětí, cyklickou deformaci a tlak. [2]

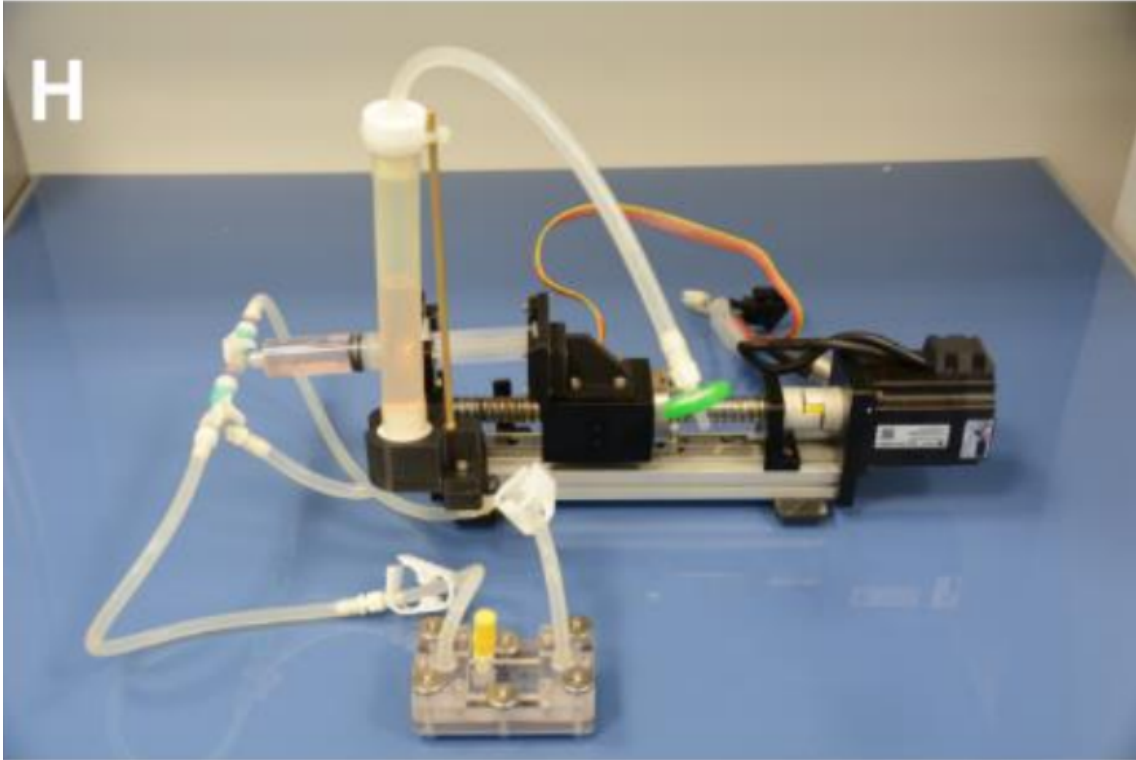
Součástí dynamické kultivace je zajištění cirkulace kultivačního media. Perfuze může být řešena peristaltickou pumpou, která funguje na principu rytmického stlačování pružné hadice s pumpovanou tekutinou pomocí lamel umístěných na rotoru. Peristaltické řešení vytváří rázové vlny, které však není možné řídit a jsou závislé na konstrukci peristaltické pumpy (průměr čerpací hlavy, počet stlačovacích elementů) a nastaveném průtoku (rychlost otáčení a okluzní hadice). Tyto nežádoucí rázové vlny je možné kompenzovat pomocí kapacitního tlumiče, ovšem není možné jejich kontrolované generování.



Obrázek 2.1: A sestava kultivačních komor perfuzního okruhu, s připojenými tlumiči rázů (válcová struktura), B exptermi peristaltická pumpa s řízením, C detail PPFC komor. Převzato z [7].

Alternativou jsou čerpadla na bázi lineárních pump využívající zjednodušeně injekční stříkačky nebo obdobné kartuše. Tyto stříkačky jsou pomocí lineárního po-

suvu stlačovány a to buď konstantní rychlostí – proudění s pevným průtokem, nebo je tento posuv modulován pro vytváření pulzních vln. Toto řešení však vykazuje velké nedostatky při dlouhodobé činnosti, neboť dochází k opotřebení pístu a je pak možná kontaminace celého okruhu. [1]



Obrázek 2.2: Lineární pumpa se stříkačkou a pomocným rezervoárem s připojenou PPFC komorou. Převzato z [7].

2.2 Smykové napětí v kultivačních experimentech

Smykové napětí vzniká při působení tangenciální síly k povrchové ploše. Tato síla je vytvářena v kardiovaskulárním systému průtokem krve. Endotelové buňky cév jsou neustále vystaveny cyklickému stahování a změnám smykového napětí z důvodu pulzujícího charakteru průtoku. Jak uvádí studie [8, 9], endotelové buňky jsou schopné převádět mechanické podněty na intracelulární signály, které ovlivňují buněčné funkce, jako je např. proliferace, apoptóza, migrace, permeabilita a remodelace, jakož i genovou expresi. Endotelové buňky reagují různě na rozdílné režimy smykového napětí, jako je laminární, turbulentní nebo oscilační proudění.

Smykové napětí způsobuje u endoteliálních buněk jejich prodlužování a orientaci ve směru proudu, v tomto směru dochází také k přeskupování mikrotubulů a cytoskeletových vláken. Remodelace endoteliálních buněk zahrnuje tři fáze. Nejprve se buňky prodlužují, přeskupují se cytoskeletová vlákna a mikrofilamenta a spoje

mezi buňkami se rozrušují. Následuje pohyb buněk a reorganizace organel uvnitř buněk. Nakonec jsou buňky přizpůsobeny směru proudu a spoje mezi nimi jsou obnoveny. Celý proces trvá zhruba 12 hod. Kromě dopadu na fyziologické vlastnosti endoteliálních buněk má však smykové napětí značný vliv i na jejich vlastnosti mechanické, např. viskozitu a pevnost buněk [9]. Za normálních podmínek, mezi-buněčné prostory neumožňují průchod makromolekule, avšak v oblastech narušeného laminárního proudění dochází k rychlejší proliferaci a odumírání buněk a místa buněčných spojů se rozšiřují a umožňují vstup větších molekul.

Je prokázáno, že růst endoteliálních buněk může být ovlivňován typem smykového napětí, kterému jsou vystaveny. Dřívější studie odhalily, že laminární smykové napětí způsobuje v závislosti na intenzitě snížení proliferace endoteliálních buněk. Dlouhodobé působení dostatečně intenzivního smykového napětí má u endoteliálních buněk za následek úbytek syntetizované DNA oproti buňkám pěstovaným za statických podmínek [9].

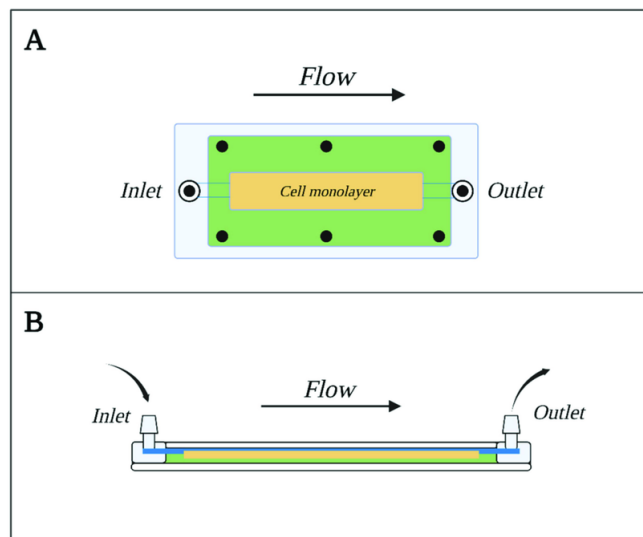
Studie [10, 11] prokázaly, že smykové napětí má značný vliv na životaschopnost a proliferaci buněk. Studie [10] uvádí, že při třítydenním dynamickém kultivačním experimentu s mechanosenzitivními buňkami, fibroblasty NIH-3T3, a průtoku $10 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, došlo k masivnímu růstu buněčné kultury oproti statické kontrole. Na druhé straně studie [11] se zabývá vlivem smykového napětí na buňky při DoD (Drop-on-Demand) biotisku. Hodnoty smykového napětí jsou při biotisku příliš vysoké na to, aby mu mohly buňky odolávat a ztrácí tak životaschopnost a možnost proliferace, přičemž smykové napětí má větší vliv na proliferaci než na životaschopnost. Dále studie [12, 13] uvádí, že smykové napětí v rozsahu ($0 - 20 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$) dokáže zlepšit diferenciaci směrem k endotelovým buňkám. Smykové napětí v rozsahu ($20 - 25 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$) naopak produkci endotelových markerů snížilo. [12]

Nejčastěji využívané komory pro vystavení buněk smykovému napětí jsou komory s paralelními deskami komory. PPFC komory se skládají ze dvou paralelních desek blízko sebe. Vniklá štěrbinová mezera mezi deskami je tak úzká, že při proudění zde vzniká pouze laminární proudění, které působí na buňky rovnoměrně. [14] V obrázku 2.3 je schématický pohled na komoru shora a ze strany.

Jednotky smykového napětí je zvykem udávat v $\text{dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$. Dyn je odvozená jednotka síly ze soustavy CGS. V soustavě SI je její rozměr $\text{g}\cdot\text{cm}\cdot\text{s}^{-2}$ a je to tedy také síla, která je potřeba k udělení zrychlení jeden centimetr za sekundu hmotnému o hmotnosti jeden gram.

2.3 Současné systémy pro dynamickou kultivaci

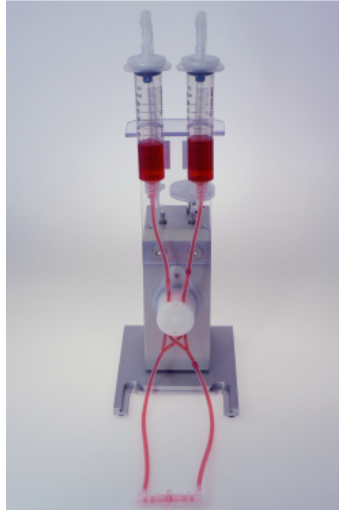
Současný trh nabízí širokou škálu komerčních zařízení. Nevýhoda komerčních zařízení je jejich nízká možnost vlastních úprav pro potřebnou aplikaci a vysoká cena.



Obrázek 2.3: Komora s paralelními deskami. Převzato z [14].

Cellix je irská firma, která se zabývá mikrofluidikou. Firma nabízí kompletní systém od kultivačních komor přes pumpy, zdroje napájení, testovací systémy, mikroskopy až po zobrazovací a ovládací softwary. Pořizovací cena včetně instalace systému je 3 054 848 Kč. Systém umožňuje velmi přesné nastavení hodnot toku ($5 - 10 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$) a smykového napětí (až $30 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$), což simuluje přirozené prostředí v cévách in vivo [15]

Další firma zabývající se perfuzními systémy je německá firma ibidi. Jejich komerční systém je k vidění na obrázku 2.4. Systém umožňuje kultivaci buněk při průtoku s definovanými hodnotami smykového napětí, nastavení kontinuálního nebo pulzujícího laminárního proudění a oscilačního proudění. Výsadní technické parametry systému jsou především možnosti přesně definovaného smykového napětí, uzavřený cirkulační okruh pro zajištění sterility, minimální mechanické namáhání buněk, rozsah průtoků ($0,1 - 10 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) a smykového napětí ($0,1 - 200 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$) a nízký pracovní objem 2,5 ml, 12 ml nebo 50 ml. [16]



Obrázek 2.4: Perfuzní systém od firmy ibidi. Převzato z [17].

System ibidi Pump přivádí do zásobníků stlačený vzduch, který vytváří průtok v kanálu mikrosystému. Samotné médium se pohybuje pouze v zásobníkových nádržkách a jednorázových sterilních hadicích a nepřichází do kontaktu s ventily, čímž je zachována sterilita. Aktivní součástky okruhu jsou dva ventily. První ventil zajišťuje směrování tlaku vzduchu do levého nebo pravého zásobníku a druhý ventil přepíná směr média, aby bylo proudění kultivační komorou stále jedním směrem. V cirkulačním okruhu jsou spoje jednotlivých komponent zajištěny konektory Luer. System je tak kompatibilní s jakýmkoli průtokovým nebo kanálovým sklíčkem. [16]

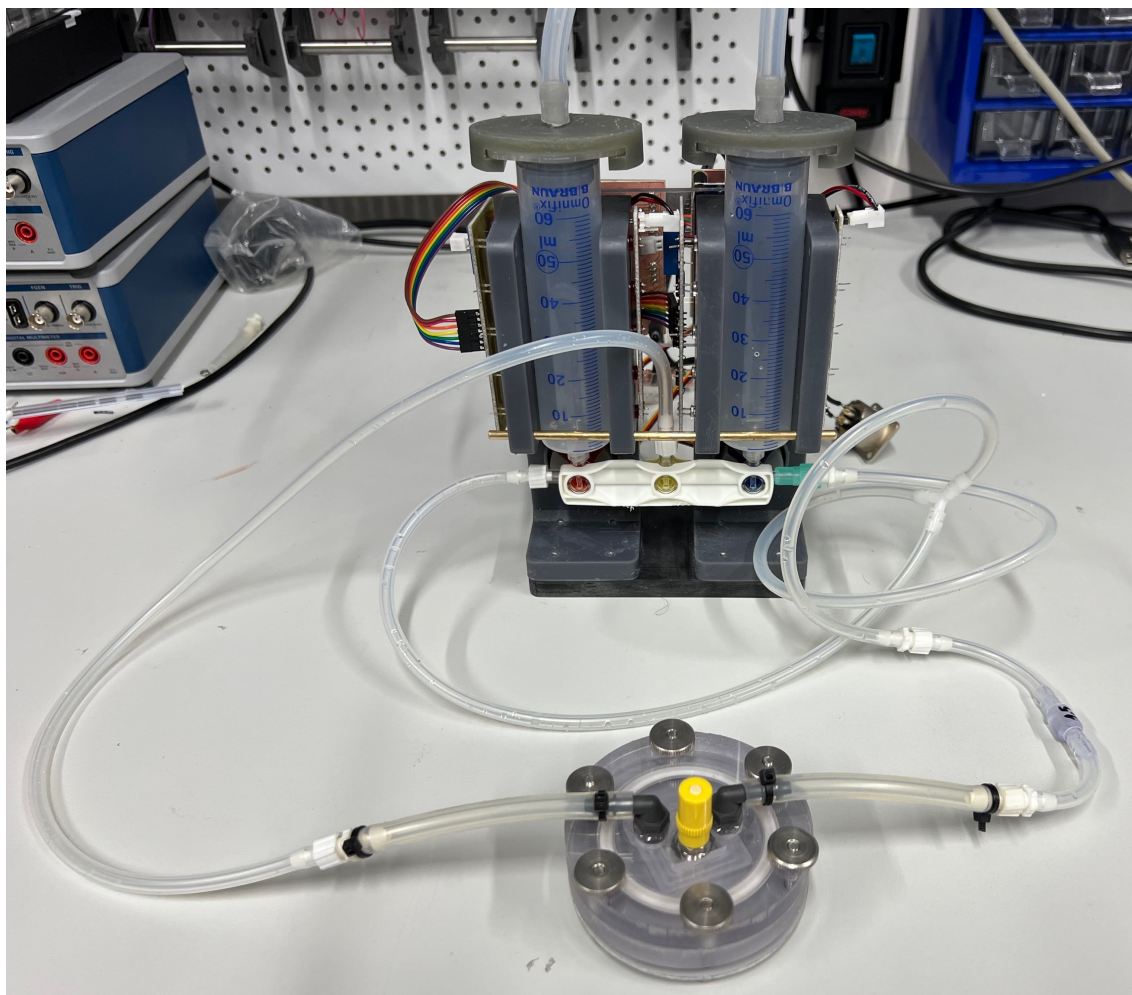
3 Cíle práce

Cíle práce jsou:

- vytvoření pneumatického perfuzního okruhu,
- navržení vhodného řešení pro sterilní monitorování průtoku,
- rozšíření řízení okruhu o pulzní režim,
- charakterizace průtočných parametrů systému a okruhu,
- ověření stability systému laboratorně,
- provedení buněčného experimentu s endotelem.

4 Metody

Navržené řešení se skládalo ze sestavy pro uchycení stříkaček a trojprvkové sestavy servoventilů, ovládací elektroniky a ovládacího firmwaru jež jsou popsány v následujících kapitolách. Na obrázku 4.1 je vytvořený systém pro řízenou perfuzi.



Obrázek 4.1: Vytvořená sestava hotového systému. Fotografie: autor.

Sestrojení okruhu pro řízenou perfuzi kultivačního média je řešené hardwarově i softwarově. Následující kapitoly se věnují návrhu konstrukce upevnění stříkaček a servomotorů, návrhu desky plošných spojů pro vyčítání hladiny média, identifikaci hardwaru, který tvoří mikroprocesor Arduino Nano Every a návrhu softwaru. Softwarem se řeší ovládání servomotorů, měření času odtoku hladiny v jednom segmentu a komunikace s platformou pro řízení tlaku.

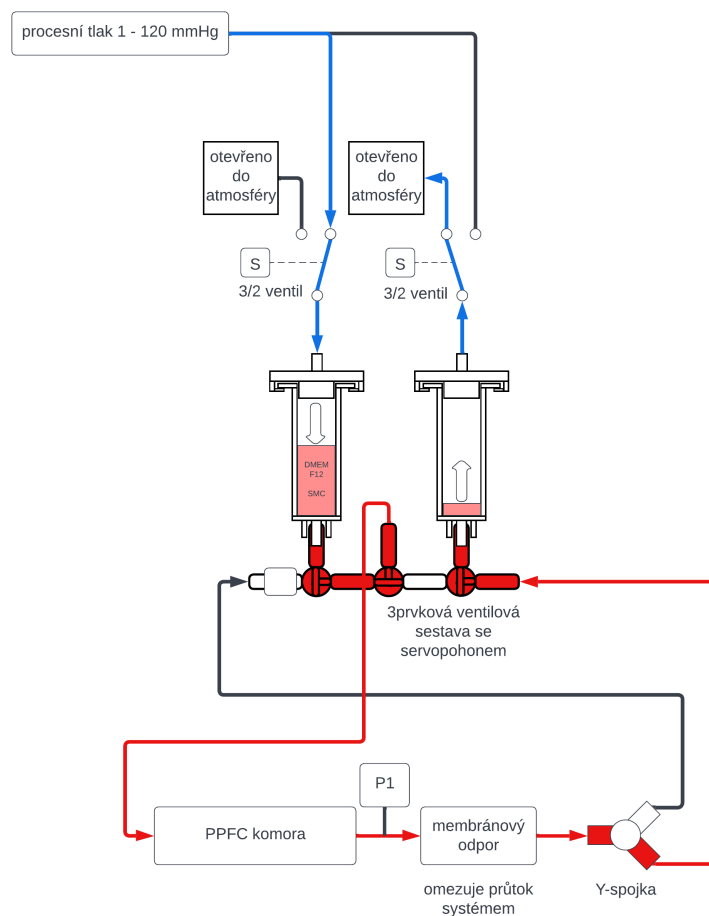
Prvním krokem pro správné fungování sestavy bylo navržení upevnění stříkaček a ovládacích kohoutů včetně servo motorů a zvolení vhodného materiálu pro výrobu. Dalším krokem bylo navržení vhodné principu pro vyčítání hladiny kultivačního média. Při vytváření metody musely být zohledněny parametry platformy Arduino

tak, aby bylo možné prvky vyčítající hladinu média napájet a zároveň zpracovávat výstupní signál. Zaznamenávání hladiny média bylo realizováno pomocí LED diod a protilehlých fotodiod zapojených ve fotokonduktivním režimu.

Výsledkem zohledněných poznatků bude systém, kterým bude možné kontinuálně ovládat průtok média kultivační komorou. Navržený okruh bude bez rázových vln, a tedy řízení perfuze bude precizní. Vytvořený systém lze dále zdokonalovat. Například optimalizací ovládacího firmwaru, přidáním ochranných krytů na desky plošných spojů nebo vylepšení součástí pro jednodušší konstrukci a nastavování systému.

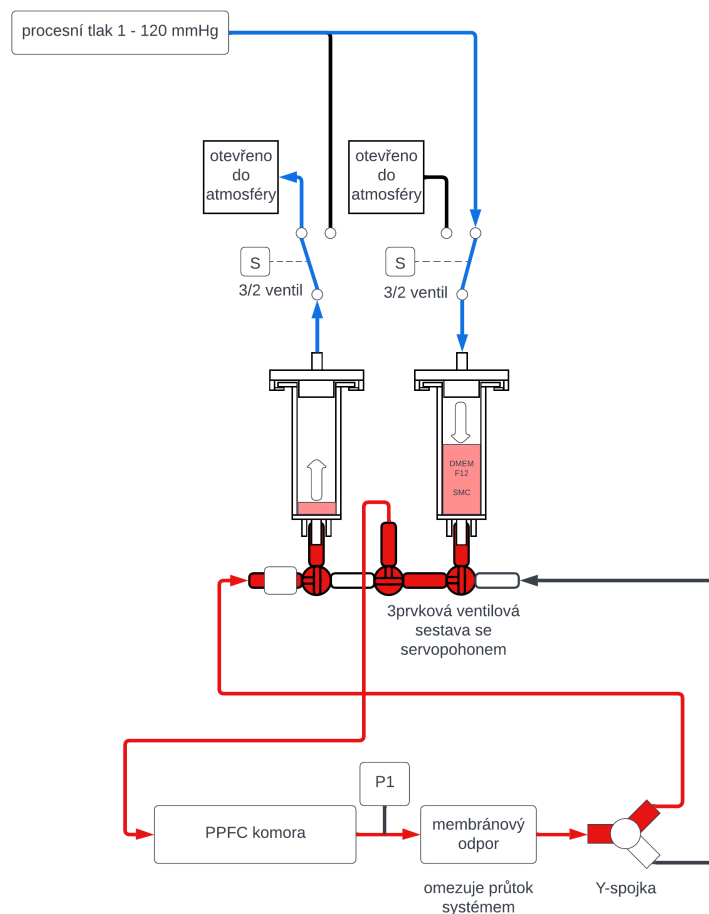
4.1 Princip systému

Systém byl navržen tak, aby řízení perfuze mohlo probíhat kontinuálně, tedy tak, aby při řízení nedocházelo k mrtvému času při přečerpávání média ze zásobní stříkačky do řídicí stříkačky. V obrázku 4.2 je vyobrazeno principiální schéma cirkulace média z levé stříkačky do pravé.



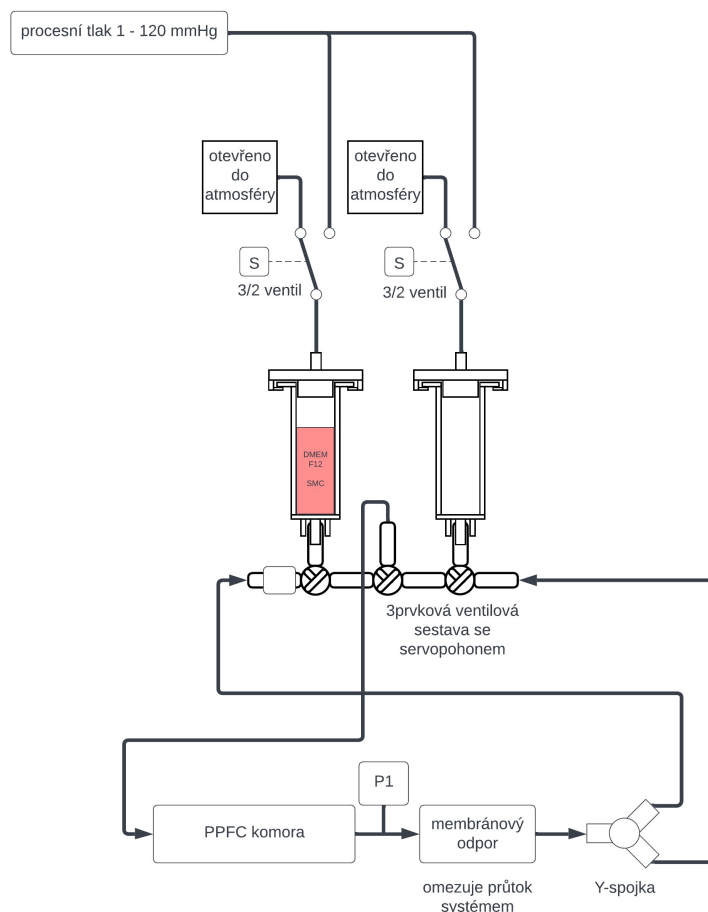
Obrázek 4.2: Schéma zapojení cirkulace přes komoru z levé stříkačky do pravé.

Okruh se skládá se dvou stříkaček značky BBraun Omifix o objemu 60 ml. Stříkačky jsou připojeny k tříprvkové soustavě třicestných kohoutů Discifix C. Pravý a levý krajní kohout slouží pro ovládání vstupu a výstupu stříkaček a prostřední kohout je ve stabilní poloze stále otevřený. Unašeče jsou tvarově přizpůsobeny pro kohouty a připevněny k servomotorům. Celý takto sestavený okruh je následně osazen do držáků, ve kterých jsou v řadě zabudované LED diody a fotodiody ve vzdálenosti $l = 18.23$ mm. Dále je v okruhu k výstupu prostředního kohoutu zapojena kultivační komora, zařízení pro výčet tlaku a membránový odpor omezující průtok systémem. Výstup membránového odporu je připojen k Y-spojce, jejíž výstupy jsou vedeny na levý a pravý vstup ventilové soustavy Discifix. Stříkačky jsou připojeny ke dvěma redukčním ventilům, které jsou přepínány do systému a atmosféry dle směru cirkulace média. Princip cirkulace z pravé stříkačky do levé je schematicky naznačen v obrázku 4.3.



Obrázek 4.3: Schéma zapojení cirkulace přes komoru z pravé stříkačky do levé.

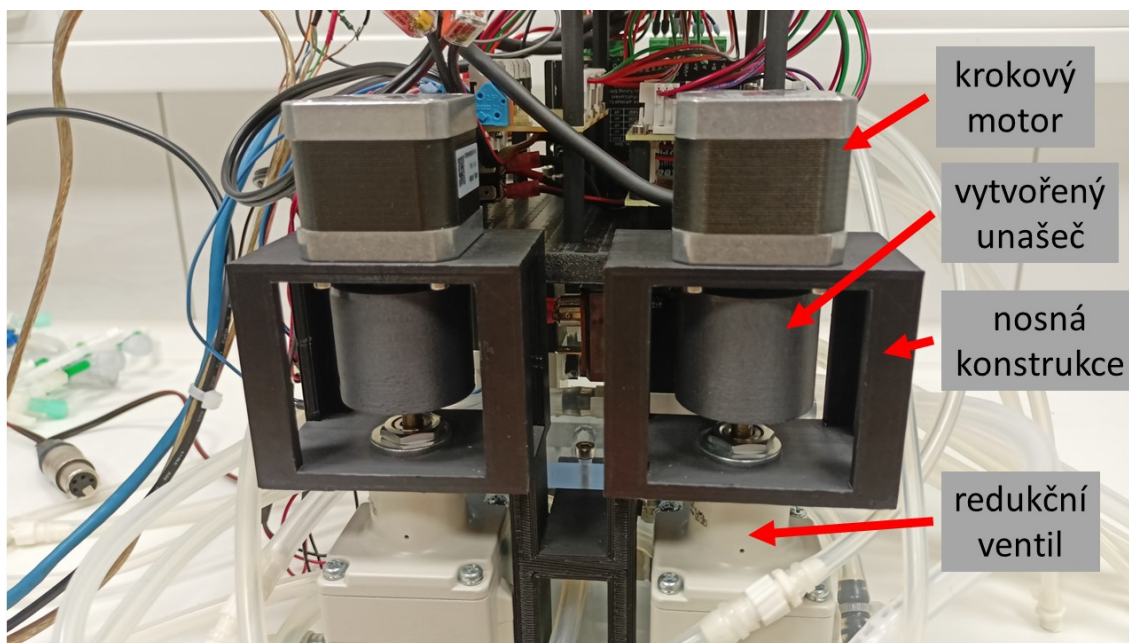
Při výměně degradovaného kultivačního média, popřípadě jeho doplnění, můžeme celý okruh uzavřít. Uzavřený okruh je vyznačen v obrázku 4.4.



Obrázek 4.4: Schéma uzavřeného okruhu.

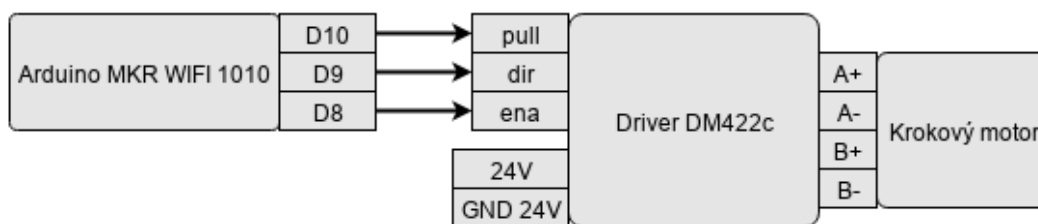
4.2 Motorizované řízení tlakové platformy

Pro řízení tlaku byla využita již vytvořená platforma z předcházejících kultivačních experimentů. Tato platforma byla rozšířena o precizní dvoufázové krokové motory 40CM04, které byly pomocí vyrobených unašečů připevněny k regulační závitové tyči redukčních ventilů řady IR2000. Platforma jsou umístěny čtyři tlakové senzory MPX2050DP, která slouží pro výčet nastaveného řídicího tlaku. Tlakové snímače mají rozsah 0-50 kPa a umožňují i diferenční měření. Dále jsou na platformě elektromagnetické 3/2 ventily řady VT307, které slouží k přepínání tlaků do jednotlivých zásobníkových kartuší a atmosféry. Celý systém je upevněný na odlehčenou konstrukci, která byla vytvořena v prostředí Fusion 360 a následně vytištěna na 3D tiskárně z černého filamentu PLA. Vytvořená konstrukce je k vidění v obrázku 4.5.



Obrázek 4.5: Konstrukce redukčního ventilu a krokového motoru. Fotografie: autor.

Elektronika platformy byla rozšířena o drivery krokových motorů DM422c. Driver obsahuje piny pull, dir, enable, napájení a GND. Pin pull slouží pro iniciaci posunutí motoru o krok. Pin pull určuje směr otáčení motoru a pin enable ovládá vstup proudu do motoru. Krokový motor vyžaduje napájení 24 V. Takovéto napětí není schopné Arduino generovat, proto je motor napájený externím zdrojem ze sítě. Zjednodušené schéma zapojení motoru je vyznačeno v obrázku 4.6.



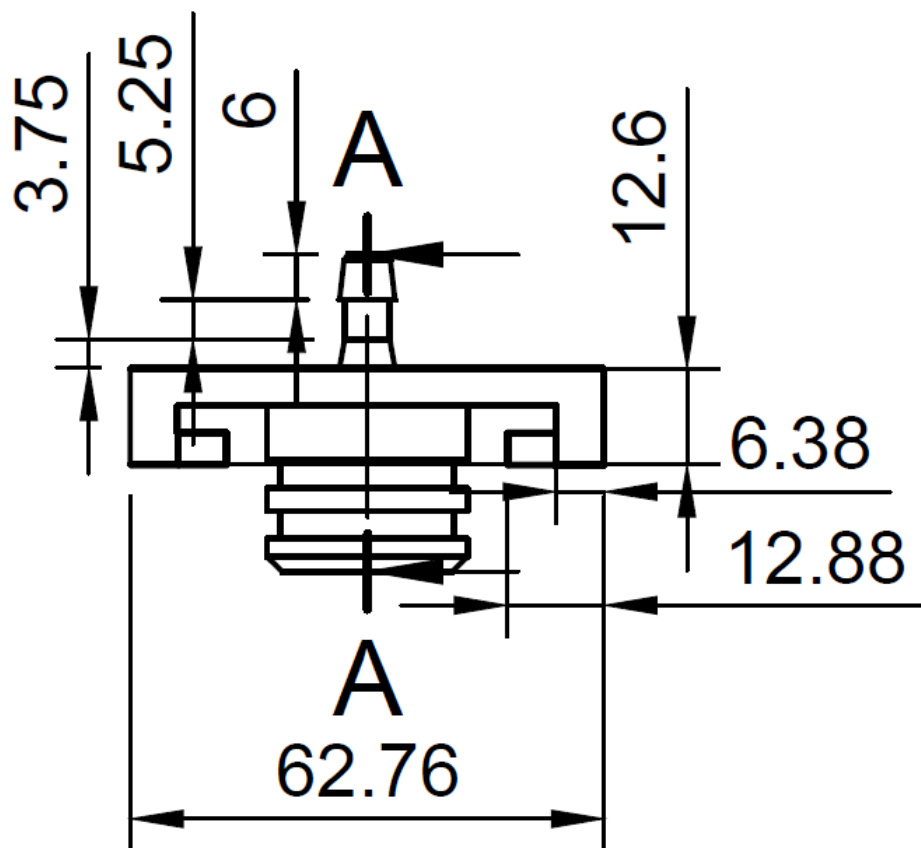
Obrázek 4.6: Schéma zapojení krokového motoru s piny Arduina.

4.3 Návrh konstrukce

Návrh konstrukce obsahuje navržení utěsnění vstupu stříkačky a vytvoření nosné konstrukce pro okruh. Modely pro 3D tisk byly vytvořeny v prostředí Fusion 360. Součástky byly vytisknuty z tekuté šedé tvrdé pryskyřice. Utěsnění bylo vytištěno z

čirého sterilizovatelného a biokompatibilního resinu BioMed, jelikož utěsnění může přijít do styku s kultivačním médiem.

Model utěsnění se skládá ze zahnutých konců, které se zaháknou za uchycení stříkačky. Dále jsou zde vytvořeny dvě drážky pro těsnící O-kroužky. Drážka pro těsnění byla vytvořena dle tolerancí uvedených v tabulkách gumárenské společnosti Rubena. [3] V této aplikaci se jedná o instalaci těsnění statické axiální, průměr průřezu těsnění je $d_2 = 3$ mm a doporučená hloubka drážky je $t_1 = 2,3$ mm a šířka drážky $b_2 = 4,1$ mm. Vnitřní průměr drážky pro O-kroužky je $d_1 = 23$ mm, jelikož byl k utěsnění použit O-kroužek o vnitřním průměru $d_1 = 22$ mm, byla drážka zmenšena na hloubku $t_1 = 1,75$ mm a šířku $b_2 = 3,7$ mm. Výkres aplikace dle doporučení je v obrázku 4.7.



Obrázek 4.7: Výkres utěsnění vstupu stříkačky.

Při návrhu konstrukce upevnění se jednalo nejvíce o rozmístění děr pro fotodiody a LED diody. V konstrukce je vytvořeno pět děr pro umístění diod, které snímají hladinu média ve čtyřech segmentech. Vzdálenost děr je $l = 18.23$ mm. Tato vzdálenost odpovídá přibližně 10 ml, což znamená, že objem cirkulujícího média je přibližně $V = 50$ ml. V zádech konstrukce jsou vytvořeny tři díry pro metrický závit M3. Tyto díry slouží pro připevnění desky s řídicí elektronikou.

V poslední části návrhu konstrukce byla vytvořena deska pro připevnění držáků stříkaček. V desce je uděláno 32 děr ve čtvercovém vzoru, vzdálených od sebe 25 mm.

4.4 Návrh hardwaru

Následující kapitoly se zabývají návrhem hardwarových částí pro výčet hladiny kultivačního média v zásobníkových kartuších. Jedná se o vytvoření desky plošných spojů pro LED diody, dále snímací desku plošných spojů s fotodiodami a desku plošných spojů pro Arduino. Pro napájení jednotlivých komponent bylo zvoleno výstupní napětí Arduina napětí $U = 3,3 \text{ V}$. Desky plošných spojů byly navrženy v prostředí Fusion 360 a následně vyrobeny na obráběcím stroji CNC.

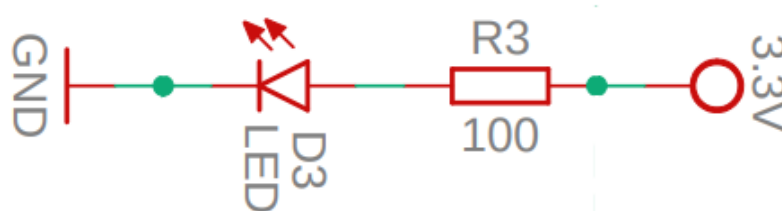
4.4.1 Návrh desky plošných spojů pro LED

Pro maximální intenzitu svitu LED diod bylo nutné vypočítat vhodnou hodnotu předřadného odporu tak, aby diodou neprotékal příliš vysoký proud, který by diodu zničil. Maximální proud diod byl omezen na $I_{max} = 20 \text{ mA}$. [18] Hodnota odporu byla vypočítána z Ohmova zákona dle vzorce 4.1

$$R = \frac{U}{I}, \quad (4.1)$$

kde U je napětí, I je proud a R je odpor. Vypočítaná hodnota odporu $R = 165 \Omega$ neodpovídá žádnému odporu z elektrotechnické řady E12. Proto byla zvolena nejbližší možná hodnota vhodná pro aplikaci $R = 100 \Omega$.

Barva LED diody byla zvolena červená. Kultivační médium obsahuje fenolovou červeň, proto má také červenou barvu a pro vyzařovanou vlnovou délku se bude chovat jako světlovod. Při poklesu hladiny média dojde ke rozptylu světla ve stěně stříkačky a tedy k poklesu intenzity detekované fotodiodou. Schéma zapojení LED diod je uvedeno v obrázku 4.8.



Obrázek 4.8: Schéma zapojení LED diod.

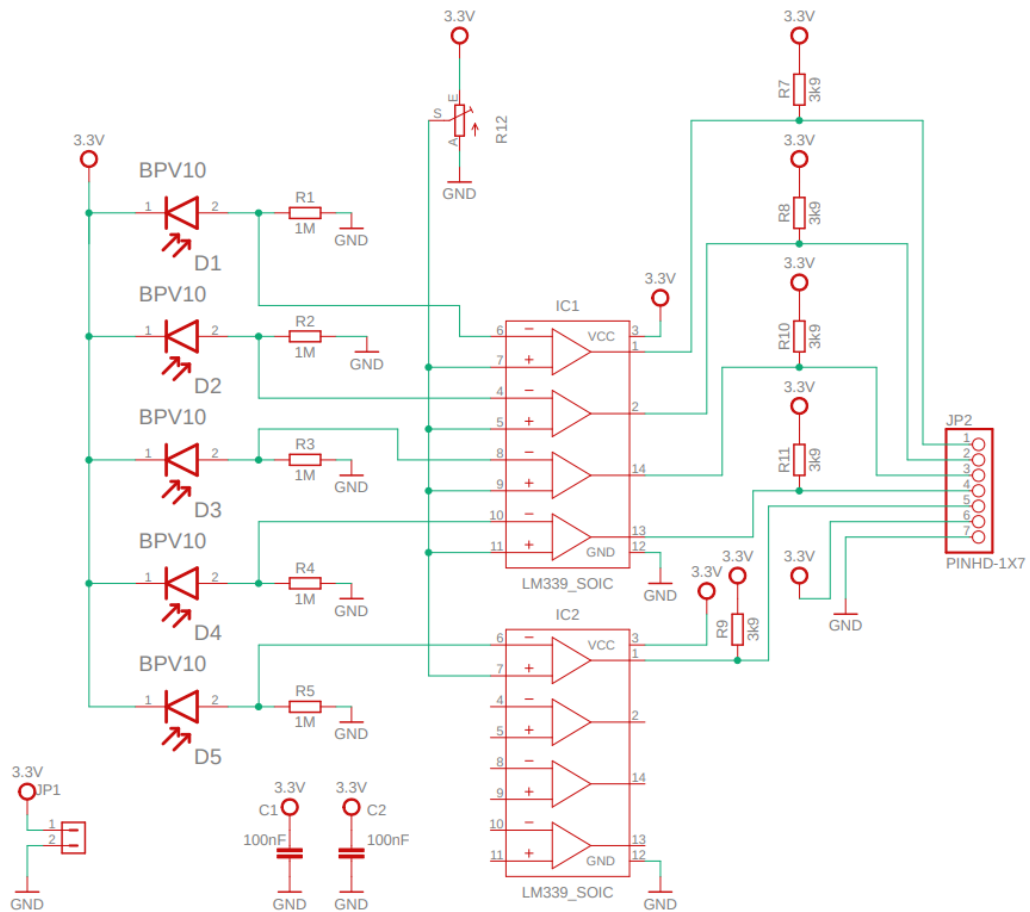
4.4.2 Návrh desky plošných spojů s fotodiodami

V návrhu snímací desky plošných spojů jsou využívány fotodiody, které je možné zapojit ve fotokonduktivním, nebo fotovoltaiickém režimu. Ve fotovoltaiickém režimu se fotodioda chová jako zdroj energie na rozdíl od fotokonduktivního režimu, kdy je na fotodiodu externím zdrojem energie přivedeno napětí v závěrném směru a pomocí rezistoru je měřen protékající proud fotodiodou. V našem případě využijeme režimu fotokonduktivního. [19]

Vyhodnocování vytvořeného napětí protékajícím proudem fotodiodou je provedeno pomocí komparátorů LM339. Napětí je přivedeno na invertující svorku komparátoru. Na neinvertující svorku je přivedeno referenční napětí vytvořené potenciometrem o jmenovité hodnotě $R = 10 \text{ k}\Omega$. Na výstupy komparátoru jsou zapojeny pull up rezistory, které definují logickou hodnotu v okamžiku rozpojeného obvodu. Hodnota odporů byla vypočítána z Ohmova zákona tak, aby při rozpojeném obvodu netekl odporem příliš vysoký proud, a to $R = 3900 \Omega$. Ke komparátorům byly zapojeny stabilizační kondenzátory z důvodu vyhlazení napěťových špiček a tím dosažení rovnoměrnějšího průběhu elektrického proudu. Tabulka 4.1 obsahuje použité součástky v obvodu a v obrázku 4.9 je vyobrazeno schéma obvodu.

Tabulka 4.1: Přehled použitých součástek na sensorické desce PCB.

Součástka	Popis	Výrobce
LM339	Komparátor	Texas Instruments
Odpory	Hodnoty: 1M, 3k9,	-
Potenciometr	Hodnota: 10k	-
Kondenzátory	Hodnota: 100 nF	-
Konektory	Pinhead, HDR	-

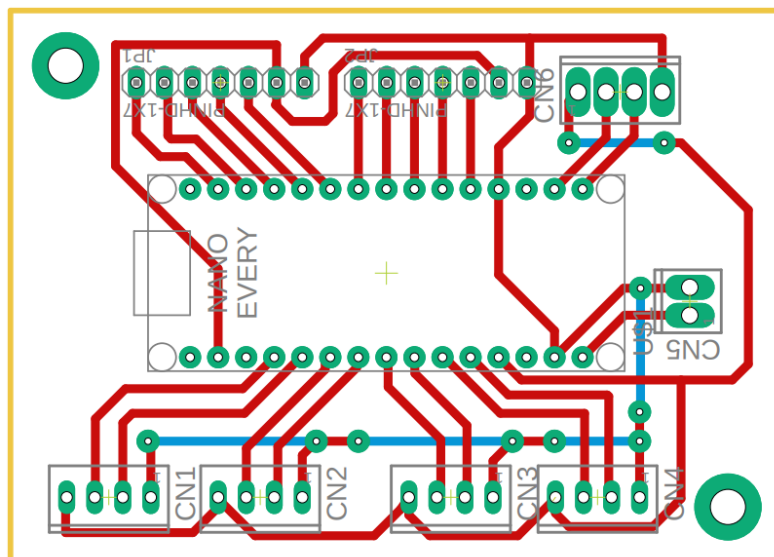


Obrázek 4.9: Schéma zapojení senzorické desky s fotodiodami.

4.5 Návrh desky plošných spojů pro mikrokontroler

Poslední navrhovanou deskou plošných spojů byla deska pro osazení Arduina. Tato deska obsahuje pouze dutinkové lišty pro Arduino a následně vyvedení pinů Arduina ke konektorům pro snadnější připojování jednotlivých hardwarových komponent k řídicímu prvku. Navržená deska je uvedena v obrázku 4.10.

Hardwarové řešení dále obsahuje desku plošných spojů pro řízení signálů a Step-down měnič s LED displejem pro redukci napájecího napětí ze sítě na stejnosměrné napětí 5 V pro DC servomotory.



Obrázek 4.10: Navržená deska pro osazení Arduinem Nano Every.

4.6 Návrh softwaru

První část kódu obsahuje implementaci knihoven a deklaraci funkcí a proměnných. V rámci knihoven se jedná o sériovou komunikaci pro zadávání příkazů servomotorům a o knihovnu pro řízení servomotorů. Pro lepší čitelnost kódu jsou jednotlivé příkazy rozděleny do funkcí. Seznam ovládacích příkazů a jejich popis je uveden v tabulce 4.2. Parametr 1 udává výběr levé a pravé strany a parametr 2 udává výběr pozice natočení serva.

Druhé části kódu, a to funkci setup, jsou nastaveny piny pro vstup a výstup a jejich počáteční hodnoty při spuštění.

V třetí části se jedná o nekonečnou smyčku loop. Tato část je tvořena sekvencí funkcí if, které vykonají jednotlivé příkazy zmíněné výše. Probíhá zde také kontrola logické změny pinů, do kterých jsou zapojeny výstupy komparátorů. Pokud dojde ke změně logické hodnoty na některém z pinů, uživateli se odešle zpráva s dobou trvání od poslední změny logické hodnoty. Doba trvání jednotlivých segmentů se odesílá jak z vyprazdňující tak z plnicí se kartuše. Uživatel tak dostává 8 hodnot průtoku z jednotlivých segmentů.

Tabulka 4.2: Přehled příkazů pro ovládání platformy.

Ovládací příkaz	Parametr 1	Parametr 2	Funkce
AlertReset	-	-	Obnoví stav pinu pro upozornění do výchozí hodnoty
TimerReset	-	-	Vynuluje časovač pro měření průtoku
ColumnChoice	r - pravý, l - levý	-	Výběr ovládaní levého a pravé sloupce
turn	r - pravý, l - levý	m - prostření pozice, r - pravá pozice, l - levá pozice, c - uzavřeno	Otočení libovolného serva do požadované pozice
ServosClose	-	-	Zavření obou servo motorů současně
ServosLeft	-	-	Natočení obou servo motorů do levé pozice
ServosRight	-	-	Natočení obou servo motorů do pravé pozice
StartCycle	r - pravý, l - levý	-	Vynulování časovače a otevření ventilů do pozice dle vybraného sloupce

4.7 Laboratorní experiment

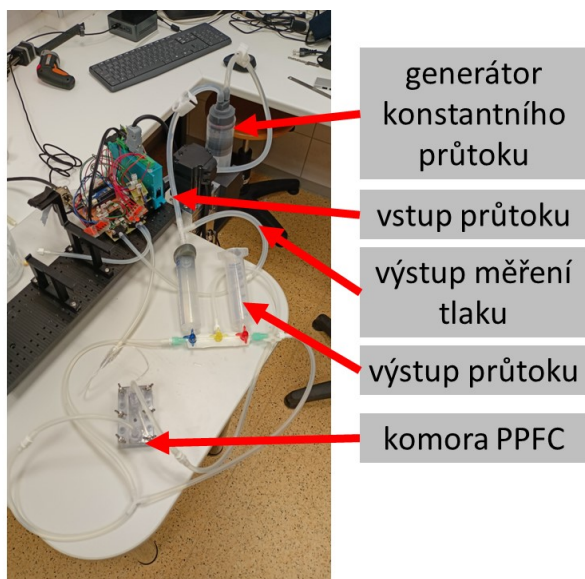
V první části ověření funkčnosti navrženého systému byly kontrolovány naměřené průtoky v jednotlivých segmentech. Do průtokového okruhu byl integrován ultrazvukový průtokoměr, který měřil průtok s frekvencí 50 Hz. Naměřené průtoky pomocí páru LED-fotodiody byly následně porovnávány s referenčním ultrazvukovým průtokoměrem.

Dále bylo provedeno měření systému pomocí generátoru konstantního průtoku, které bylo reverzně ověřeno tlakovým řízením. Okruh systému byl naplněn vodou, která funguje jako světlovod, stejně jako kultivační médium. Měření tlaků bylo ověřováno průtoky systému pro $7,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $15,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $31,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $62,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $125 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $156,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Řízení tlakem bylo provedeno pro naměřené hodnoty 7 mmHg, 15 mmHg, 38 mmHg, 85 mmHg, 225 mmHg, 305 mmHg.

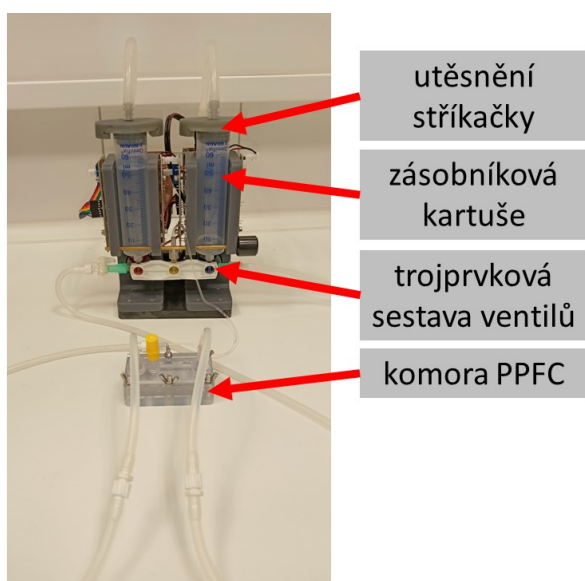
Měření bylo vyhodnoceno deskriptivní statistikou, tedy maximální, minimální a průměrná hodnota a porovnání měření tlakového a objemového řízení. V obrázku

4.11 je vyobrazena a popsána sestava objemového řízení a v obrázku 4.12 je vyobrazena sestava tlakového řízení.

Pomocí generátoru konstantního průtoku byly změřeny i jednotlivé komponenty odděleně, aby je bylo možné charakterizovat a ověřit pomocí CFD simulace. Při odlišném sestavení okruhu, či odlišné velikosti štěrbin kultivační komory, nebude třeba provádět měření objemového řízení pro zjištění řídicích tlaků systému pro požadované průtoky. Při odlišné konfiguraci okruhu bude stačit udělat simulaci, jejíž výsledky budou hodnoty řídicích tlaků okruhu.



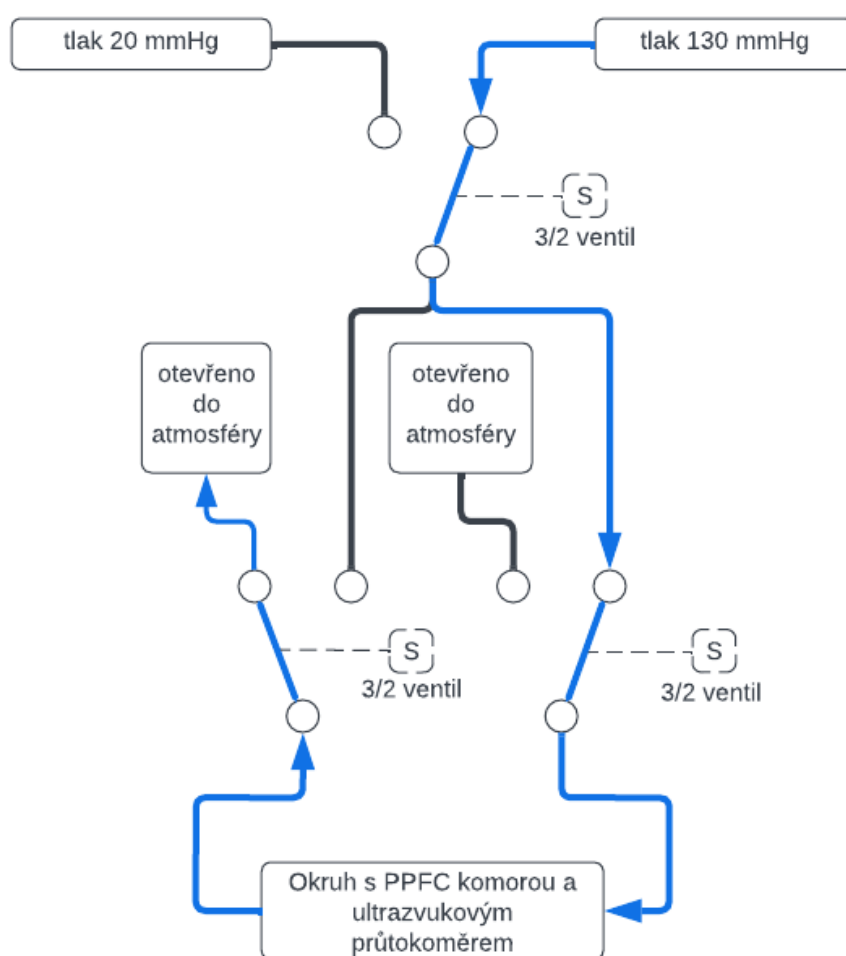
Obrázek 4.11: Sestava objemového řízení. Fotografie: autor.



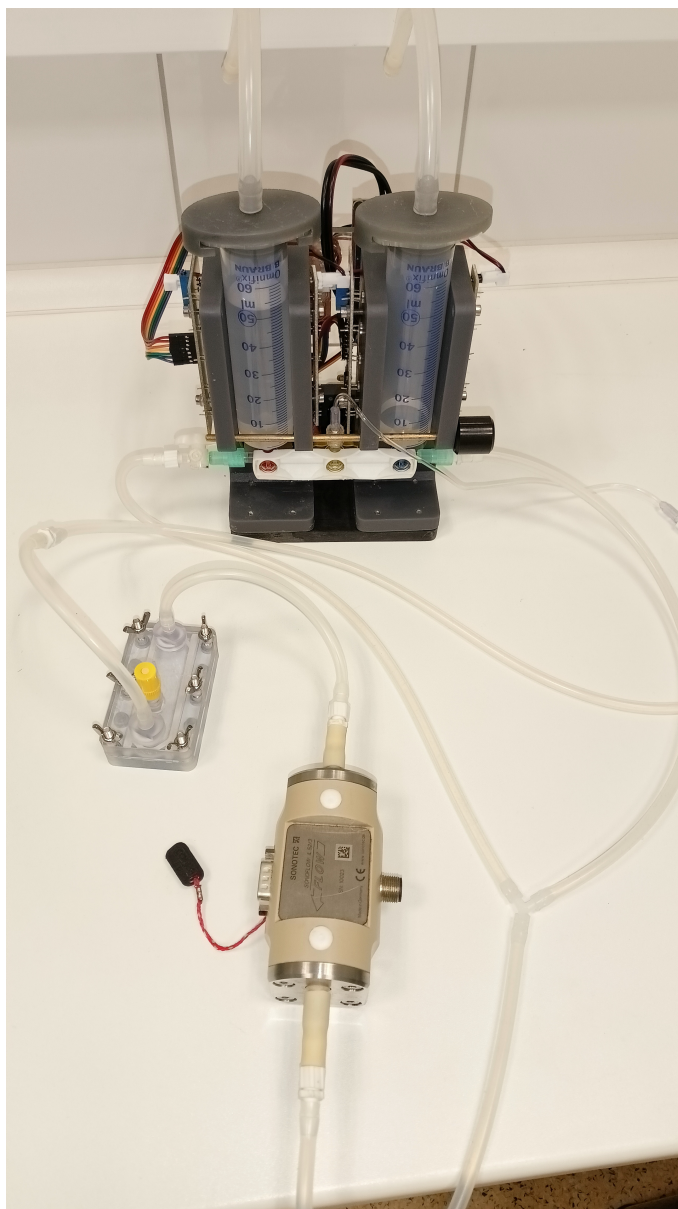
Obrázek 4.12: Sestava tlakového řízení. Fotografie: autor.

4.8 Pulzní režim

Při pulzním režimu jsou využívány oba redukční ventily z tlakové platformy, které jsou nastaveny na různé hodnoty tlaků. Jejich výstupy vedou do 3/2 ventilu, který dle nastavených časových prodlev přepíná mezi tlakovými hladinami. Výstup ventilu je přiveden na vstupy dalších dvou 3/2 ventilů z nichž je jeden otevřen do atmosféry a druhý zapojen do tlakového okruhu dle směru vyčerpávání kapaliny, stejně jako v obrázcích 4.2 a 4.3. V průtočném okruhu je zapojený ultrazvukový průtokoměr pro měření průtoku při jednotlivých hladinách tlaku. Schématické zapojení redukčních ventilů a 3/2 ventilu je uvedeno v obrázku 4.13, v obrázku 4.14 je sestavený okruh pro pulzní režim.



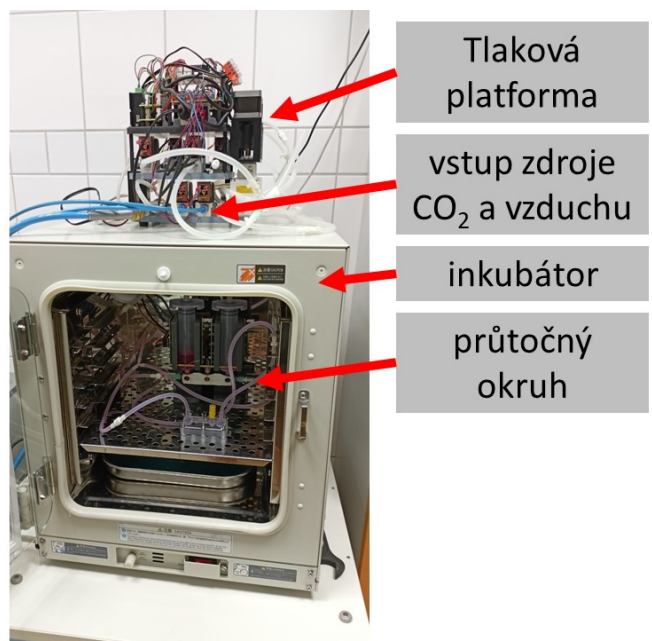
Obrázek 4.13: Schéma zapojení ventilů v pulzním režimu.



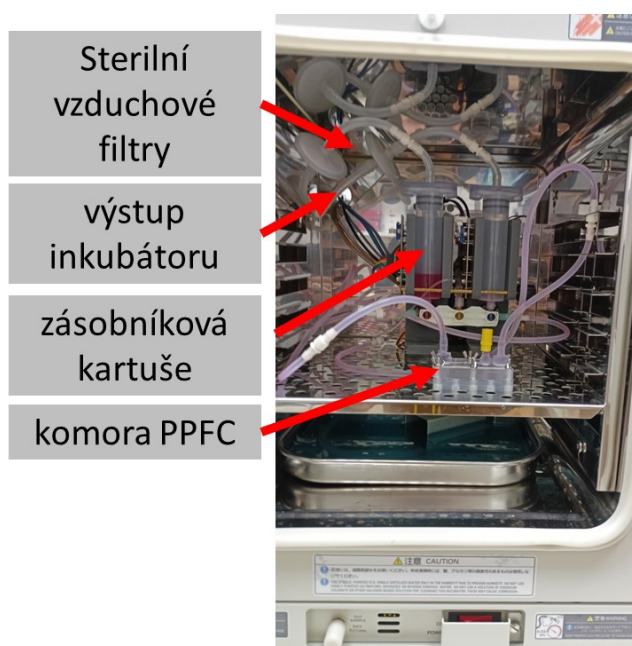
Obrázek 4.14: Sestavený okruh pulzního řízení. Fotografie: autor.

4.9 Buněčný experiment

Buněčný experiment probíhal s přesně charakterizovaným okruhem, který byl sterilizovaný v autoklávu. Jako kultivační komora byla použita PPFC komora, která vytváří definované smykové napětí v průtočném obdélníkovém kanálu. Smykové napětí je stanoveno šířkou a výškou kanálu a nastaveným průtokem média. Výška průtočné štěrbině byla v našem případě $h = 45 \mu\text{m}$ a šířka $d = 18 \text{ mm}$. Požadované průtoky pro cílová smyková napětí v rozsahu $\sigma = 2\text{-}20 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ byly $q = 11\text{-}167 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. V obrázku 4.15 a 4.16 je zobrazený systém pro dynamickou kultivaci myšního endotelu.



Obrázek 4.15: Sestava pro kulturační experiment. Fotografie: autor.



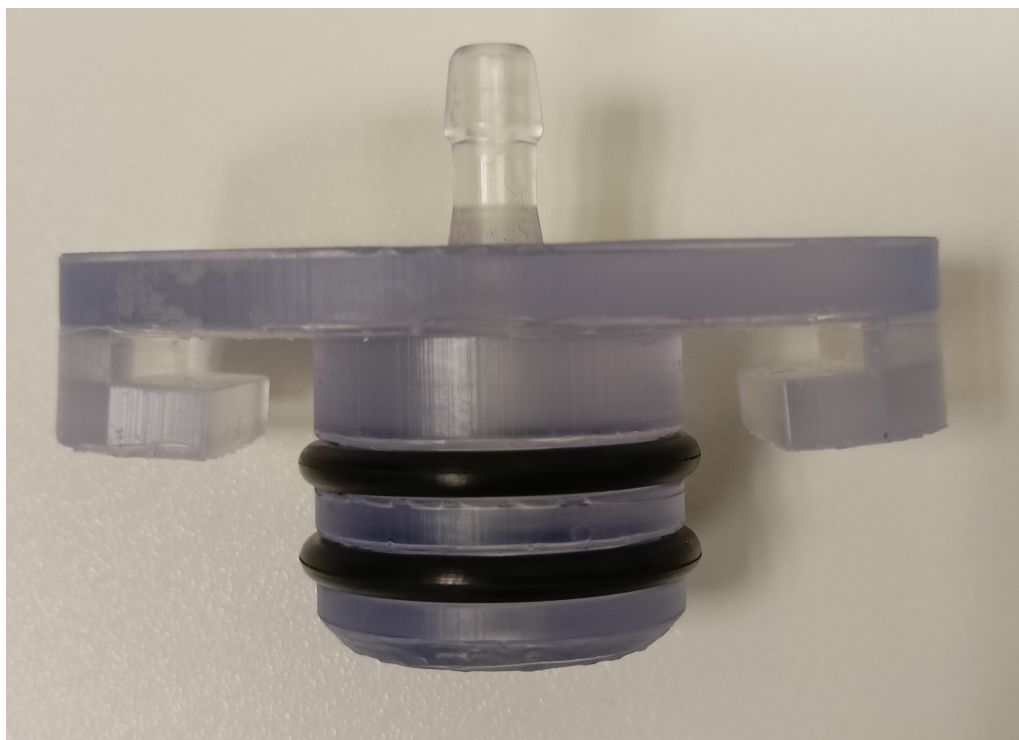
Obrázek 4.16: Průtočný okruh instalovaný v inkubátoru. Fotografie: autor.

5 Výsledky

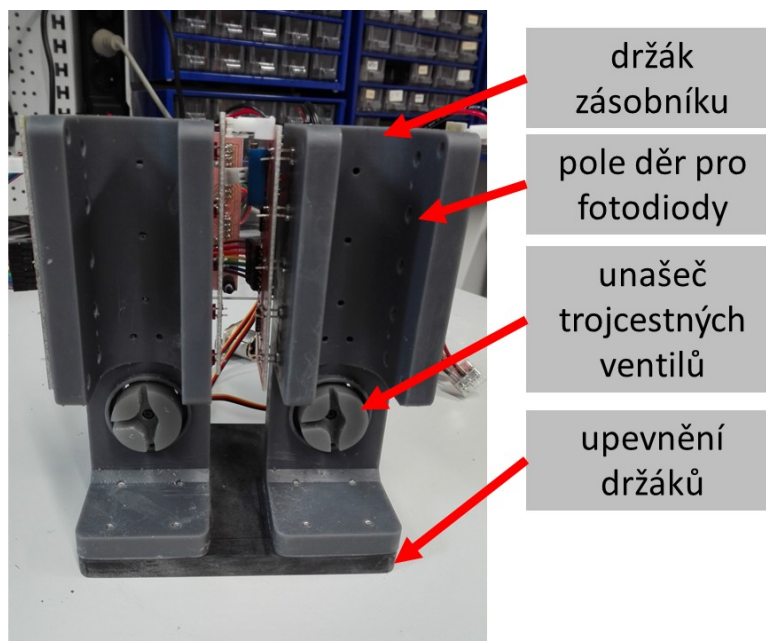
Tato kapitola se věnuje realizované konstrukci sestavy, hardwarové a softwarové části. Dále jsou zde uvedeny výsledky charakterizace průtočných parametrů okruhu při objemovém a tlakové řízení. V poslední části jsou uvedeny výsledky pulzního řízení sestavy a výsledky buněčného experimentu

5.1 Výroba sestavy

Navržený model konstrukce byl vytištěn na 3D tiskárně a následně sestaven se servomotory a unašeci. Vytisknuté utěsnění včetně těsnění O-kroužků je předvedeno na obrázku 5.1. Zkompletovaná sestava je vidět na obrázku 5.2. Vytvořená konstrukce je předpřipravená na umístění okruhu.



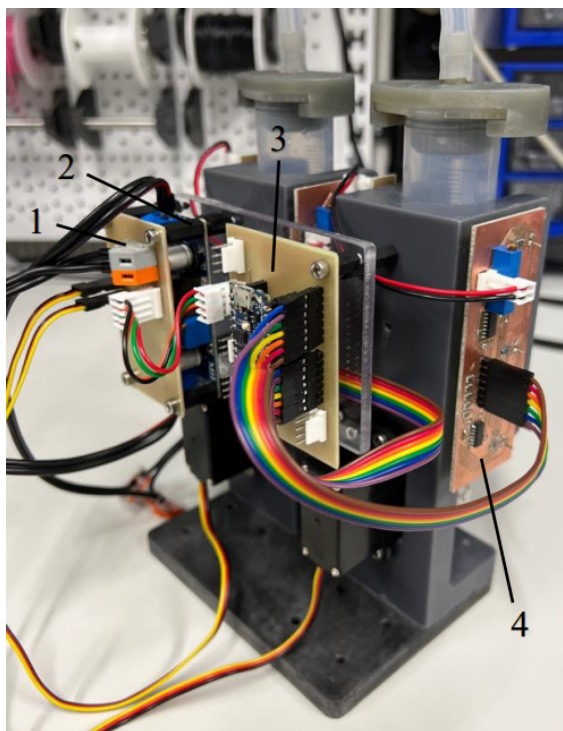
Obrázek 5.1: Vyrobené utěsnění stříkačky. Fotografie: autor.



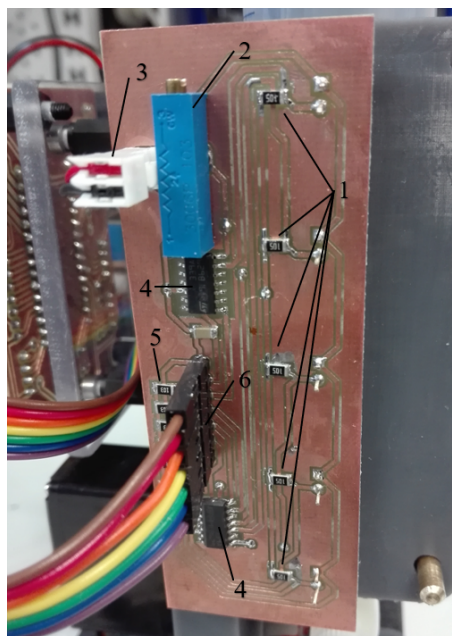
Obrázek 5.2: Zkompletovaný držák pro řízený okruh. Fotografie: autor.

5.2 Sestavení hardwaru a implementace softwaru

Desky plošných spojů byly spájeny s potřebnými komponentami. Všechny PCB desky byly zalakovány bezbarvým lakem, z důvodu umístění konstrukce v inkubátoru, kde se vyskytuje vlhké a teplé prostředí. Bezbarvý lak zamezuje oxidaci a degradaci povrchu desek a prodlužuje tak jejich životnost a snižuje riziko jejich poruchy. Arduino Nano Every bylo osazeno na desku a propojeno s jednotlivými periferiemi. Na desku byl nahrán vytvořený software. Výslednou sestavu lze vidět na obrázku 5.3. Na obrázku 5.4 je v detailněji zobrazena senzorická deska s fotodiodami.



Obrázek 5.3: Zkompletované desky plošných spojů a propojené periferie. (1) řídicí deska servo motorů, (2) step-down měnič s LED displejem, (3) deska plošných spojů osazená Arduinem Nano Every, (4) senzorická deska s fotodiodami. Fotografie: autor.



Obrázek 5.4: Senzorická deska plošných spojů s fotodiodami. (1) rezistory 1 M Ω , (2) potenciometr 10 k Ω , (3) konektor napájení PCB LED, (4) komparátor LM339, (5) pull up rezistory 3,9 k Ω , (6) pinout pro Arduino Nano Every. Fotografie: autor.

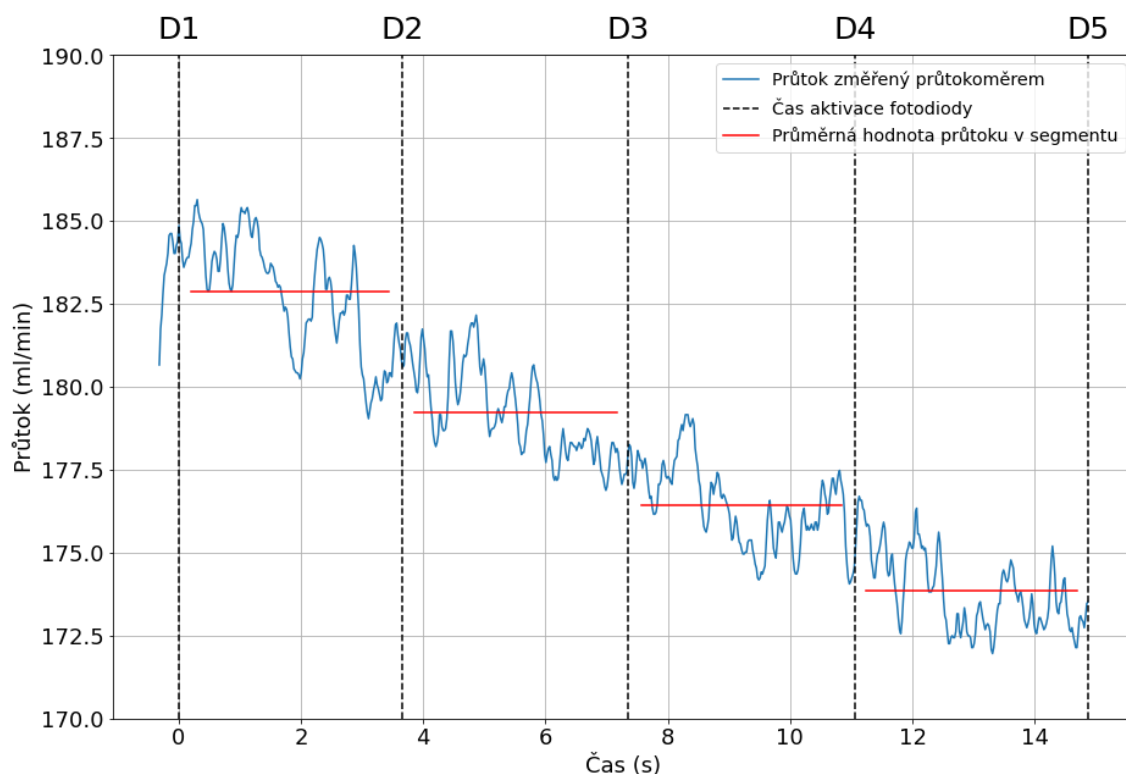
5.3 Laboratorní experiment

Tato kapitola se věnuje ověřování správnosti vyčítání průtoku pomocí fotodiod a řízení tlakem a samotné charakterizaci průtočného okruhu.

5.3.1 Ověření správnosti průtoků segmentů

Naměřené hodnoty průtoku byly zaznamenány do tabulky a deskriptivní statistikou zpracovány. Vyhodnocována byla maximální a minimální hodnota průtoku a jejich rozdíl. Dále byl vypočítán průměrný průtok a směrodatná odchylka. Takto zpracovaná data byla porovnávána mezi naměřenými průtoky fotodiodami a průtoky naměřené průtokoměrem. Hodnocení bylo provedeno pro tlaky 30 mmHg, 50 mmHg, 75 mmHg, 100 mmHg a 150 mmHg.

Obrázek 5.5 ukazuje graf ve kterém je názorně vyobrazeno zpracování dat. Naměřené kontinuální průtoky byly synchronizací poklesu průtoku a délky trvání jednotlivých segmentů fotodiod rozděleny na ekvivalentní časové úseky, ze kterých byla vypočtena průměrná hodnota průtoku, která byla následně porovnávána s vypočteným průtokem z času fotodiod.



Obrázek 5.5: Graf průtoku při provozním tlaku 100 mmHg.

V následujících tabulkách je uvedeno ukázkové zpracování dat pro tlak 30 mmHg. Zbylá data pro ostatní tlaky jsou uvedena v příloze C.

Tabulka 5.1: Průtoky vypočtené pomocí času z fotodiod. ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

Hodnoty naměřené pro levou a pravou stříkačku						
	Levý 1	Levý 2	Levý 3	Pravý 1	Pravý 2	Pravý 3
Segment 1	87,57	88,14	87,89	85,92	86,35	86,28
Segment 2	82,34	82,57	82,39	81,23	81,59	81,67
Segment 3	77,46	77,52	77,47	77,76	77,64	77,76
Segment 4	76,44	76,83	76,66	72,12	72,08	72,08
Minimum	76,44	76,83	76,66	72,12	72,08	72,08
Maximum	87,57	88,14	87,89	85,92	86,35	86,28
Rozdíl	11,13	11,31	11,23	13,79	14,26	14,2
Max-Min						
Průměr	80,96	81,26	81,11	79,26	79,41	79,45
Sm.	4,42	4,55	4,49	5,03	5,24	5,21
Odchylka						

Tabulka 5.2: Průtoky naměřené průtokoměrem. ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

Hodnoty naměřené pro levou a pravou stříkačku						
	Levý 1	Levý 2	Levý 3	Pravý 1	Pravý 2	Pravý 3
Segment 1	87,55	88,13	87,87	85,90	86,33	86,26
Segment 2	82,33	82,55	82,38	81,22	81,57	81,66
Segment 3	77,45	77,50	77,46	77,75	77,63	77,75
Segment 4	76,43	76,81	76,65	72,11	72,07	72,07
Minimum	76,43	76,81	76,65	72,11	72,07	72,07
Maximum	87,55	88,13	87,87	85,90	86,33	86,26
Rozdíl	11,12	11,31	11,23	13,79	14,26	14,19
Max-Min						
Průměr	80,94	81,25	81,09	79,24	79,40	79,43
Sm.	4,42	4,55	4,49	5,03	5,23	5,21
Odchylka						

Tabulky 5.3 a 5.4 znázorňují zpracování průměrných hodnot průtoků měřené fotodiodami a průtokoměrem. Obrázek 5.1 ukazuje graf ve kterém je názorně vyobrazeno zpracování dat.

Tabulka 5.3: Průměrné průtoky vypočtené pomocí času z fotodiod. ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

Hodnoty naměřené pro levou a pravou stříkačku						
	Levý		Pravý		Levý a Pravý	
	Průměr	Sm. od.	Průměr	Sm. od.	Průměr	Sm. od.
Segment 1	87,87	0,23	86,18	0,19	87,02	0,84
Segment 2	82,43	0,10	81,50	0,19	81,97	0,47
Segment 3	77,49	0,02	77,72	0,05	77,60	0,12
Segment 4	76,65	0,16	72,10	0,02	74,37	2,27
Minimum	76,65		72,10		74,37	
Maximum	87,87		86,18		87,02	
Rozdíl Max-Min	11,22		14,08		12,65	
Průměr	81,11		79,37		80,24	
Sm. odch.	4,49		5,16		4,75	

Tabulka 5.4: Průměrné průtoky naměřené průtokoměrem. ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

Hodnoty naměřené pro levou a pravou stříkačku						
	Levý		Pravý		Levý a Pravý	
	Průměr	Sm. od.	Průměr	Sm. od.	Průměr	Sm. od.
Segment 1	87,85	0,23	86,16	0,19	87,01	0,84
Segment 2	82,42	0,10	81,48	0,19	81,95	0,47
Segment 3	77,47	0,02	77,71	0,05	77,59	0,12
Segment 4	76,63	0,16	72,08	0,02	74,36	2,27
Minimum	76,63		72,08		74,36	
Maximum	87,85		86,16		87,01	
Rozdíl Max-Min	11,22		14,08		12,65	
Průměr	81,09		79,36		80,23	
Sm. odch.	4,48		5,16		4,75	

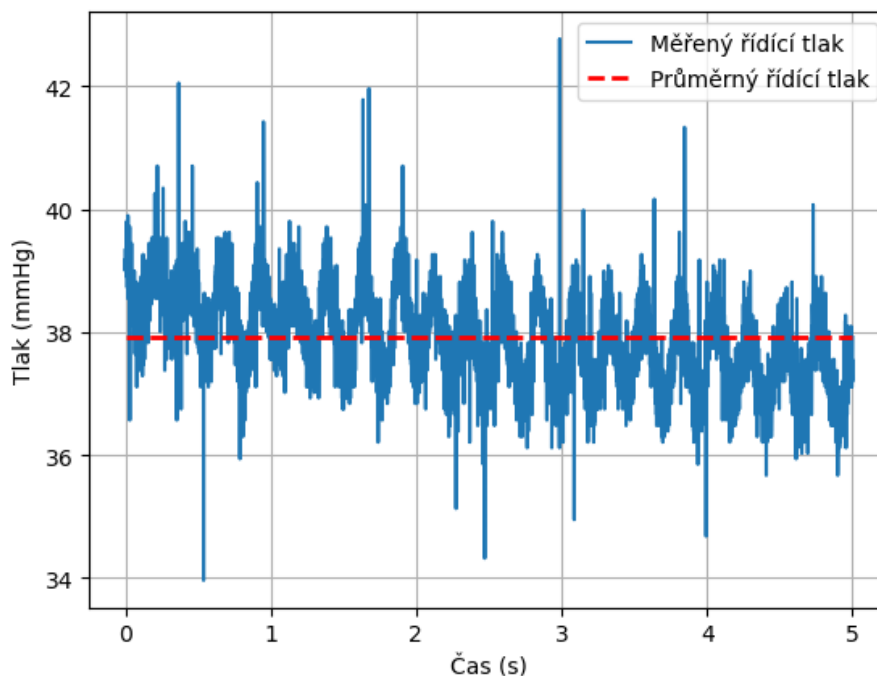
V tabulce 5.5 jsou hodnoty rozdílu průměrného průtoku naměřeného průtokoměrem a průměrného průtoku vypočteného ze změny času fotodiod pro všechny měřené tlaky.

Tabulka 5.5: Rozdíly průtoků průtokoměru a fotodiod pro jednotlivé tlaky.

Tlak [mmHg]	Rozdíl průměrných hodnot průtoků [ml/min]	Relativní chyba [%]
30	0,02	0,02 %
50	0,02	0,02 %
75	2,14	1,41 %
100	1,92	1,06 %
150	1,55	0,66 %

5.3.2 Ověření tlakových gradientů

Tlakové gradienty byly ověřovány pro požadované průtoky dle smykového napětí. Vizualizace dat je k vidění v obrázku 5.6.

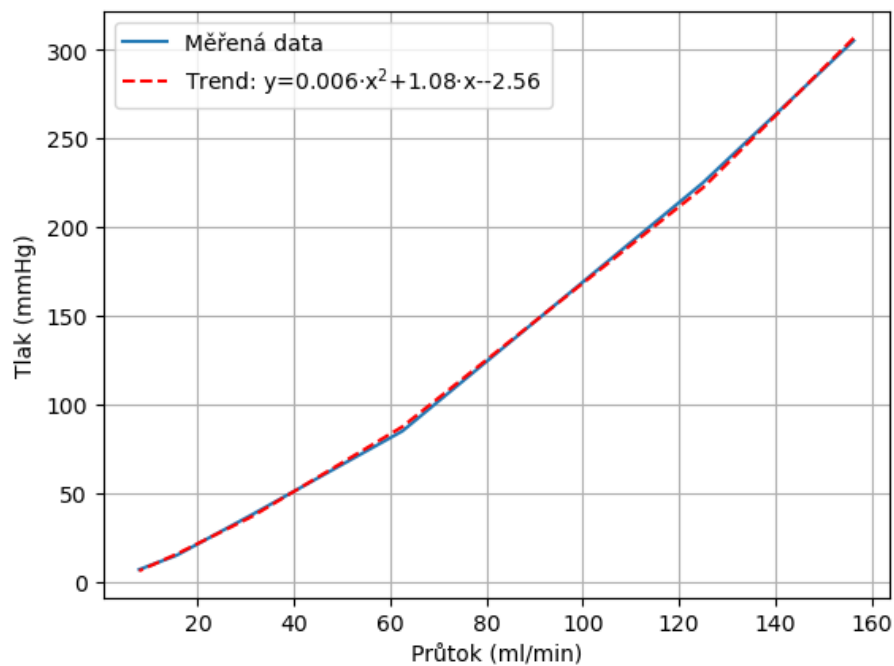


Obrázek 5.6: Graf měřeného tlaku při konstantním průtoku $31,25 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

V tabulce 5.6 jsou uvedeny všechny změřené řídicí tlaky pro požadované průtoky. Závislost tlaku na průtoku je vynesena do grafu v obrázku 5.7, naměřená data jsou proložena trendovou křivkou, z jejíž rovnice je možné dopočítat řídicí tlak pro nastavované průtoky.

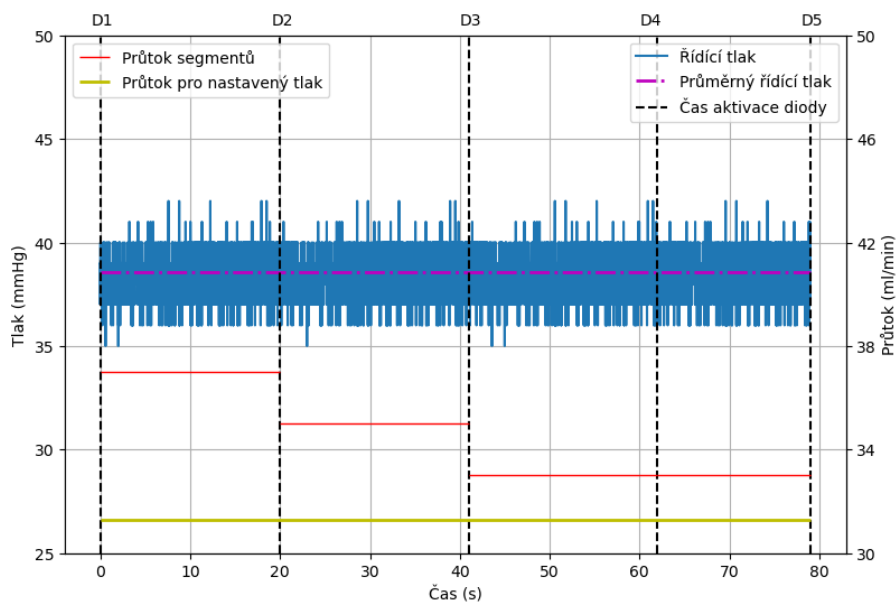
Tabulka 5.6: Naměřené řídicí tlaky.

Průtok ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)	Řídicí tlak (mmHg)
156,3	305
125	225
62,5	85
31,3	38
15,6	15
7,8	7



Obrázek 5.7: Graf závislosti řídicího tlaku a průtoku.

Po zjištění řídicích tlaků bylo provedeno reverzní řízení pomocí konstantního tlaku, při kterém byl měřený průtok. Vizualizace řídicích tlaků je uvedena v obrázku 5.8. V tabulce 5.7 jsou uvedeny změřené průtoky pro všechny řídicí tlaky a jejich popis deskriptivní statistikou.



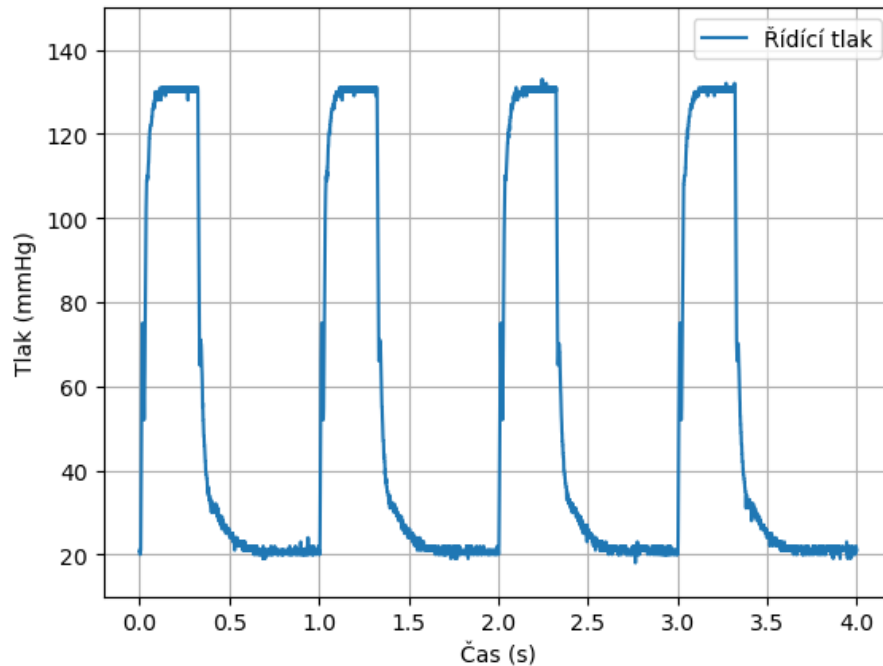
Obrázek 5.8: Graf měřeného průtoku při provozním tlaku 38 mmHg.

Tabulka 5.7: Naměřené průtoky jednotlivých řídicích tlaků.

Tlak (mmHg)	7	15	38	85	225	305
	Průtok ml·min ⁻¹					
Požadovaný průtok	7,8	15,6	31,3	62,5	125	156
Segment 1	12	20	37	65	129	160
Segment 2	10	19	35	63	127	159
Segment 3	7	18	33	62	124	160
Segment 4	5	16	33	61	130	158
Půměr	8,5	18,25	34,5	62,75	127,5	159,25
Max	12	20	37	65	130	160
Min	5	16	33	61	124	158
Max-min	7	4	4	4	6	2
Sm. odch.	3,11	1,71	1,91	1,71	2,65	0,96

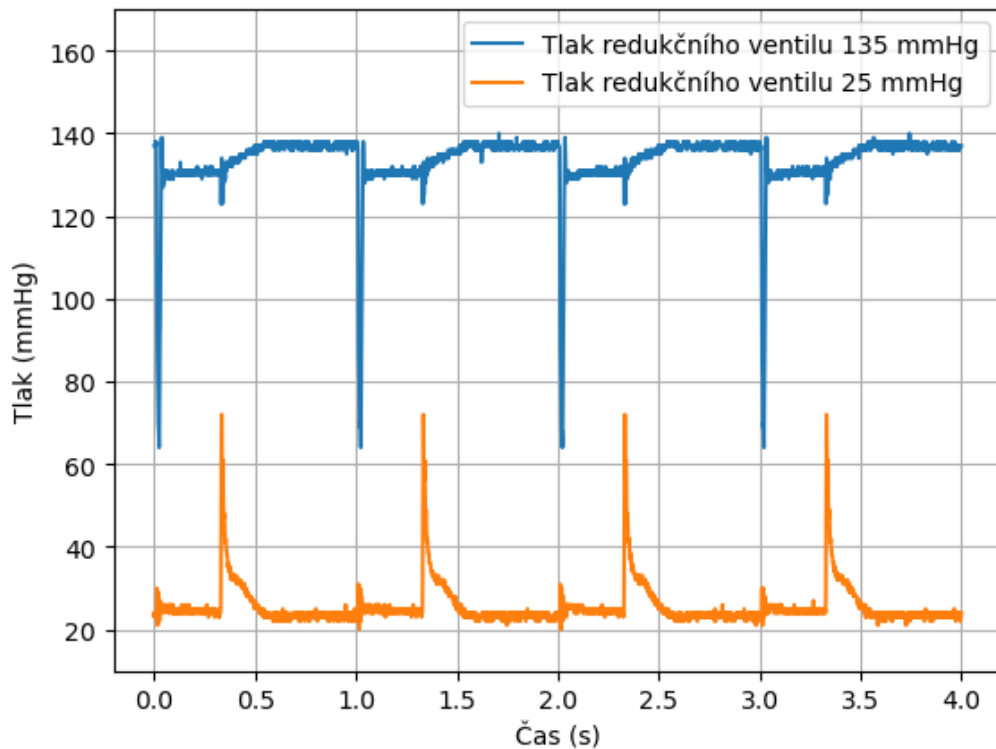
5.4 Pulzní režim

Měření pulzního režimu probíhalo v konfiguraci zapojení ventilů popsané v kapitole 4.8 s nastavením pulzu na délku periody $T = 1$ s a střídou pulzu $DCL = 40\%$. V obrázku 5.9 je časový průběh pulzního signálu, jehož hladiny jsou 130 mmHg a 20 mmHg.



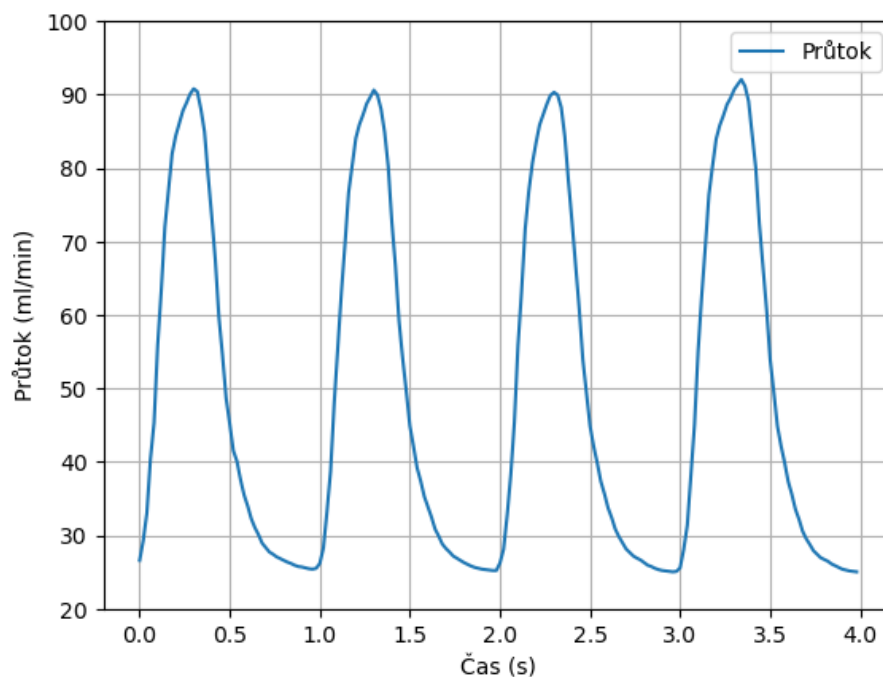
Obrázek 5.9: Graf obdélkového řídicího tlaku v čase.

V obrázku 5.10 jsou zobrazeny průběhy tlaků redukčních ventilů. Z grafu je viditelné, že při otevření ventilu (respektive přepnutí na vyšší tlak) v čase $t_1 = 0$ dojde k výraznému poklesu tlaku, pokud je připojený tlak vyšší. Pokud je připojený tlak nižší, jako je v čase $t_2 = 0,4$, dojde k jeho nárůstu. Při přepnutí ventilu v čase $t_2 = 0,4$ dochází k postupnému obnovování nastaveného tlaku až do času $t_3 = 0,5$. Dynamický tlak při otevřeném stavu je mírně nižší než statický tlak při zavřeném ventilu.



Obrázek 5.10: Graf tlaků redukčních ventilů v čase.

Obrázek 5.11 ukazuje průběh průtoku v pulzním režimu v čase. Průtok má integrační charakter. Velikost průtoku však neodpovídá nastavenému řídicímu tlaku. Sestavený okruh měl rozdílný průtočný odpor z důvodu začlenění ultrazvukového průtokoměru do okruhu. Řídící hladiny pulzů tedy nejdou nastavovat dle závislosti tlaku a průtoku uvedeného v obrázku 5.7.

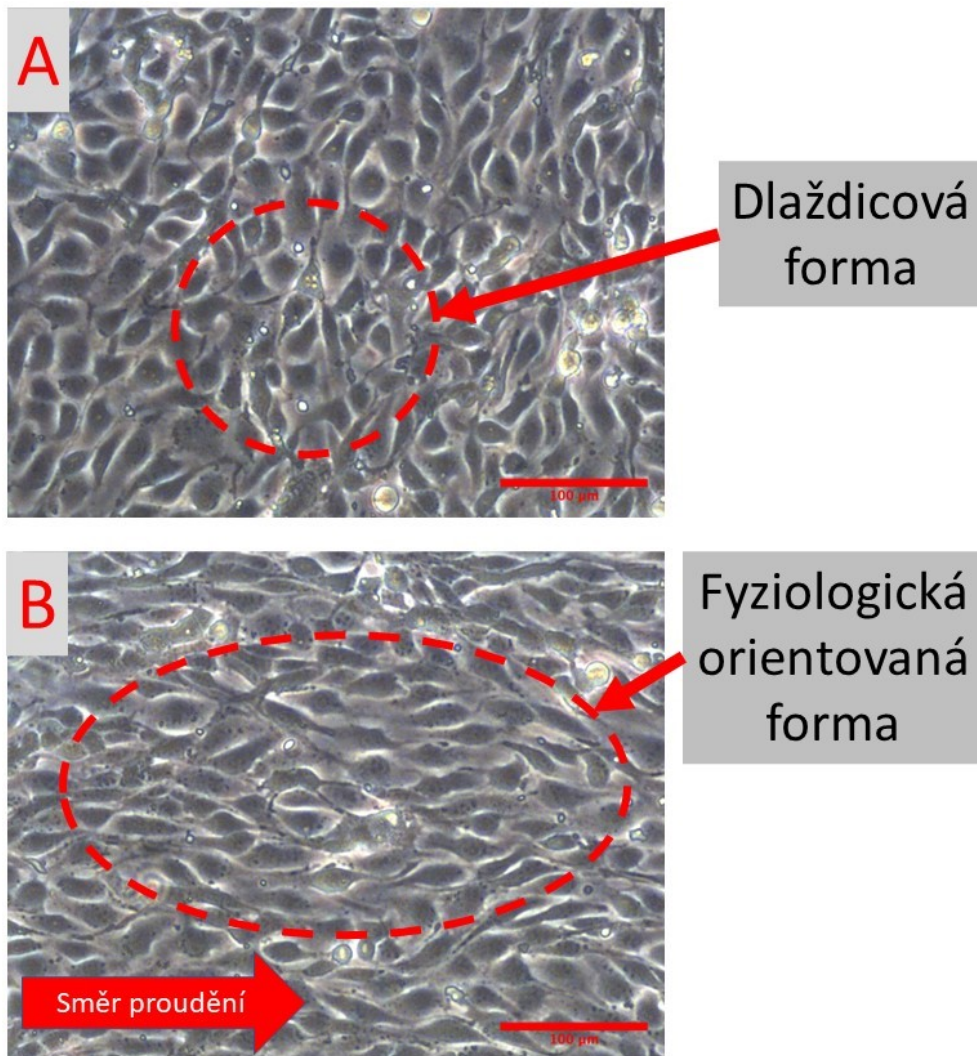


Obrázek 5.11: Graf průtoku pulzního řízení v čase.

5.5 Buněčný experiment

Kultivační komora používala mikroskopické sklo rozměru 26 x 76 mm jako základní substrát. Pro zvýšení schopnosti adheze buněk byl na tyto skla sorpčně navázán myší kolagen typu 1 (Sigma). V buněčném experimentu byla použita linie myšího pankreatického endotelu MS-1 kultivovaná v médiu DMEM/F12 (Gibco) s přidavkem 10% fetálního séra a 1% roztoku antibiotik a antimykotik (penicilin, streptomycin a amfotericin B, Gibco). Po sestavené celého okruhu, jeho zaplavení kultivačním médiem byly odstraněny veškeré bubliny v hadicích a komoře. Poté byla kultura endotelu vstříknuta do komory přes sterilní septum.

Po nasazení buněk bylo zastaveno proudění po dobu 30 minut nutných pro iniciační adhezi buněk na sklo v komoře. Poté byl postupně zvedán průtok (a zároveň s ním smykové napětí) v krocích 2, 5, 10 dynů·cm⁻² ve 2hodinových intervalech a poté po 3 hodinách byla zátěž zvýšena na 15 dynů·cm⁻² a za další 3 hodiny na finálních 20 dynů·cm⁻². Celková doba kultivace byla 36 hodin.



Obrázek 5.12: Mikroskopický snímek endotelových buněk ve fázovém kontrastu při statické (A) a dynamické kultivaci (B). Ve statických podmínkách (A) endotel tvoří dlaždicovou formu, kdežto v dynamických (B) je orientován ve směru proudění. Mikroskop ThorLabs CERNA s objektivem Olympus UPlanFL N 20x, CCD kamera Imaging Source, měřítko v obrázku 100 µm. Fotografie: autor.

6 Diskuse

Výsledky práce prokázaly, že vytvořená sestava dokáže řídit perfuzi v okruhu pro kultivaci buněčných tkání. Vytvořená platforma dokáže ovládat cirkulaci bez rázových vln, a proto je řízení přesné a lze ho regulovat.

Cíl zhotovení konstrukce pro upevnění okruhu pro řízenou cirkulaci byl splněn. Vytvořená konstrukce splňuje požadavky pro vyčítání hladiny kultivačního média a tedy i kontrolu průtoku bez nutnosti zapojení průtokoměru v okruhu. V konstrukci jsou zhotoveny díry pro přišroubování elektroniky. Tento prvek usnadňuje manipulace s platformou, jelikož při instalaci nikde nepřekáží propojovací kabely. Navíc upevnění ve výšce chrání elektroniku před zničením při úniku kapaliny z okruhu. Ke konstrukci jsou dále připojeny servomotory, které přesně doléhají unašeči na třicícné ventily a mohou tak přesně ovládat směr cirkulace oběhové kapaliny. Konstrukce je maximálně zmenšena, její pevnost je dostačující, plné stěny upevnění stříkaček zabráňují průniku okolního světla na fotodiody a tím ovlivnění měření hladiny kultivačního media.

Druhý cíl zhotovení hardwaru a softwaru byl také splněn. Desky plošných spojů pro LED diody a fotodiody fungují dostatečně pro jejich aplikaci. Vylepšení je možné, a to například optimalizací vedení cest. Dále by bylo vhodné uzemnit nevyužité vstupy a výstupy jednoho z komparátorů, jelikož se na nich může indukovat rušení, které může ovlivnit jeho činnost. Deska pro osazení Arduinem je připravena pro možné zpracování jiných signálů, jelikož na konektory byly přivedeny i nevyužité piny. Pokud by servomotory byly schopny pracovat i při napětí 5 V, bylo by možné takovýmto napětím napájet i Arduino, tím by byla odstraněna nutnost napájení USB kabelem. Software je připravený na další optimalizace. Do řídicího kódu je možné začlenění dalších prvků jako je například automatizace pulzního režimu.

Laboratorní ověření prokázalo, že systém je schopný spolehlivě měřit průtok cirkulační kapaliny. Naměřené průtoky se lišily minimálně. To dokazuje tabulka 5.5, ve které je vidět, že rozdíly průtoků mezi naměřenými hodnotami fotodiodami a průtokoměru se neliší o více než $2,14 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Největší limitace řešení výčtem hladiny kultivačního média pomocí optických prvků je rozptyl paprsků a sepnutí diody v moment, kdy je úroveň hladiny média v její úrovni. Nicméně měření prokázalo, že tyto limitace nejsou problém. I přes to je třeba dbát na to, aby stříkačky použité jako zásobník media byly čisté a na jejich povrchu nic nebránilo průniku světelný paprsku LED diody. Rozdíl maximálního a minimálního průtoku mezi jednotlivými segmenty je $10 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Tento rozdíl může být způsoben gravitačním spádem, jelikož při průtoku kultivačního média se hladina snižuje a tím pádem se snižuje i tlak sloupce kapaliny. V navazující práci by bylo vhodné tlak vodního sloupce kompenzovat softwarově. Dále může být rozdíl způsoben množstvím prošlého plynu redukčním

ventilem nebo objemem plynu ve stříkačce. S rostoucím objemem plynu klesá tlak a tím pádem se snižuje i průtok. Pro zjištění důvodu této vlastnosti systému je třeba změřit křivku tlaku.

Při měření řídicích tlaků pomocí generátoru konstantního tlaku a následného reverzního tlakového řízení vznikal problém, že řídicí tlak pro malé průtoky byl příliš nízký na to, aby dokázal přetlačit tlak vznikajícího vodního v druhé zásobníkové kartuši. Tento problém lze řešit softwarovou kompenzací nebo zvětšením průtočného odporu průtočného okruhu. Jelikož je kompenzace pro různé průtoky jiná, byla zvolena cesta zvýšení průtočného odporu. V systému byl použit průtočný odpor o průměru 1,5 mm a 1 mm. Tyto odpory se ukázaly jako nedostatečné, proto byla do systému zakomponovaná tenká hadice o délce 10 cm. Takto zvětšený odpor okruhu výrazně zvedl řídicí tlak pro nejnižší požadovaný průtok $q = 7,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a to z 2 mmHg na 7 mmHg.

Měření pulzního režimu potvrdilo předpokládaný integrační charakter průtoku. Nastavené hladiny tlakových pulzů udržují průtok v maximálních hodnotách dle měření uvedeném v obrázku 5.7. Výkyvy redukčních ventilů při přepínání polohy 3/2 ventilu nemají na řízení průtoku vliv pro vyšší hodnoty střídy pulzu. Pokud by byla střída pulzu nízká, je možné, že redukční ventil by nedokázal uregulovat požadovanou hodnotu tlaku. Při nízké střídě pulzu by nedošlo ani k dovršení integrační křivky a tedy dosažení požadovaného průtoku.

Vytvořený průtočný okruh byl inspirován systémem ibidi. Vytvořený systém má větší zásobník kultivačního média o 10 ml, při dlouhodobějších experimentech je větší objem média výhodou. Navržený systém má namísto ventilů, které zaškrcují hadice při změně směru průtoku trojcestné kohouty, které se natáčejí dle požadovaného směru průtoku. Trojprvková soustava kohoutů je k dostání sterilní a je jednorázová, výhodou použití jednorázových ventilů je v nižším opotřebení během experimentu. Navržený byl ověřený pro rozsah průtoků $7,8 - 156,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a smykového napětí $2 - 30 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$. Systém ibidi pracuje v nižším rozsahu průtoků ($0,1 - 10 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) a vyšším rozmezí smykového napětí ($0,1 - 20 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$) [16]. Výraznou výhodou vytvořeného systému je možné přizpůsobení okruhu pro požadovanou aplikaci. Na základě experimentu s myším endotelem byla ověřena stejná funkce vytvořeného systému jako u systému ibidi.

Jak je patrné z obrázku 5.12, tak ve statických podmínkách endotel vykazuje nefyziologickou dlaždicovou formu (pro cévní endotel). Při kultivaci v reaktoru došlo k postupné orientaci endotelu a změny jeho morfologie v protáhlou formu, která se orientovala ve směru proudění, což je typický znak pro cévní endotel vystavený smykovému napětí a je klíčový z hlediska jeho fenotypu a správné funkce.

7 Závěr

Cílem této práce bylo vytvořit okruh pro řízenou perfuzi s tlakovou vlnou pro tubulární tkáň v kultivační komoře včetně implementace vyčítání tlaku a průtoku a softwarového řešení.

Navržená konstrukce splňuje požadavky pro ovládání perfuze kultivačního média. Materiály použité pro utěsnění stříkaček jsou hodné pro maximální utěsnění a tedy minimální ovlivnění řízeného tlaku. Servomotory ovládají trojcestné kohouty a řídí směr cirkulace media. Sestava dokáže pracovat kontinuálně, což ušetří velkou část času při experimentech.

Vytvořený software umožňuje ovládání servomotorů a řízení celého experimentu. Rychlost programu je dostačující. Pro implementaci softwaru do jiných aplikací se stavy je vhodná optimalizace zdrojového kódu a úprava kódu pro kompatibilitu s jinými systémy. Hardware, který byl vytvořen a splňuje požadavky na sterilní monitorování průtoku. V navazující práci by bylo vhodné vytvoření krytu desek plošných spojů a tím zamezení rušení přenášených signálů vnějšími vlivy.

Laboratorním experimentem byly naměřeny průtoky a tlakové gradienty v okruhu cirkulace. Průtoky byly porovnány s naměřenými hodnotami průtokoměrem. Tlakové gradienty byly ověřeny shodnými výsledky objemového a tlakového řízení. Při používání platformy lze využívat hodnoty průtoků naměřené fotodiodami k nastavování řídicích tlaků. Systém je připraven pro aplikaci do buněčných experimentů.

Systém byl rozšířen o pulzní režim, ve kterém lze nastavit délku periody a střihu pulzu. Tlakové ventily jsou schopny dostatečně rychle přepínat mezi jednotlivými pozicemi, aby se řídicí signál dal považovat za obdélníkový. Změřené průtoky odpovídají hladinám pulzu.

Platforma byla otestována kultivačním buněčným experimentem s buněčnou linií MS-1 v PFFC komoře. Výsledky experimentu prokázaly, že vytvořený systém je schopný zajistit dostatečný průtok okruhem pro požadované smykové napětí a ovlivnit tak růst kultivovaných buněk.

Seznam použité literatury

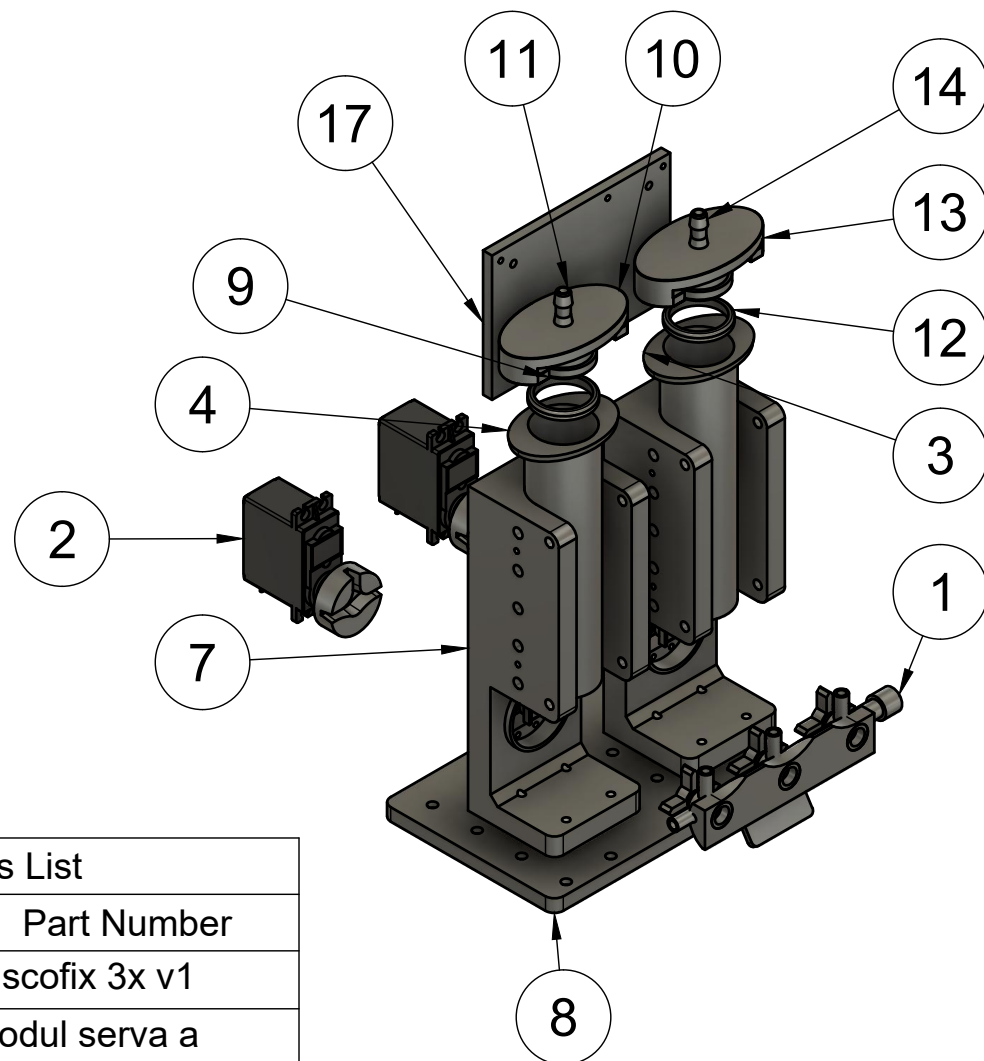
1. MATĚJKA, Roman; KOŇAŘÍK, Miroslav; ŠTĚPANOVSÁ, Jana; LIPENSKÝ, Jan; CHLUPÁČ, Jaroslav; TUREK, Daniel; PRAŽÁK, Šimon; BROŽ, Antonín; ŠIMŮNKOVÁ, Zuzana; MRÁZOVÁ, Iveta et al. Bioreactor processed stromal cell seeding and cultivation on decellularized pericardium patches for cardiovascular use. *Applied Sciences*. 2020, roč. 10, č. 16, s. 5473. Dostupné z DOI: [10.3390/app10165473](https://doi.org/10.3390/app10165473).
2. BACA KOVA, Lucie; TRAVNICKOVA, Martina; FILOVA, Elena; MATEJKA, Roman; STEPANOVS KA, Jana; MUSILKOVA, Jana; ZARUBOVA, Jana. Vascular smooth muscle cells (VSMCS) in blood vessel tissue engineering: The use of differentiated cells or stem cells as VSMC precursors. *Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field*. 2018. Dostupné z DOI: [10.5772/intechopen.77108](https://doi.org/10.5772/intechopen.77108).
3. *Těsnící prvky*. Rubena, 2015. Dostupné také z: <https://www.rubena.eu/underwood/download/files/tesnici-prvky.pdf>.
4. STEPANOVS KA, Jana; SUPOVA, Monika; HANZALEK, Karel; BROZ, Antonin; MATEJKA, Roman. Collagen Bioinks for bioprinting: A systematic review of hydrogel properties, bioprinting parameters, protocols, and bioprinted structure characteristics. *Biomedicines*. 2021, roč. 9, č. 9, s. 1137. Dostupné z DOI: [10.3390/biomedicines9091137](https://doi.org/10.3390/biomedicines9091137).
5. BACA KOVA, Lucie; PAJOROVA, Julia; TOMKOVA, Maria; MATEJKA, Roman; BROZ, Antonin; STEPANOVS KA, Jana; PRAZAK, Simon; SILJANDER, Sanna; KALLIO, Pasi. Applications of nanocellulose/nanocarbon composites: Focus on biotechnology and medicine. *Nanomaterials*. 2020, roč. 10, č. 2, s. 196. Dostupné z DOI: [10.3390/nano10020196](https://doi.org/10.3390/nano10020196).
6. CHLUPAC, Jaroslav; MATEJKA, Roman; KONARIK, Miroslav; NOVOTNY, Robert; SIMUNKOVA, Zuzana; MRAZOVA, Iveta; FABIAN, Ondrej; ZAPLETAL, Milan; PULDA, Zdenek; LIPENSKY, Jan Falk et al. Vascular remodeling of clinically used patches and decellularized pericardial matrices recellularized with autologous or allogeneic cells in a porcine carotid artery model. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, roč. 23, č. 6, s. 3310. Dostupné z DOI: [10.3390/ijms23063310](https://doi.org/10.3390/ijms23063310).
7. MATĚJKA, Roman. *Autonomní systém pro udržení biofyzikálních podmínek potřebných pro kultivaci biologických kultur in vitro*. 2020. Dostupné také z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/123697>. Disertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav lékařské biofyziky a lékařské informatiky 3. LF UK.

8. TOPPER, James N.; GIMBRONE JR, Michael A. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Molecular Medicine Today*. 1999, roč. 5, č. 1, s. 40–46. Dostupné z DOI: [10.1016/s1357-4310\(98\)01372-0](https://doi.org/10.1016/s1357-4310(98)01372-0).
9. LI, Yi-Shuan J.; HAGA, Jason H.; CHIEN, Shu. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *Journal of Biomechanics*. 2005, roč. 38, č. 10, s. 1949–1971. Dostupné z DOI: [10.1016/j.jbiomech.2004.09.030](https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.09.030).
10. CHABANON, Morgan; DUVAL, Hervé; GRENIER, Jérôme; BEAUCHESNE, Claire; GOYEAU, Benoit; DAVID, Bertrand. Histological Method to Study the Effect of Shear Stress on Cell Proliferation and Tissue Morphology in a Bioreactor. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2019, roč. 16, č. 3, s. 225–235. Dostupné z DOI: [10.1007/s13770-019-00181-3](https://doi.org/10.1007/s13770-019-00181-3).
11. SHI, Jia; WU, Bin; LI, Shihao; SONG, Jinchun; SONG, Bin; LU, Wen F. Shear stress analysis and its effects on cell viability and cell proliferation in drop-on-demand bioprinting. *Biomedical Physics & Engineering Express*. 2018, roč. 4, č. 4, s. 045028. Dostupné z DOI: [10.1088/2057-1976/aac946](https://doi.org/10.1088/2057-1976/aac946).
12. BAI, Ke; HUANG, Yan; JIA, Xiaoling; FAN, Yubo; WANG, Wen. Endothelium oriented differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under chemical and mechanical stimulations. *Journal of Biomechanics*. 2010, roč. 43, č. 6, s. 1176–1181. Dostupné z DOI: [10.1016/j.jbiomech.2009.11.030](https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.11.030).
13. FISCHER, Lauren J.; MCILHENNY, Stephen; TULENKO, Thomas; GOLESORKHI, Negar; ZHANG, Ping; LARSON, Robert; LOMBARDI, Joseph; SHAPIRO, Irving; DIMUZIO, Paul J. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: Effects of endothelial cell growth supplement and Shear Force. *Journal of Surgical Research*. 2009, roč. 152, č. 1, s. 157–166. Dostupné z DOI: [10.1016/j.jss.2008.06.029](https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.06.029).
14. RUEL, J.; LEMAY, J.; DUMAS, G.; DOILLON, C.; CHARARA, J. Development of a parallel plate flow chamber for studying cell behavior under pulsatile flow. *ASAIO J.* 1995, roč. 4, č. 41.
15. CELLIX. *Cellix, VenaFlux Elite*. 2021. Dostupné také z: <https://www.wearecellix.com/product-page/venaflux-elite>.
16. IBIDI. *ibidi, Pump System*. 2023. Dostupné také z: <https://ibidi.com/pump-system/112-ibidi-pump-system.html>.
17. *Instruction Manual ibidi Pump System*. Ibidi, 2022. Dostupné také z: https://ibidi.com/img/cms/products/instruments/I_1090X_PumpSystem/IN_1090X_pump_system.pdf.
18. *Standard LED*. Farnell multicom, 2015. Dostupné také z: <https://www.farnell.com/datasheets/1498852.pdf>.

19. *Silicon PIN Photodiode BPV10*. Vishay, 2023. Dostupné také z: <https://www.vishay.com/docs/81502/bpv10.pdf>.

Příloha A: Technické výkresy

- Výkres číslo 1 - Držák stříkaček
- Výkres číslo 2 – Utěsnění vstupu
- Výkres číslo 3 – D těsnění
- Výkres číslo 4 – Držák desek plošných spojů
- Výkres číslo 5 – Držák uchycení stříkaček

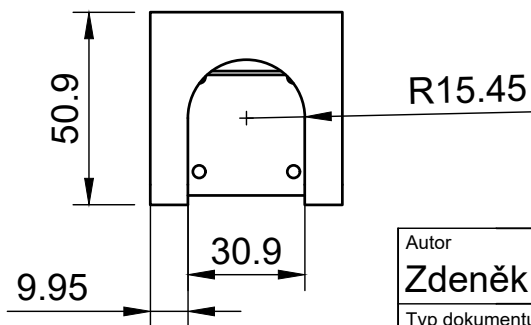
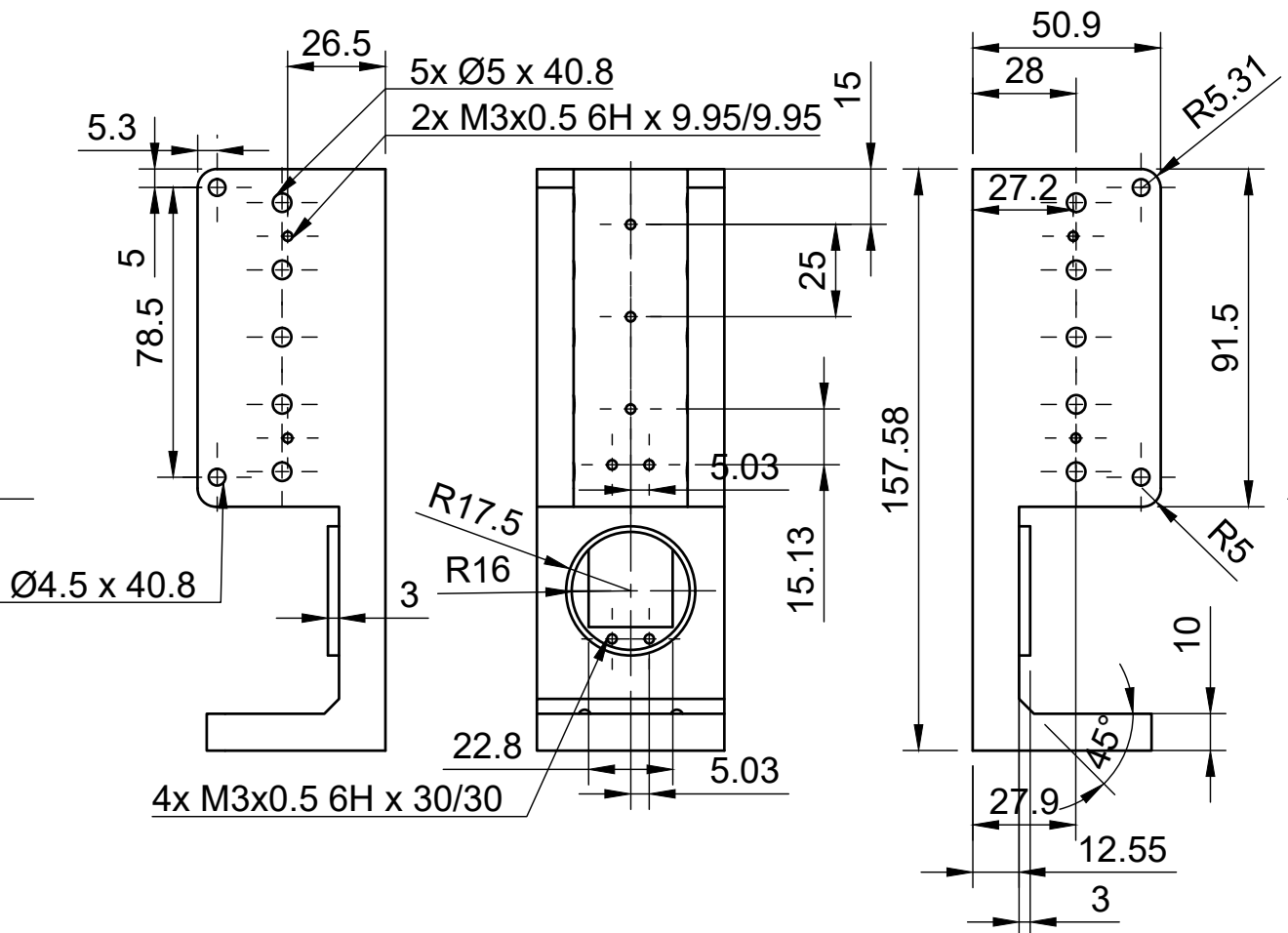
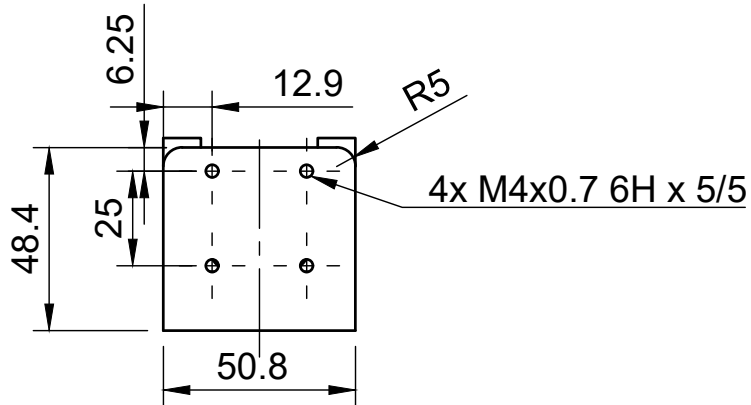


Parts List

Item	Qty	Part Number
1	1	Discofix 3x v1
2	2	Modul serva a unasecu
3	1	Strikacka BBraun v3
4	1	Strikacka BBraun v3 (1)
7	2	Upevneni strikacky s polem diod
8	1	Pripevneni drzaku
9	1	D tesneni
10	1	Utesneni vstupu pro D tesneni
11	1	Trn hadice 4 v0.2 v2 (2)
12	1	D tesneni (1)
13	1	Utesneni vstupu pro D tesneni (1)
14	1	Trn hadice 4 v0.2 v2 (3)
17	1	Drzak desek

Strana
1/5

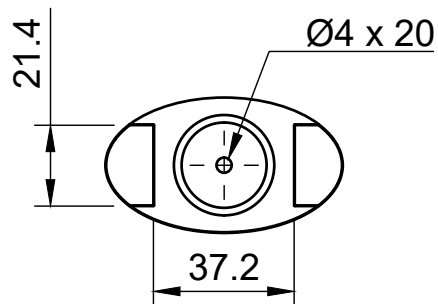
Autor	Zdeněk Kukla	15.5.2023
Typ dokumentu		
Název	Pumpa 2x BBraun 50 ml servo v0.2 spojená	



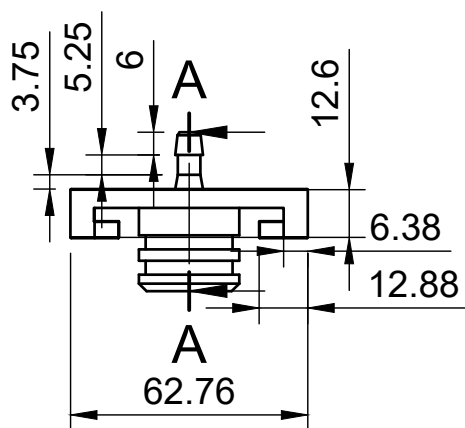
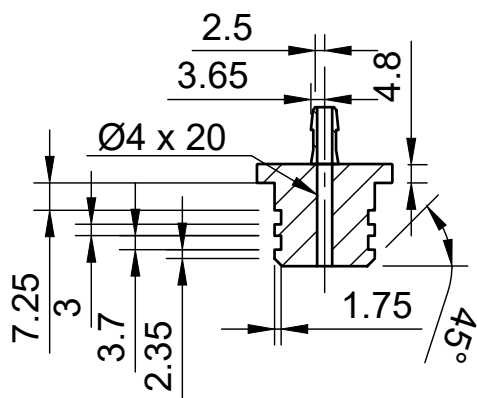
Strana
2/5

Autor
Zdeněk Kukla
15.5.2023
Typ dokumentu

Název
Drzak strikacek



A-A (1:2)



Sheet

3/5

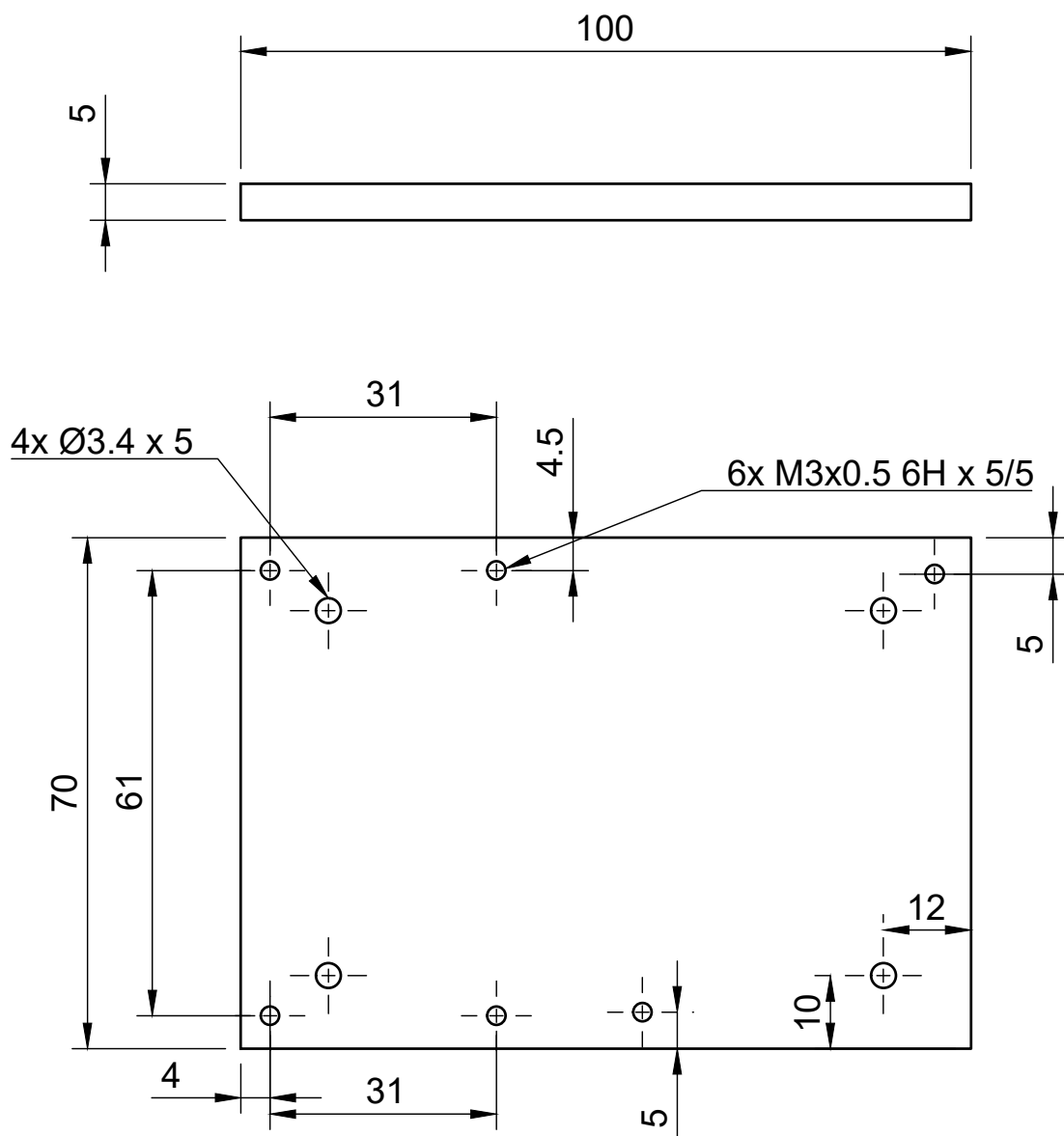
Autor

Zdeněk Kukla 15.5.2023

Typ dokumentu

Název

Utesneni vstupu



Strana

4/5

Autor

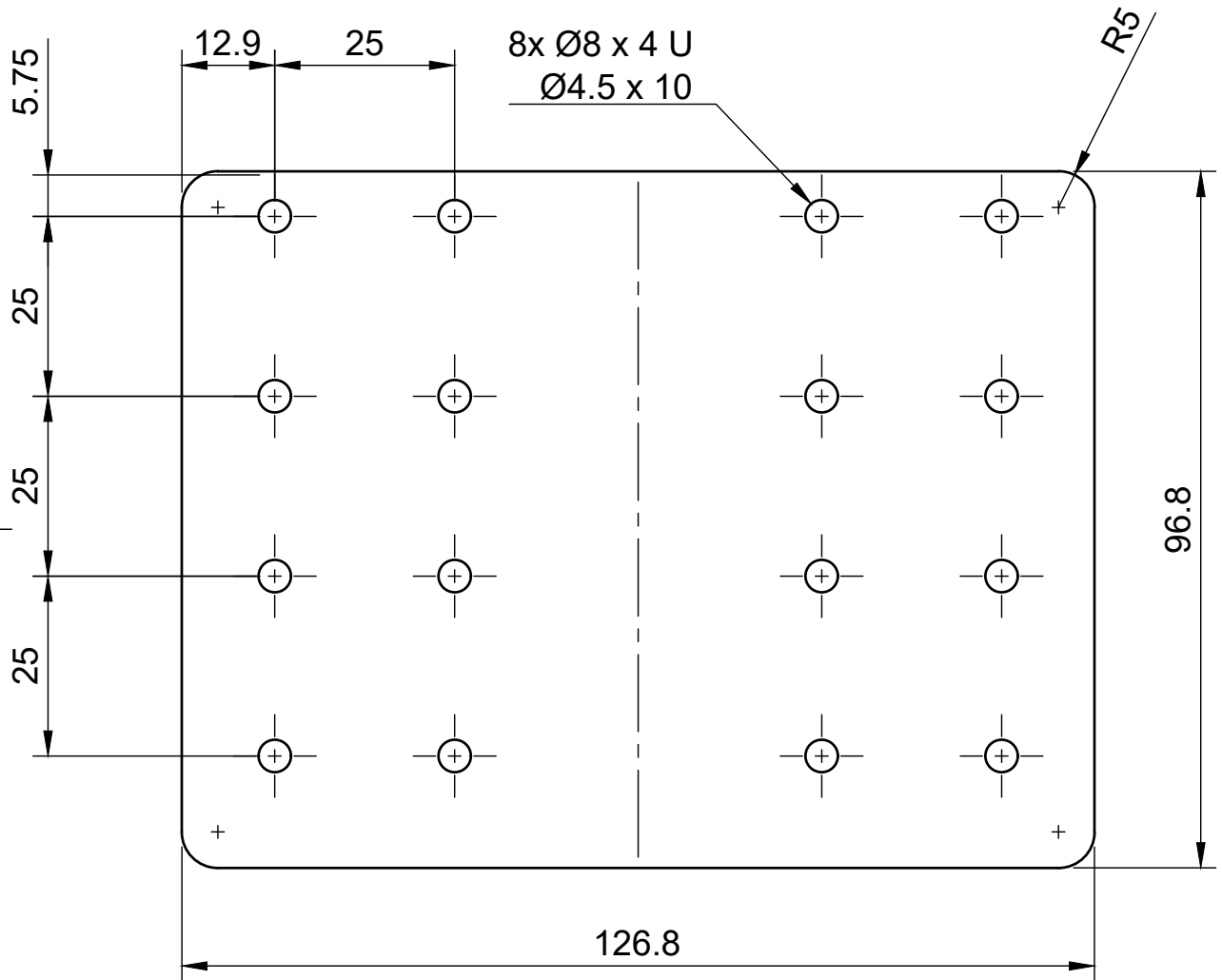
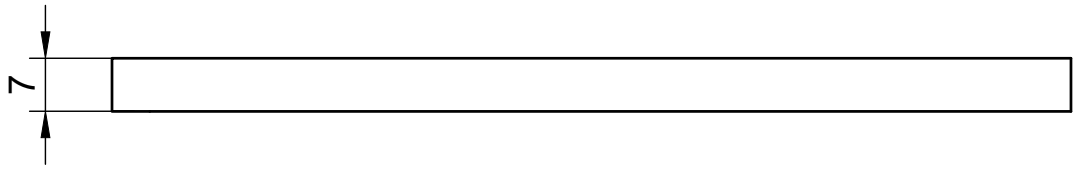
Zdeněk Kukla

15.5.2023

Typ dokumentu

Název

Drzak desek plosnch spoju



Příloha B: Schémata a návrh desek plošných spojů

Deska plošných spojů LED

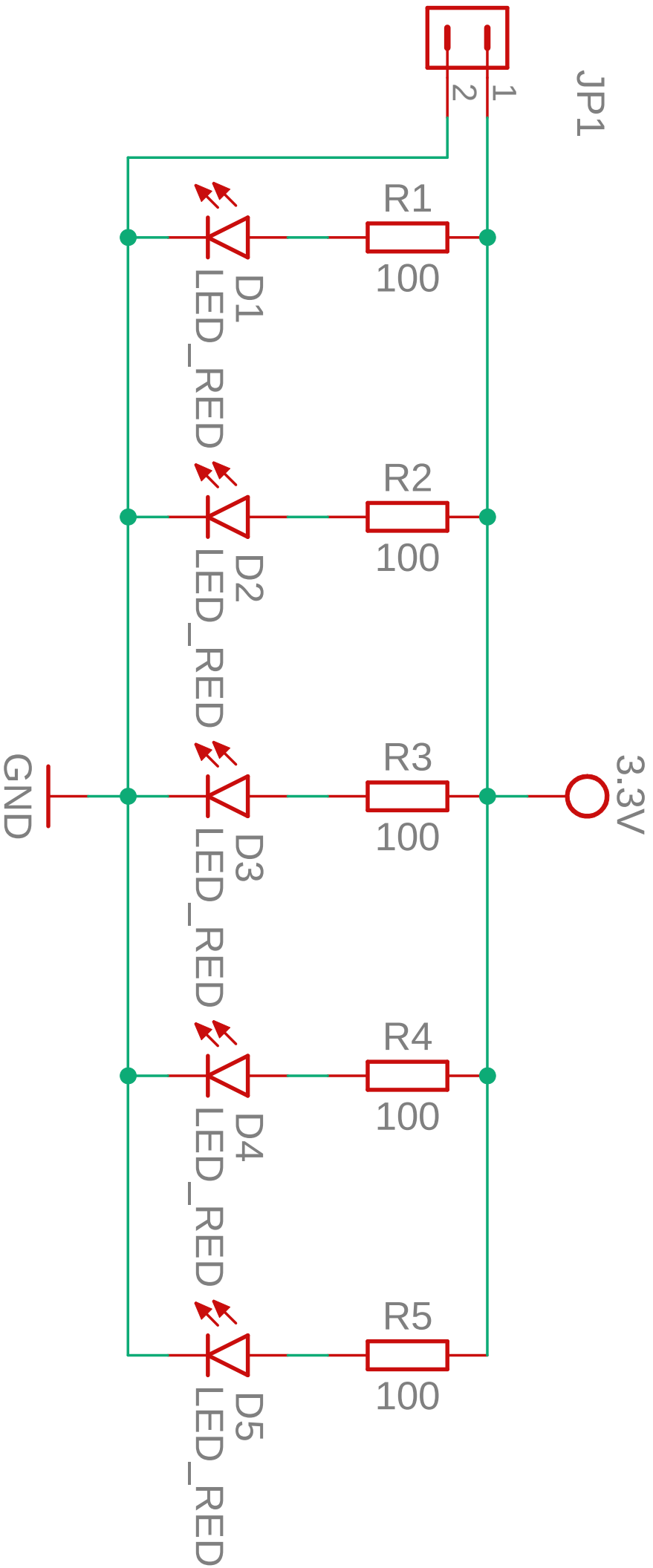
- Schéma zapojení
- Návrh desky plošných spojů

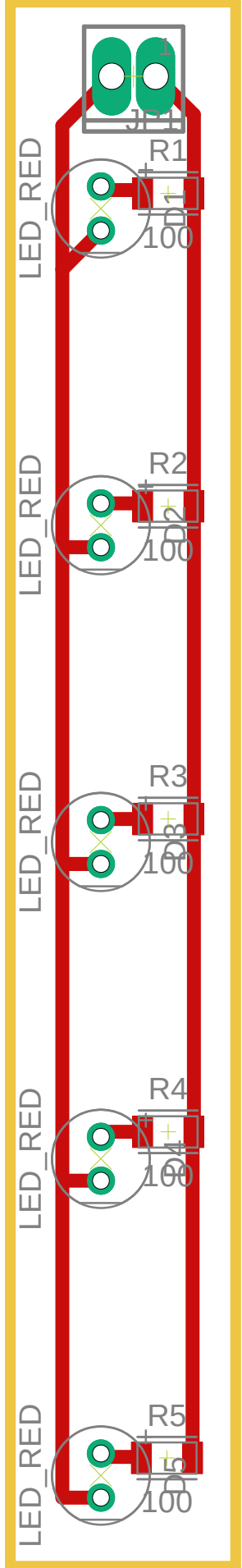
Senzorická deska plošných spojů s fotodiodami

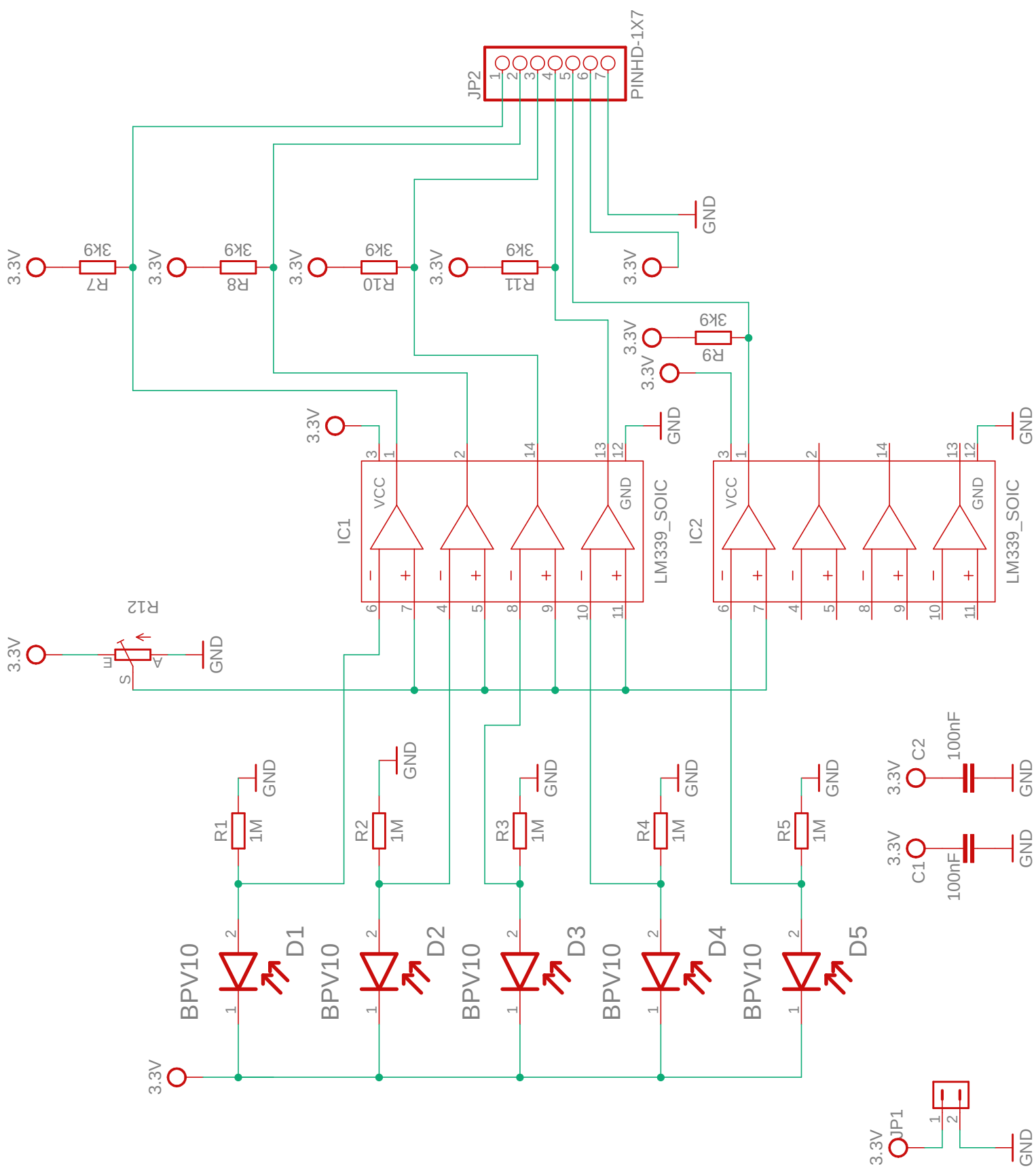
- Schéma zapojení
- Návrh desky plošných spojů

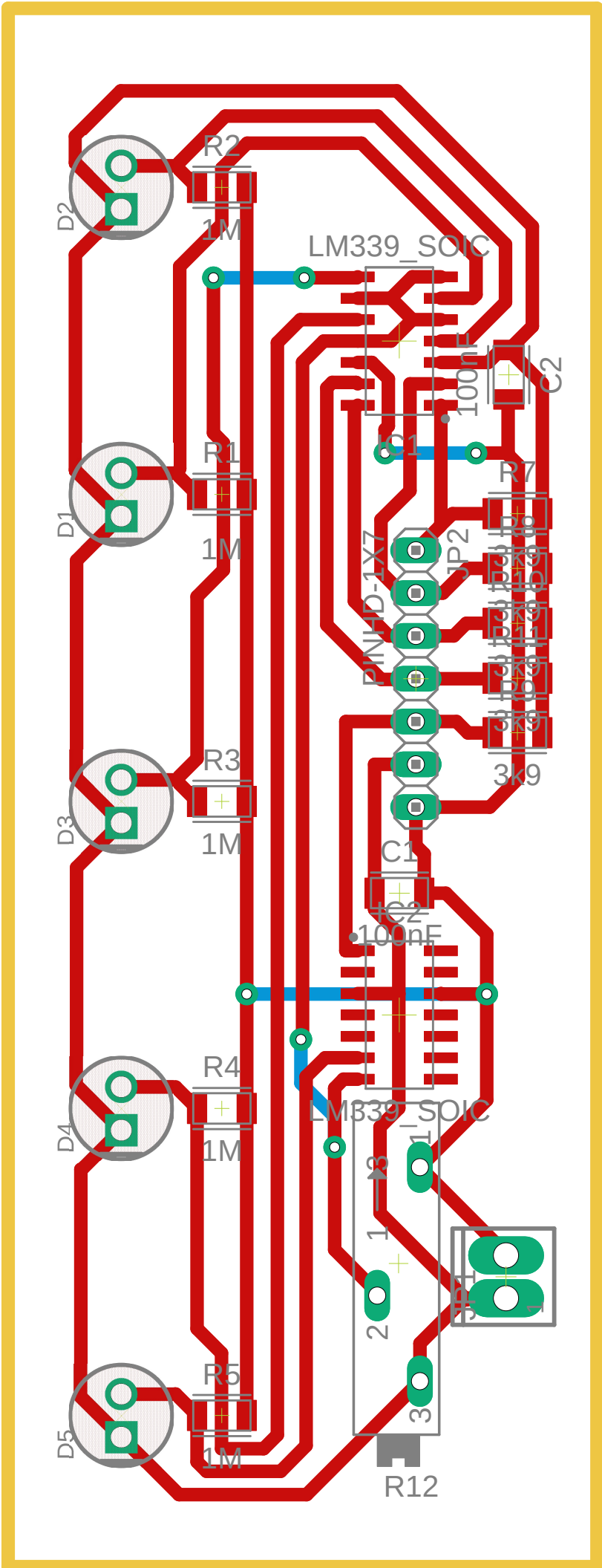
Deska plošných spojů Arduino Nano Every

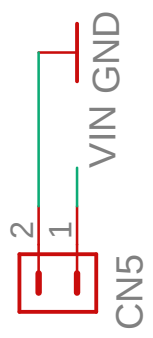
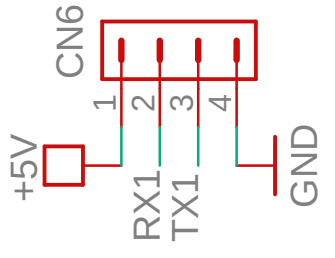
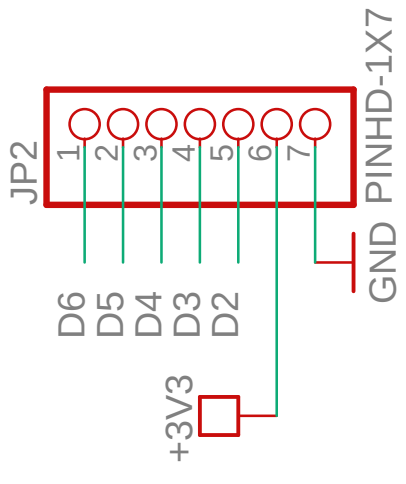
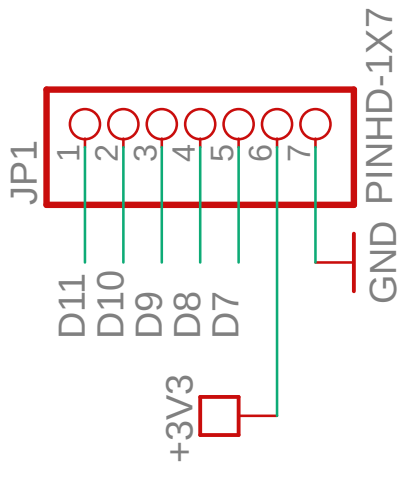
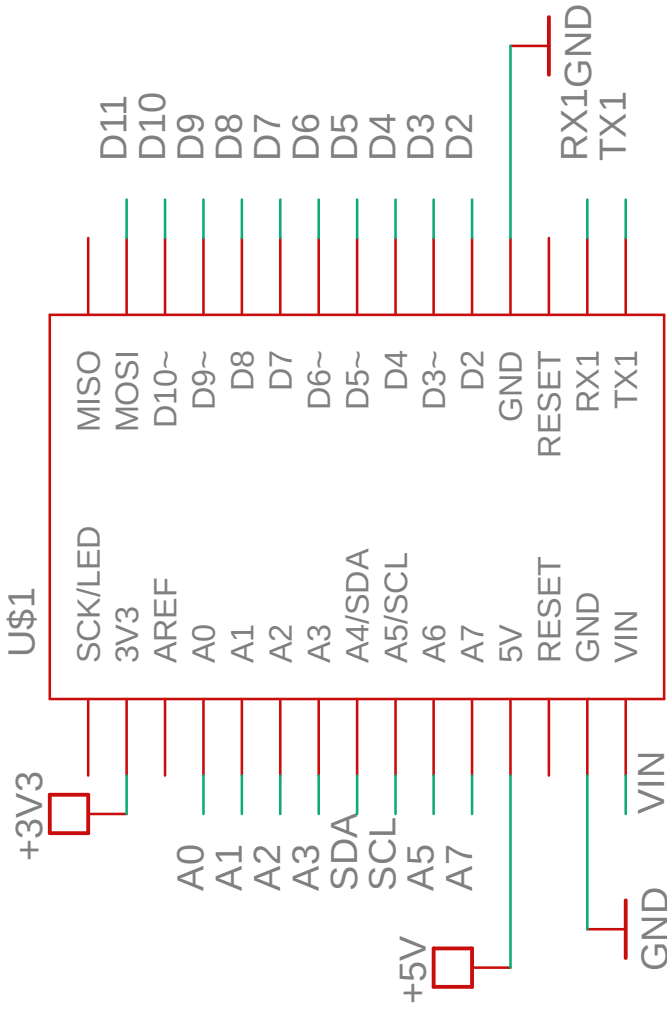
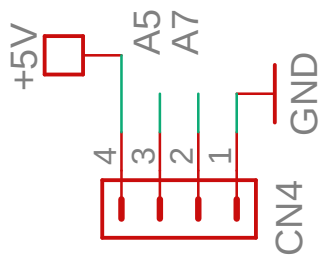
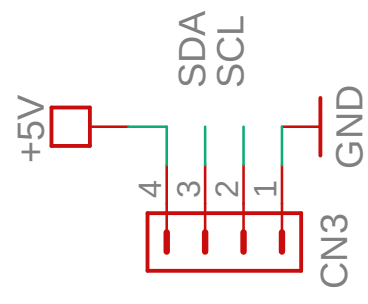
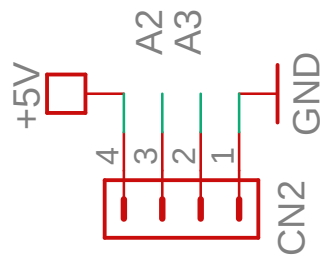
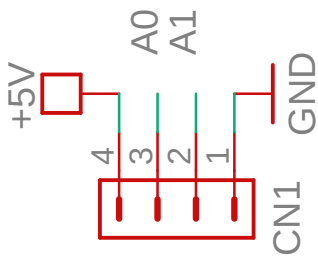
- Schéma zapojení
- Návrh desky plošných spojů

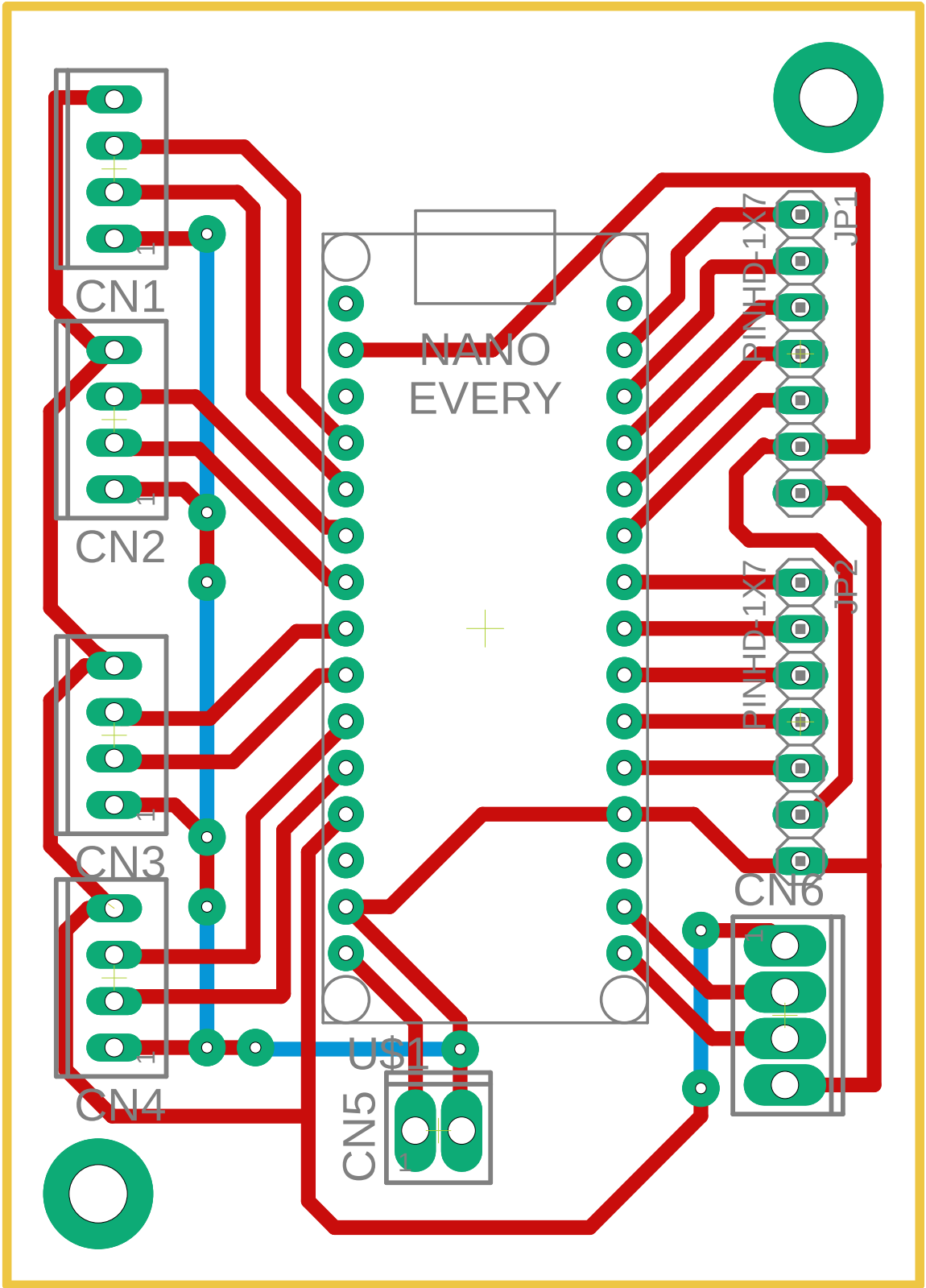












Příloha C: Tabulky měřených a zpracovaných dat

- Tabulky naměřených hodnot fotodiodami
- Tabulky naměřených hodnot průtokoměry

Tabulka C.1: Průtoky vypočtené z času fotodiod 50 mmHg. ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

	Levý 1	Levý 2	Levý 3	Pravý 1	Pravý 2	Pravý 3
Segment 1	123,93	124,67	124,83	122,91	124,07	124,12
Segment 2	119,45	120,11	120,17	119,09	120,19	120,52
Segment 3	115,49	115,85	115,91	117,43	117,84	118,13
Segment 4	118,19	118,84	118,67	112,45	112,71	112,88
Minimum	115,49	115,85	115,91	112,45	112,71	112,88
Maximum	123,93	124,67	124,83	122,91	124,07	124,12
Rozdíl Max-Min	8,44	8,82	8,92	10,47	11,36	11,24
Průměr	119,27	119,87	119,89	117,97	118,70	118,91
Sm. Odchylka	3,05	3,17	3,23	3,76	4,11	4,08

Tabulka C.2: Průtoky naměřené průtokoměrem 50 mmHg. ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

	Levý		Pravý		Levý a Pravý	
	Průměr	Sm. odch	Průměr	Sm. odch	Průměr	Sm. odch
Segment 1	124,48	0,39	123,70	0,56	124,09	0,39
Segment 2	119,91	0,33	119,93	0,61	119,92	0,01
Segment 3	115,75	0,18	117,80	0,29	116,77	1,02
Segment 4	118,56	0,27	112,68	0,18	115,62	2,94
Minimum	115,75		112,68		115,62	
Maximum	124,48		123,70		124,09	
Rozdíl Max-Min	8,72		11,02		8,47	
Průměr	119,68		118,53		119,10	
Sm. Odchylka	3,15		3,98		3,28	

Tabulka C.3: Průměrné průtoky vypočtené z času fotodiod 50 mmHg. ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

	Levý 1	Levý 2	Levý 3	Pravý 1	Pravý 2	Pravý 3
Segment 1	123,91	124,64	124,81	122,89	124,05	124,09
Segment 2	119,43	120,09	120,15	119,07	120,17	120,49
Segment 3	115,47	115,83	115,89	117,40	117,82	118,11
Segment 4	118,17	118,81	118,65	112,42	112,69	112,86
Minimum	115,47	115,83	115,89	112,42	112,69	112,86
Maximum	123,91	124,64	124,81	122,89	124,05	124,09
Rozdíl Max-Min	8,44	8,81	8,92	10,47	11,36	11,23
Průměr	119,24	119,84	119,87	117,95	118,68	118,89
Sm. Odchylka	3,05	3,17	3,23	3,76	4,11	4,08

Tabulka C.4: Průměrné průtoky naměřené průtokoměrem 50 mmHg. ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

	Levý		Pravý		Levý a Pravý	
	Průměr	Sm. odch	Průměr	Sm. odch	Průměr	Sm. odch
Segment 1	124,45	0,39	123,68	0,56	124,06	0,39
Segment 2	119,89	0,33	119,91	0,61	119,90	0,01
Segment 3	115,73	0,18	117,78	0,29	116,75	1,02
Segment 4	118,54	0,27	112,66	0,18	115,60	2,94
Minimum	115,73		112,66		115,60	
Maximum	124,45		123,68		124,06	
Rozdíl Max-Min	8,72		11,02		8,46	
Průměr	119,65		118,50		119,08	
Sm. Odchylka	3,15		3,98		3,28	

Tabulka C.5: Průtoky vypočtené z času fotodiod 75 mmHg. ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

	Levý 1	Levý 2	Levý 3	Pravý 1	Pravý 2	Pravý 3
Segment 1	156,70	157,87	158,73	156,55	156,73	156,92
Segment 2	152,44	153,27	153,97	154,04	154,15	154,18
Segment 3	148,77	149,36	150,13	152,79	152,68	152,99
Segment 4	154,26	154,68	155,83	147,76	147,69	147,76
Minimum	148,77	149,36	150,13	147,76	147,69	147,76
Maximum	156,70	157,87	158,73	156,55	156,73	156,92
Rozdíl Max-Min	7,93	8,51	8,60	8,79	9,04	9,16
Průměr	153,04	153,80	154,66	152,78	152,81	152,96
Sm. Odchylka	2,89	3,05	3,12	3,20	3,29	3,33

Tabulka C.6: Průtoky naměřené průtokoměrem 75 mmHg. ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

	Levý		Pravý		Levý a Pravý	
	Průměr	Sm. odch	Průměr	Sm. odch	Průměr	Sm. odch
Segment 1	153,23	0,63	154,13	0,06	153,68	0,45
Segment 2	149,42	0,56	152,82	0,13	151,12	1,70
Segment 3	154,92	0,66	147,73	0,03	151,33	3,59
Segment 4	149,42	0,56	147,73	0,03	148,58	0,84
Minimum	149,42		147,73		148,58	
Maximum	154,92		154,13		153,68	
Rozdíl Max-Min	5,50		6,39		5,10	
Průměr	151,75		150,60		151,18	
Sm. Odchylka	2,40		2,91		1,81	

Tabulka C.7: Průměrné průtoky vypočtené z času fotodiod 75 mmHg. (ml·min⁻¹)

	Levý 1	Levý 2	Levý 3	Pravý 1	Pravý 2	Pravý 3
Segment 1	156,67	157,84	158,70	156,52	156,70	156,89
Segment 2	152,41	153,24	153,94	154,02	154,12	154,16
Segment 3	148,74	149,33	150,10	152,76	152,65	152,97
Segment 4	154,23	154,65	155,80	147,73	147,66	147,73
Minimum	148,74	149,33	150,10	147,73	147,66	147,73
Maximum	156,67	157,84	158,70	156,52	156,70	156,89
Rozdíl Max-Min	7,93	8,51	8,60	8,79	9,04	9,16
Průměr	153,01	153,77	154,64	152,76	152,79	152,93
Sm. Odchylka	2,89	3,05	3,12	3,20	3,29	3,32

Tabulka C.8: Průměrné průtoky naměřené průtokoměrem 75 mmHg. (ml·min⁻¹)

	Levý		Pravý		Levý a Pravý	
	Průměr	Sm. odch	Průměr	Sm. odch	Průměr	Sm. odch
Segment 1	157,74	0,83	156,70	0,15	157,22	0,52
Segment 2	153,20	0,63	154,10	0,06	153,65	0,45
Segment 3	149,39	0,56	152,79	0,13	151,09	1,70
Segment 4	154,89	0,66	147,71	0,03	151,30	3,59
Minimum	149,39		147,71		151,09	
Maximum	157,74		156,70		157,22	
Rozdíl Max-Min	8,34		9,00		6,13	
Průměr	153,81		152,83		153,32	
Sm. Odchylka	3,02		3,27		2,47	

Tabulka C.9: Průtoky vypočtené z času fotodiod 100 mmHg. (ml·min⁻¹)

	Levý 1	Levý 2	Levý 3	Pravý 1	Pravý 2	Pravý 3
Segment 1	186,62	186,36	187,92	184,22	185,28	185,49
Segment 2	182,03	181,49	183,52	182,18	182,92	183,37
Segment 3	178,55	177,89	180,18	181,78	182,97	183,32
Segment 4	186,00	185,44	187,40	176,59	177,52	178,08
Minimum	178,55	177,89	180,18	176,59	177,52	178,08
Maximum	186,62	186,36	187,92	184,22	185,28	185,49
Rozdíl Max-Min	8,07	8,47	7,74	7,63	7,77	7,41
Průměr	183,30	182,80	184,75	181,19	182,17	182,56
Sm. Odchylka	3,26	3,37	3,14	2,82	2,85	2,73

Tabulka C.10: Průtoky naměřené průtokoměrem 100 mmHg. ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

	Levý		Pravý		Levý a Pravý	
	Průměr	Sm. odch	Průměr	Sm. odch	Průměr	Sm. odch
Segment 1	182,35	0,86	182,82	0,49	182,58	0,24
Segment 2	178,87	0,96	182,69	0,66	180,78	1,91
Segment 3	186,28	0,82	177,40	0,62	181,84	4,44
Segment 4	178,87	0,96	177,40	0,62	178,14	0,74
Minimum	178,87		177,40		178,14	
Maximum	186,28		182,82		182,58	
Rozdíl Max-Min	7,40		5,43		4,45	
Průměr	181,59		180,08		180,83	
Sm. Odchylka	3,05		2,68		1,68	

Tabulka C.11: Průměrné průtoky vypočtené z času fotodiod 100 mmHg. ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

	Levý 1	Levý 2	Levý 3	Pravý 1	Pravý 2	Pravý 3
Segment 1	186,59	186,33	187,89	184,19	185,25	185,45
Segment 2	182,00	181,46	183,48	182,14	182,89	183,33
Segment 3	178,52	177,86	180,14	181,75	182,93	183,28
Segment 4	185,97	185,40	187,36	176,55	177,48	178,05
Minimum	178,52	177,86	180,14	176,55	177,48	178,05
Maximum	186,59	186,33	187,89	184,19	185,25	185,45
Rozdíl Max-Min	8,07	8,47	7,74	7,63	7,77	7,41
Průměr	183,27	182,76	184,72	181,16	182,14	182,53
Sm. Odchylka	3,26	3,37	3,14	2,81	2,85	2,73

Tabulka C.12: Průměrné průtoky naměřené průtokoměrem 100 mmHg. ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

	Levý		Pravý		Levý a Pravý	
	Průměr	Sm. odch	Průměr	Sm. odch	Průměr	Sm. odch
Segment 1	186,93	0,68	184,96	0,56	185,95	0,98
Segment 2	182,31	0,86	182,79	0,49	182,55	0,24
Segment 3	178,84	0,96	182,66	0,66	180,75	1,91
Segment 4	186,24	0,82	177,36	0,62	181,80	4,44
Minimum	178,84		177,36		180,75	
Maximum	186,93		184,96		185,95	
Rozdíl Max-Min	8,09		7,60		5,20	
Průměr	183,58		181,94		182,76	
Sm. Odchylka	3,26		2,80		1,95	

Tabulka C.13: Průtoky vypočtené z času fotodiod 150 mmHg. ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

	Levý 1	Levý 2	Levý 3	Pravý 1	Pravý 2	Pravý 3
Segment 1	238,43	235,35	237,17	236,92	234,28	235,59
Segment 2	232,02	230,12	231,86	235,68	232,66	234,20
Segment 3	228,79	226,94	228,56	237,42	234,12	235,84
Segment 4	239,79	237,50	239,53	231,94	237,09	230,59
Minimum	228,79	226,94	228,56	231,94	232,66	230,59
Maximum	239,79	237,50	239,53	237,42	237,09	235,84
Rozdíl Max-Min	11,00	10,57	10,98	5,48	4,42	5,25
Průměr	234,76	232,48	234,28	235,49	234,54	234,06
Sm. Odchylka	4,53	4,18	4,32	2,14	1,60	2,10

Tabulka C.14: Průtoky naměřené průtokoměrem 150 mmHg. ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

	Levý		Pravý		Levý a Pravý	
	Průměr	Sm. odch	Průměr	Sm. odch	Průměr	Sm. odch
Segment 1	231,33	0,86	234,18	1,23	232,76	1,42
Segment 2	228,09	0,82	235,79	1,35	231,94	3,85
Segment 3	238,94	1,02	233,21	2,80	236,07	2,87
Segment 4	228,09	0,82	231,73	0,86	229,91	1,82
Minimum	228,09		231,73		229,91	
Maximum	238,94		235,79		236,07	
Rozdíl Max-Min	10,85		4,06		6,16	
Průměr	231,62		233,73		232,67	
Sm. Odchylka	4,43		1,48		2,22	

Tabulka C.15: Průměrné průtoky vypočtené z času fotodiod 150 mmHg. ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

	Levý 1	Levý 2	Levý 3	Pravý 1	Pravý 2	Pravý 3
Segment 1	238,39	235,30	237,13	236,88	234,24	235,55
Segment 2	231,98	230,08	231,82	235,63	232,62	234,16
Segment 3	228,75	226,90	228,51	237,38	234,08	235,80
Segment 4	239,74	237,46	239,49	231,90	237,04	230,55
Minimum	228,75	226,90	228,51	231,90	232,62	230,55
Maximum	239,74	237,46	239,49	237,38	237,04	235,80
Rozdíl Max-Min	11,00	10,56	10,97	5,48	4,42	5,25
Průměr	234,71	232,43	234,24	235,45	234,49	234,01
Sm. Odchylka	4,52	4,18	4,32	2,14	1,60	2,10

Tabulka C.16: Průměrné průtoky naměřené průtokoměrem 150 mmHg. ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)

	Levý		Pravý		Levý a Pravý	
	Průměr	Sm. odch	Průměr	Sm. odch	Průměr	Sm. odch
Segment 1	236,94	1,27	235,55	1,08	236,25	0,69
Segment 2	231,29	0,86	234,14	1,23	232,71	1,42
Segment 3	228,05	0,82	235,75	1,35	231,90	3,85
Segment 4	238,90	1,02	233,16	2,80	236,03	2,87
Minimum	228,05		233,16		231,90	
Maximum	238,90		235,75		236,25	
Rozdíl Max-Min	10,85		2,59		4,35	
Průměr	233,79		234,65		234,22	
Sm. Odchylka	4,33		1,06		1,94	

Příloha D: Zdrojový kód softwaru

- Zdrojový kód je přiložen v ZIP archivu (Pneumatic-Syringe-Pump-Control)