



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra biomedicínské techniky

**Dynamický kultivační systém pro diferenciaci kmenových buněk
směrem k buňkám hladké svaloviny**

**Dynamic culture system for differentiation of stem cells towards smooth
muscle cells**

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský inženýr

Autor diplomové práce: Bc. Adéla Hůlová

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jana Štěpanovská

Kladno 2018

Katedra biomedicínské techniky

Akademický rok: 2017/2018

Z a d á n í d i p l o m o v é p r á c e

Student: **Bc. Adéla Hůlová**
Studijní obor: Biomedicínský inženýr
Téma: **Dynamický kultivační systém pro diferenciaci kmenových buněk směrem k buňkám hladké svaloviny**
Téma anglicky: Dynamic culture system for differentiation of stem cells towards smooth muscle cells

Zásady pro vypracování:

Navrhněte systém, jež bude mechanicky stimulovat mezenchymální kmenové buňky směrem k buňkám hladké svaloviny s možností průběžného optického sledování. Zařízení musí mimo stimulaci zajistit ideální podmínky pro růst buněk a sterilní prostředí pro buněčnou kulturu. Součástí systému by mělo být uživatelské prostředí pro nastavení parametrů stimulace.

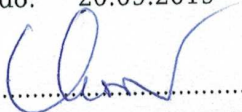
Ověřte systém při dynamické kultivaci. Dále stanovte vhodné parametry mechanické stimulace pro diferenciaci kmenových buněk směrem k buňkám hladké svaloviny a srovnajte výsledky se statickou kulturou.

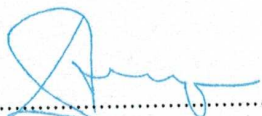
Seznam odborné literatury:

- [1] Joseph D Bronzino, The Biomedical Engineering Handbook, ed. First edition, Boca Raton : CRC Press, 2000, ISBN 0-8493-0461-X
[2] VEMURI, Mohan C., Lucas G. CHASE a Mahendra S. RAO, Mesenchymal stem cell assays and applications, ed. 1., Humana Press/Springer, 2011, ISBN 978-1-60761-998-7

Vedoucí: Ing. Jana Štěpanovská
Konzultant: Ing. Roman Matějka

Zadání platné do: 20.09.2019


.....
vedoucí katedry / pracoviště


.....
děkan

V Kladně dne 19.02.2018

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Dynamický kultivační systém pro diferenciaci kmenových buněk směrem k buňkám hladké svaloviny“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci. Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně

.....

Bc. Adéla Hůlová

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Ing. Janě Štěpanovské za vedení mé práce, cenné rady, trpělivost a čas, který mi během vytváření této práce věnovala.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 15-29153A.

ABSTRAKT

Dynamický kultivační systém pro diferenciaci kmenových buněk směrem k buňkám hladké svaloviny

Hlavním cílem této práce bylo navrhnout, vytvořit a ověřit systém pro diferenciaci kmenových buněk směrem k buňkám hladké svaloviny. V první části práce byly popsány různé vlivy na diferenciaci směrem k buňkám hladké svaloviny, obdobné systémy vytvořené během studií a komerčně dostupné systémy. Dále byla navržena úprava lineárního posuvu s motorem a jeho ovládání pomocí Arduina a uživatelského rozhraní. Nakonec byl celý systém ověřen při experimentech s buňkami. Výstupem práce je, kromě samotného systému a programového vybavení, také stanovení optimálních parametrů stimulace, kdy k diferenciaci směrem k buňkám hladké svaloviny dochází.

Klíčová slova

mezenchymální kmenové buňky, buňky hladké svaloviny, mechanická stimulace, uniaxiální namáhání

ABSTRACT

Dynamic culture system for differentiation of stem cells towards smooth muscle cells

The main aim of this thesis was to design, create and verificate a system for differentiation of stem cells towards smooth muscle cells. In the first part of the thesis various influences on differentiation towards smooth muscle cells are described as well as similar systems made during studies and commercial systems. A modification of linear rail with motor was designed and also controlling using Arduino and graphical user interface. In the end was the complete system verificated during experiments with stem cells. Outputs of this thesis include, apart from the system itself and software, also determination of optimal stimulation parameters when differentiation towards smooth muscle cells occurs.

Key words

mesenchymal stem cells, smooth muscle cells, mechanical stimulation, uniaxial strain

Obsah

Seznam symbolů a zkratk	9
1 Úvod	10
1.1 Přehled současného stavu	11
1.1.1 Diferenciace kmenových buněk směrem k buňkám hladké svaloviny .	13
1.1.2 Komerční zařízení	16
1.2 Cíle práce	19
2 Metody	20
2.1 Lineární posuv	20
2.1.1 Úchyty kultivační komory	21
2.2 Kultivační komora a kryt kultivační komory	24
2.3 Ovládání motoru	26
2.3.1 Arduino UNO	27
2.4 Uživatelské rozhraní	30
2.4.1 Nastavení sériového portu	30
2.4.2 Nastavení cyklického namáhání	32
2.4.3 Jednorázový posun	34
2.5 Buněčné experimenty	35
3 Výsledky	38
3.1 Ověření systému	40
3.2 Dlouhodobé experimenty	44
4 Diskuze	48
5 Závěr	52
Reference	53

Seznam příloh	58
Obsah přiloženého CD	59

Seznam symbolů a zkratek

Zkratka	Význam
SC	Stem cells (kmenové buňky)
MSC	Mesenchymal stem cells (mezenchymální kmenové buňky)
BMSC	Bone marrow stem cells (kmenové buňky z kostní dřeně)
ASC	Adipose stem cells (kmenové buňky z tukové tkáně)
VSMC	Vascular smooth muscle cells (cévní buňky hladké svaloviny)
SMC	Smooth muscle cells (buňky hladké svaloviny)
ECM	Extracelulární matrix
SM	Smooth muscle (hladký sval)
MHC	Myosin heavy chain (myozinový těžký řetězec)
SPC	Sphingosilphosphorylcholin
TGF	Transforming growth factor (transformující růstový faktor)
ABS	Akrylonitrilbutadienstyren
COM	Communication (sériový port)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4 (kostní morfogenetický protein 4)
col1	Kolagen 1
calp1	Calponin 1
fal	Faloidin
PB	Počet buněk

1 Úvod

Kardiovaskulární onemocnění, jako například ateroskleróza, jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí a zhoršení kvality života. Při ateroskleróze se na stěnách cév vytváří usazeniny, což může mít za následek jejich zúžení nebo úplné ucpání. Nedostatečný přísun krve pak může způsobit ischemii a například infarkt myokardu. Současná řešení arteriálních onemocnění zahrnují bypass, při němž se přemostí ucpaná céva jinou cévou, čímž se obnoví průtok krve tkání. K tomuto účelu se využívají autologní (vlastní) cévy pacienta odebrané z jiné části těla, nebo lze použít cévu uměle vyrobenou. Výhodou autologního štěpu je, že je tkáň pro tělo přirozená, je tedy zaručena biokompatibilita a nedochází k odmítnutí štěpu imunitním systémem pacienta. Zároveň je autologní céva okamžitě k dispozici a má pro daný účel optimální vlastnosti. Odebrání vhodné cévy však vyžaduje další operaci, tedy riziko pro pacienta, a ne všichni pacienti mají periferní cévy v takovém stavu, aby byly pro transplantaci vhodné. Pokud není k dispozici vhodná autologní céva, je možné použít cévy umělé, které jsou nejčastěji na bázi polymerů. Tyto látky jsou sice biologicky inertní, nejsou ale odolné vůči tvorbě trombů, takže jejich použití pro výrobu cév malého průměru není vhodné [1]. Další alternativou je tkáňové inženýrství, kdy je umělá céva vytvořena in vitro s použitím vhodných buněk, scaffoldů a bioreaktoru. Scaffoldy fungují jako forma pro tvorbu tkáně, která je osazena buňkami a vystavena biofyzikálním stimulům v bioreaktoru. Pro účely tkáňového inženýrství mají velký význam kmenové buňky, které mají potenciál nahradit nebo obnovit funkci poškozených tkání [2].

Kmenové buňky (SC - stem cells) jsou definované jako prekurzory buněk schopné sebeobnovy a diferenciací do různých typů buněk na základě stimulů, kterým jsou vystaveny [3]. Kmenové buňky lze rozdělit na základě potence, tedy potenciálu diferencovat do buněk určitých tkání, na totipotentní, pluripotentní a multipotentní. Totipotentní kmenové buňky jsou za vhodných podmínek schopny vytvořit embryo, buňky jakékoli tkáně a placentu. Mezi totipotentní buňky patří oplozené vajíčko a buňky, které vzniknou během jeho několika prvních dělení [4]. Později se totipotentní buňky začnou stávat více specializovanými a vytvoří blastocystu, shluk buněk, jehož vnitřní strana je tvořena kmenovými buňkami pluripotentními. Tyto buňky mohou vytvořit jakoukoli tkáň těla, kromě placenty [3]. Další specializací pluripotentních buněk vznikají buňky multipotentní, které jsou schopny vytvořit jen užší skupinu typů buněk [4].

Kmenové buňky se nevyskytují jen v embryonálních tkáních, ale také v tkáních dospělých jedinců, odkud je možné je i odebrat. Pro využití v tkáňovém inženýrství je vhodné, aby použité kmenové buňky byly v těle v hojném množství a jejich odběr byl co nejméně invazivní. Mezenchymální kmenové buňky (MSC - mesenchymal stem cells) jsou multipotentní

a mohou být u dospělého člověka izolovány například z kostní dřeně (BMSC - bone marrow stem cells) nebo tukové tkáně (ASC - adipose stem cells). Právě získávání kmenových buněk z tukové tkáně vyhovuje požadavku co nejmenší invazivity [5].

Za diferenciaci kmenových buněk do buněk určitých tkání jsou zodpovědné podmínky a stimuly, kterým jsou buňky v těle přirozeně vystavovány. Napodobením těchto podmínek in vitro lze kmenové buňky rovněž k diferenciaci přimět.

1.1 Přehled současného stavu

Tkáňové inženýrství je možné aplikovat, mimo jiné, i v případě náhrad cév, které se obvykle skládají ze tří vrstev: tunica intima, tunica media a tunica adventitia [6]. Nejtěsnější vrstvou je tunica intima, která je tvořena jedinou vrstvou endotelových buněk. Pod těmito buňkami se nachází fibroelastická pojivová tkáň, která endotelovým buňkám zajišťuje flexibilitu a stabilitu [7]. Naopak nejsilnější vrstvou je tunica media, která obsahuje převážně buňky hladké svaloviny (VSMC - vascular smooth muscle cells), mezi nimi a kolem nich probíhají kolagenní a elastická vlákna. Poslední, od středu cévy nejvzdálenější vrstvou, je tunica adventitia. Ta je tvořena zejména kolagenními a elastickými vlákny, která na povrchu cévy vytvářejí síť a uchycují cévu k okolním tkáním [6]. Tato struktura tkáně je u tepen a u žil podobná, v případě žil bývá tunica media tenčí kvůli nižšímu krevnímu tlaku v žilách a tunica intima obsahuje u některých žil chlopně pro zajištění toku krve jedním směrem. Nejmenší cévy, kapiláry, strukturu tří popsaných vrstev nemají. Jsou tvořeny tubulární strukturou endotelových buněk obklopenou pericyty, které jsou analogií VSMC ve větších cévách [8].

Pro stimulaci diferenciaci kmenových buněk in vitro mohou být využity různé stimuly, které napodobují působení na buňky in vivo, přičemž tyto stimuly mohou být chemické i mechanické. Na základě těchto stimulů se pak z kmenových buněk stávají specializované buňky dané tkáně. Z mezenchymálních kmenových buněk se tak mohou vyvíjet, mimo jiné, buňky kostí, chrupavek nebo svalů. Diferenciaci kmenových buněk do buněk hladké svaloviny (SMC - smooth muscle cells) má široký potenciál využití, například při výrobě umělých cév [9]. VSMC se fyziologicky podílejí na regulaci cirkulace krve tak, že zajišťují kontrakci a relaxaci cév [8]. SMC mohou mít dva fenotypy, které mohou střídat: kontraktilní a proliferativní, tato flexibilita je pro SMC nezbytná, aby se vyrovnaly různým podmínkám [10]. Ve zdravých dospělých cévách se nacházejí VSMC kontraktilního fenotypu, takovéto buňky se hojně nemnoží (neproliferují) a jsou charakterizovány markery [8] a svou funkcí [11]. Funkce SMC zahrnují kontraktilitu a vytváření extracelulární matrix (ECM), která buňky obklopuje a chrání. ECM je komplexní struktura složená z množství proteinů a ostatních látek

produkovaných samotnými buňkami a je, mimo jiné, také důležitým faktorem růstu a přilnavosti buněk [12]. Kontraktilní aparát všech svalů je tvořen zejména dvěma typy vláken: tlustými (myozinovými) a tenkými (aktinovými). Právě interakce mezi aktinem a myozinem vede ke klouzavému pohybu mezi oběma typy vláken, což má za následek kontrakci svalu [13].

Markery VSMC mohou být rozděleny na rané, střednědobé a pozdní podle jejich výskytu během embryonálního vývoje. Mezi rané markery patří SM α -aktin, myocardin a SM22- α . Nejčasnější marker VSMC diferenciaci je SM α -aktin, který se spolu s ostatními formami aktinu (β a γ) nachází v tenkých vláknech VSMC, množství α -aktinu ve VSMC však nad ostatními formami převládá. α -aktin jako marker VSMC není příliš specifický a jeho přítomnost, pokud je jediný marker, diferenciaci směrem k SMC ještě nedokazuje. Myocardin je koaktivátor transkripce faktorů sérové odpovědi, které se zapojují, mimo jiné, do regulace buněčného cyklu. Ovlivňuje také expresi některých dalších markerů a pro diferenciaci směrem k VSMC je nezbytný. SM22- α je protein, který se podílí na kontrakci hladké svaloviny bez přítomnosti vápníkových iontů, se podílí na uspořádání cytoskeletonu VSMC. Dále usnadňuje uspořádání aktinových vláken a zajišťuje kontraktilní fenotyp VSMC [8].

Střednědobé markery VSMC zahrnují h-caldesmon a calponin. Caldesmon je protein, který je společně s tropomyozinem důležitým činitelem tlumení kontrakce svalu v přítomnosti vápenatých kationtů [8], svojí vazbou na aktin omezuje schopnost aktinu interagovat s myozinem a způsobit tak kontrakci svalu [13]. Caldesmon se vyskytuje ve dvou formách: caldesmon s vysokou molekulární hmotností (h-caldesmon) a s nízkou molekulární hmotností (l-caldesmon). Narozdíl od l-caldesmonu se h-caldesmon vyskytuje pouze v buňkách hladké svaloviny. Podobně jako caldesmon se na aktin váže také calponin a reguluje tak kontrakci svalu, vyskytuje se ve třech izoformách, z nichž se calponin 1 specificky nachází v SMC [8].

Do skupiny pozdních markerů VSMC se řadí desmin, MHC (myosin heavy chain) a smoothelin [8]. Desmin je protein, který spolu s vimentinem tvoří hlavní složky sítě středních vláken (jeden z cytoskeletálních systémů) hladkého svalu. Nedostatek desminu vede k poškození kontraktilní funkce SMC [14]. MHC je protein, který je hnací silou kontrakce hladké svaloviny [15], vyskytuje se v několika izoformách, z nichž formy 1 a 2 se vyskytují specificky v tlustých vláknech plně diferencovaných VSMC [8]. Smoothelin je protein, který se vyskytuje pouze v plně diferencovaných SMC kontraktilního fenotypu [10], vyskytuje se ve dvou izoformách, z nichž forma B se vyskytuje pouze ve VSMC [8].

VSMC kontraktilního fenotypu dále produkují elastin a kolagen, hlavně typu I, III a IV, které hrají roli při zajištění mechanické integrity cév a mohou rovněž sloužit jako nespecifické markery diferenciaci do buněk hladké svaloviny [16].

1.1.1 Diferenciace kmenových buněk směrem k buňkám hladké svaloviny

Diferenciace kmenových buněk do SMC je komplikovaný proces, který zahrnuje mnoho faktorů. V rámci studie [11] z roku 2009 byl zkoumán vliv určitých látek rozpuštěných v kulturačním médiu na diferenciaci kmenových buněk získaných z tukové tkáně do buněk hladké svaloviny, přičemž byly hodnoceny markery calponin, caldesmon, MHC a kontraktilita buněk. Pro tento účel byly jako rozpuštěné látky použity angiotenzin II, sphingosilphosphorylcholin (SPC) a transformující růstový faktor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) a buňky byly v médiích uchovány po dobu tří týdnů. Kontraktilita buněk po uplynutí této doby byla hodnocena pomocí aplikace KCl na buňky, přičemž výrazný nárůst kontraktility byl zaznamenán jen u buněk, které byly v médiu obsahujícím SPC nebo TGF $\beta 1$.

Na diferenciaci kmenových buněk mají rovněž velký vliv mechanické stimuly, kterým jsou buňky v těle přirozeně vystavovány. Mechanické namáhání in vitro může mít různé podoby, je však snaha napodobit fyziologické podmínky buněk v těle. VSMC jsou přirozeně vystaveny cyklickému mechanickému namáhání způsobeným pulzatilním prouděním krve. In vitro mohou být buňky namáhány různými způsoby, mezi něž patří ekviaxiální a uniaxiální namáhání. V případě ekviaxiálního jsou buňky zatíženy rovnoměrně, to znamená, že namáhání působí ve všech směrech stejně [17]. To lze realizovat například membránou, která zčásti uprostřed leží na podpěře kruhového tvaru. V tomto případě je změna tlaku v prostorách pod membránou zajištěna uniformní namáhání buněk, které jsou umístěny uprostřed membrány. Tento princip používá například komerčně dostupný systém Flexcell (Flexcell International Corporation) [18]. Uniaxiální (jednoosé) namáhání lépe napodobuje mechanické zatížení, kterému jsou VSMC v těle vystaveny. V tomto případě působí namáhání jen podél jedné osy a buňky jsou tak zatíženy jen v jednom směru. Jednoosé namáhání lze realizovat například natahováním membrány, kdy je její jeden konec pevně uchycen [17]. V následujících studiích jsou popsány vlivy různých namáhání kmenových buněk na jejich diferenciaci.

Ve studii [19] z roku 2004 byly pro experimenty využity BMSC a tyto buňky byly pro porovnání vystaveny jak uniaxiálnímu tak ekviaxiálnímu cyklickému namáhání. Pro ekviaxiální namáhání byl použit komerční systém Flexcell TensionPlus, při experimentu byly buňky naneseny na silikonové membrány potažené kolagenem I nebo elastinem a pro napodobení fyziologických podmínek bylo aplikováno 10% prodloužení s frekvencí 1 Hz. Pro porovnání se statickou kulturou byly na stejný typ membrán naneseny buňky a byly umístěny do stejného inkubátoru. V případě jednoosého namáhání bylo zařízení pro potřeby experimentu vytvořeno na míru a buňky byly umístěny na silikonovou membránu. Buňky byly vystaveny rovněž 10% prodloužení s frekvencí 1 Hz a pro porovnání byla vytvořena statická kultura obdobně, jako při ekviaxiálním namáhání. Po jednom dni došlo v případě ekviaxiálního na-

máhání ke snížení exprese α -aktinu a SM22 α , zatímco při uniaxiálním namáhání se exprese těchto markerů přechodně zvýšila, než se buňky přeorientovaly podle směru namáhání, kdy se opět snížila na původní hladinu.

Vliv jednoosého namáhání na ASC je popsán také ve studii [20] z roku 2007. Účelem bylo zjistit účinek TGF β 1 samostatně a v kombinaci s jednoosým cyklickým namáháním na morfologii, proliferaci a diferenciaci ASC. Při experimentu byly buňky stimulovány 10% prodloužením s frekvencí 1 Hz po dobu 7 dnů. Bylo zjištěno, že mechanické namáhání snížilo proliferaci buněk a způsobilo zarovnění buněk, což bylo zjištěno již po jednom dni stimulace. Jednoosé namáhání v kombinaci s TGF β 1 způsobovalo expresi markerů hladké svaloviny (α -aktin a calponin).

Cílem studie [21] z roku 2008 bylo zjistit vliv amplitudy prodloužení a počtu cyklů na diferenciaci BMSC. Pro tento účel byl vyroben přístroj pro jednoosé namáhání buněk založený na krokovém motoru. Pro experiment bylo nastavena amplituda namáhání 5-15 % s frekvencí 1 Hz. Experiment trval jen dvě hodiny a po této době se buňky ještě diferencovat nezačaly, nicméně bylo zjištěno, že buňky mají tendenci zarovnat se podle směru namáhání.

Cílem studie [22] z roku 2009 bylo zjistit vliv cyklického namáhání na proliferaci a uspořádání aktinových vláken BMSC a jejich diferenciaci do buněk hladké svaloviny. Pro cyklické jednoosé namáhání bylo pro tento experiment vyrobeno zařízení schopné pracovat uvnitř inkubátoru a zajišťovat namáhání 0-25 % s frekvencí 1-3 Hz. Buňky byly vystaveny namáhání s různou délkou trvání (1, 2 a 4 hodiny) a různou amplitudou (5 %, 10 % a 15 %). Počátek diferenciaci buněk byl pozorován již po dvou hodinách od začátku stimulace. Aplikované namáhání způsobilo zvýšení exprese α -aktinu oproti kontrolnímu vzorku, u kterého nebyla exprese α -aktinu zpozorována.

Vývojem zařízení pro mechanickou stimulaci buněk se rovněž zabývala studie [23] z roku 2013, v rámci které byl navržen přístroj pro cyklické jednoosé namáhání buněk při současném snímání obrazu kamerou. V tomto zařízení jsou buňky umístěny na tenkou PDMS (polydimethylsiloxanovou) membránu a byl zkoumán vliv namáhání na změnu morfologie namáhaných buněk, experimentům ale nebyly podrobeny kmenové buňky.

V roce 2015 byla publikována studie [24], při níž byl sledován vliv cyklického mechanického namáhání na diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk do VSMC. Při experimentu byly buňky vystaveny dvoustupňovému nebo jednostupňovému namáhání. V případě jednostupňového byly buňky po 24 hodin vystaveny jednoosému 10% natahování při různých frekvencích (0,1 Hz, 0,5 Hz a 1 Hz), dále byl jeden vzorek uchován ve statických podmínkách jako kontrola. Při dvoustupňové stimulaci byly buňky vystaveny stejnému namáhání s tím, že byly po sobě použity frekvence 0,1 Hz a 1 Hz (prvních 24 hodin byly namáhány

s frekvencí 0,1 Hz nebo 1 Hz a dalších 24 hodin 1 Hz nebo 0,1 Hz). Množství markerů hladké svaloviny (hodnoceny byly α -aktin, MHC a calponin) bylo nejvyšší pro vzorek stimulovaný frekvencí 1 Hz. Se vzrůstající frekvencí se také měnila orientace buněk, rostl jejich úhel natočení vzhledem k ose namáhání, až na 90°, což odpovídá jejich fyziologické orientaci v cévách.

Dynamickou stimulací ASC se rovněž zabývala studie [25] z roku 2016. V ní autoři hodnotili vliv jednoosého namáhání s různým počtem deformačních cyklů následovaných dobou bez namáhání na morfologii ASC. Pro tento účel bylo v rámci studie vytvořeno zařízení schopné pracovat v inkubátoru a aplikovat prodloužení až 25 % s frekvencí 1-3 Hz a volitelným počtem cyklů. Pro experiment bylo zvoleno 10% prodloužení s frekvencí 1 Hz a tři různé počty cyklů, 5000, 10000 a 15000 a kontrolní skupina, ve které buňky nebyly mechanickému namáhání vystaveny. Data byla získána před zahájením stimulace, okamžitě po ukončení stimulace a 24 hodin po ukončení stimulace, během kterých nebyly buňky vystaveny žádnému namáhání. Hodnocena byla délka a šířka buněk a jejich orientace (úhel natočení). Bylo zjištěno že s rostoucím počtem cyklů namáhání se zvětšoval úhel natočení buněk, který se pohyboval mezi 60 a 70 stupni. Natočení buněk vzniká jako odpověď cytoskeletu na cyklické namáhání, kdy cytoskeleton změní tvar tak, aby se při namáhání co nejméně deformoval. Buňky po cyklickém namáhání byly ve srovnání se stavem před namáháním delší a tenčí a to jak bezprostředně po ukončení stimulace, tak i po 24 hodinách.

V rámci studie [26] z roku 2016 bylo vytvořeno zařízení pro namáhání živých buněk za účelem studia buněčných mechanoreceptorů, nicméně toto zařízení namáhalo buňky radiálně a studie nebyla zaměřena na stimulaci kmenových buněk. Obdobně bylo také v práci z roku 2012 [27] vytvořeno zařízení pro jednoosé namáhání buněk, předmětem sledování ale opět nebyly kmenové buňky.

Cílem studie [28] z roku 2016 bylo vytvořit zařízení pro namáhání buněk s následujícími parametry: deformační poměr 1-20 %, volitelné frekvence 0,1-10 Hz, volitelná doba trvání stimulace a kompatibilita s prostředím inkubátoru (100% vlhkost a teplota 37 °C). Vytvořené zařízení zajišťuje jednoosé namáhání vzorku umístěného na PDMS membránu, přičemž membrána je pro zajištění stálého prostředí po celou dobu experimentu ponořena v médiu. Zařízení bylo založeno na krokovém motoru a řízeno mikrokontrolérem Atmel ATmega 328P. Na zařízení byly také provedeny dva experimenty s buňkami, avšak jen pro demonstraci biokompatibility zařízení. Pro experimenty nebyly využity kmenové buňky a nebyl zkoumán vliv nastavení zařízení na jejich diferenciaci.

V uvedených publikacích bylo k mechanické stimulaci kmenových buněk k diferenciaci do buněk hladké svaloviny nejčastěji využíváno namáhání 10% prodloužením s frekvencí 1 Hz.

1.1.2 Komerční zařízení

K dispozici jsou také některé komerční systémy určené přímo pro mechanickou stimulaci kmenových buněk. Kromě výše uvedeného zařízení Flexcell, který umožňuje ekviální namáhání jsou to také přístroje umožňující namáhání jednoosé. Jedním z nich je systém STREX Cell Stretching System, zobrazený na Obrázku 1.1. Toto zařízení umožňuje natahování kultivační komory s buňkami v jednom směru s 64 různými vzory namáhání. Systém poskytuje různé poměry prodloužení 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 a 20 %, a různé scénáře namáhání: cyklické namáhání (tvar sinus) o volitelné periodě 10, 15, 30 nebo 60 cyklů za minutu, kontinuální mód (obdélníkový tvar) s volitelnou periodou 1, 10 a 20 cyklů za minutu a mód při němž je komora natažena na nastavené prodloužení a toto prodloužení je udrženo po celou dobu experimentu. Zařízení se liší podle velikosti kultivačních komor, pro které je lze využít. K dispozici jsou pro kultivační komoru o 4 cm² (označení zařízení STB-10-04), do kterého je možno umístit až 8 komor a 10 cm² (STB-10-10), do kterého je možné umístit až 6 komor. Nevýhodou tohoto zařízení je, že nelze buňky sledovat online pod světelným mikroskopem a tedy sledovat změny, které se ve vzorku odehrávají [29].



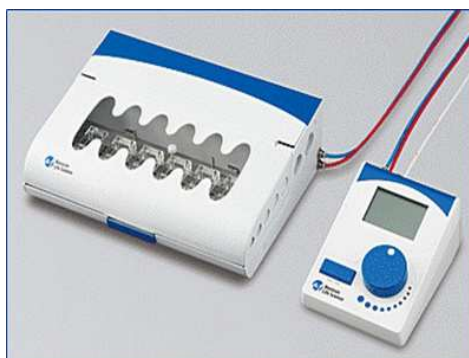
Obrázek 1.1: STREX Cell Stretching System. Převzato z [30].

Strex také vyrábí systémy, které je možné připevnit na mikroskop (Microscope-Mountable Stretching System), zařízení je zachyceno na Obrázku 1.2. Tento systém poskytuje rovněž jednoosé prodloužení a je kompatibilní s komorami o velikosti 1 nebo 4 cm², přičemž do systému může být upevněna jen jedna komora. Tento systém, stejně jako předchozí, umožňuje nastavení až 64 vzorů namáhání [31]. Při experimentu není kultivační komora ničím zakryta a hrozí tak kontaminace vzorku.



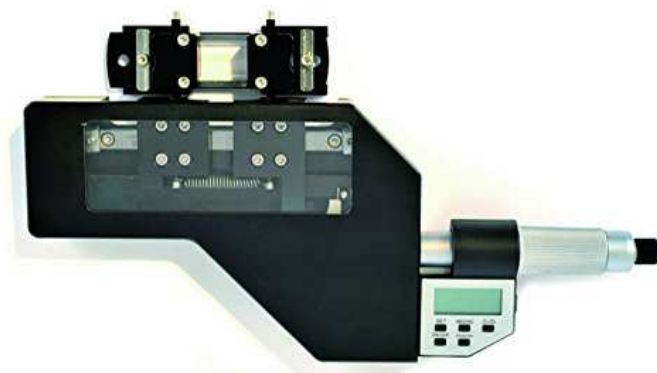
Obrázek 1.2: Strex zařízení připevnitelné na mikroskop. Převzato z [32].

Dalším systémem je ShellPa Mechanical Cell Strain Instrument (As One International) [33], který umožňuje rovněž jednoosé namáhání s volitelnými parametry: 1-120 cyklů za minutu s prodloužením 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 a 20 %. Systém umožňuje současné upevnění až šesti kultivačních komor, přičemž celý přístroj je překryt částečně průhledným víkem. Nevýhodou tohoto zařízení je, že pro sledování buněk pod mikroskopem musí být komory z přístroje vyjmuty. Zařízení je zobrazeno na Obrázku 1.3.



Obrázek 1.3: ShellPa Mechanical Cell Strain Instrument. Převzato z [34].

Sledování buněk online pod mikroskopem naopak nabízí přístroj Cell Stretcher CS-10 Series [35]. Zařízení je řízené pomocí programu v počítači a umožňuje jednoosé namáhání, a to jak natahování tak kompresi. K dispozici nicméně nejsou údaje o nastavení přístroje (nastavitelné prodloužení, frekvence) a není do přístroje možné umístit kultivační komoru s médiem. Vzorky je možné umístit pouze na PDMS membránu a upnout do přístroje, což je pro experimenty s kmenovými buňkami nevhodné. Přístroj je zachycen na Obrázku 1.4.



Obrázek 1.4: Cell Stretcher CS-10 Series. Převzato z [36].

1.2 Cíle práce

Cílem práce je vytvořit zařízení, které by kombinovalo vlastnosti jednotlivých komerčních zařízení, tedy kromě zajištění ideální teploty, vlhkosti a tlaku hlavně jednoosé namáhání kmenových buněk s nastavitelnou frekvencí a amplitudou namáhání. Dále musí být zajištěno sterilní prostředí pro růst buněk, součásti systému tak musí být sterilizovatelné a musí být zamezeno možnosti kontaminace v průběhu kultivace. Celý proces musí být také možné sledovat metodou live imaging, která spočívá v periodickém snímání buněčné kultury v čase. Všechny tyto požadavky přímo nesplňuje žádné z uvedených komerčních zařízení. Pravděpodobně by bylo možné zkombinovat některý z komerčních systémů s vlastním řešením, avšak z hlediska finančního i dalšího využití je výhodnější vytvořit systém nový založený na stávajícím vybavení laboratoří FBMI ČVUT v Praze a FGÚ AV ČR v.v.i.

Pro realizaci systému je třeba splnit následující dílčí úkoly:

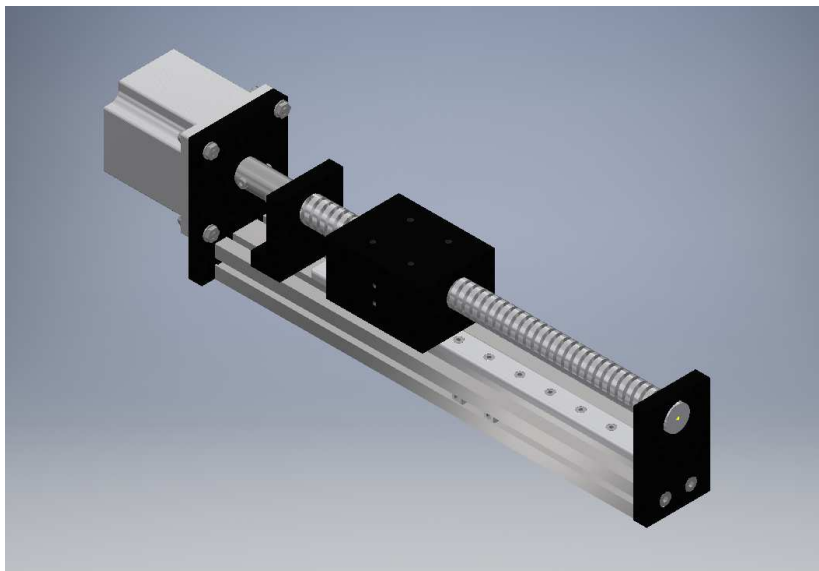
- Modifikovat komerčně získaný lineární posuv s krokovým motorem tak, aby na něj mohla být umístěna kultivační komora, která bude v průběhu stimulace sledována světelným mikroskopem.
- Navrhnout a vyrobit kryt komory, který zabrání kontaminaci v průběhu dynamické kultivace.
- Vytvořit systém pro jednoosé namáhání, který se bude skládat z driveru pro ovládání krokového motoru, řídicí jednotky (Arduino UNO), softwaru pro komunikaci Arduina s motorem a uživatelského prostředí, kde bude možné nastavit požadované parametry amplitudy (poměrného prodloužení) a frekvence namáhání.
- Ověřit jednotlivé komponenty při krátkodobých experimentech (nezávadnost pro buňky, stabilita systému při podmínkách kultivace, manipulace se systémem, apod.) a v případě potřeby optimalizovat systém na základě primárních výsledků.
- Dynamicky stimulovat buňky při dlouhodobých experimentech a na základě následné analýzy určit, zda buňky diferencují směrem k buňkám hladké svaloviny a porovnat výsledky se statickou kulturou.

2 Metody

Vytvořený systém pro mechanické namáhání buněk se skládá ze dvou hlavních částí, z části, která vytváří mechanický pohyb, a části, která jej řídí. Mechanický pohyb je vytvářen pomocí lineárního posuvu se servomotorem ES-M32309 (Leadshine Technology, Čína), jenž je ovládán pomocí driveru motoru Leadshine ES-D508 (Leadshine Technology, Čína). Při stimulaci jsou buňky v klutivační komoře, která je upnutá do systému a zároveň opatřena krytem pro zamezení kontaminace. Celý systém lze umístit do snímacího zařízení v inkubátoru a průběžně pořizovat snímky stimulované kultury. Hlavním ovládacím prvkem je Arduino UNO (Atmel, CA, USA), které prostřednictvím driveru řídí činnost motoru. Arduino, a tedy i celé zařízení, je dále ovládáno uživatelem pomocí uživatelského rozhraní v počítači. Software pro Arduino byl vytvořen v jazyce wiring, uživatelské rozhraní pak v jazyce RapidQ.

2.1 Lineární posuv

Hlavní částí, která zprostředkovává vlastní mechanický pohyb je lineární posuv, jehož součástí je motor. Zařízení funguje tak, že motor točí závitovou tyčí, na které je jezdec. Jezdec je zároveň v posuvu upevněn tak, aby se nemohl otáčet, čímž je zajištěn pouze lineární pohyb. Pro účely návrhu dílů pro uchycení kultivační komory k posuvu byl v prostředí Autodesk Inventor nejprve vytvořen model posuvu včetně motoru, který je zobrazen na Obrázku 2.1.



Obrázek 2.1: Lineární posuv s krokovým motorem. Obrázek: autor

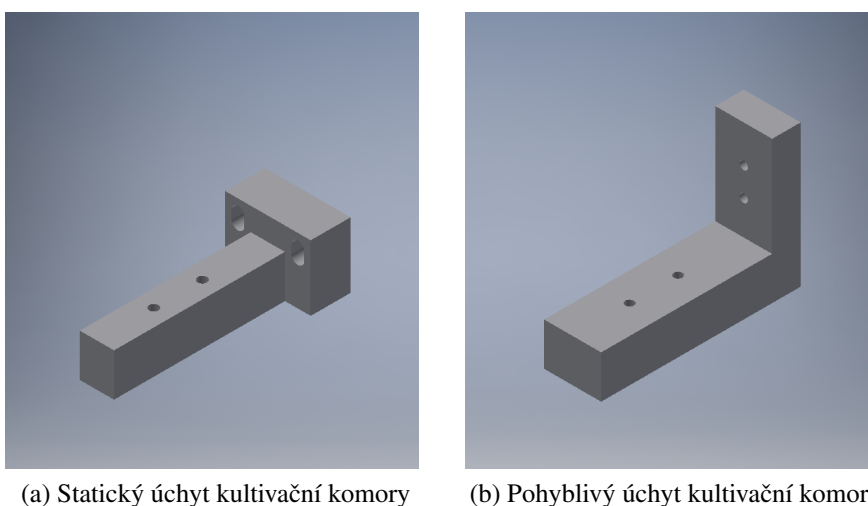
Ve své finální podobě je zařízení vybaveno servomotorem, předchozí návrhy ale počítaly

s motorem krokovým. Pro zařízení byl nejprve použit krokový motor Microcon SX16-0402LA-120, již při zkušebním provozu zařízení při pokojové teplotě však docházelo k přehřívání motoru, a to i bez zátěže (bez upnuté kultivační komory). Z tohoto důvodu byl původní motor nahrazen jiným (57HS5417-22B20-5500 Leadshine Technology, Čína), u kterého bylo menší riziko přehřívání.

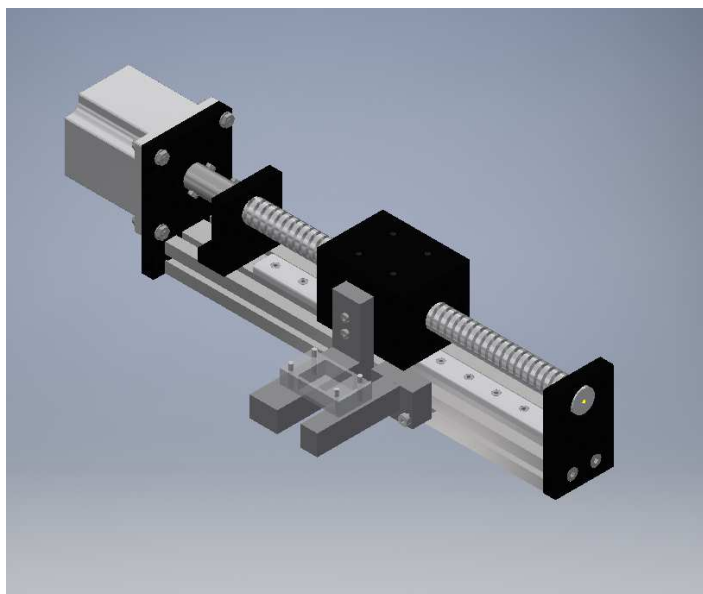
U krokového motoru hrozí nebezpečí „přeskočení“ kroků, které by mělo za následek změnu nastaveného poměrného prodloužení a stimulace by tak probíhala s jinými než nastavenými parametry. Z tohoto důvodu byl krokový motor nahrazen servomotorem, který pomocí zpětné vazby polohu kontroluje.

2.1.1 Úchyty kultivační komory

Pro upnutí kultivační komory do zařízení byly navrženy a následně vyrobeny úchyty, které byly v několika krocích postupně optimalizovány. Pro připevnění komory bylo zapotřebí vyrobit dva úchyty, statický a pohyblivý, který je připevněn k jezdcí, a jeho pohyb tak zprostředkovává natahování kultivační komory. V prvním kroku byly navrženy úchyty tak, aby byla možnost pozorovat buňky v kultivační komoře pod mikroskopem, komora tak měla být umístěna nad úchyty. Při návrhu tohoto řešení bylo předpokládáno, že bude kryt kultivační komory vyroben ze silikonu, bude při stimulaci umístěn přímo na komoře a bude s ní i natahován. Navržené úchyty pro toto řešení jsou i s upevněnou kultivační komorou zobrazeny na Obrázku 2.2 a způsob jejich upevnění v modelu zařízení je zachycen na Obrázku 2.3. Výkresy úchytů jsou zahrnuty v příloze pod označením DP_01 a DP_02.

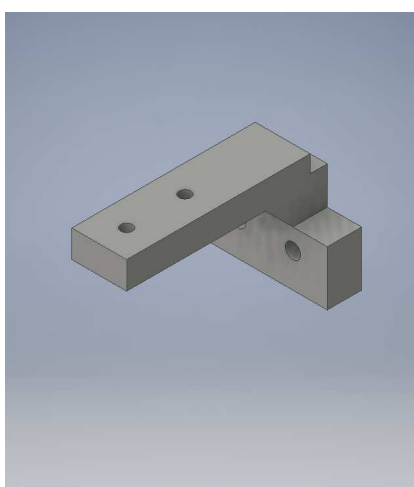


Obrázek 2.2: Původní řešení úchytů kultivační komory. Obrázky: autor

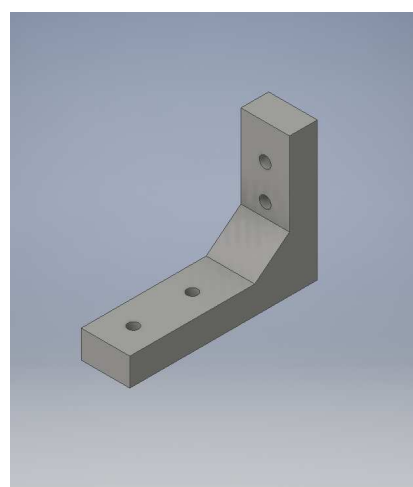


Obrázek 2.3: Upevnění původních úchytlů komory k posuvu. Obrázek: autor

Protože byl kryt kutivační komory nakonec vyřešen jinak, než bylo zpočátku předpokládáno, ukázalo se toto řešení jako nevhodné. Z tohoto důvodu byly navrženy a vytvořeny úchyty tak, aby mohl kryt kultivační komory být volně položený vedle posuvu, přičemž způsob připevnění úchytlů k posuvu zůstal zachován. Návrh úchytlů pro finální řešení je zobrazen na Obrázku 2.4 a jejich výkresy jsou s označením DP_03 a DP_04 přiloženy k této práci. Připevnění úchytlů k posuvu, včetně upnuté kultivační komory, je zobrazeno na Obrázku 2.5.

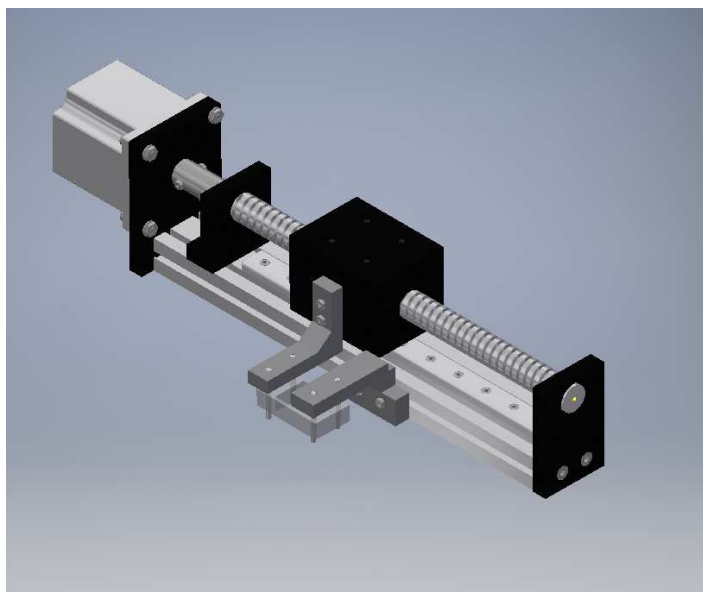


(a) Statický úchyt kultivační komory



(b) Pohyblivý úchyt kultivační komory

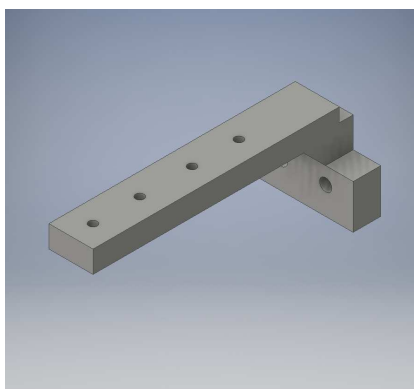
Obrázek 2.4: Finální řešení úchytlů kultivační komory. Obrázky: autor



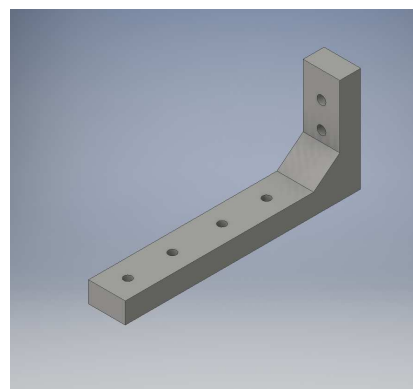
Obrázek 2.5: Upevnění finálních úchytů komory k posuvu. Obrázek: autor

Úchyty kultivační komory byly vyrobeny pomocí 3D tisku z materiálu ABS (akrylonitrilbutadienstyren), který je mechanicky odolný a netoxický pro buňky (ač nepřichází bezprostředně do kontaktu s buňkami, potenciálně je možná kontaminace při manipulaci s celým zařízením). Úchyty jsou k posuvu připevněny pomocí šroubů M4 M3 a, v případě statického úchytu, pomocí nerezových matic v drážkách posuvu. Kryt s kultivační komorou je k úchytům upevněn pomocí nerezových tyčinek o průměru 3 mm.

Navržený systém úchytů nabízí variabilitu z hlediska počtu kultivovaných komor: přidáním dalších úchytů z druhé strany posuvu lze kultivovat dvě komory, rozšířením úchytů pak až čtyři komory (příčemž živě lze snímat pouze jednu komoru). Návrh rozšířených úchytů je zobrazen na Obrázku 2.6, výkres je obsažen v příloze s označením DP_05 a DP_06.



(a) Statický úchyt



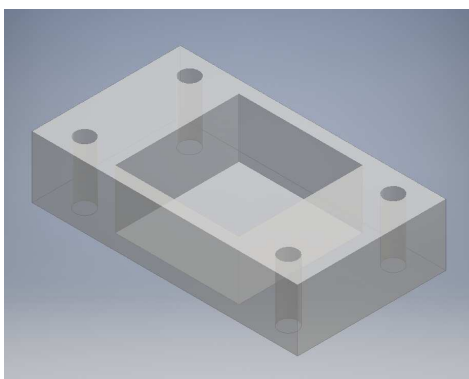
(b) Pohyblivý úchyt

Obrázek 2.6: Rozšířené úchyty kultivační komory. Obrázky: autor

2.2 Kultivační komora a kryt kultivační komory

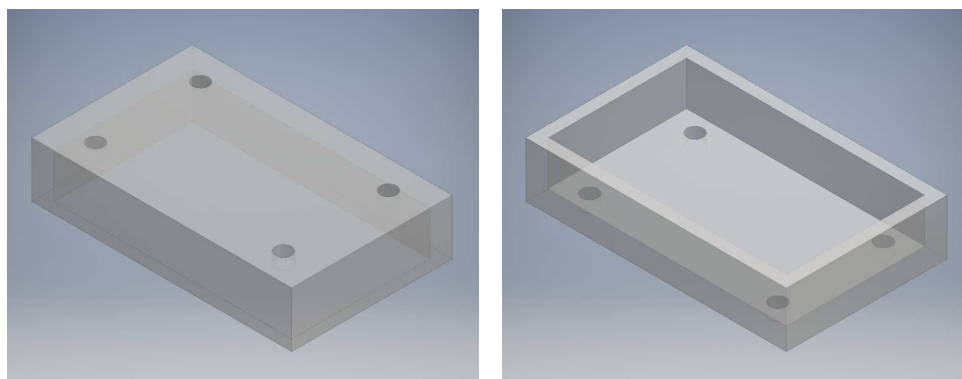
Vytvořené zařízení je navrženo pro použití s transparentní kultivační komorou Strex (Strex Inc., Japonsko), konkrétně typem STB-CH-04 s efektivní plochou pro nasazení buněk 4 cm^2 . Komoru lze také použít v kombinaci s mikroskopem, díky tenké membráně ($100\text{-}200 \mu\text{m}$), na kterou se buňky nasazují. Komora je určena pro jednoosé namáhání s poměrným prodloužením 1-20 %. Vysoká ohebnost a zachování stejných vlastností i během dlouhodobého mechanického namáhání jsou zajištěny díky materiálu, ze kterého je komora vyrobena, PDMS. Tento materiál je však vysoce vodoodpudivý, kvůli čemuž nedochází k přilnutí buněk k povrchu membrány a před nasazením buněk tak musí dojít k úpravě povrchu[37].

Před návrhem krytu kultivační komory byl v programu Autodesk Inventor vytvořen model používané kultivační komory, aby byla zajištěna kompatibilita mezi komorou a krytem. Model kultivační komory je zobrazen na Obrázku 2.7.



Obrázek 2.7: Model kultivační komory. Obrázek: autor

První návrh krytu komory (na Obrázku 2.8) předpokládal jako výrobní materiál pro kryt silikon, který se jevil jako vhodný z důvodu své pružnosti, transparentnosti, netoxičnosti a teplotní stability. Tento návrh předpokládal, že kryt bude umístěn přímo na komoře a bude natahován spolu s komorou. Výkres krytu je obsažen v příloze s označením DP_10.

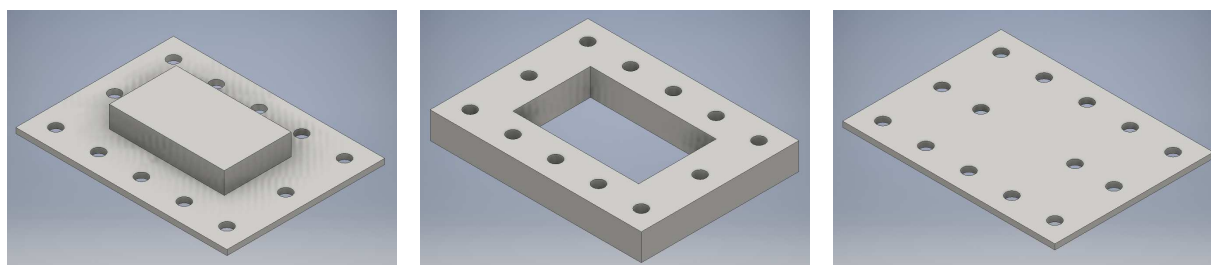


(a) Pohled na kryt zeshora

(b) Pohled na kryt zespoda

Obrázek 2.8: Návrh krytu kultivační komory. Obrázky: autor

Aby mohl být kryt vyroben, bylo nutné navrhnout a vyrobit formu, kterou by bylo možné silikonem vylít. Navržená forma měla tři části (na Obrázku 2.9, v přílohách výkresy DP_07, DP_08 a DP_09), které měly po obvodu otvory pro sešroubování a ve svrchním dle formy byly navíc dva otvory pro vstříknutí silikonu.



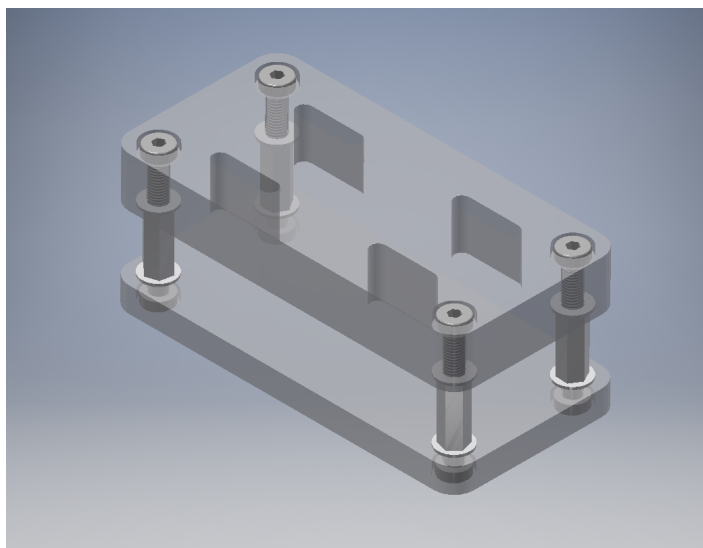
(a) Spodní díl formy

(b) Prostřední díl formy

(c) Svrchní díl formy

Obrázek 2.9: Původní návrh formy krytu kultivační komory. Obrázky: autor

Oproti původnímu předpokladu se ukázalo, že bez porušení silikonového krytu jej není možné z formy vyjmout. Proto bylo navrženo a vytvořeno náhradní řešení v podobě krytu z průhledného polykarbonátu, pro které není potřeba forma. I toto řešení bylo nejprve navrženo v prostředí Autodesk Inventor a následně vyrobeno, návrh je zobrazen na Obrázku 2.10. Výkresy krytu, s označením DP_11, DP_12, DP_13 a DP_14 jsou zahrnuty jako přílohy práce.



Obrázek 2.10: Návrh krytu z polykarbonátu. Obrázek: autor

Ve své finální podobě se kryt skládá ze dvou upravených polykarbonátových desek, které jsou nad sebou upevněny pomocí distančních sloupků a nerezových šroubů M4. Do prostoru mezi oběma deskami je pak možné vložit kultivační komoru. Oproti původnímu řešení, kdy měl být silikonový kryt natahován spolu s kultivační komorou, nedochází u této varianty krytu k jeho pohybu a změna délky kultivační komory je umožněna díky drážkám ve svrchní desce krytu, kudy prochází nerezové tyčinky, na nichž je komora upnuta.

2.3 Ovládání motoru

Ovládání krokového motoru je, jak bylo již zmíněno výše, řešeno v několika úrovních. Přímě k motoru je připojený driver, jehož činnost je řízena Arduinem, které je ovládáno uživatelem prostřednictvím uživatelského rozhraní v počítači.

Servomotor je ovládán driverem Leadshine ES-D508, pomocí něhož lze nastavit proud procházející motorem a počet mikrokroků na jednu otáčku. V systému je nastaveno 6400 mikrokroků na otáčku, vzhledem k tomu, že s tímto nastavením počítá program nahraný na Arduinu, je pro správnou funkci systému nutné tento počet zachovat.

Driver má konektory pro připojení cívek motoru (A+, A-, B+, B-), konektory pro napájení (+Vdc, GND), a konektory pro přivedení řídicích signálů PUL +/-, DIR +/-, OPTO +/- a ENA +/-, + konektory jsou připojeny na GND Arduina a - konektory jsou zapojeny do níže uvedených pinů Arduina. Pro napájení systému bylo použito napájecí napětí 24 V a proud motorem byl nastaven na 1,9 A.

V případě krokového motoru byl použit driver Leadshine DM422C, jehož ovládání, včetně programu nahraném na Arduinu, bylo stejné jako u driveru pro servomotor.

2.3.1 Arduino UNO

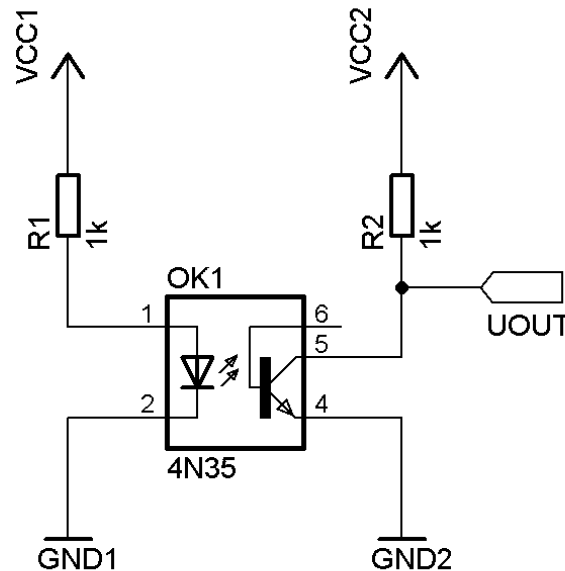
Arduino UNO je vývojová platforma založená na procesoru ATmega 328P. Součástí desky je 6 analogových a 16 digitálních pinů, pin 5 V a dva piny GND. K počítači se Arduino připojuje pomocí rozhraní USB, přes které může být Arduino napájeno, hlavně je ale možné nahrát na desku program, který má vykonávat.

Pro Arduino byl v jazyce wiring vytvořen program (Stretch.ino) pro ovládání připojeného driveru, který na něj byl následně nahrán. Konektory PUL-, DIR-, OPTO a ENA- jsou připojeny na Arduino následujícím způsobem: konektor ENA- je připojen na digitální pin 12, OPTO je připojen na pin 5 V, PUL- na digitální pin 3 a DIR- na digitální pin 2. Toto zapojení je třeba zachovat, protože v programu nahraném na Arduinu je měněna napěťová úroveň pro řízení motoru jen na uvedených pinech a pokud by bylo zapojení jiné, zařízení by nefungovalo.

Na digitálních pinech Arduina mohou být dvě napěťové úrovně: high (odpovídá 5 V) a low (odpovídá 0 V). Pinem DIR- je řízen směr otáčení, zároveň ale záleží na tom, jak jsou zapojeny cívky motoru. Na digitálním pinu 3 (PUL-) je vytvářen pulzní signál, který určuje rychlost točení motoru: jeden pulz odpovídá jednomu mikrokroku.

Pro sběr snímků z mikroskopu v průběhu stimulace byl využit již existující systém, založený rovněž na platformě Arduino. Pro synchronizaci mezi oběma zařízeními je z Arduina, které ovládá snímání, vysílán signál, na základě kterého Arduino ovládající posuv stimulaci zastaví ve výchozí poloze, aby mohl být snímek vytvořen. Po ukončení snímání se stimulace opět spustí s již nastavenými parametry. Díky tomuto je splněn požadavek na metodu live imaging. Arduina jsou mezi sebou propojena a toto propojení je galvanicky odděleno optočlenem 4N35, jak je znázorněno na schématu na Obrázku 2.11. Celé zapojení je realizováno pomocí univerzální desky plošného spoje, která je pomocí pinů připevněna na Arduino, které ovládá posuv. Deska musí být na Arduinu umístěna tak, aby byl výstup z optočlenu (na Obrázku 2.11 označen UOUT) zapojen do pinu A0 Arduina, zdroj VCC2 na pinu 5V a uzemnění GND2 na pinu GND Arduina. Zdroj VCC1 a uzemnění GND1 jsou na desce realizovány

dvěma piny, na které lze pomocí kablíku přivést požadovaný řídicí signál.



Obrázek 2.11: Schéma zapojení optočlenu. Obrázek: autor

Po připojení Arduina k počítači se vytvoří virtuální sériový port, přes který může probíhat komunikace mezi počítačem a Arduinem. Kromě toho, že lze prostřednictvím tohoto spojení nahrát na Arduino program, jak bylo zmíněno výše, lze prostřednictvím sériového portu také posílat Arduino informace, pomocí kterých lze nahraný program řídit, čehož využívá vytvořené uživatelské rozhraní. Kvůli ovládní Arduina přes uživatelské rozhraní je nutné, aby bylo Arduino po celou dobu činnosti zařízení připojeno k počítači.

Program se skládá ze dvou částí: část pro nastavení (setup) a smyčka. Celý program se spouští od začátku při připojení Arduina k napájení, ale také při otevření sériového portu. Zatímco setup proběhne po dobu běhu programu jen jednou na začátku, smyčka se stále opakuje. V části setup jsou definovány parametry sériového přenosu a nastaveny piny jako výstupní nebo vstupní. Ve smyčce jsou pak definovány úkony pro ovládní driveru a tedy celého systému.

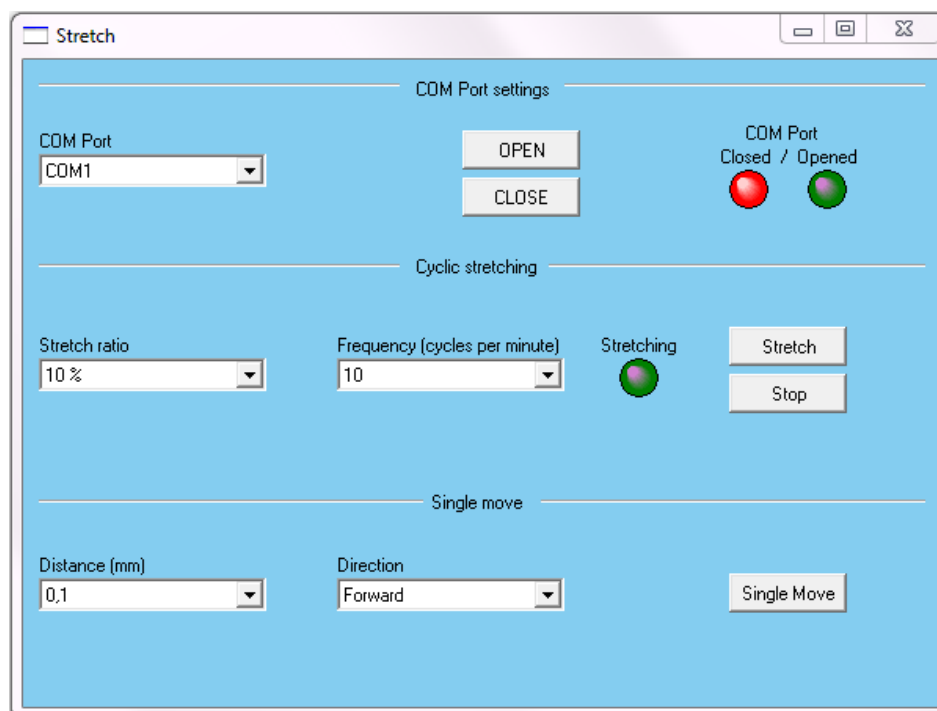
Program umožňuje dva módy ovládní motoru, jejichž výsledkem je jednorázový pohyb nebo cyklický pohyb. Jednorázový pohyb je určen pro nastavení počáteční polohy jezdce posuvu, tak aby do zařízení mohla být upnuta kultivační komora. Volitelnými parametry jednorázového posunutí jsou vzdálenost a směr. Cyklický pohyb je určen pro vlastní stimulaci buněk a jeho volitelnými parametry jsou počet cyklů za minutu a poměrné prodloužení, které je vztaženo k použité kultivační komoře (délka komůrky je 2 cm). Jednotlivé parametry pro ovládní

motoru jsou uživatelem nastavovány pomocí uživatelského rozhraní a přes sériový port se toto nastavení přenáší do Arduina. V programu Arduina je vytvořena sériová událost (Serial Event), která zajišťuje reakci Arduina při změně na sériovém portu. Pokud nastane sériová událost, Arduino dokončí aktuální činnost (např. cyklus) a poté provede instrukce, které jsou zapsány v sériové události. Z uživatelského rozhraní jsou posílány informace o nastavení stimulace jako znaky, které se načítají v sériové události. Na základě přijatých znaků program Arduina rozhoduje, jaká činnost a s jakými parametry bude vykonána.

Defaultně není v programu Arduina nastaven žádný mód činnosti a po připojení k počítači tak musí nastavení vždy provést uživatel. Pokud dojde k odpojení Arduina od počítače nebo uzavření sériového portu, musí po opětovném připojení a otevření sériového portu uživatel rovněž provést nové nastavení systému.

2.4 Uživatelské rozhraní

Uživatelské rozhraní bylo vytvořeno v jazyce RapidQ a lze jej bez jakékoli instalace spustit pomocí příloženého spustitelného souboru Stretch.exe. V okně se následně otevře program, který má tři hlavní části: nastavení sériového portu, nastavení cyklického namáhání (vlastní stimulace) a nastavení jednorázového posunu. Jednotlivé části programu jsou pro přehlednost opticky odděleny linkami. Uživatelské rozhraní je v anglickém jazyce a jeho náhled v defaultním nastavení je zobrazen na Obrázku 2.12.



Obrázek 2.12: Uživatelské rozhraní. Obrázek: autor

Prvním krokem pro nastavení systému je otevření sériového portu. Následně je možné, v případě nutnosti, nastavit počáteční polohu jezdce posuvu tak, aby při upnutí kultivační komory do zařízení nebyla komora nijak deformovaná. Poté již lze nastavit samotné parametry stimulace a stimulaci spustit.

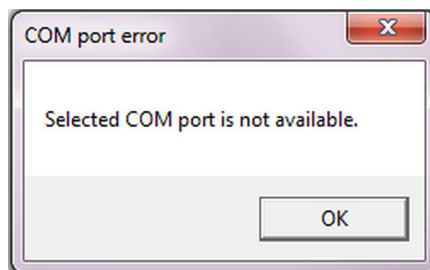
2.4.1 Nastavení sériového portu

První částí, kterou je nutné nastavit vždy, je nastavení sériového portu (část COM Port settings). Pro správné nastavení je nutné nejprve zjistit, na jakém sériovém portu se Arduino hlásí, což lze provést například přes Správce zařízení, např. ve Windows 7: Tento počítač → Vlastnosti →

Správce zařízení → Porty (COM a LPT) → Arduino Uno (COM3). Sériový port je označen COM a číslem, například COM3 jako v uvedeném příkladě. Ve stejném nastavení lze rovněž číslo portu změnit.

Část nastavení sériového portu se skládá ze tří prvků: rozbalovacího menu pro výběr požadovaného portu, tlačítek pro otevření nebo uzavření portu a LED indikátorů stavu portu. Dokud port není otevřený, svítí červená LED pod nápisem „COM Port Closed“. Pro jakoukoli sériovou komunikaci je nutné napřed sériový port otevřít.

Pro otevření sériového portu je nejprve třeba nastavit příslušný sériový port, na kterém se hlásí Arduino. Pro toto nastavení je určeno rolovací menu s názvem „COM Port“, kde lze zvolit jednu z celkem devíti možností: COM1 až COM9. Po vybrání požadovaného portu jej lze pomocí tlačítka s nápisem „OPEN“ otevřít. Pokud se vybraný port nepodaří otevřít, zobrazí se v novém okně chybové hlášení, které na tuto skutečnost upozorňuje, náhled tohoto hlášení je zobrazen na Obrázku 2.13. Tato situace může nastat například v případě, že uživatel nevybere správný sériový port, na kterém se Arduino hlásí. Pokud je port vybrán správně, je možné, že je port již otevřený jiným programem a v tomto případě je nutné jej nejprve v tomto programu uzavřít.



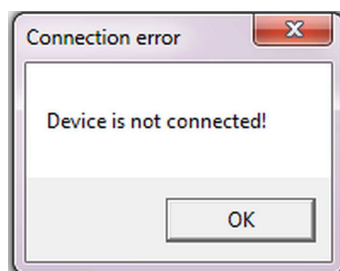
Obrázek 2.13: Chybové hlášení při otevírání sériového portu. Obrázek: autor

Pokud se port v pořádku otevřít podaří, rozsvítí se pod nápisem „COM Port Opened“ zelená indikační LED a zároveň zhasne červená LED pod nápisem „COM Port Closed“. Kliknutím na tlačítko „CLOSE“ dojde k uzavření sériového portu, což je opět indikováno rozsvícením červené LED a zhasnutím zelené. Pokud je port otevřený a uživatel rozbálí rolovací menu a znovu vybere z nabídky některý z portů (včetně původně otevřeného), dojde rovněž k uzavření portu, a to okamžitě po vybrání z menu. Pro všechna další nastavení je nutné, aby byl sériový port otevřený.

Otevření sériového portu vyvolá hardwarový reset Arduina, který způsobí start nahraného programu od začátku. To znamená, že pokud Arduino vykonává nějakou činnost, v okamžiku otevření sériového portu tuto činnost přeruší a dále pokračuje od začátku programu, který má nahraný. Pokud tedy uživatel nastaví například cyklické namáhání a následně uzavře a opět

otevře sériový port, dojde k přerušení aktuální činnosti zařízení okamžitě. Z této skutečnosti vyplývá, že se zařízení může zastavit například v polovině cyklu namáhání, tedy v místě, kdy je kultivační komora napnutá. Pokud by v této situaci uživatel znovu nastavil cyklické namáhání, dojde k dalšímu natažení komory, což způsobí nejen nesprávnou stimulaci, ale mohlo by dojít až k přetržení komory. Z tohoto důvodu je vhodné, aby se uživatel popsané situace vyvaroval, popřípadě před opětovným spuštěním stimulace zkontroloval polohu komory a v případě nutnosti ji upravil.

Pokud je sériový port otevřený, může nastat situace, kdy je následně Arduino odpojeno od počítače, ať už jej odpojil sám uživatel nebo k tomuto dojde z jiných příčin. V takovém případě ke zhasnutí zelené a rozsvícení červené LED automaticky nedojde, přestože je spojení přerušeno. Aby byla automaticky po odpojení příslušná dioda zapnuta nebo vypnuta, musel by program neustále kontrolovat připojení Arduina, což by jakoukoli další komunikaci přes sériový port znemožnilo a nebylo by možné zařízení ovládat. V případě, že k opojení Arduina dojde, dozví se o tom uživatel až když se pokusí nastavit parametry pomocí jednoho ze tří tlačítek v částech „Cyclic stretching“ a „Single move“. V takové situaci se pak zobrazí chybové hlášení, které na přerušení připojení upozorňuje, zároveň dojde k uzavření sériového portu a v části „COM port settings“ ke zhasnutí nebo rozsvícení příslušných LED. Chybové hlášení je zobrazeno na Obrázku 2.14.



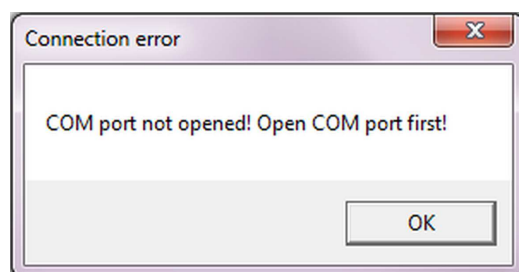
Obrázek 2.14: Chybové hlášení o odpojeném zařízení. Obrázek: autor

2.4.2 Nastavení cyklického namáhání

Druhou částí uživatelského rozhraní je nastavení parametrů stimulace buněk, označená jako „Cyclic stretching“. Pro toto nastavení slouží dvě rozbalovací menu a dvě tlačítka, součástí je také indikační zelená LED. Prvním rozbalovacím menu, s názvem „Stretch ratio“, se nastavuje poměrné prodloužení vztahené k délce prostoru pro buňky v komoře, 2 cm. Na výběr jsou možnosti 2,5 %, 5 %, 7,5 %, 10 %, 12,5 %, 15 %, 17,5 % a 20 %, přičemž hodnota 10 % je nastavena defaultně. Pomocí druhého rozbalovacího menu, označeného „Frequency (cycles per minute)“ je možné nastavit frekvenci stimulace jako počet cyklů za minutu. K dispozici

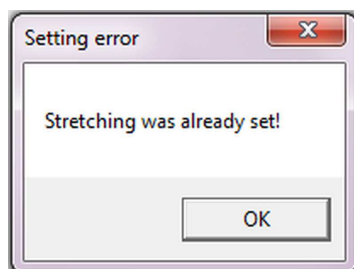
je devět předvoleb: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 a 60 cyklů za minutu a předvolena je možnost 10 cyklů za minutu.

Po výběru parametrů stimulace je možné tyto parametry nastavit prostřednictvím tlačítka „Stretch“. Pokud před nastavením parametrů cyklického namáhání nedošlo k otevření sériového portu, otevře se v novém okně chybové hlášení (na Obrázku 2.15), které uživatele k otevření sériového portu vyzývá.



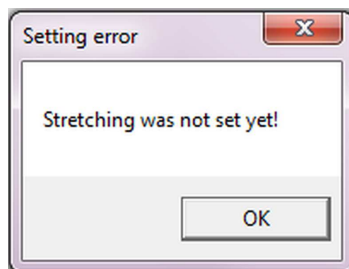
Obrázek 2.15: Chybové hlášení při uzavřeném sériovém portu. Obrázek: autor

Pokud je sériový port otevřený, parametry stimulace se nastaví a rozsvítí se zelená LED s označením „Stretching“, která indikuje, že stimulace probíhá. V případě, že probíhá stimulace a uživatel znovu zmáčkne tlačítko „Stretch“, opět se v novém okně zobrazí chybové hlášení, které je zachyceno na Obrázku 2.16.



Obrázek 2.16: Chybové hlášení v případě opakovaného nastavení stimulace. Obrázek: autor

Pro nastavení jiných parametrů cyklického namáhání je zapotřebí nejprve to současně nastavené zastavit, protože je určené tlačítko s nápisem „Stop“. Po jeho zmáčknutí dojde ještě k dokončení započatého cyklu, další cyklus se však již nespustí a zařízení zůstane v klidu. Rovněž po zmáčknutí tlačítka zhasne po dokončení cyklu LED indikující stimulaci. Před zmáčknutím tlačítka „Stop“ musí být, stejně jako v předchozím případě, sériový port otevřený, v opačném případě dojde k zobrazení stejného chybového hlášení, jako je na Obrázku 2.15. V případě, že uživatel zmáčkne tlačítko „Stop“ před spuštěním cyklického namáhání, zobrazí se chybové hlášení, jako je na Obrázku 2.17.



Obrázek 2.17: Chybové hlášení při zmáčknutí tlačítka „Stop“ před spuštěním namáhání. Obrázek: autor

Připojení Arduina k počítači je kontrolováno při každém zmáčknutí obou uvedených tlačítek. Pokud po úspěšném otevření sériového portu dojde z jakékoli příčiny k odpojení Arduina a uživatel jedno z tlačítek zmáčkne, zobrazí se chybové hlášení, které je již zobrazeno na Obrázku 2.14, přičemž mezi zmáčknutím tlačítka a zobrazením tohoto hlášení je prodleva 12 sekund. To je způsobeno tím, že pokud je Arduino připojeno k počítači a probíhá stimulace, je před novým nastavením vždy napřed dokončen cyklus tak, aby k zastavení jezdce posuvu došlo vždy ve výchozí poloze. Nejnižší nastavitelná frekvence stimulace je pětkrát za minutu, čemuž odpovídá právě 12 sekund na jeden cyklus. Pokud by byla prodleva menší, mohlo by se zobrazit chybové hlášení i v případě, že by Arduino ve skutečnosti stále k počítači připojeno bylo.

2.4.3 Jednorázový posun

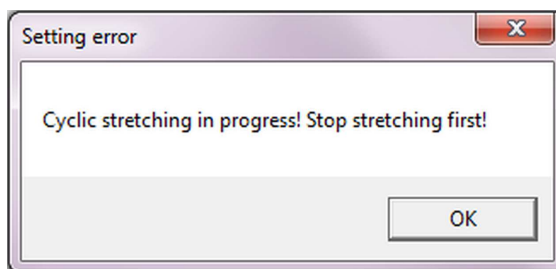
Třetí a poslední částí uživatelského rozhraní je nastavení jednorázového posunu, který je určen pro nastavení počáteční polohy tak, aby mohla být do zařízení upnuta kultivační komora. Toto nastavení je tak třeba provést před zahájením samotné stimulace. Stejně jako u nastavení cyklického namáhání lze také v této části nastavit pomocí rozbalovacího menu dva parametry. Prvním z nich je vzdálenost jednorázového posunu v milimetrech, s označením „Distance (mm)“. V menu je možné vybrat z pěti možností: 0,1 mm, 0,2 mm, 0,5 mm, 1 mm a 2 mm, přičemž přednastavena je hodnota 0,1 mm. V druhém rozbalovacím menu s názvem „Direction“ je možné zvolit směr posunu. K dispozici jsou dvě možnosti, „Forward“ a „Back-

ward“, tedy dopředu a dozadu. Směr posunu tím však není jednoznačně určen, protože je zároveň závislý na uspořádání zapojení cívek motoru.

Pro poslání parametrů jednorázového posunu do Arduina a tedy nastavení zařízení slouží tlačítko s nápisem „Single Move“. Pro umožnění přenosu musí opět před tímto nastavením dojít k otevření sériového portu. Pokud port otevřený není, zobrazí se v novém okně chybové

hlášení, stejně jako tomu bylo v případě cyklického namáhání (na Obrázku 2.15). Obdobně také dochází při každém zmáčknutí tohoto tlačítka ke kontrole připojení Arduina k počítači a pokud Arduino připojeno není, následují stejné akce jako je popsáno výše.

V případě, že v okamžiku zmáčknutí tlačítka „Single move“ probíhá stimulace, opět se v novém okně otevře chybové hlášení (na Obrázku 2.18), které uživatele vyzývá, aby napřed stimulaci ukončil.



Obrázek 2.18: Chybové hlášení vyzývající k ukončení stimulace. Obrázek: autor

2.5 Buněčné experimenty

Buněčné experimenty proběhly při ověření vytvořeného systému a pro zjištění optimálních parametrů stimulace. Při krátkodobých experimentech, které trvaly jeden den, byla ověřena funkčnost systému a jeho nezávadnost pro buněčnou kulturu. Při dlouhodobých experimentech, které trvaly tři až čtyři dny, byl zjišťován vliv nastavení systému na diferenciaci buněk směrem k buňkám hladké svaloviny.

Veškeré materiály použité pro stavbu systému a přicházející do styku s buňkami jsou sterilizovatelné a netoxické pro buňky, což bylo ověřeno při prvních krátkodobých experimentech. Sterilizace komor, celého krytu včetně šroubů, distančních sloupků a úchyťových tyčinek byla provedena v parním sterilizátoru (Tuttnauer, 2840 EL-D), nástroje pro sestavení krytu a vsazení komory byly sterilizované v 96% ethanolu.

Pro krátkodobé i dlouhodobé experimenty byly použity prasečí mezenchymální kmenové buňky izolované z tuku (původ: vlastní izolace na AV ČR v.v.i.), které byly staticky namnoženy v růstovém médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) s přidavkem 10% fetálního séra a gentamycinu o koncentraci 40 $\mu\text{g/ml}$ po dobu cca 7 dní, kdy byly zpasážovány. Kultivační médium DMEM z výroby obsahuje fenolftalein, který reaguje na okyselení média oxidem uhličitým změnou barvy do žluta až oranžova z původní růžové a je tak indikátorem metabolismu buněk. První pasáž byla následně kultivována po dobu 5-7 dní do následující pasáže. Pro experimenty byla použita druhá buněčná pasáž.

Vzhledem k přirozeně nízké adhezi buněk na silikon bylo nutné dno komory fyzikálně-chemicky upravit. Zvýšení smáčivosti materiálu bylo dosaženo pomocí oplazmení povrchu za přítomnosti kyslíku (15 min, Diener Zepto V6), pro integraci buněk k silikonu byla následně nanášena fibrinová vrstva o velikosti několika μm . Bez tohoto by buňky na dno komory neadherovaly, následkem čehož by nebyly mechanicky namáhány, přestože by komora natahována byla.

ASC byly z kultivačních lahví izolovány pomocí enzymu trypsinu a centrifugace (5 minut, 300G). Buňky byly jak do statické, tak dynamické komory nasazeny v relativně husté násadě 100 tis. buněk/ cm^2 , čímž byla zkrácena doba proliferace a brzy tak nastala diferenciace kmenových buněk směrem k buňkám hladké svaloviny. Tato násada byla dodržena pro všechny experimenty stejná.

Pro diferenciaci buněk v obou typech komor bylo použito médium DMEM pro hladký sval, kdy přísady do média byly následující:

- 10% fetální sérum
- 40 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin
- 50 $\mu\text{g/ml}$ kyselina askorbová
- 5 ng/ml TGF β 1
- 2,5 ng/ml BMP4 (Bone morphogenetic protein 4 - kostní morfogenetický protein 4)

Pro dynamickou komoru o kultivační ploše 4 cm^2 byly použity 2 ml média. Statická kontrola byla nasazena do 12jamkové kultivační desky (TPP, Trasadingen, Švýcarsko), kdy plocha jedné jamky je cca 3,5 cm^2 , objem média byl pak 1,75 ml.

Do složeného krytu byla po nasazení buněk umístěna kultivační komora a následně upnuta do systému. Po připojení driveru na zdroj napětí (24 V) a připojení Arduina k počítači pomocí rozhraní USB již bylo možné ovládat systém pouze pomocí uživatelského rozhraní. Statická kultura byla umístěna rovněž v inkubátoru.

Při dlouhodobých experimentech byly nastavovány parametry stimulace (frekvence a poměrného prodloužení) s cílem zjistit optimální nastavení pro diferenciaci kmenových buněk směrem k buňkám hladké svaloviny. Pro experimenty byly na základě analýzy dostupné literatury vybrány následující parametry: poměrné prodloužení 5 %, 10 %, 20 % a frekvence 15, 30 a 60 cyklů za minutu [19, 21, 22, 24, 25]. Plánováno bylo otestovat všechny kombinace uvedených parametrů, avšak výběr musel být zúžen kvůli problémům s kultivačními komorami. Během stimulační kultury byla buněčná kultura pravidelně snímána a pokud bylo ze snímků

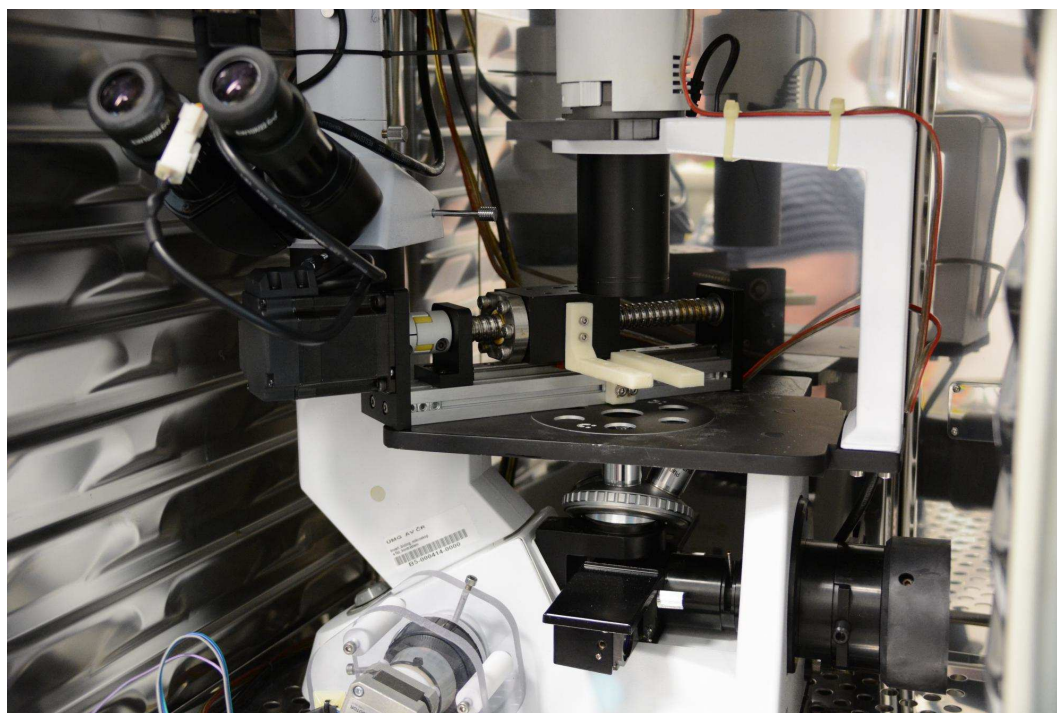
patrné, že došlo k odumření buněk, byla stimulace ukončena. Vzhledem k nedostatku kulturačních komor byla v takovém případě komora vyčištěna (hypertonický a hypotonický roztok NaCl, ředěné Savo) a po sterilizaci použita znovu pro novou násadu buněk.

Po určité době (při dlouhodobých experimentech se jednalo o 3-4 dní) bylo vyjmuto diferenciální médium a buňky z dynamické i statické kultury byly zafixovány ve 4% roztoku paraformaldehydu v pufrovaném fyziologickém roztoku. Po fixaci byly prováděny následující analýzy (konkrétní výběr analýz závisel na experimentu, všechny analýzy byly provedeny pouze u pozitivních výsledků viditelných na světelném mikroskopu s fázovým kontrastem): odhad počtu buněk v dané kultuře, imunochemické barvení markerů: kolagen typu I (všeobecný marker pro diferenciaci mj. do buněk hladké svaloviny), calponin 1 (specifický marker diferenciacie do hladké svaloviny), zobrazení jader a cytoskeletu (barviva faloidin, Hoechst).

3 Výsledky

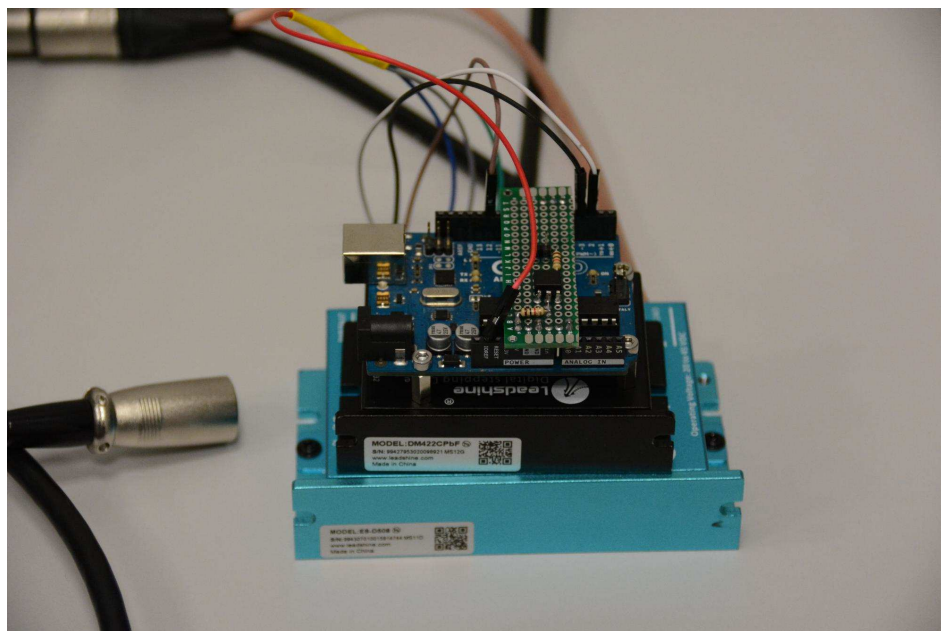
V rámci diplomové práce byl jako jeden z výstupů navržen a ověřen systém pro uniaxiální namáhání buněčné kultury. Systém se skládá z lineárního posuvu se servomotorem, plastových úchytů pro upnutí kultivační komory, polykarbonátového krytu komory a samotné kultivační komory. Systém je doplněn elektronikou pro ovládání (driver krokového motoru, optické oddělení, Arduino UNO) a softwarem pro komunikaci platformy Arduino s motorem a uživatelským rozhraním.

Vývoj systému probíhal v několika krocích, kdy byla každá komponenta ověřena při krátkodobých experimentech (s buňkami i bez buněk) z hlediska funkčnosti, využitelnosti pro buňky (zejména sterility) a manipulace při experimentu. Na základě problémů, které byly zjištěny během těchto experimentů došlo k některým úpravám systému, které jsou blíže popsány v diskuzi. Výsledný optimalizovaný systém splňuje požadavky dané v zadání práce, což bylo ověřeno dlouhodobými experimenty. Kompletní systém umístěný v inkubátoru je zobrazen na Obrázku 3.1.



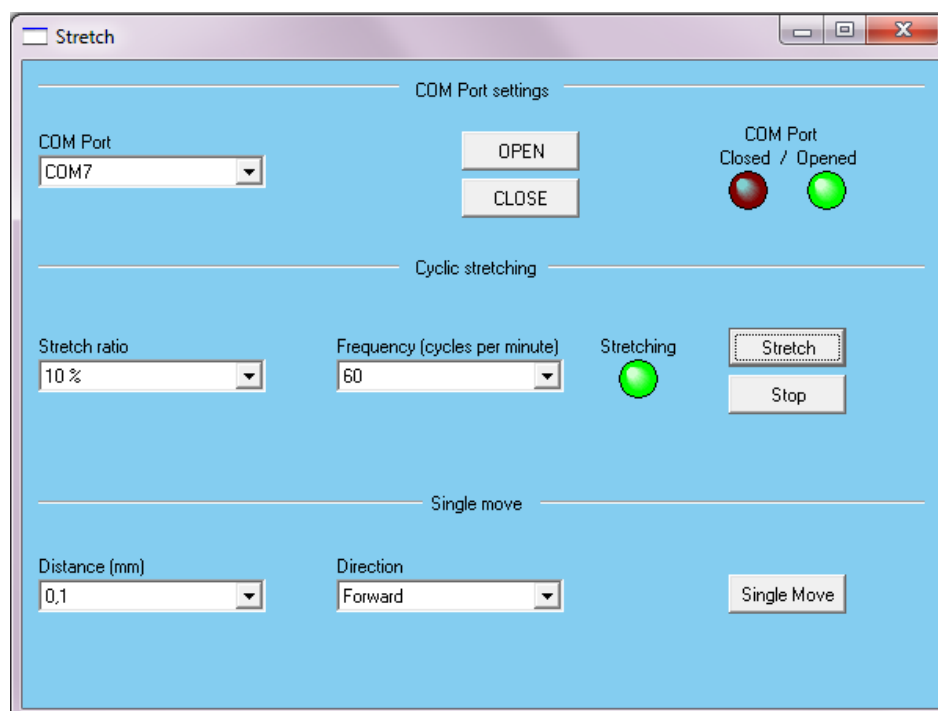
Obrázek 3.1: Systém pro uniaxiální namáhání buněk. Obrázek: autor

Driver pro ovládání motoru spolu s Arduinem a připojenou deskou s optočlenem pro galvanické oddělení je zobrazen na Obrázku 3.2.



Obrázek 3.2: Řídící jednotka systému. Obrázek: autor

Uživatelské rozhraní umožňuje několik nastavení: nastavení sériového portu, na kterém se hlásí Arduino, provedení jednorázového pohybu pro nastavení optimální výchozí polohy jezdce posuvu pro upnutí kultivační komory a část pro nastavení parametrů stimulace a její spuštění. Uživatelské rozhraní lze spustit bez instalace pomocí spustitelného souboru Stretch.exe. Náhled programu při spuštění stimulaci s nastavením 10% prodloužení a 60 cykly za minutu je zobrazen na Obrázku 3.3.

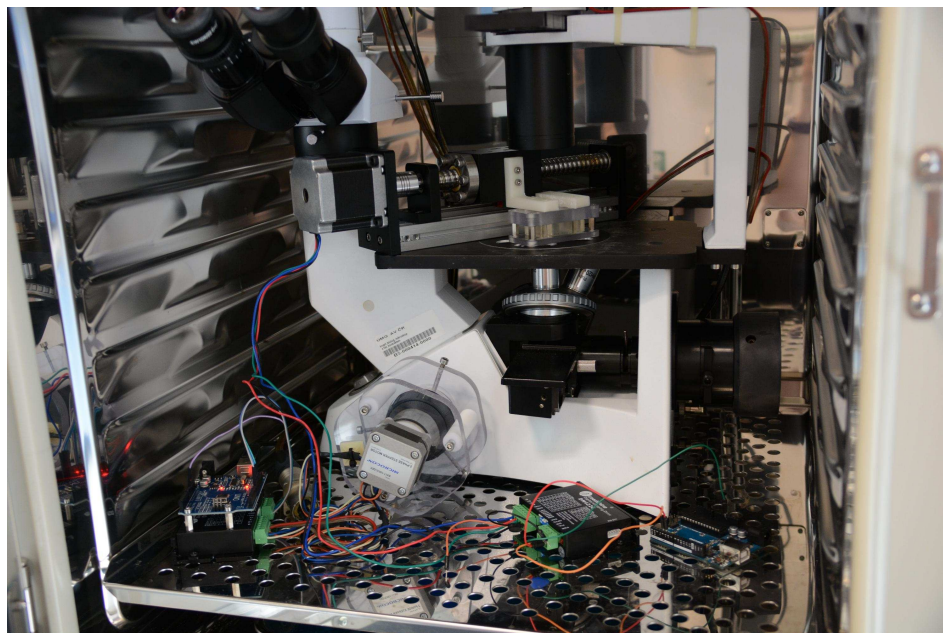


Obrázek 3.3: Uživatelské rozhraní. Obrázek: autor

3.1 Ověření systému

Ověření systému probíhalo v několika fázích. Každá navržená a sestavená komponenta byla otestována při krátkodobých experimentech buď s nasadou buněk, nebo bez ní. První proběhlo ověření funkčnosti samotného systému v inkubátoru bez buněk: přehřívání motoru nejen že zkracuje jeho životnost, ale navíc přehřívá prostředí pro kultivaci buněk, což vede k apoptóze buněk a neúspěšnosti experimentu. Při těchto experimentech byly ověřeny i úchyty komory na manipulaci, pevnost apod. Dále byla testována zejména netoxičnost použitých materiálů, technické řešení celého systému, aby byla udržena sterilita prostředí po celou dobu kultivace, a manipulace se systémem a komorou. Po úspěšném ověření při těchto experimentech bylo celé zařízení využito pro dlouhodobé experimenty pro diferenciaci kmenových buněk k hladké svalovině.

Při ověření systému z hlediska jeho přehřívání a ovlivňování teploty v inkubátoru byla do posuvu upnuta komora a nastavena frekvence stimulace 60 cyklů za minutu s poměrným prodloužením 10 %. Po dvou hodinách probíhající stimulace k ovlivnění nastavené teploty v inkubátoru nedošlo a z tohoto důvodu chlazení součástí systému není. Umístění systému v inkubátoru a popsané ověření je zobrazeno na Obrázku 3.4.

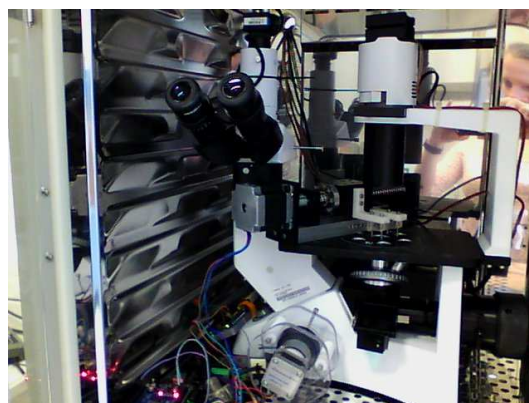


Obrázek 3.4: Ověření systému v inkubátoru. Fotografie: autor

Při zkušebním provozu byly pro ověření rovněž pořízeny snímky termokamerou, aby bylo zjištěno, jaká je teplota systému. Na Obrázku 3.5 je zobrazen snímek z termokamery po dvou hodinách činnosti v inkubátoru.



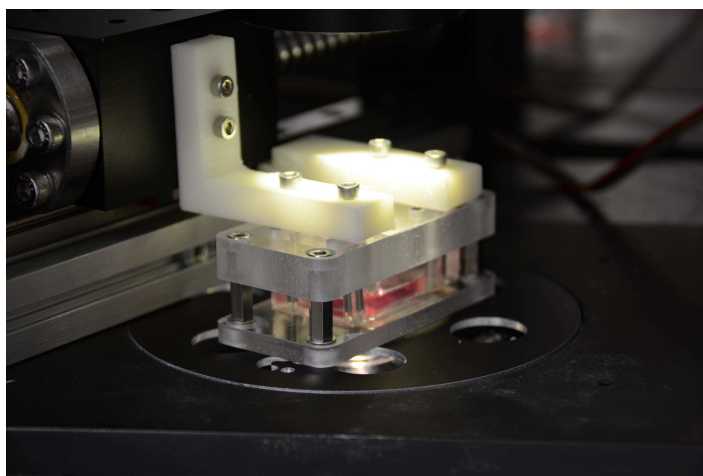
(a) Snímek z termokamery



(b) Odpovídající snímek

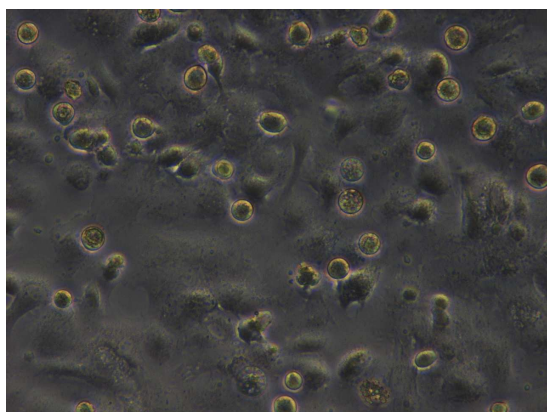
Obrázek 3.5: Ověření: snímek z termokamery. Obrázek: autor

Pro ověření systému z hlediska nezávadnosti prostředí pro buňky a zajištění vhodných podmínek byly nasazeny kmenové buňky, které byly vystaveny namáhání nejprve s amplitudou 2,5 % s frekvencí 10 cyklů za minutu. Stimulace probíhala po dobu 1 dne, během kterého byla buněčná kultura pravidelně zachycována pomocí mikroskopu a snímacího zařízení. Konfigurace systému v inkubátoru byla zachována stejná jako byla při předchozím ověření systému. Zakrytovaná kultivační komora upnutá do systému je zobrazena na Obrázku 3.6.

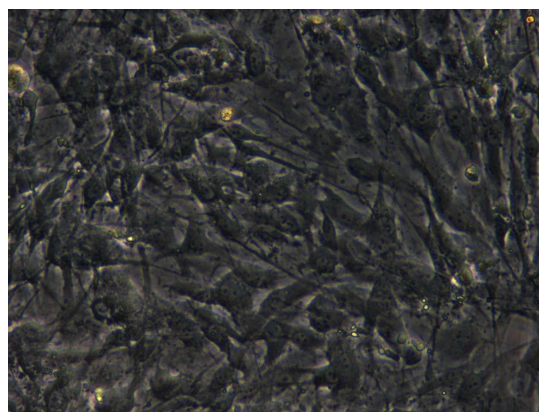


Obrázek 3.6: Kultivační komora při experimentu. Obrázek: autor

Na Obrázku 3.7 je zobrazena buněčná kultura bezprostředně po nasazení (a) a po dvou hodinách stimulace (b). Zatímco bezprostředně po nasazení je patrné, že buňky ještě neadhérovaly ke dnu kultivační komory, po dvou hodinách stimulace již přilnutí buněk patrné je. Experimenty byly hodnoceny na základě snímků ze světelného mikroskopu s fázovým kontrastem (live imaging).



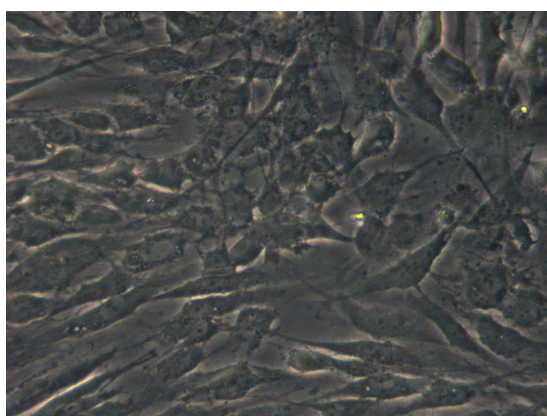
(a) Kultura ihned po nasazení



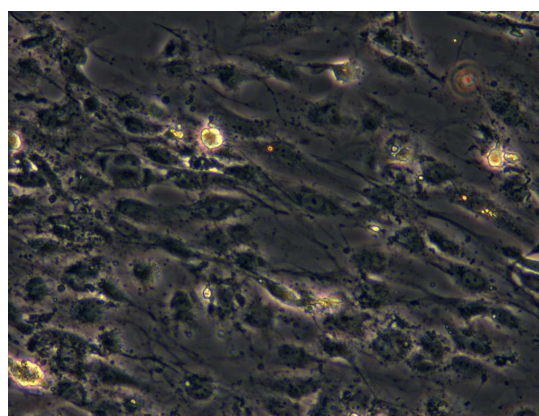
(b) Kultura po dvou hodinách stimulace

Obrázek 3.7: Snímky stimulované buněčné kultury. Obrázky: autor

Pro srovnání byla současně s kulturou vystavenou cyklickému namáhání nasazena statická kultura. Experiment byl po jednom dni ukončen a jeho výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 3.8.



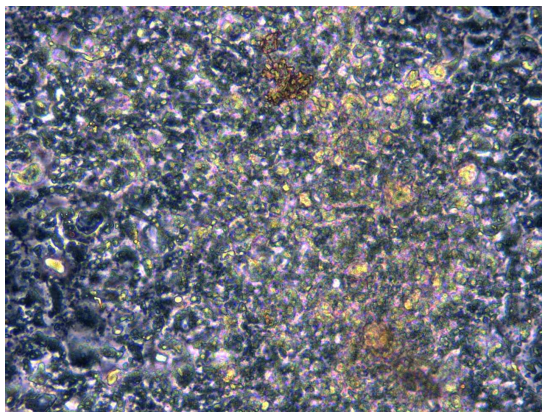
(a) Statická kultura



(b) Stimulovaná kultura

Obrázek 3.8: Snímky statické a stimulované kultury po jednom dni. Obrázky: autor

Během experimentu došlo v některých místech dynamicky stimulované kultury nejspíše k odumření buněk, což je zobrazeno na Obrázku 3.9.



Obrázek 3.9: Odumření buněk během stimulace. Obrázek: autor

Krátkodobé buněčné experimenty potvrdily, že systém je funkční a po nezbytných úpravách kompatibilní se snímacím zařízením.

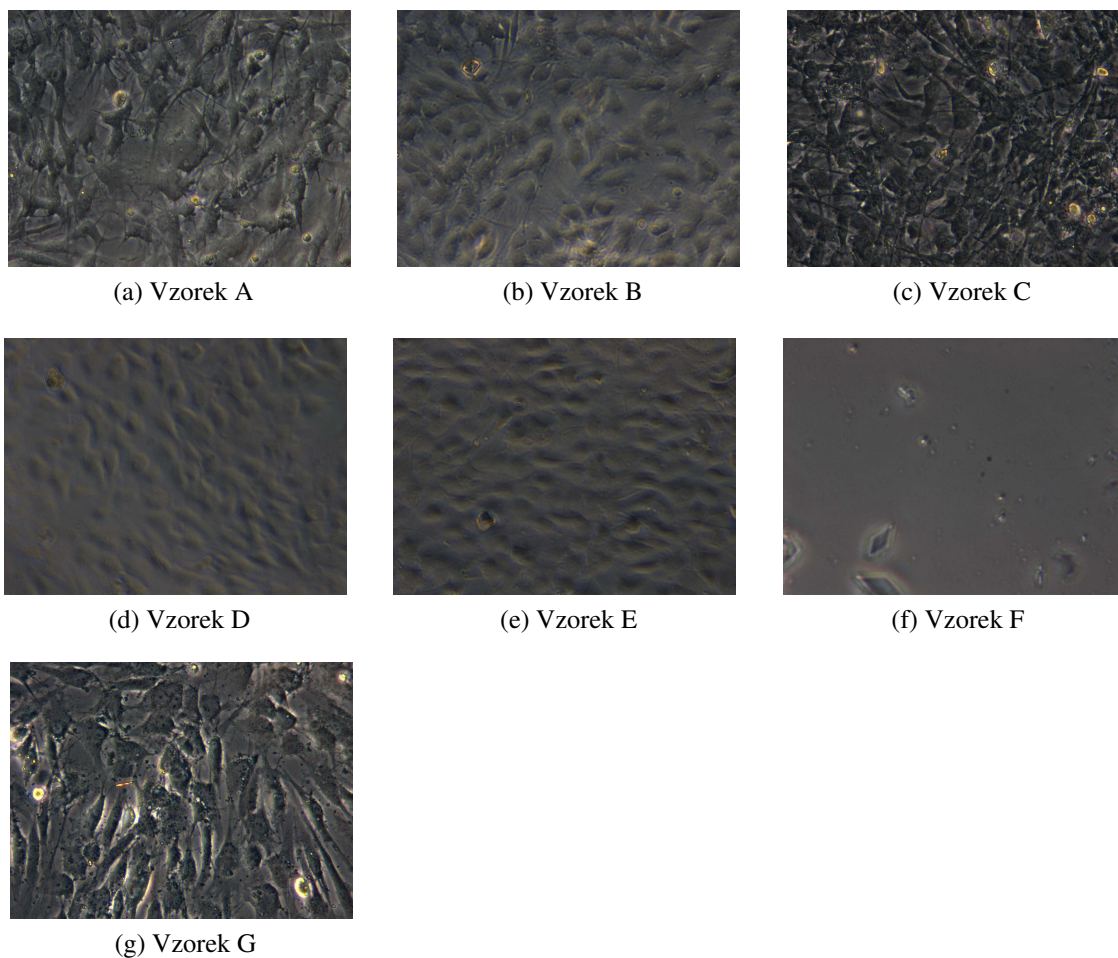
3.2 Dlouhodobé experimenty

Při dlouhodobých experimentech, jejichž cílem bylo zjistit optimální nastavení systému, byly nastavovány stimule s různými kombinacemi frekvence a amplitudy namáhání. Při experimentech bylo nastavováno poměrné prodloužení 5 %, 10 % a 20 % a frekvence 15, 30 a 60 cyklů za minutu. Z důvodů uvedených v diskuzi byly použity jen některé kombinace paramterů, které jsou spolu s výsledky a provedenými analýzami uvedeny v Tabulce 3.1, písmenem G je v tabulce označená statická kultura. Analýzy nebyly provedeny u všech experimentů: pokud již při vizuálním hodnocení snímků bylo patrné, že nediferencují, nebyly analýzy provedeny. Pro analýzy bylo použito imunochamické barvení kolagenu 1 (v Tabulce 3.1 col1) calponinu 1 (v Tabulce 3.1 calp1) a zobrazení cytoskeletu barvivem faloidin (v Tabulce 3.1 fal) a jader barvivem Hoechst. Dále byl určen počet buněk (v Tabulce 3.1 PB). Případy, kde nebyly analýzy provedeny nebo parametr nemá smysl (případ parametrů stimule statické kultury), jsou v Tabulce 3.1 označeny znakem „-“.

Označení	Amplituda (%)	Frekvence (cykly/min)	Morfologie	Výsledek kultivace Diferenciace	Jiné	Použité analýzy	Počet buněk (v tisících/cm ²)
A	5	15	kulaté i prodloužené	-		PB	101±11
B	5	60	prodloužené, částečně orientované	ano, mírně vyšší než G		PB, col1, calp1	97±12
C	10	15	kulaté i prodloužené	-		PB	92±10
D	10	30	prodloužené, orientované	ano, vyšší než B		PB, col1, calp1	95±14
E	10	60	prodloužené, orientované	ano, vyšší než D		PB, col1, calp1, fal, hoechst	83±12
F	20	60	-	-	apoptóza	-	0
G	-	-	kulaté i prodloužené	ano		PB, col1, calp1, fal, hoechst	112±5

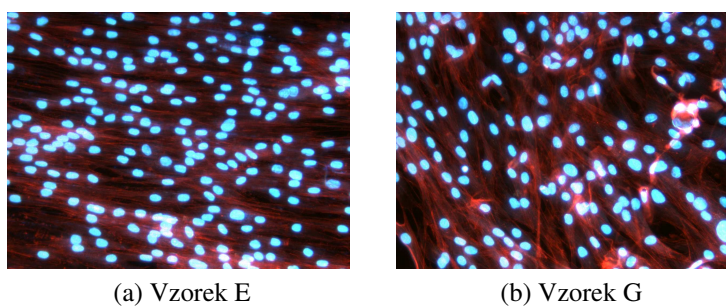
Tabulka 3.1: Parametry a výsledky dlouhodobých experimentů.

Nativní snímky ze světelného mikroskopu s fázovým kontrastem pořízené po skončení experimentu (po 3-4 dnech) jsou zobrazeny na Obrázku 3.10.



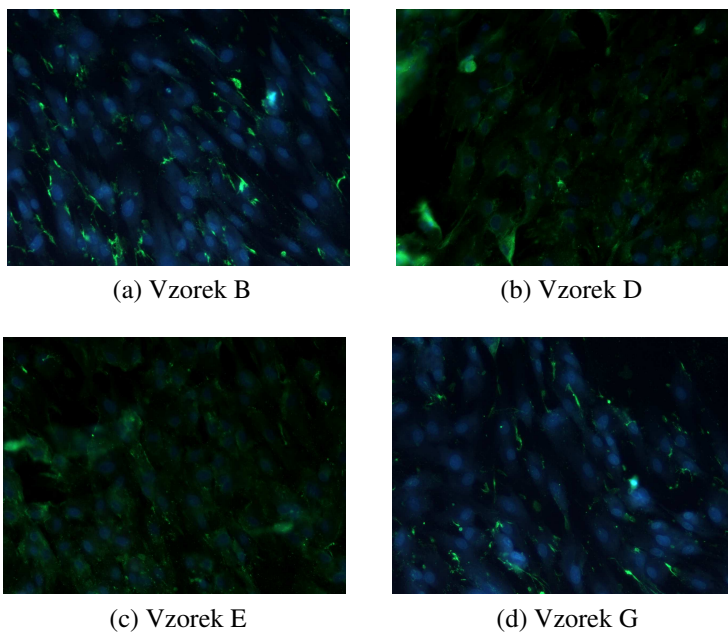
Obrázek 3.10: Nativní snímky po ukončení experimentu. Obrázky: autor

Barvení cytoskeletu (červená barva) a jader (modrá barva) je zachyceno na snímcích na Obrázku 3.11. Tato analýza byla provedena jen pro vzorek E a G.

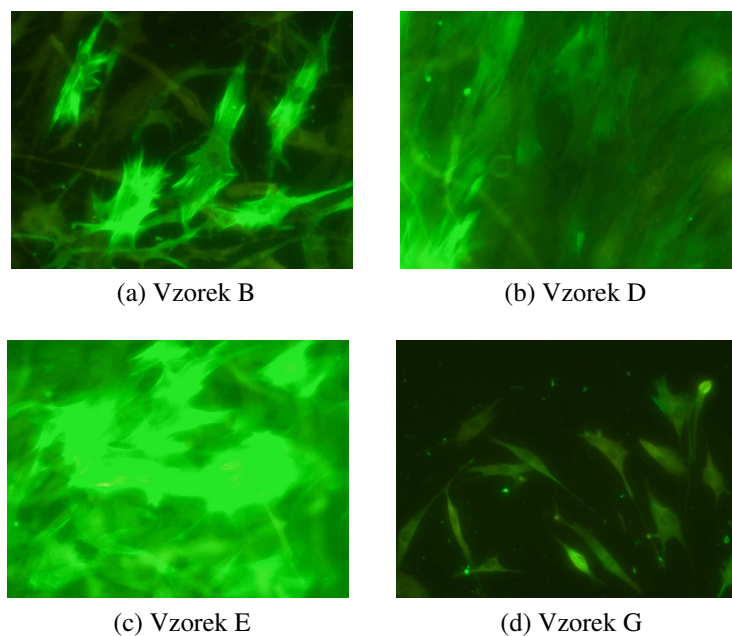


Obrázek 3.11: Zobrazení cytoskeletu a jader. Obrázky: autor

Na snímcích na Obrázku 3.12 je zobrazen extracelulární kolagen zelenou barvou. Barvení kolagenu bylo provedeno jen v případě vzorků B, D, E a G, stejně jako v případě calponinu, který je zobrazen na snímcích na Obrázku 3.13, rovněž zelenou barvou.



Obrázek 3.12: Zobrazení extracelulárního kolagenu. Obrázek: autor



Obrázek 3.13: Zobrazení calponinu. Obrázek: autor

4 Diskuze

V rámci práce byl vytvořen systém pro mechanické namáhání buněk, který byl ověřen při krátkodobých experimentech bez buněk i s buňkami. Systém se skládá z lineárního posuvu se servomotorem, kterým byl nahrazen původní krokový motor, driveru motoru, Arduina UNO a uživatelského rozhraní. V prvním návrhu zařízení byl použit menší krokový motor (Microcon SX16-0402LA-120), u kterého ale docházelo k výraznému přehřívání již při stimulaci bez zátěže v pokojových podmínkách. Z tohoto důvodu nebylo možné využít motor pro experimenty bez přídavného chlazení, které bylo připraveno v podobě vodních bloků. Pokud by bylo chlazení třeba, byly by vodní bloky připevněny na motor a pomocí propojovacích hadic a čerpadla by byl vytvořen okruh pro vodní chlazení. Dalším řešením, aniž by bylo nutné chlazení využít, bylo užití motoru s větším točivým momentem, u kterého by nedocházelo k nadměrnému ohřívání. Pro tento účel byl zvolen krokový motor 57HS5417-22B20-5500 (Leadshine Technology, Čína). Testování ukázalo, že nedochází k přehřívání motoru jak při pokojových podmínkách při zátěži (natahování kultivační komory bez buněk), tak v inkubátoru při podmínkách 37 °C a 100% vlhkosti. U krokového motoru však hrozí přeskočení kroků, čímž se vytváří rozdíl mezi nastavenými otáčkami a otáčkami, které motor skutečně vykoná. V této aplikaci by tak mohlo dojít k tomu, že bude kultivační komora natahována s jinou amplitudou poměrného prodloužení, než jaká je uživatelem nastavena. Z tohoto důvodu byl v konečné fázi krokový motor nahrazen servomotorem ES-M32309 (Leadshine Technology, Čína), u kterého riziko přeskočení kroků a tedy změny polohy motoru nehrozí. Výměnou motoru nedošlo k žádné změně v systému z hlediska jeho ovládní, pouze bylo nutné použít pro servomotor jiný driver (ES-D508, Leadshine Technology, Čína), než který byl použit v případě krokového motoru (DM422C, Leadshine Technology, Čína).

Součástí systému je také kryt kultivační komory pro zamezení kontaminace buněčné kultury. Původně měl být kryt umístěn na komoře a spolu s ní být během stimulační natahování, proto první návrh počítal s tím, že bude vyroben ze silikonu díky jeho vhodným vlastnostem (pružnost, ohebnost, transparentnost), rovněž byla pro tuto variantu navržena odlévací forma. Následně bylo ale zjištěno, že bez porušení krytu jej nelze z formy vyjmout a proto bylo navrženo náhradní řešení, kdy je kryt realizován dvěma upravenými deskami z průhledného polykarbonátu. Tento kryt byl vyroben a byly s ním provedeny veškeré experimenty.

Při ověření byl při krátkodobých experimentech zjištěn vliv zařízení na buněčnou kulturu, kdy byly nasazeny buňky a po dobu jednoho dne vystaveny cyklickému namáhání, během kterého byla kultura pravidelně snímána pomocí již hotového snímacího zařízení. Z výsledků je patrné, že se stimulované buňky diferencovaly, avšak v této fázi experimentů nebyla diferenciace blíže určena. Během experimentu část buněčné kultury odumřela (zachyceno na Ob-

rázku 3.9), k čemuž pravděpodobně došlo v důsledku častého pořizování snímků kultury. Při snímkování je totiž nutné buněčnou kulturu prosvítit, na což jsou buňky velice citlivé a nejspíše kvůli fototoxicitě tak došlo k jejich odumření. Při dalších experimentech, kdy byla kultura snímána v delších časových intervalech, již k tomuto nedošlo. Na základě výsledků byly provedeny úpravy z hlediska synchronizace systému se snímacím zařízením: před dalšími experimenty bylo nutné sladit systém pro uniaxiální namáhání se systémem live imaging, který již byl v laboratořích FGÚ vyvinut a zaveden, ale pro typově odlišné experimenty (bylo nutné zejména ošetřit snímání komory v jedné konkrétní poloze při stimulaci a synchronizovat tak oba systémy). Aby byla buněčná kultura zachycována pokaždé ve stejné poloze byla vytvořena synchronizace mezi oběma systémy, kdy systém pro snímkování vyšle v časovém předstihu signál a systém pro mechanické namáhání na základě tohoto signálu pozastaví stimulaci po ukončení již započatého cyklu, přičemž vodivé spojení mezi oběma systémy je odděleno optočlenem. Komora s nasazenými buňkami se tak při pořizování snímku vždy zastaví ve výchozí pozici a po pořízení snímku se stimulace opět spustí se stejnými parametry jako byly nastaveny. Díky tomuto nastavení tak systém splňuje požadavek na živé sledování stimulované buněčné kultury. Z výsledků krátkodobých experimentů tak vzešla podoba výsledného systému, který splňuje podmínky zadání práce.

Do budoucna by bylo vhodné vyřešit několik záležitostí týkajících se vytvořeného systému. Přestože je uživatelské rozhraní plně funkční, problém by mohl nastat, pokud po otevření sériového portu dojde z nějakého důvodu k odpojení Arduina od počítače. V tomto případě se totiž uživatel o odpojení Arduina dozví až pokud stiskne některé z tlačítek nastavení. Automaticky se tedy informace o přerušení spojení s Arduinem nezobrazí. Dále je problémem, že pokud dojde k odpojení Arduina, okamžitě se zastavuje nastavený pohyb, tedy i případné cyklické namáhání, a to nezávisle aktuální fázi cyklu. Pokud k tomuto dojde, je nutné před obnovením namáhání polohu kultivační komory zkontrolovat a případně ji nastavit tak, aby byla ve výchozí pozici. Tato situace však během ověřování i následné činnosti systému při experimentech ani jednou nenastala.

Nečekaným problémem se ukázala dostupnost a kvalita silikonových komůrek Strex, které jsou v ČR dostupné od několika dodavatelů. Na konci roku 2017 a začátku roku 2018 došlo k problémům s kvalitou dodaných komůrek, neboť se ukázalo, že komory jsou pro buňky toxické, k čemuž nejspíše došlo špatným výrobním postupem nebo sterilizací. Několik týdnů byly proto komory u dodavatelů úplně nedostupné, případně se na kvalitu komor nedalo spolehnout. Vzhledem k uzávěrce diplomové práce na jaře 2018 bylo potřeba navrhnout řešení nastalé situace. Z tohoto důvodu došlo k redukci experimentů u parametrů stimulace, které se jevily jako neúčinné pro diferenciaci směrem k hladké svalovině (šlo o experimenty s prodloužením 20 %, kdy buňky šly do apoptózy a frekvenci 15 cyklů za minutu, která se jevila

jako málo účinná). Dále byly komory z experimentů, kde buňky odumřely, vyčištěny (hypertonický a hypotonický roztok NaCl, ředění Savo) a druhotně využity pro další experimenty. Podařilo se tak provést experimenty se zbylými parametry stimulace při zachování kvality komor. Pro další experimenty v budoucnu by bylo vhodné vyvarovat se tohoto problému návrhem a výrobou vlastní odlévací komory z leštěného hliníku a odléváním vlastních komůrek, což již pro jiné experimenty na FGÚ probíhá. Rovněž se tím sníží finanční náročnost experimentů.

V práci byl také srovnáván vliv uniaxiální mechanické stimulace na diferenciaci kmenových buněk směrem k hladké svalovině, kdy bylo hodnocení diferenciace stanoveno pomocí několika markerů. Na základě nativních snímků byla srovnávána morfolgie buněk a jejich počet. Morfolgie buněk byla ovlivněna působenou zátěží na buňky, čím byla zátěž větší (z hlediska amplitudy i frekvence), tím buňky získávaly protáhlejší tvar a začaly se orientovat ve směru osy namáhání. Ve vzorku F se zátěží 20 % a 60 cyklů za minutu však buňky podlely apoptóze, nejspíše z důvodu vysoké zátěže, protože byly další vzorky s amplitudou 20 % vyřazeny. S morfolgií velmi souvisel počet buněk, neboť vzorky z dynamické zátěže vykazovaly menší počet buněk, což bylo způsobeno většími rozměry buněk. Počet buněk byl počítán jako průměr z 10 zorných polí. Pro srovnání statické a dynamické morfolgie kultury byla u vzorků E a G obarvena jádra a cytoskelet (na Obrázku 3.11).

Diferenciace buněk byla hodnocena na základě exprese extracelulárního kolagenu typu I, který sice není specifickým markerem pro diferenciaci do buněk hladké svaloviny, tvoří ale velký podíl extracelulární hmoty svalů a kostí, tedy jeho produkce je nezbytná. Produkce kolagenu rostla se zátěží kultury, kdy ho nejméně vyprodukovala statická kultura a nejvíce kultura se zátěží 10 %, 60 cyklů/min, což je patrné na snímcích na Obrázku 3.12, kde lze porovnat jeho produkci podle množství zelené barvy na snímku. Specifickým markerem diferenciace do hladké svaloviny je calponin 1, který se objevuje v časně až střední fázi diferenciace. Jak je patrné ze snímků na Obrázku 3.13, jeho produkci zvyšovala dynamická zátěž: nejméně calponinu vyprodukovala statická kultura, nejvíce pak dynamická kultura se zátěží 10 % a 60 cyklů za minutu.

Na základě těchto primárních výsledků lze zhodnotit, že k diferenciaci směrem k hladké svalovině mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z tuku dochází, dle uvedených výsledků. Vzorky byly porovnávány se statickou kulturou, kdy lze konstatovat, že stimulace buněk podpořila diferenciaci směrem k hladké svalovině ve většině případů. Výjimkou byla stimulace 20%, kdy došlo k apoptóze buněk, a stimulace s frekvencí 15 cyklů/min, kdy se výsledky příliš nelišily od statické kultury. Pro potvrzení těchto výsledků je však potřeba navázat dalšími pokusy s delší dobou kultivace (7-21 dní), které potvrdí závěry primárních

experimentů, dále je potřeba rozšířit analýzy o další markery, např. α -aktin apod., které indikují diferenciaci do hladké svaloviny. Vhodné by také bylo doplnit výsledky kvantitativními metodami, kdy lze vliv stimulační na diferenciaci buněk statisticky porovnat.

5 Závěr

V rámci této práce byl vytvořen systém pro diferenciaci kmenových buněk směrem k buňkám hladké svaloviny. Vytvořený systém lze umístit do inkubátoru a zajistit tak optimální podmínky pro buňky (teplota 37 °C, 100% vlhkost a 5% koncentraci CO₂) a rovněž je díky sterilizovatelnému krytu kultivační komory zamezeno kontaminaci kultury během experimentů. Systém rovněž umožňuje pravidelné snímání stimulované kultury v čase, čímž splňuje požadavky na metodu live imaging. Ovládání systému je zajištěno pomocí driveru krokového motoru a Arduina, které je dále ovládáno pomocí uživatelského rozhraní, prostřednictvím kterého je možné nastavovat parametry stimulace (frekvenci a poměrné prodloužení).

Vytvořený systém byl rovněž ověřen z hlediska jeho vlivu na buněčnou kulturu při krátkodobých experimentech s buňkami a dále byly provedeny experimenty dlouhodobé pro zjištění nejvhodnějších parametrů stimulace tak, aby k diferenciaci směrem k buňkám hladké svaloviny docházelo. Na základě primárních výsledků lze usoudit, že uniaxiální zatěžování kultury kmenových buněk přispívá k jejich diferenciaci směrem k buňkám hladké svaloviny. Jako nejlepší nastavení byla stanovena kombinace parametrů 10% poměrného prodloužení a frekvence 60 cyklů za minutu na základě morfologie a počtu buněk a produkce markerů kolagen 1 a calponin 1. Pro ověření tohoto výsledku je ale zapotřebí provést sérii dalších experimentů s dobou kultivace 7-21 dní, analýzou více markerů a kvantitativním stanovením těchto markerů.

Reference

- [1] LI, Song, Debanti SENGUPTA a Shu CHIEN. Vascular tissue engineering: from in vitro to in situ. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* [online]. 2014, **6**(1), 61-76 [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.1002/wsbm.1246. ISSN 19395094. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/wsbm.1246>
- [2] O'BRIEN, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* [online]. 2011, **14**(3), 88-95 [cit. 2018-02-24]. DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X. ISSN 13697021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S136970211170058X>
- [3] WANG, Yang-Kao a Christopher S. CHEN. Cell adhesion and mechanical stimulation in the regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. 2013, **17**(7), 823-832 [cit. 2017-05-12]. DOI: 10.1111/jcmm.12061. ISSN 15821838. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jcmm.12061>
- [4] AVASTHI, S, R N SRIVASTAVA a A SINGH. Stem Cell: Past, Present and Future-A Review Article. *Internet Journal of Medical Update - EJOURNAL* [online]. 2008, **3**(1), - [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.4314/ijmu.v3i1.39856. ISSN 1694-0423. Dostupné z: <http://www.ajol.info/index.php/ijmu/article/view/39856>
- [5] BUNNELL, B, M FLAAT, C GAGLIARDI, B PATEL a C RIPOLL. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation☆. *Methods* [online]. 2008, **45**(2), 115-120 [cit. 2017-05-12]. DOI: 10.1016/j.ymeth.2008.03.006. ISSN 10462023. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202308000601>
- [6] ČIHÁK, Radomír, DRUGA, Rastislav a Miloš GRIM, ed. Anatomie. 2., upr. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2004. ISBN 802471132x.
- [7] PUGSLEY, M.K. a R. TABRIZCHI. The vascular system. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* [online]. 2000, **44**(2), 333-340 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1016/S1056-8719(00)00125-8. ISSN 10568719. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056871900001258>
- [8] BACAKOVA, Lucie, Martina TRAVNICKOVA, Elena FILOVA, Roman MATEJKA, Jana STEPANOVSKA, Jana MUSILKOVA, Jana ZARUBOVA a Martin MOLITOR.

The vascular smooth muscle cells: their origin, behavior, use in vascular tissue engineering and differentiation from stem cells. *Muscle Cell and Tissue*. 1. Intech Open. ISBN 978-953-51-6092-2.

- [9] WANG, Chen, Lian CEN, Shuo YIN, Qihai LIU, Wei LIU, Yilin CAO a Lei CUI. A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose-derived stem cells. *Biomaterials* [online]. 2010, **31**(4), 621-630 [cit. 2017-05-02]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.086. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209010540>
- [10] VAN EYS, Guillaume J., Petra M. NIESSEN a Sander S. RENSEN. Smoothelin in Vascular Smooth Muscle Cells. *Trends in Cardiovascular Medicine* [online]. 2007, **17**(1), 26-30 [cit. 2018-02-24]. DOI: 10.1016/j.tcm.2006.11.001. ISSN 10501738. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050173806001733>
- [11] HARRIS, Lisa J., Hamid ABDOLLAHI, Ping ZHANG, Stephen MCILHENNY, Thomas N. TULENKO a Paul J. DIMUZIO. Differentiation of Adult Stem Cells into Smooth Muscle for Vascular Tissue Engineering. *Journal of Surgical Research* [online]. 2011, **168**(2), 306-314 [cit. 2017-05-02]. DOI: 10.1016/j.jss.2009.08.001. ISSN 00224804. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480409004235>
- [12] XIAO, Q., G. WANG, Z. LUO a Q. XU. The mechanism of stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2010, **104**(3), 440-448 [cit. 2018-02-14]. DOI: 10.1160/TH09-11-0794. ISSN 0340-6245. Dostupné z: <http://www.schattauer.de/index.php?id=1214&doi=10.1160/TH09-11-0794>
- [13] WANG, C.-L. Albert. Caldesmon and Smooth-Muscle Regulation. *Cell Biochemistry and Biophysics* [online]. 2001, **35**(3), 275-288 [cit. 2018-02-24]. DOI: 10.1385/CBB:35:3:275. ISSN 1085-9195. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/CBB:35:3:275>
- [14] TANG, Dale D. Intermediate filaments in smooth muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* [online]. 2008, **294**(4), C869-C878 [cit. 2018-02-24]. DOI: 10.1152/ajpcell.00154.2007. ISSN 0363-6143. Dostupné z: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00154.2007>
- [15] CHI, M., Y. ZHOU, S. VEDAMOORTHYRAO, G. J. BABU a M. PERIASAMY. Ablation of smooth muscle myosin heavy chain SM2 increases smooth muscle contraction and results in postnatal death in mice. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences* [online]. 2008, **105**(47), 18614-18618 [cit. 2018-02-24]. DOI: 10.1073/pnas.0808162105. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0808162105>
- [16] WANJARE, Maureen, Nayan AGARWAL a Sharon GERECHT. Biomechanical strain induces elastin and collagen production in human pluripotent stem cell-derived vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* [online]. 2015, 309(4), C271-C281 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1152/ajpcell.00366.2014. ISSN 0363-6143. Dostupné z: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00366.2014>
- [17] KRUPINSKI, Kyle, Jennifer PARK, Rahul G. THAKAR a Song LI. Regulation of vascular smooth muscle cells and mesenchymal stem cells by mechanical strain. *Molecular & Cellular Biomechanics* [online]. 2006, **1**(3), 21-34 [cit. 2018-02-14]. Dostupné z: <http://www.techscience.com/doi/10.3970/mcb.2006.003.021.pdf>
- [18] Flexcell® Tension Systems. Flexcell® International Corporation [online]. Burlington, c211 [cit. 2018-02-19]. Dostupné z: <http://www.flexcellint.com/slideshow2.htm>
- [19] PARK, Jennifer S., Julia S.F. CHU, Catherine CHENG, Fanqing CHEN, David CHEN a Song LI. Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2004, **88**(3), 359-368 [cit. 2018-02-06]. DOI: 10.1002/bit.20250. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.20250>
- [20] LEE, Wen-Chi C., Timothy M. MAUL, David A. VORP, J. P. RUBIN a Kacey G. MARRA. Effects of uniaxial cyclic strain on adipose-derived stem cell morphology, proliferation, and differentiation. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* [online]. 2007, **6**(4), 265-273 [cit. 2018-02-13]. DOI: 10.1007/s10237-006-0053-y. ISSN 1617-7959. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10237-006-0053-y>
- [21] GHAZANFARI, Samane, Mohammad TAFAZZOLI-SHADPOUR, Mohammad Ali SHOKRGOZAR, Naser AMIRIZADEH a Esmael Jafargholi RANGRAZ. Morphological changes of mesenchymal stem cells by cyclic stretch. In: *2008 International Conference on BioMedical Engineering and Informatics* [online]. IEEE, 2008, s. 743-747 [cit. 2017-05-14]. DOI: 0.1109/BMEI.2008.366. ISBN 978-0-7695-3118-2/08. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/4548768/>
- [22] GHAZANFARI, Samane, Mohammad TAFAZZOLI-SHADPOUR a Mohammad Ali SHOKRGOZAR. Effects of cyclic stretch on proliferation of mesenchymal stem cells and their differentiation to smooth muscle cells. *Biochemi-*

- cal and Biophysical Research Communications* [online]. 2009, **388**(3), 601-605 [cit. 2017-05-12]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.08.072. ISSN 0006291x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X09016404>
- [23] SHAO, Yue, Xinyu TAN, Roman NOVITSKI, Mishaal MUQADDAM, Paul LIST, Laura WILLIAMSON, Jianping FU a Allen P. LIU. Uniaxial cell stretching device for live-cell imaging of mechanosensitive cellular functions. *Review of Scientific Instruments* [online]. 2013, **84**(11), 114304- [cit. 2017-06-15]. DOI: 10.1063/1.4832977. ISSN 00346748. Dostupné z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4832977>
- [24] YAO, Raphael a Joyce Y. WONG. The Effects of Mechanical Stimulation on Controlling and Maintaining Marrow Stromal Cell Differentiation Into Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Biomechanical Engineering* [online]. 2015, **137**(2), 020907- [cit. 2017-05-12]. DOI: 10.1115/1.4029255. ISSN 01480731. Dostupné z: <http://biomechanical.asmedigitalcollection.asme.org/article.aspx?doi=10.1115/1.4029255>
- [25] RABBANI, Mohsen, Mohsen JANMALEKI, Mohammad TAFAZZOLI-SHADPOUR, Morteza TEYMOORI a Seyedkamaladdin REZVANINEJAD. Effects of uniaxial cyclic stretch loading on morphology of adipose derived stem cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [online]. 2016, **13**(4), 396-402 [cit. 2018-02-12]. DOI: 10.1007/s13770-016-9037-x. ISSN 1738-2696. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13770-016-9037-x>
- [26] SCHÜRMAN, S, S WAGNER, S HERLITZE, et al. The IsoStretcher: An isotropic cell stretch device to study mechanical biosensor pathways in living cells. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2016, **81**, 363-372 [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.1016/j.bios.2016.03.015. ISSN 09565663. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095656631630207X>
- [27] SIM, J. Y., N. BORGHI, A. RIBEIRO, et al. Uniaxial cell stretcher enables high resolution live cell imaging. In: *2012 IEEE 25th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)* [online]. IEEE, 2012, s. 854-857 [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.1109/MEMSYS.2012.6170320. ISBN 9781467303255. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/6170320/>
- [28] SERIANI, S., G. DEL FAVERO, J. MAHAFFEY, D. MARKO, P. GALLINA, C. S. LONG, L. MESTRONI a O. SBAIZERO. The cell-stretcher: A novel device for the mechanical stimulation of cell populations. *Review of Scientific Instruments* [online]. 2016,

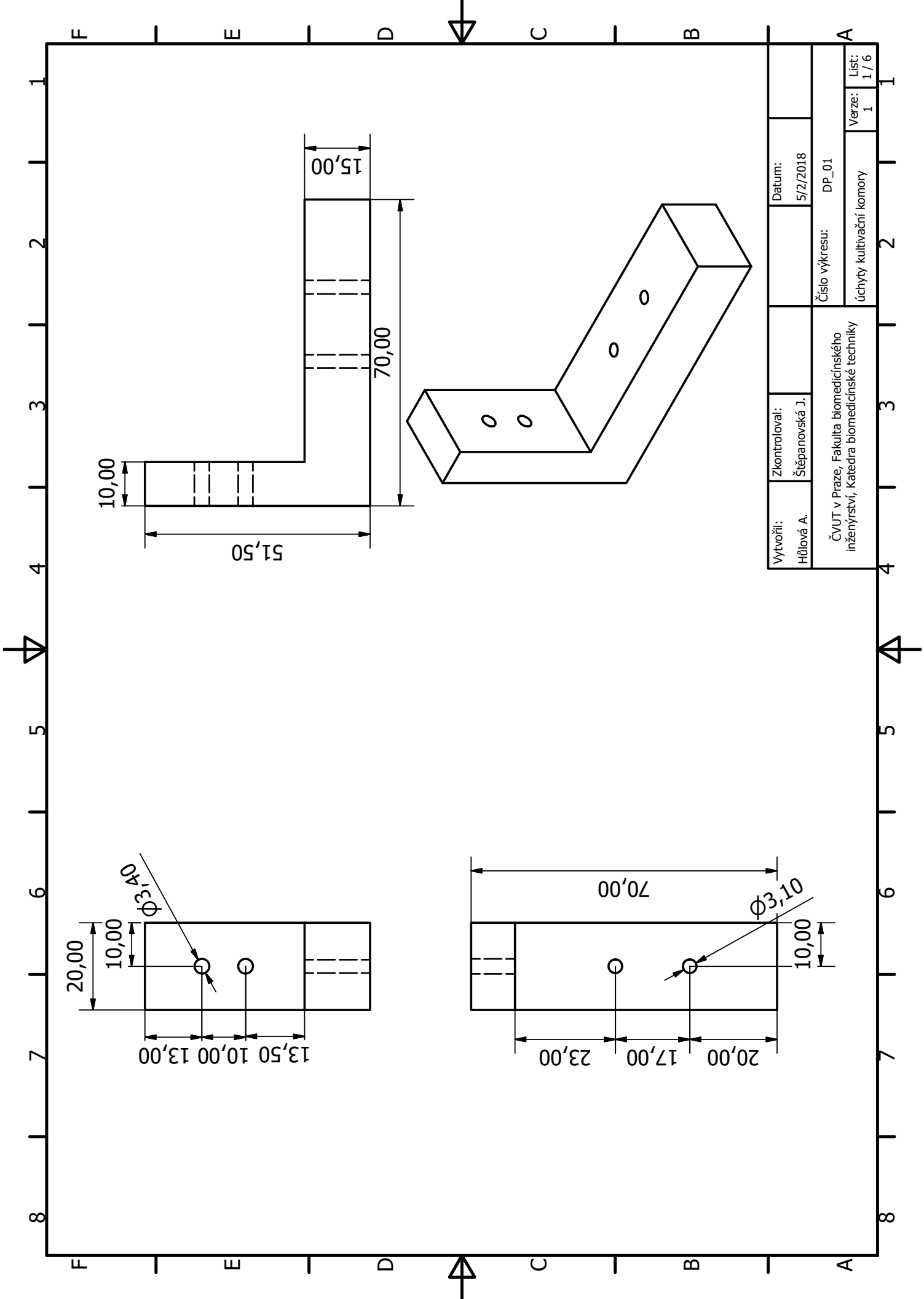
- 87**(8), 084301- [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.1063/1.4959884. ISSN 00346748. Dostupné z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4959884>
- [29] Cell Stretching System: Physiological Simulation System in Cell Cultures. *Strexcell* [online]. California: Amuza, c2017 [cit. 2017-05-13]. Dostupné z: <https://strexcell.com/cell-stretching-system/>
- [30] Strex Cell Stretcher. *Izumi International* [online]. Greenville: Izumi International, c2016 [cit. 2017-06-14]. Dostupné z: https://www.izumiinternational.com/media/catalog/product/cache/1/image/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/b/i/bio_med_-_strex_cell_stretcher.jpg
- [31] Microscope-Mountable Stretching System. *Strexcell* [online]. San Diego (California): Amuza, c2017 [cit. 2017-05-13]. Dostupné z: <https://strexcell.com/cell-stretching-system/models/microscope-stretching-system/>
- [32] Microscope-Mountable Stretching System. *Strexcell* [online]. San Diego (California): Amuza, c2017 [cit. 2017-06-14]. Dostupné z: <https://i0.wp.com/strexcell.com/wp-content/uploads/2015/06/STB-150-Main-unit-and-control.jpg?w=547&ssl=1>
- [33] ShellPa Mechanical Cell Strain Instrument from AS ONE INTERNATIONAL. *Biocompare* [online]. Santa Clara (California): Biocompare, c1999-2017 [cit. 2017-05-13]. Dostupné z: <http://www.biocompare.com/24935-Mechanical-Cell-Strain-Instruments/4752139-ShellPa-Mechanical-Cell-Strain-Instrument/>
- [34] ShellPa Mechanical Cell Strain Instrument from AS ONE INTERNATIONAL. *Biocompare* [online]. Santa Clara (California): Biocompare, c1999-2017 [cit. 2017-06-14]. Dostupné z: <http://media.biocompare.com/m/37/product/4752139-img1-400x300.jpg>
- [35] Computer Controlled Cell Deforming - Cell Stretcher. *Electron Microscopy Sciences* [online]. Hatfield, c2017 [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: https://www.emsdiasum.com/microscopy/products/histology/cell_stretcher.aspx
- [36] MCCS10 – Manual Controlled Cell Stretcher. *Amazon* [online]. Seattle: Amazon.com, c1996-2017 [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: <https://images-na.ssl-images-amazon.com/images/I/41FTLkdolVL.jpg>
- [37] Stretch Chamber. *STREX Inc.* [online]. Osaka (Japan): STREX, c2014 [cit. 2018-04-02]. Dostupné z: http://strex.co.jp/en/?page_id=1013

Seznam příloh

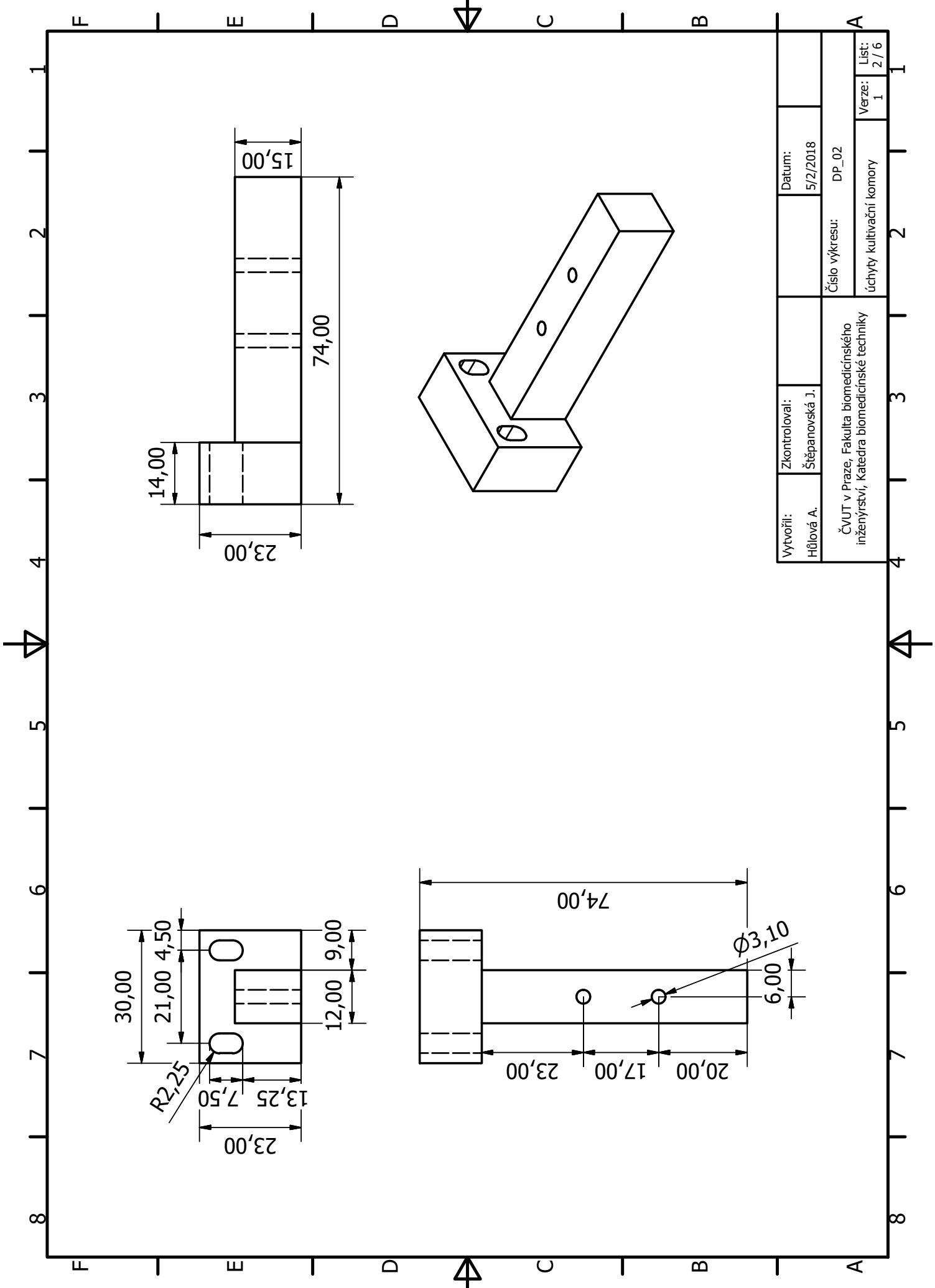
Číslo výkresu	Název
DP_01	Pohyblivý úchyt kultivační komory (původní)
DP_02	Statický úchyt kultivační komory (původní)
DP_03	Pohyblivý úchyt kultivační komory
DP_04	Statický úchyt kultivační komory
DP_05	Rozšířený pohyblivý úchyt kultivační komory
DP_06	Rozšířený statický úchyt kultivační komory
DP_07	Forma na původní kryt kultivační komory (svrchní část)
DP_08	Forma na původní kryt kultivační komory (prostřední část)
DP_09	Forma na původní kryt kultivační komory (spodní část)
DP_10	Kryt kultivační komory (původní)
DP_11	Kryt kultivační komory
DP_12	Kryt kultivační komory (svrchní deska)
DP_13	Kryt kultivační komory (spodní deska)
DP_14	Kryt kultivační komory (distanční sloupky a podložky)

Obsah přiloženého CD

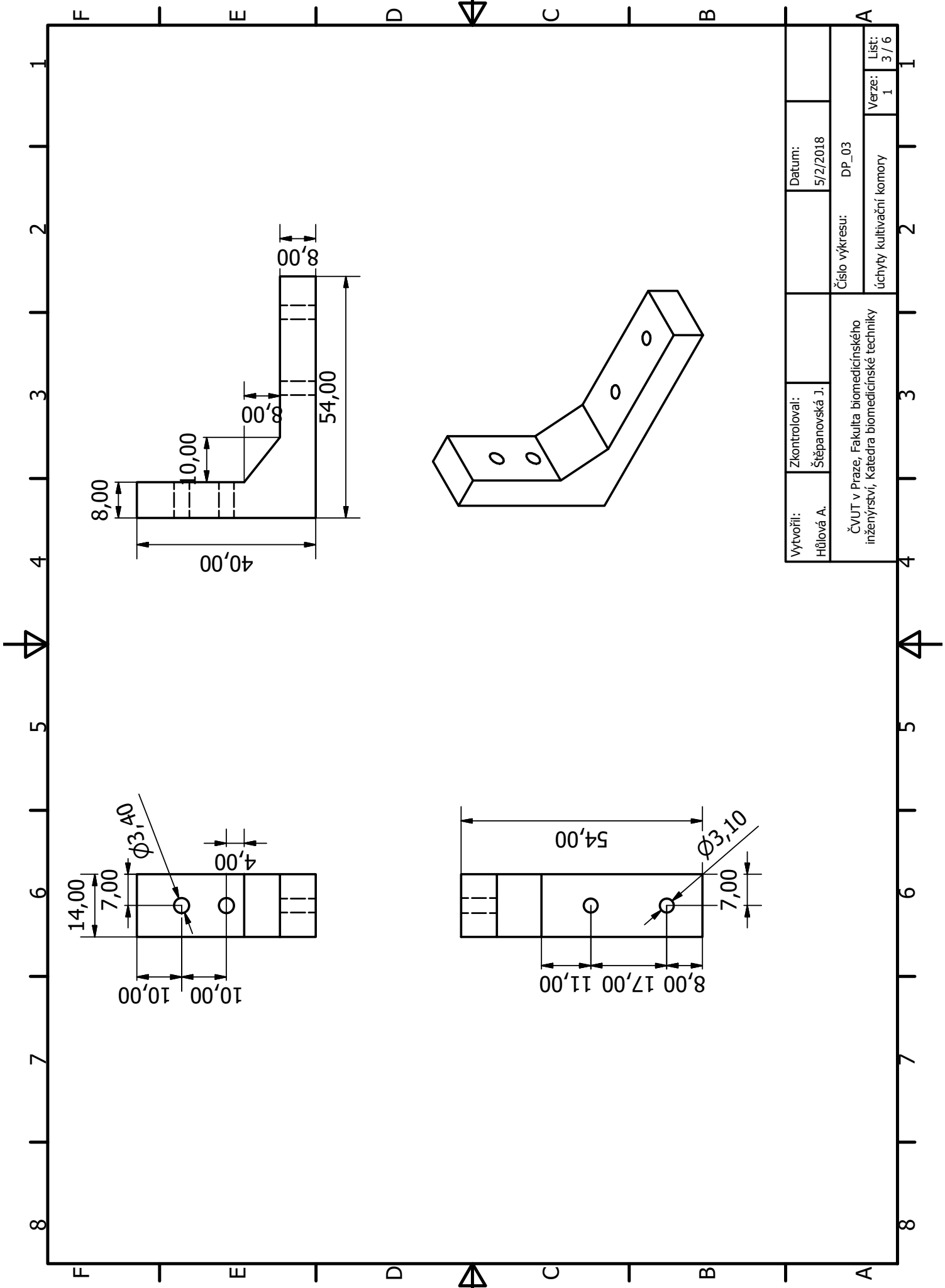
Soubor	Popis
17PMBDP_419046_Adela_Hulova.pdf	Kompletní diplomová práce
Abstract.pdf	Abstrakt anglicky
Abstrakt.pdf	Abstrakt česky
Klicova_slova.pdf	Klíčová slova
Zadani.pdf	Naskenované zadání
Stretch.ino	Program pro Arduino
Stretch.bas	Uživatelské rozhraní (kód)
Stretch.exe	Uživatelské rozhraní (spustitelný soubor)



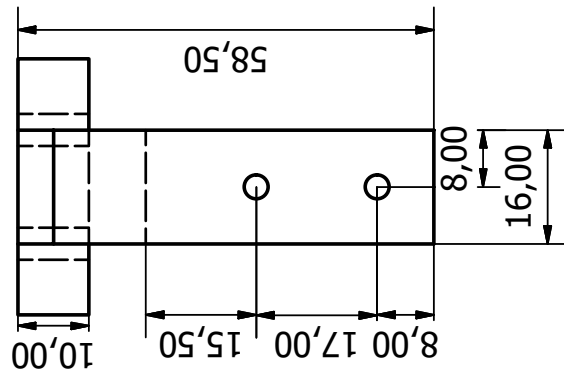
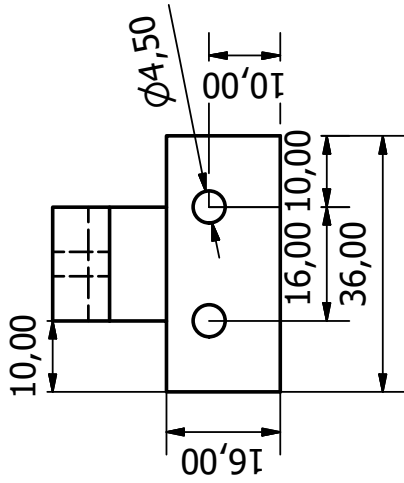
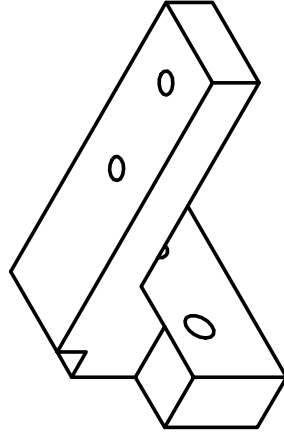
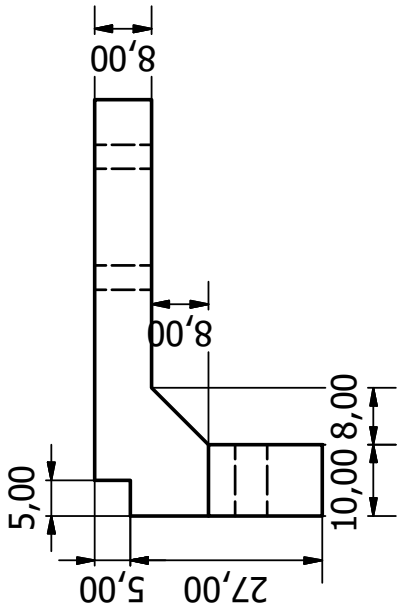
Vytvořil: Hůřlová A.	Zkontroloval: Štěpanovská J.	Datum: 5/2/2018	Číslo výkresu: DP_01
ČVUT v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra biomedicínské techniky		Verze: I	List: I / 6
		úchyty kultivační komory	



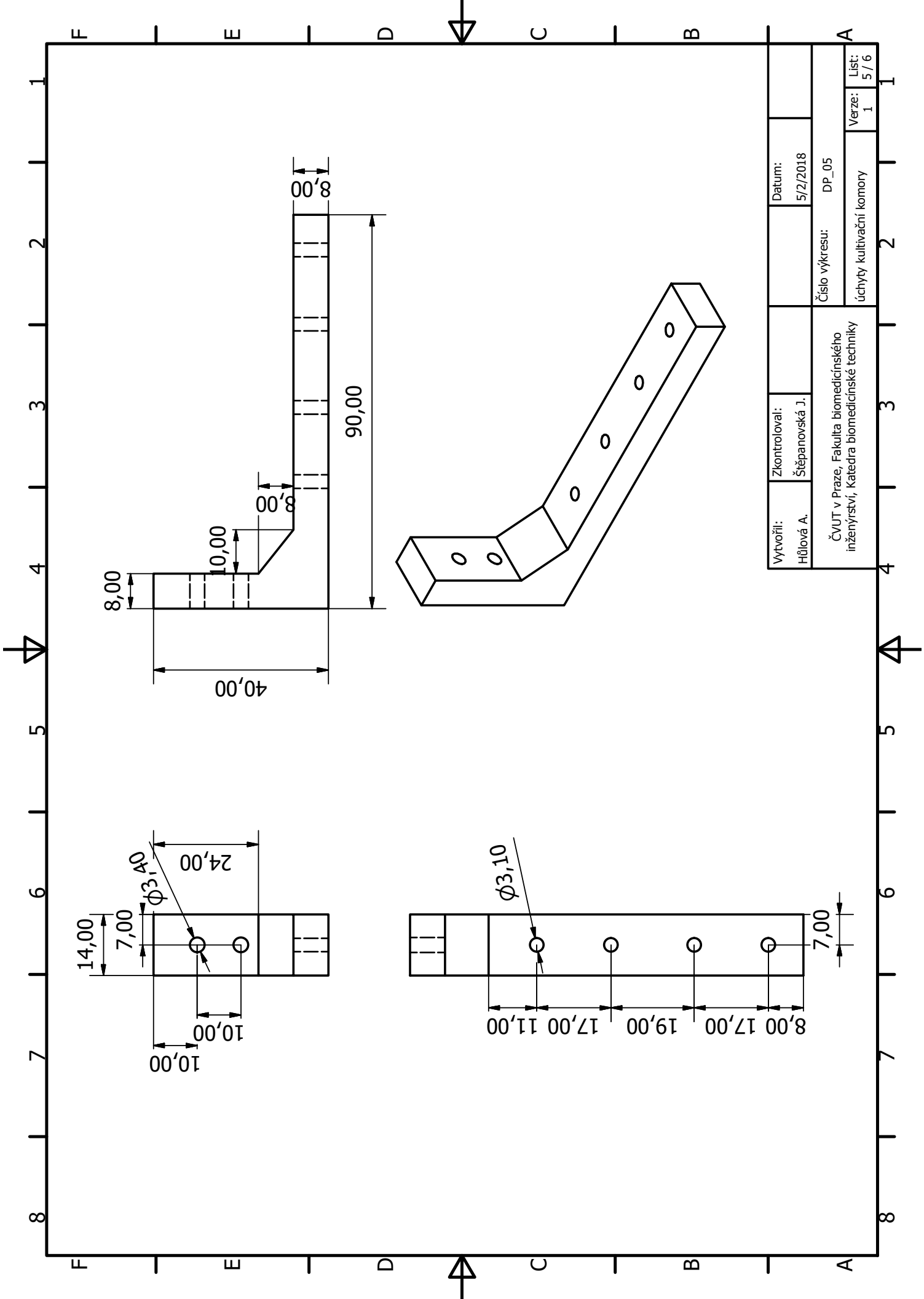
Vytvořil: Hůřlová A.	Zkontroloval: Štěpanovská J.	Datum: 5/2/2018	Číslo výkresu: DP_02
ČVUT v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra biomedicínské techniky		Verze: I	List: 2 / 6
		úchyty kultivační komory	



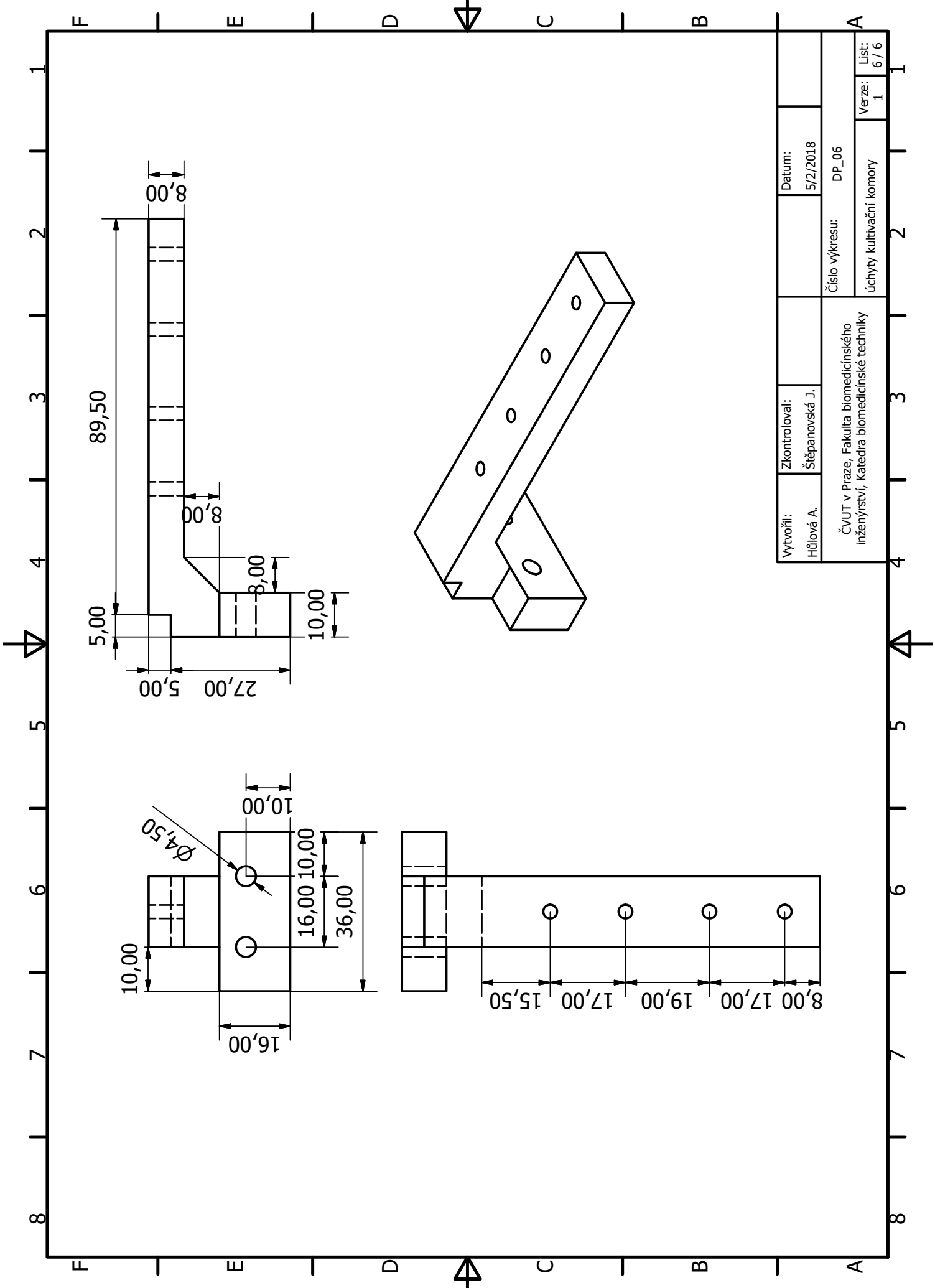
Vytvořil:	Zkontroloval:	Datum:	Číslo výkresu:
Hájlová A.	Štěpanovská J.	5/2/2018	DP_03
ČVUT v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra biomedicínské techniky		Verze:	List:
		I	3 / 6



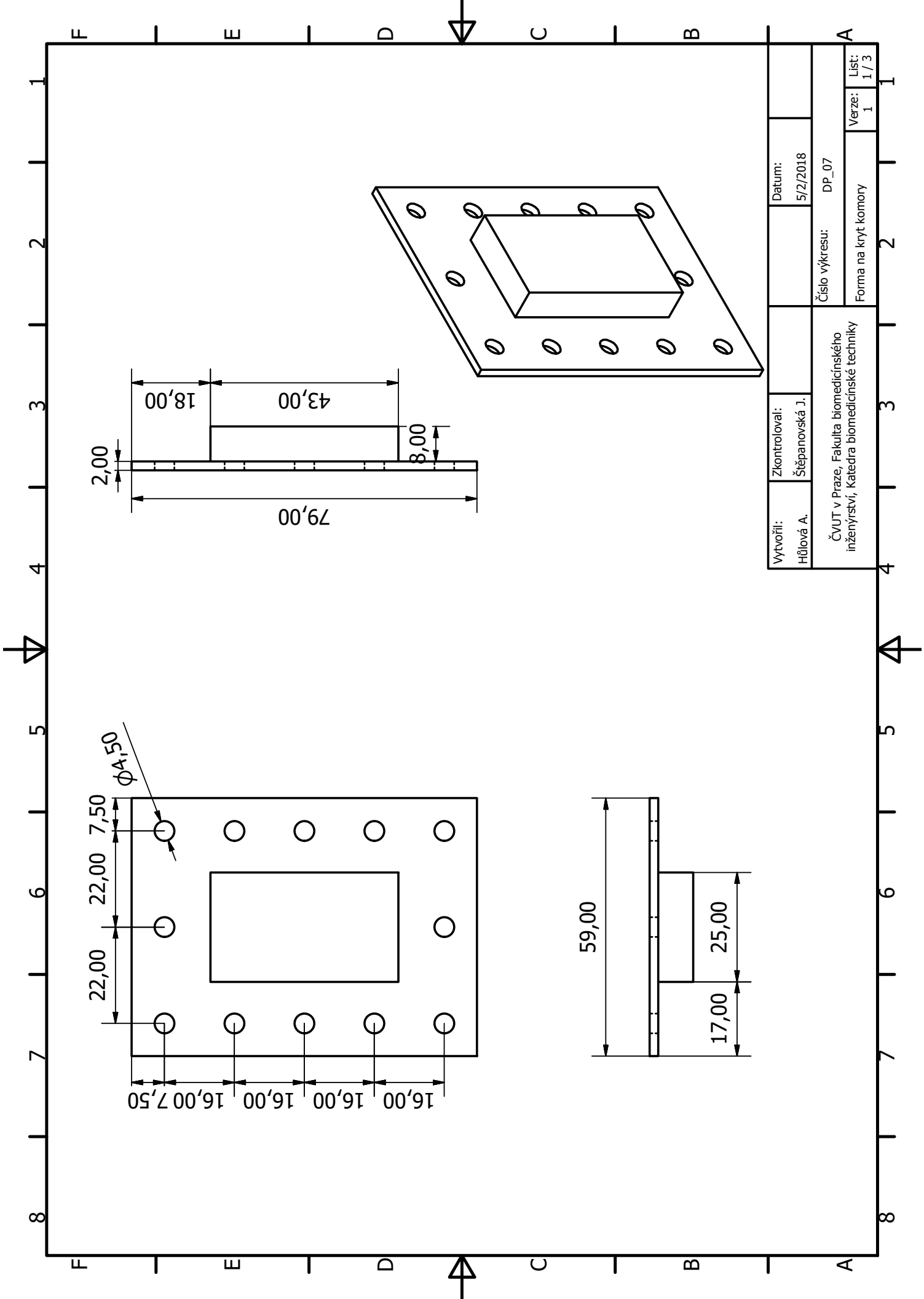
Vytvořil: Hůlová A.	Zkontroloval: Štěpanovská J.	Datum: 5/2/2018	Číslo výkresu: DP_04
ČVUT v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra biomedicínské techniky		Verze: I	List: 4 / 6
		úchyty kultivační komory	



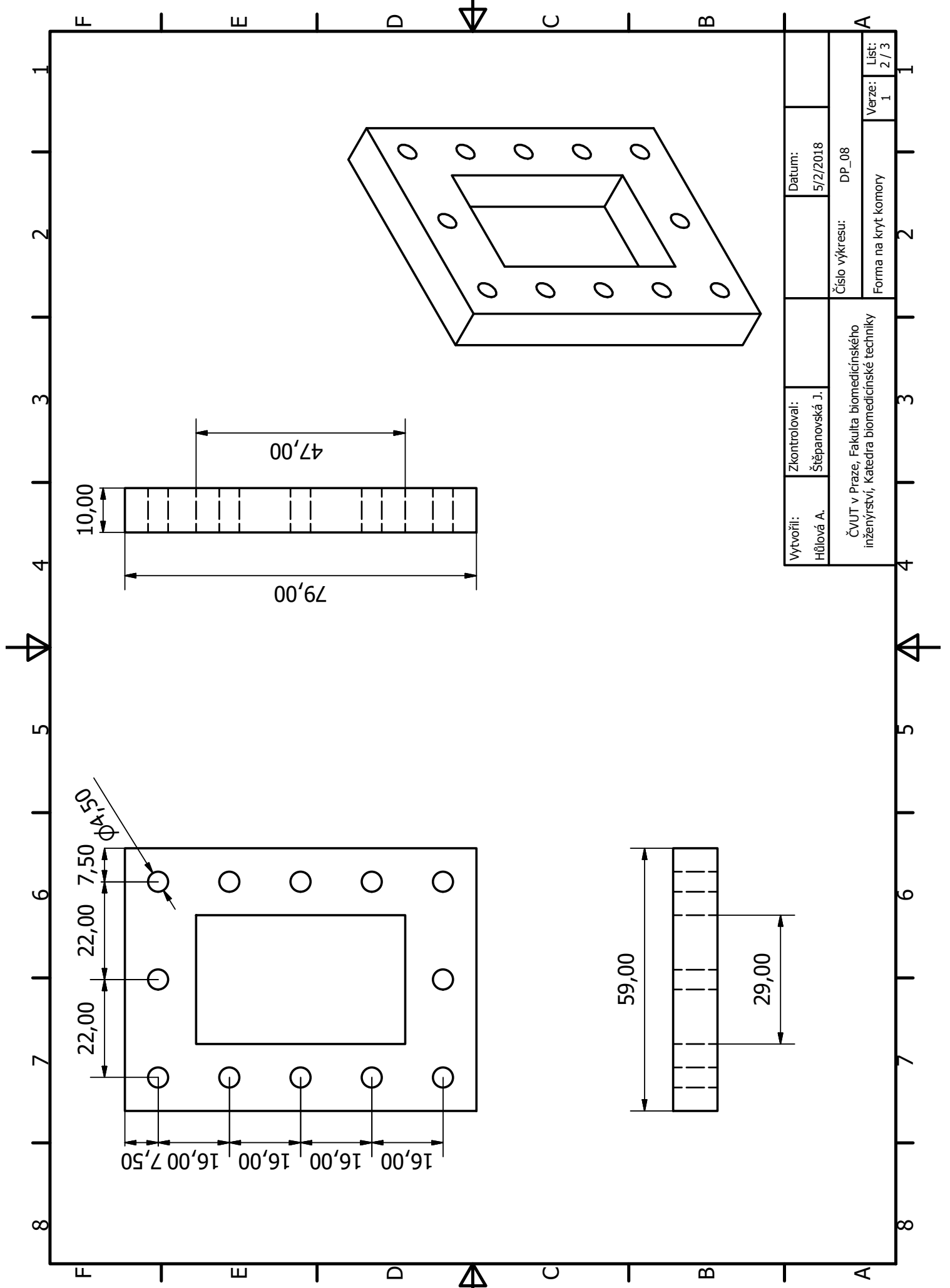
Vytvořil: Hřilová A.	Zkontroloval: Štěpanovská J.	Datum: 5/2/2018	Číslo výkresu: DP_05
ČVUT v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra biomedicínské techniky		Verze: I	List: 5 / 6
úchyty kultivační komory			



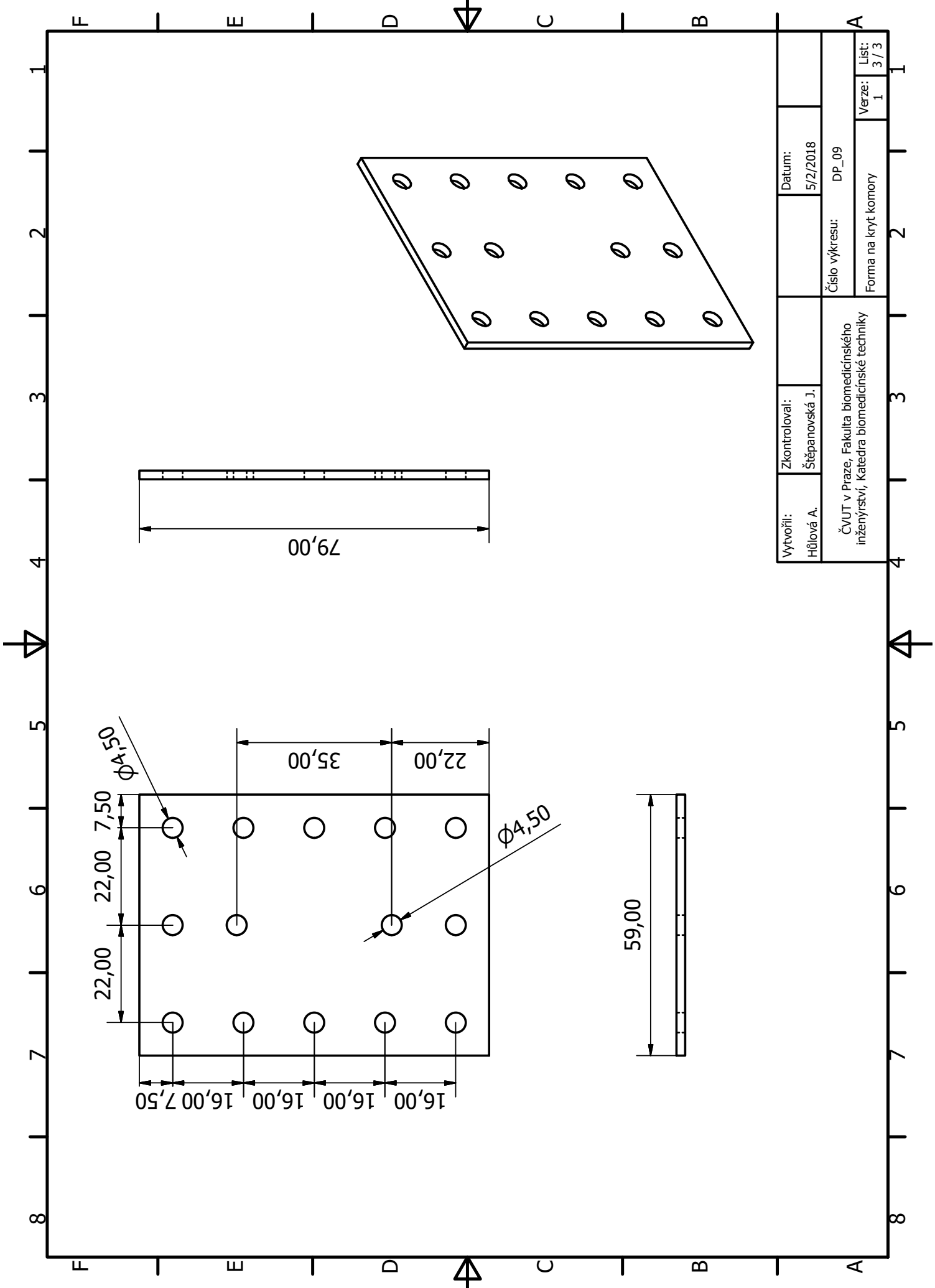
Vytvořil: Hůřlová A.	Zkontroloval: Štěpanovská J.	Datum: 5/2/2018	Číslo výkresu: DP_06
ČVUT v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra biomedicínské techniky		Verze: I	List: 6 / 6
		úchyty kultivační komory	



Vytvořil: Hůlová A.	Zkontroloval: Štěpanovská J.	Datum: 5/2/2018	Číslo výkresu: DP_07
ČVUT v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra biomedicínské techniky		Verze: I	List: 1 / 3
		Forma na kryt komory	

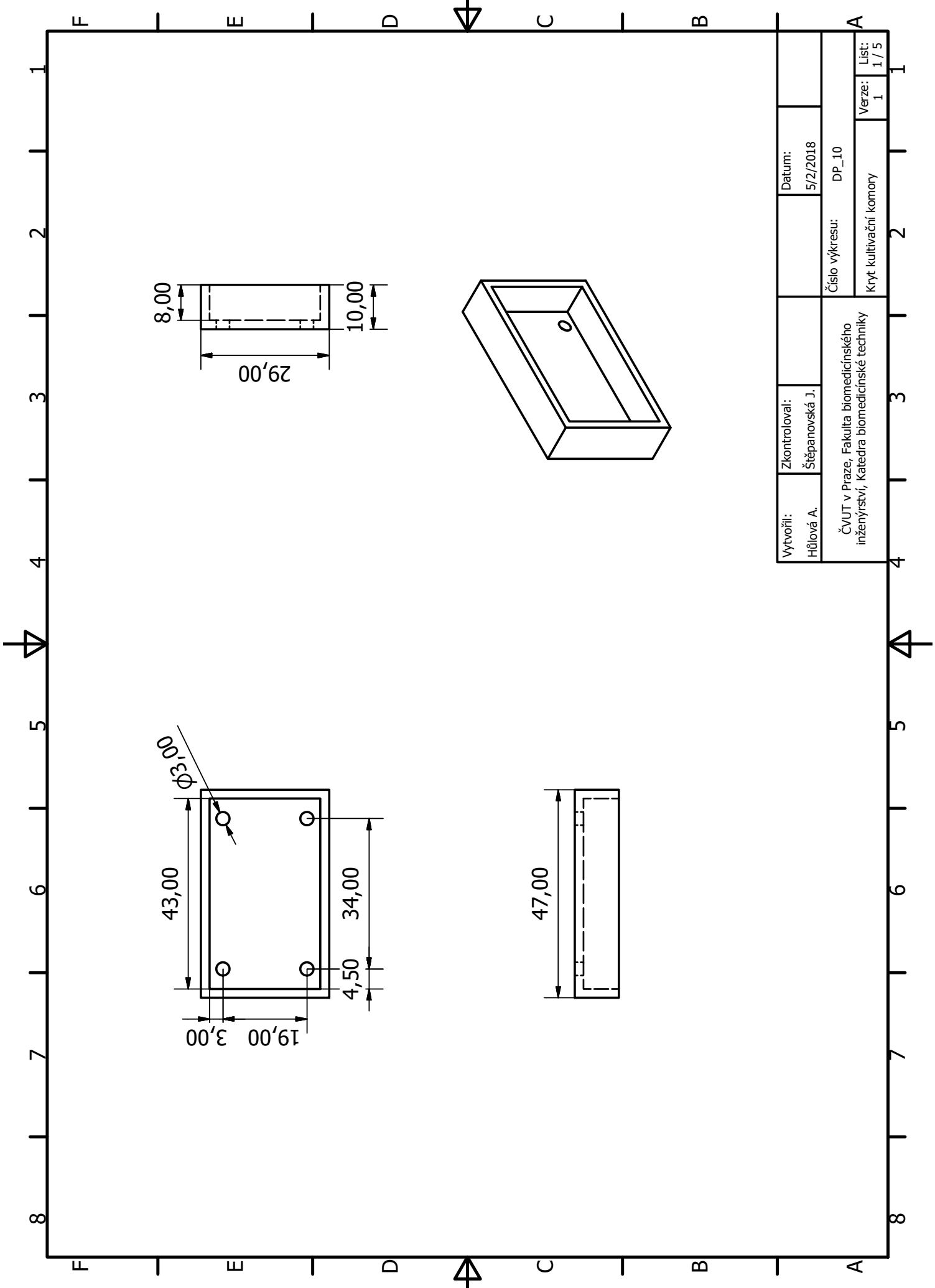


Vytvořil: Hůlová A.	Zkontroloval: Štěpanovská J.	Datum: 5/2/2018	Číslo výkresu: DP_08
ČVUT v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra biomedicínské techniky		Verze: I	List: 2 / 3
Forma na kryt komory			



Vytvořil: Hůlová A.	Zkontroloval: Štěpanovská J.	Datum: 5/2/2018	Číslo výkresu: DP_09
ČVUT v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra biomedicínské techniky		Verze: I	List: 3 / 3

Forma na kryt komory



Vytvořil: Hůlová A.	Zkontroloval: Štěpanovská J.	Datum: 5/2/2018	Číslo výkresu: DP_10
ČVUT v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra biomedicínské techniky		Verze: I	List: I / 5

A

A

B

B

C

C

D

D

E

E

F

F

1

2

3

4

5

6

7

8

1

2

3

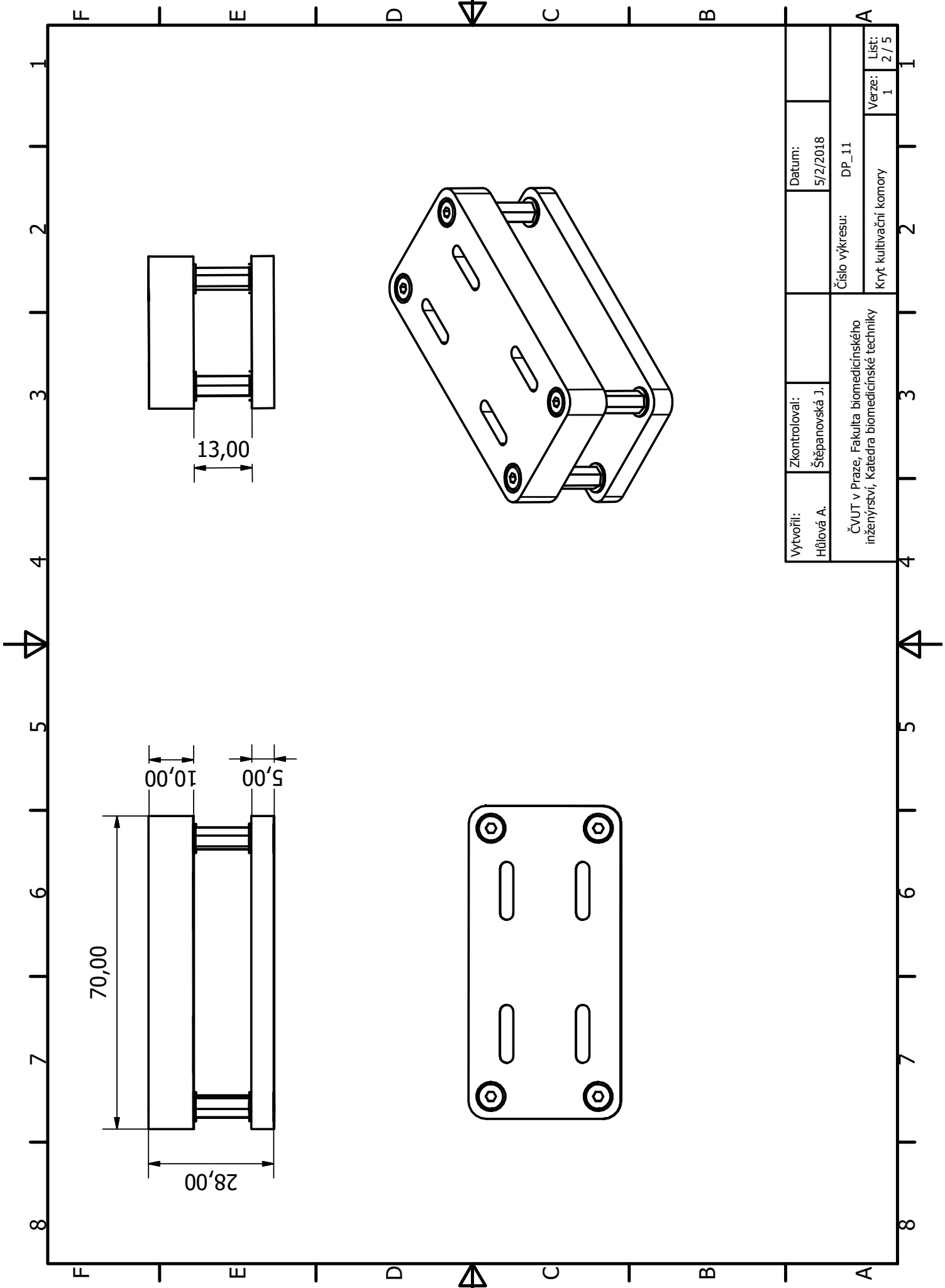
4

5

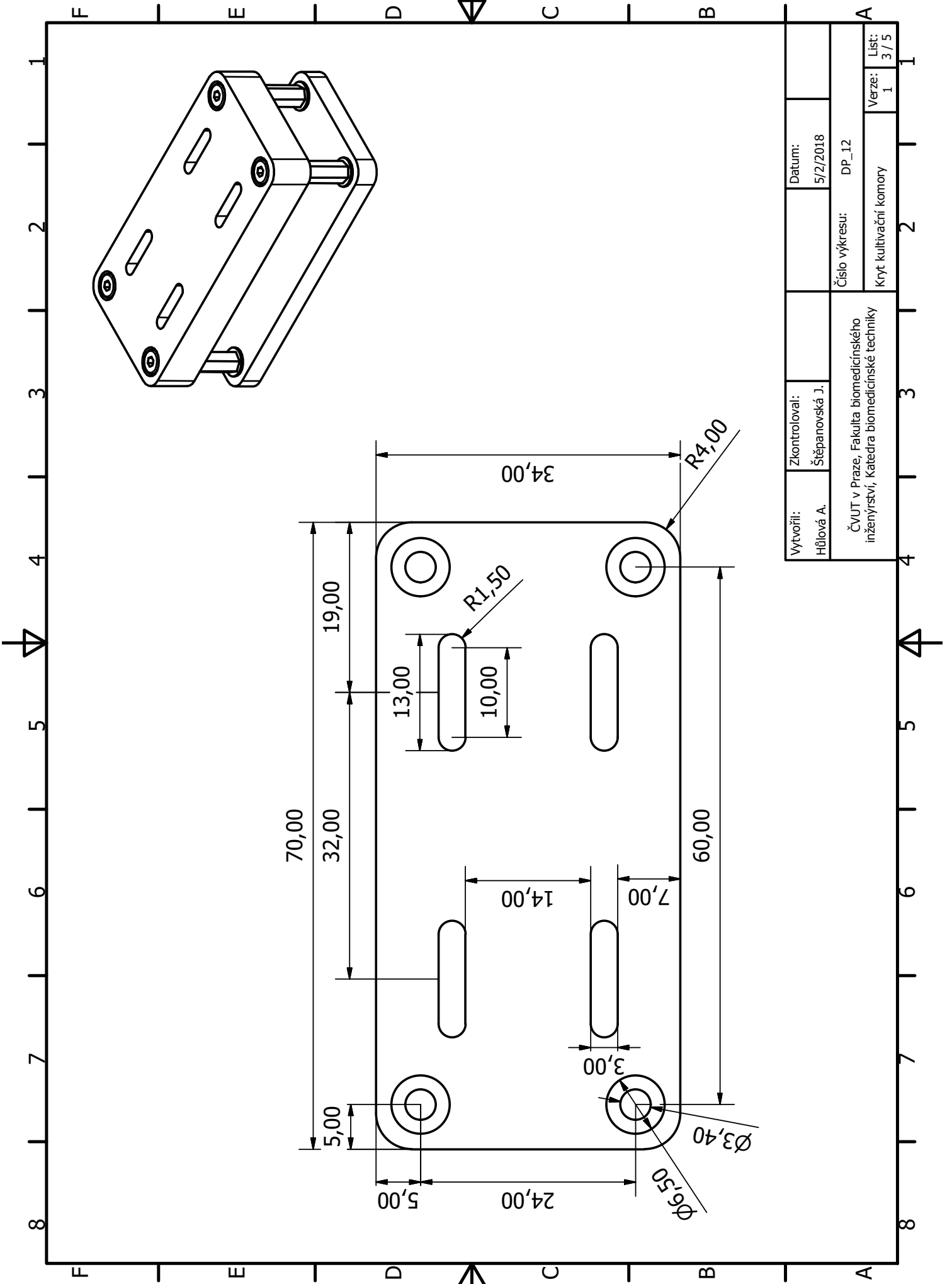
6

7

8

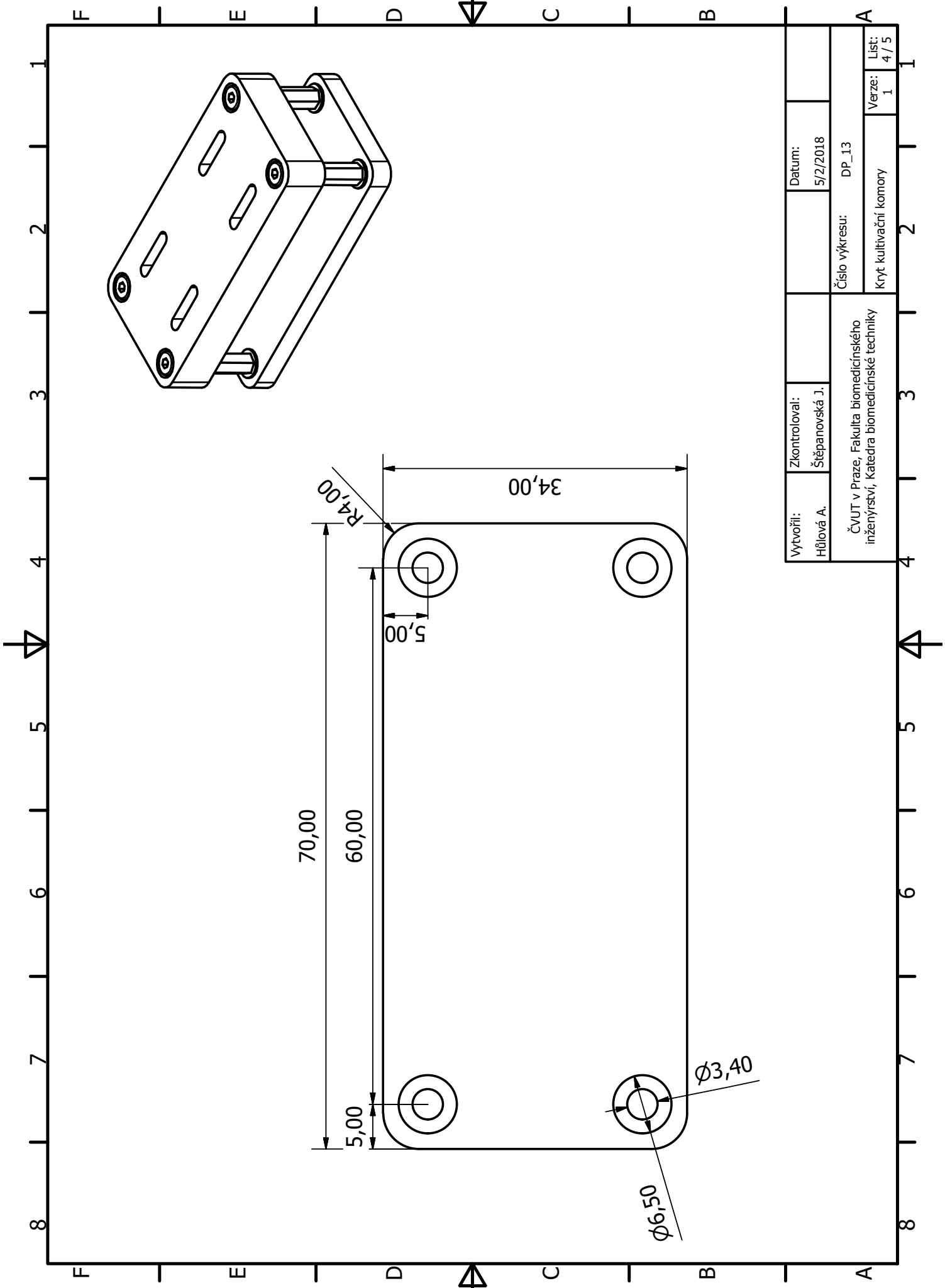


Vytvořil: Hůlová A.	Zkontroloval: Štěpanovská J.	Datum: 5/2/2018	Číslo výkresu: DP_11
ČVUT v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra biomedicínské techniky		Verze: I	List: 2 / 5
		Kryt kulturační komory	

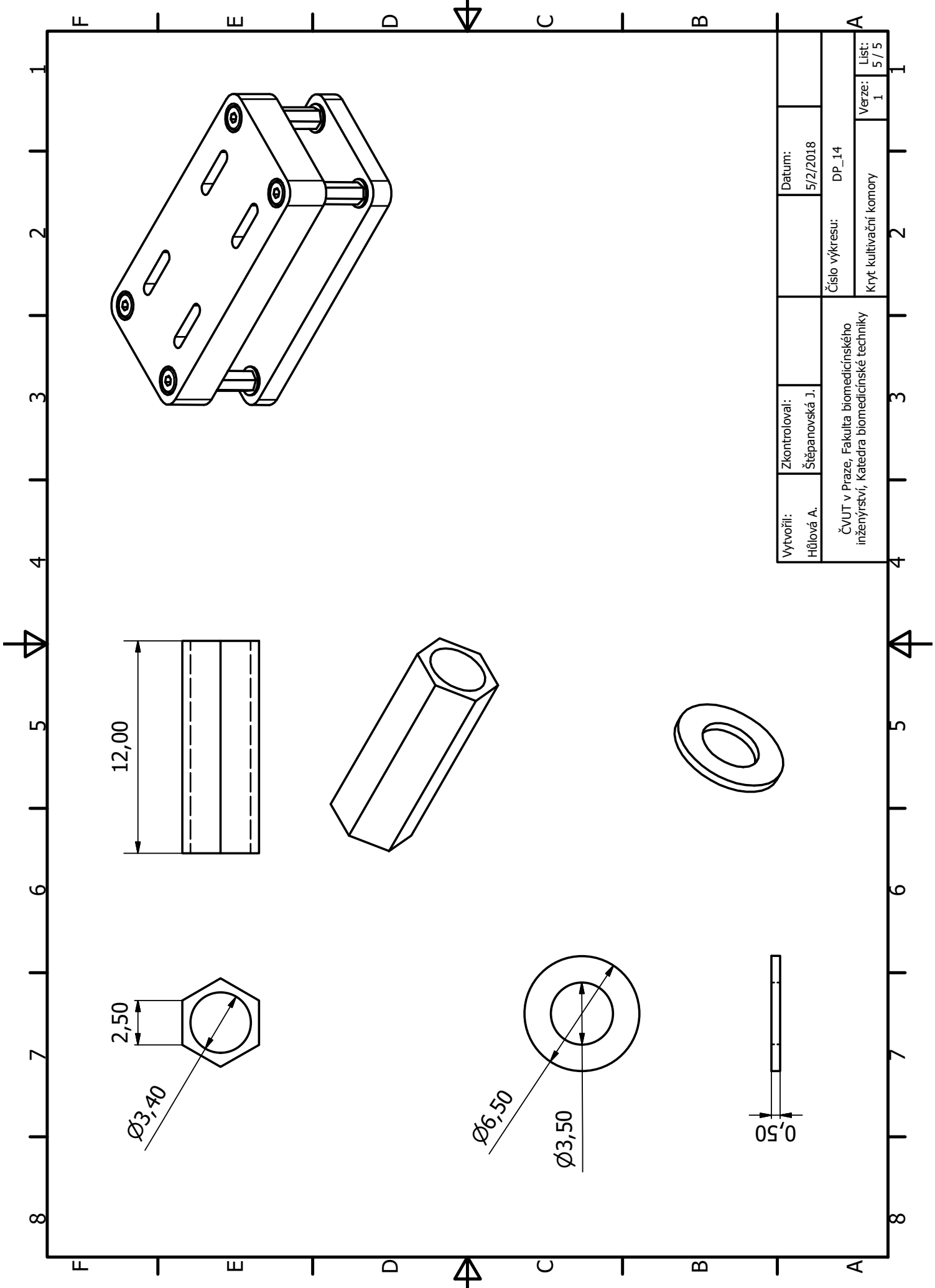


Vytvořil: Hůlová A.	Zkontroloval: Štěpanovská J.	Datum: 5/2/2018	Číslo výkresu: DP_12
ČVUT v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra biomedicínské techniky		Verze: I	List: 3 / 5

Kryt kultivační komory



Vytvořil:	Zkontroloval:	Datum:	Číslo výkresu:
Hůlová A.	Štěpanovská J.	5/2/2018	DP_13
ČVUT v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra biomedicínské techniky		Verze:	
		I	
		Kryt kultivační komory	
		List:	
		4 / 5	



Vytvořil: Hůřlová A.	Zkontroloval: Štěpanovská J.	Datum: 5/2/2018	Číslo výkresu: DP_14
ČVUT v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra biomedicínské techniky		Verze: I	List: 5 / 5
		Kryt kultivační komory	