



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra biomedicínské techniky

**Mechanické vlastnosti fibrinových gelů
pro dynamickou kultivaci kmenových
buněk**

**Mechanical properties of fibrin gels for
the dynamic cultivation of stem cells**

Bakalářská práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský technik

Autor bakalářské práce: Filip Černý

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Jana Štěpanovská

Kladno 2019

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Černý** Jméno: **Filip** Osobní číslo: **461605**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra biomedicínské techniky**
Studijní program: **Biomedicínská a klinická technika**
Studijní obor: **Biomedicínský technik**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Mechanické vlastnosti fibrinových gelů pro dynamickou kultivaci kmenových buněk

Název bakalářské práce anglicky:

Mechanical properties of fibrin gels for the dynamic cultivation of stem cells

Pokyny pro vypracování:

Navrhněte metodu a proveďte měření pro charakterizaci gelů o různé koncentraci fibrinu a trombinu z hlediska mechanických vlastností. Stanovte Youngův modul jednotlivých gelů a stanovte, jakým tlakem se musí na daný gel působit, aby namáhání bylo fyziologické, tedy podobné namáhání osteoblastů ve spongiózní kosti. Vybrané koncentrace gelů připravte pro dynamickou kultivaci kmenových buněk a proveďte experiment, kdy připravíte suspenzi kmenových buněk v gelech. Vyhodnoťte vliv mechanické stimulace na buněčnou kulturu v gelu a na základě analýzy diferenciačních markerů stanovte optimální koncentraci fibrinu a trombinu pro diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk do osteoblastů.

Seznam doporučené literatury:

[1] Joseph D Bronzino, The Biomedical Engineering Handbook, ed. First edition, Boca Raton : CRC Press, 2000, ISBN 0-8493-0461-X

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

Ing. Jana Štěpanovská

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Ing. Roman Matějka

Datum zadání bakalářské práce: **18.02.2019**

Platnost zadání bakalářské práce: **20.09.2020**



prof. Ing. Peter Kneppo, DrSc.
podpis vedoucí(ho) katedry



prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.
podpis děkana(ky)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Mechanické vlastnosti fibrinových gelů pro dynamickou kultivaci kmenových buněk vypracoval samostatně a použil 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 10.5.2019



Filip Černý

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval Ing. Janě Štěpanovské za dobré vedení, flexibilitu pro konzultace, konstruktivní připomínky a velikou podporu při vypracovávání této bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat rodině a přítelkyni za několikerou editaci a úpravu práce a za podporu po celou dobu studia.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s registračním číslem NV18-02-00422.

ABSTRAKT

Mechanické vlastnosti fibrinových gelů pro dynamickou kultivaci kmenových buněk

Výzvou pro moderní tkáňové inženýrství je úspěšná kultivace funkční kostní tkáně. Pro takovou kultivaci je nutné vytvořit prostředí, které bude správně mechanicky a výživově stimulovat kmenové buňky při diferenciaci do osteogenních buněk. Jakožto kultivační prostředí bylo navrženo použití 3D scaffoldů tvořených fibrinovými gely. Výhodou zvolení fibrinových gelů je možnost vysoké míry modulace parametrů fibrinových gelů a dále přípravy autologních gelů ze séra pacienta. Pro tento účel byla v rámci bakalářské práce vytvořena aparatura určená k pozorování mechanických vlastností fibrinových gelů o různých koncentracích jejich základních složek, fibrinogenu a trombinu, zvláště pak jejich strukturního modulu (Youngova modulu).

Klíčová slova

Fibrinové gely, hydrogely, Youngův modul, tlaková stimulace, osteoblasty, dynamická kultivace, tkáňové inženýrství

ABSTRACT

Mechanical properties of fibrin gels for the dynamic cultivation of stem cells

One of the current challenges of modern tissue engineering is a successful cultivation of a functional bone tissue. For such a cultivation it is necessary to create an environment that will mechanically stimulate and support stem cells to differentiate into osteogenic cells. A 3D scaffold composed of fibrin gels was suggested as a cultivation environment. Advantage of such an environment is a high possibility of modulation of fibrin networks and an opportunity to prepare these gels from patient's blood serum. For this bachelor thesis a pressure stimulation device was created to study mechanical properties of fibrin gels containing different concentrations of its primary components, fibrinogen and thrombin, especially its Young's modulus.

Keywords

Fibrin gels, hydrogels, Young's modulus, pressure stimulation, osteoblasts, dynamic cultivation, tissue engineering

Obsah

Seznam symbolů a zkratk.....	8
1 Úvod	9
1.1 Přehled současného stavu.....	10
1.2 Cíle práce.....	14
2 Metody	15
2.1 Návrh upevnění měřicí kyvety a držáku pro mikroskopickou kameru	15
2.2 Snímač aplikovaného tlaku	16
2.3 LabVIEW aplikace tlakového snímače	17
2.4 Mechanické testování fibrinových gelů	18
2.5 Zkušební aplikace tlakového zatížení	19
2.6 Příprava fibrinových gelů pro testování stlačení hladiny.....	20
2.7 Příprava fibrinových a agarových gelů pro testování stlačení bubliny	23
2.8 Stanovení Youngova modulu dle fotografií gelů	24
2.9 Příprava buněčných experimentů	25
2.10 Parametry buněčných experimentů	26
2.11 Statistické zpracování naměřených dat	27
3 Výsledky.....	28
3.1 Sestavení měřicí aparatury	28
3.2 DPS a LabVIEW aplikace snímače tlaku.....	30
3.3 Mechanické testování fibrinových gelů dle poklesu hladiny	31
3.4 Mechanické testování hydrogelů dle poklesu objemu bubliny	33
3.5 Výsledky buněčné kultivace.....	35
3.6 Analýza buněčných experimentů	37
4 Diskuze.....	38
5 Závěr	43
Seznam příloh.....	48
Příloha A: Technické výkresy navržené aparatury	49
Příloha B: Schéma navrženého elektrického obvodu a desky plošných spojů.....	56
Příloha C: Obsah přiloženého CD.....	59

Seznam symbolů a zkratk

Seznam symbolů

Symbol	Jednotka	Význam
c_f	mg/ml	Koncentrace fibrinogenu
c_t	IU/ml	Koncentrace trombinu
V_t	ml	Použitý objem zásobního roztoku trombinu
V_f	ml	Použitý objem zásobního roztoku fibrinogenu
V_{H_2O}	ml	Objem destilované vody v gelu
w_{agar}	%	Hmotnostní procento agaru v připraveném gelu
m_{agar}	g	Množství agaru v připraveném gelu
σ	torr	Mechanické namáhání
L	m	Délka
ε	$\mu\varepsilon$	Strain. Podélná deformace. Bez rozměrná, používá se symbol veličiny
E	Pa	Youngův modul

Seznam zkratk

Zkratka	Význam
ABS	Akrylonitrilbutadienstyren. Materiál použitý pro tisk aparatury.
ASC	Adipose stem cells. Kmenové buňky odebrané z tukové tkáně.
BIOCEV	Biotechnologický institut akademie věd.
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol. Fluorescenční barvivo sloužící ke zviditelnění buněčných jader.
DMEM	Dulbeccova modifikace Eagle média (Dulbecc's modified Eagle medium).
DPS	Deska plošných spojů.
HSC	Hematopoietic stem cells. Hematopoetické kmenové buňky.
IU/ml	International unit. Mezinárodní jednotka na mililitr.
MSC	Mesenchymal stem cells. Mezenchymální kmenové buňky.
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer. Činidlo používané pro rozklad proteinů.
THT	Through hole technology. Způsob osazování desek plošných spojů součástkami s drátovými vývody.
YM	Youngův modul.

1 Úvod

Kostní tkáňové inženýrství je rychle se rozvíjející odvětví tkáňového inženýrství zabývající se vytvořením metod a postupů pro kultivaci tkáně co nejvíce se přibližující kostní tkáni člověka, a to z hlediska struktury, mechanických vlastností a metod formování tkáně. Pro kultivaci osteogenních buněk a potažmo kostní tkáně byla navržena metoda využívající jako kultivační prostředí 3D hydrogely tvořené fibrinem. Fibrinové gely jsou 3D scaffoldy, polymery fibrinogenu a trombinu, které při kultivaci buněčné tkáně slouží jako mechanická opora a biochemická zásobárna živin. Jednou z hlavních výhod použití fibrinových scaffoldů je jejich naturalita pro lidský organismus, biodegradabilita a možnost přípravy autologních gelů z pacientova séra, čímž lze předejít případným problémům, které mohou nastat s pacientovým imunitním systémem.

Tato bakalářská práce vzniká jako součást výzkumu aplikace fibrinových gelů v kostním tkáňovém inženýrství. Hlavní snahou této práce je stanovit mechanické vlastnosti fibrinových gelů o různých koncentracích, ve kterých se při následné tlakové stimulaci budou z nasazených kmenových buněk nejlépe diferenciovat osteogenní buňky – osteoblasty. Práce je součástí výzkumu probíhajícího na Biotechnologickém ústavu Akademie věd (BIOCEV), kde probíhají experimentální pokusy s kultivací kostní tkáně v prostředí fibrinových gelů.

1.1 Přehled současného stavu

V dnešní době se upouští od růstu a manipulace kultivovaných buněk na 2D povrchu z důvodu odlišného chování buněk oproti přirozenému prostředí a více se upřednostňuje použití 3D buněčných kultur rostoucích na scaffoldech. Provedené vědecké studie uvádějí, že buněčné kultury kultivované na 3D prostředí jsou v porovnání s 2D kulturami účinnější z hlediska diferenciačního potenciálu buněk a z hlediska přítomnosti většího množství osteogenních markerů [1]. Scaffoldy připravené z různých biomateriálů mohou sloužit k uskutečnění mnoha procesů při remodelaci lidské tkáně, jako je přesun buněk a kontrola proliferace a diferenciace [2]. 3D kultivační prostředí také umožňuje lepší simulaci mechanických, biologických a biochemických procesů probíhajících ve skutečných tkáních.

Jako 3D kultivační prostředí jsou ve tkáňovém inženýrství stále více využívány hydrogely. Hydrogely jsou vodou nasycené polymerové sítě obsahující vzájemně propletené hydrofilní polymerové řetězce, které mohou být naturálního nebo syntetického původu. Pro tkáňové inženýrství je použití hydrogelů výhodné díky jejich schopnosti obklopit kultivované buňky a umožnit pozorování a zkoumání ve 3D prostředí, podobně jako v těle [3]. Důležitou vlastností hydrogelů je také jejich schopnost dobře přenášet mechanickou stimulaci na kultivované buňky [4]. Jedním z naturálních hydrogelů je 3D fibrinový scaffold (fibrinový gel). Fibrinové gely se připravují polymerací fibrinogenu a trombinu. Jejich užití ve tkáňovém inženýrství je slibné z více hledisek. Tím prvním je především možnost syntézy autologních fibrinových gelů z krevní plasmy pacienta a tím se vyvarovat problémům vzešlým z imunitní reakce pacientova organismu. Druhým hlediskem je velká míra modifikovatelnosti vlastností fibrinových gelů a z toho plynoucí široká možnost uplatnění při kultivaci většího množství typů živočišných tkání. Třetí výhodou je nezatěžování organismu a nezanesení kultivovaných buněk syntetickými látkami díky naturalitě a biodegradabilitě fibrinu. Fibrinový scaffold o správných parametrech by měl prostorově napodobovat prostředí uvnitř kostní tkáně, vytvářet adhezi, stimulovat buňky pro vytvoření pórovité struktury spongiózní kosti a následně podporovat osteoblasty v produkci kolagenu [5].

Stěžejním bodem této práce je vytvoření fibrinového gelu o mechanických vlastnostech odpovídajících podmínkám, ve kterých dochází k vývoji osteoblastů ve spongiózní části kosti. Některými z těchto mechanických parametrů jsou podélná deformace, tlak a elastický modul.

Podélná deformace (strain) je spolu s namáháním parametr vznikající působením vnějších sil na objekt. Namáhání je vnitřní síla, kterou se namáhaný objekt brání deformaci. Strain je bezrozměrná veličina udávající hodnotu této deformace. Je definován jako poměr deformace na jednotku délky objektu při aplikaci silového působení. Jelikož je hodnota podélné deformace většinou velmi malá, je v literatuře většinou uváděna v jednotkách micro-strain ($\mu\epsilon$) [6]. Elastický modul je materiálový parametr udávající

schopnost objektu, na který je vyvolávána vnější síla, odolávat deformaci. Jedním z hlavních typů elastického modulu je Youngův modul, který popisuje reakci tělesa na namáhání pouze v jednom směru. Tímto směrem je buďto natažení (extenze), nebo stažení (komprese) a poskytuje informaci o tuhosti studovaného materiálu. Jednotkou Youngova modulu je typicky Pascal, v odborné literatuře a v medicínské praxi se ovšem často používají i další jednotky tlaku, například centimetr vodního sloupce nebo milimetr rtuti (torr) [7].

Existuje několik metod pro měření Youngova modulu materiálu. Pro vzorky malé velikosti (buňky, nanomateriály) je vhodné použití Hertzova modelu využívajícího mikroskop atomárních sil. Zjednodušeně, Hertzův model funguje tak, že předpokládá nestlačitelnost studované buňky a nekonečnou stlačitelnost okolního prostředí. Na buňku je vyvíjena silová zátěž a pomocí velmi tenkého hrotu je v jednom směru snímána změna polohy buňky v prostředí. Hertzův model je limitován svými předpoklady – absolutním elastickým chováním prostředí, neinterakcí mezi buňkou a jejím okolím a předpokladem, že veškerá energie vyvinutá na buňku je přenesena. I přes své limitace poskytuje Hertzův model spolehlivé určení Youngova modulu pro velmi malé biologické vzorky [8] [9].

Další metodou, která může být také použita pro studium mechanických vlastností hydrogelů, je využití tenkého hrotu o zvoleném průměru, který je přednastavenou rychlostí vtlačován do studovaného materiálu. Měřeným parametrem je doba, za kterou je dosaženo nastaveného stlačení, při dané rychlosti. Nevýhodou této metody je požadavek na vlastnění nákladného přístroje schopného přesně dodržet stanovenou rychlost a pracovat s precizně nastavenými parametry.

Zkoumáním vlivu koncentrace fibrinogenu na Youngův modul fibrinových gelů se zabývala studie z roku 2002, a to pro koncentrace 4-14 mg/ml za konstantní koncentrace trombinu. Výsledkem výzkumu bylo zjištění, že se pro dané koncentrace fibrinogenu Youngův modul fibrinového gelu přibližně lineárně zvyšuje, ale nad hodnotou 14 mg/ml už nemá zvyšování koncentrace fibrinogenu vliv na Youngův modul vzniklé suspenze. Maximální Youngův modul při fibrinogenové koncentraci 14 mg/ml byl stanoven na 9995 Pa (± 185) a při 20% deformaci na 29600 Pa (± 932) [10].

Modulací tuhosti fibrinových gelů v závislosti na poměru fibrinogenu a trombinu se zabývala také studie z roku 2009. Zjištěná mechanická tuhost se pohybuje mezi hodnotami 0,058 kPa pro gely s nižšími koncentracemi fibrinogenu/trombinu a 4 kPa pro vyšší koncentrace, přičemž větší vliv na zvyšování mechanické tuhosti gelu nese zvyšování koncentrace fibrinogenu. Studie také zjistila negativní vliv zvyšující se koncentrace fibrinogenu na množství proliferovaných fibroblastů, kdy byla největší proliferace zjištěna při koncentraci 5 mg/ml fibrinogenu a 2 IU/ml trombinu [11].

Použití fibrinových gelů jakožto naturálních scaffoldů se již ve tkáňovém inženýrství několikrát uplatnilo. V roce 2009 se úspěšně podařila kultivace srdeční chlopně z ovčích srdečních buněk, což podpořilo využití scaffoldu na bázi fibrinu [12]. V současné době

se v klinické medicíně používají fibrinové gely o vysokých koncentracích fibrinogenu a trombinu jakožto hemostatická lepidla, sloužící jako náhrada invazivních stehů [13].

Kostní tkáň je typ tvrdé tkáně tvořící neelastickou část opěrné soustavy člověka a slouží jak k pevné mechanické opoře těla, tak k ochraně vnitřních orgánů. Pevnost kosti spočívá v mineralizaci mezibuněčné hmoty. Mezibuněčná hmota (extracelulární matrix) je substancí složenou z organické části, hlavně z kolagenu typu I. (až 95 %), a anorganické části, složené převážně z fosforu a vápníku, tvořící krystaly hydroxylapatitu. Hydroxylapatit krystalizuje na kolagenové struktuře, která slouží jako vyživující a opěrné prostředí pro anorganické složky kosti [14]. Osteoblasty jsou typ jednojaderných kostních buněk, které při přítomnosti ve větším počtu zajišťují tvorbu organické části extracelulární kostní matrix, především kolagenu I. typu. Osteoblasty pohlcené v syntetizovaném matrix se mění na osteocyty a dále slouží pro rozvod živin v kostech, což z důvodu mineralizované kostní matrix nelze provádět extracelulárně. Zakončení dlouhých kostí se nazývá epifýza. Vnitřek epifýzy je tvořen spongiózní kostí (*substantia spongiosa*), tato oblast se vyznačuje nižší hustotou než má diafýza, čímž je tkáň slabší, ale pružnější. Spongiózní kost je složená z kostních trámů (*trabeculae osseae*), tyto trámy jsou v dlouhých kostech (například v kosti stehenní) orientovány do směru oblasti vystavované vysoké mechanické zátěži. Díky trámovému uspořádání vzniká v epifýze prostor pro kostní dřev [15].

Existuje mnoho výzkumů, které popisují mechanické podmínky uvnitř spongiózní kosti. Tlak ve vnitřní části epifýzy stehenní kosti se dle studie z roku 2001 běžně pohybuje v rozmezí 1600-4900 Pa [16]. Dle modelových měření může při fyzicky náročných aktivitách tento tlak dosahovat hodnot až 2 MPa [17]. Aplikace takto vysokého tlaku na samotné kultivované buňky se ovšem nejeví jako realistická simulace tlaků, kterým jsou buňky *in vivo* vystavovány. Studie [18] tedy uvádí optimální stimulaci kostní tkáně při tlakových hodnotách 5-35 kPa, tato hodnota byla zjištěna ze studií zaměřujících se na tlaky, jimž je vystavena tibia ovce [18].

Pomocí měřidel podélných deformací byly změřeny maximální hodnoty deformací na holenní kosti. Při kompresi, ke které dochází při běžné chůzi, byly tyto hodnoty stanoveny na 400 $\mu\epsilon$ [19]. Na buněčné úrovni při různě náročných fyzických aktivitách nedochází ke kompresním deformacím kostních buněk vyšším než 1200 $\mu\epsilon$. Laboratorními měřeními bylo přitom zjištěno, že osteoblasty začínají reagovat až na deformace pohybující se v hodnotách 6 000-30 000 $\mu\epsilon$. To naznačuje existenci mechanismu zesilujícího buněčnou deformaci pro zajištění stimulace buněk [20]. Metodou konečných prvků byl na modelu stehenní kosti aproximován intramedulární elastický modul v oblasti epifýzy u kolenního kloubu. Zde se hodnoty pohybují v rozmezí 0,10-0,45 GPa. Model předpokládá nehomogenní stavbu kosti, čímž se přibližuje k reálné stavbě spongiózní kosti [21].

Kmenové buňky se dělí na několik typů dle diferenčního potenciálu. Pro tuto práci jsou stěžejní kmenové buňky multipotentního typu. Tyto buňky jsou schopny diferenciovat do více druhů buněk, počet těchto druhů je ovšem, na rozdíl od totipotentních nebo pluripotentních buněk, omezen. V kostní dřeni nacházíme dva typy multipotentních kmenových buněk – hematopoetické a mesenchymální. Hematopoetické kmenové buňky (HSC) jsou krvetvorné buňky diferencující se na základní krevní elementy – erytrocyty, leukocyty a trombocyty. Mesenchymální kmenové buňky (MSC) se mohou diferenciovat na svalové buňky (myocyty), tukové buňky (adipocyty), buňky chrupavek (chondrocyty) a kostní buňky (osteoblasty) [22] [23]. Existuje několik míst odebrání MSC. Invazivní metodou je odebrání přímo z kostní dřene, neinvazivní a také cenově dostupnější způsob je odebrání typově podobných tukových kmenových buněk (ASC) z tukové tkáně pomocí liposukce.

Úspěšnost tkáňové kultivace se dá posoudit dle analýzy diferenčních markerů přítomných v kultivovaných buněčných kulturách. Hlavním transkripčním faktorem diferenciace mesenchymálních kmenových buněk do osteoblastů je faktor Runx2. Jeho aktivací přechází buňky do stádia vývinu zvaného preosteoblasty. Následuje třífázová diferenciace, přičemž každá část je charakterizována expresí jiných molekulárních markerů. V první fázi probíhá hlavně proliferace buněk, jejímiž markery jsou například fibronectin a osteopontin. Ve fázi druhé dochází k diferenciaci a dozrávání extracelulární matrix buněk, hojně zastoupen je zde marker ALP. Ve třetí fázi probíhá mineralizace buněčné tkáně a v buňce se začne ve větší míře vyskytovat osteokalcin [24].

1.2 Cíle práce

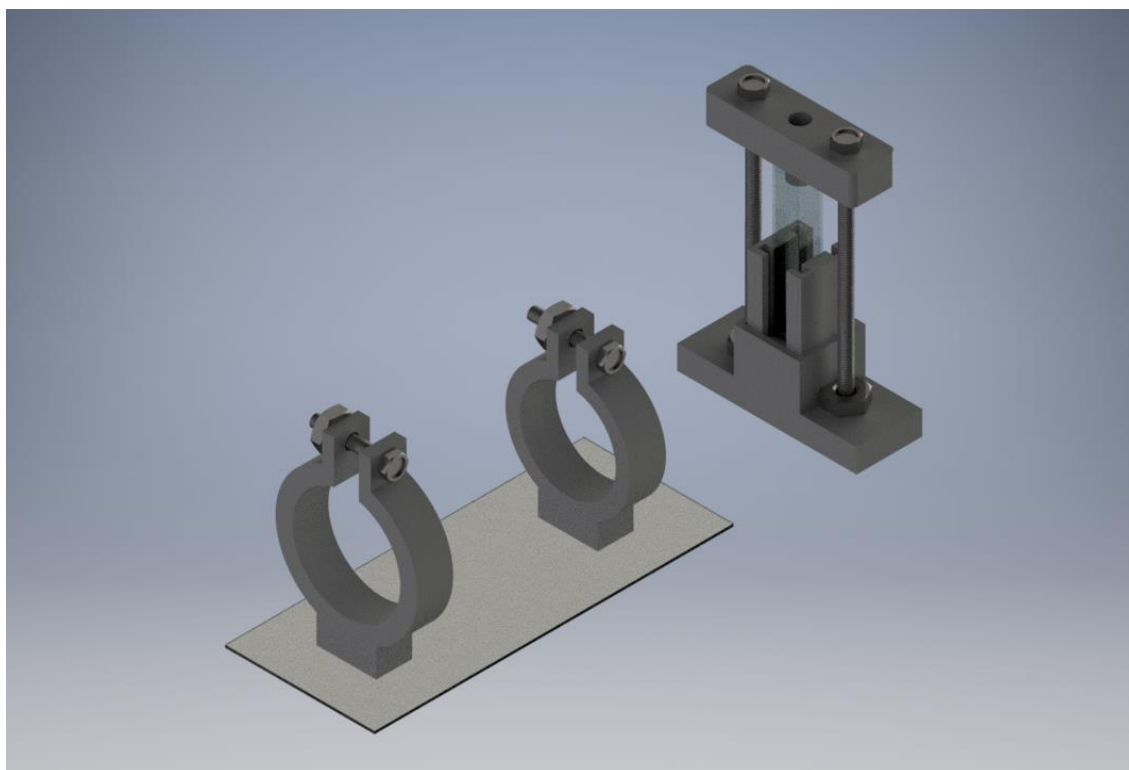
Cílem bakalářské práce je navrhnout metodiku měření mechanických parametrů fibrinových gelů. Za tímto účelem je navržena a vytvořena měřicí aparatura umožňující vizuální pozorování vlivu tlakové stimulace na fibrinové gely. Na aparatuře je proměřeno několik sad fibrinových gelů o různých koncentracích fibrinogenu a trombinu. Z výsledků mechanického testování je poté vybráno několik fibrinových gelů, které jsou použity jako 3D scaffoldy pro buněčné experimenty s cílem diferenciací mezenchymálních kmenových buněk do osteoblastů za dynamické stimulace. Na konci kultivační doby je vyhodnocen vliv koncentrace fibrinového gelu a mechanické tlakové stimulace na diferenciaci kmenových buněk do osteoblastů.

2 Metody

2.1 Návrh upevnění měřicí kyvety a držáku pro mikroskopickou kameru

Pro potřeby studia mechanických parametrů fibrinových gelů byla navržena metoda, při které je vizuálně snímáno stlačování hladiny fibrinových gelů. Pro tento účel byla navržena speciální aparatura, která se skládá ze stojanu na kyvetu, víka na kyvetu, držáku digitálního mikroskopu a podstavce. Stojánek umožňuje hermeticky těsné uchycení spektrofotometrické kyvety s fibrinovým gelem pomocí víka. Do vnitřního prostředí kyvety je středním otvorem víka přiváděno tlakové zatížení generované pomocí stříkačky, která je propojena se stojánkem infuzním setem a fitinkou Luer-lock vlepenou do víka. Těsnost dále zajišťuje gumový O-kroužek utěsňující rozhraní komory a víčka. Dva držáky byly navrženy dle rozměrů digitálního mikroskopu *Plugable USB 2.0 USB Microscope*. Digitální mikroskop je v držácích ukotven pomocí šroubů, které oba držáky utahují.

V přílohách této práce jsou umístěny technické výkresy navrhnuté aparatury.

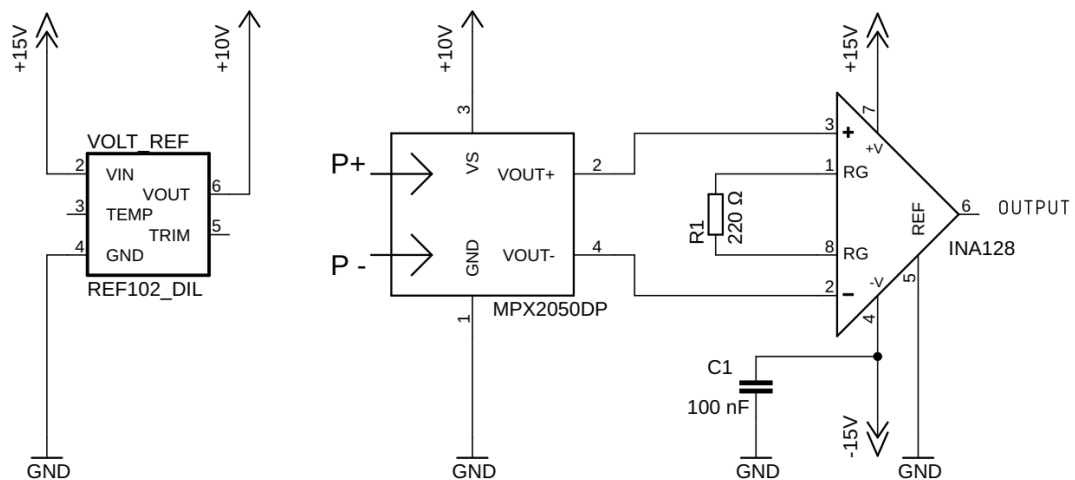


Obrázek 2.1: Návrh držáku pro uchycení digitálního mikroskopu (vlevo) a držák pro spektrofotometrickou kyvetu a víko. Obrázek byl vytvořen v prostředí Autodesk Inventor.

2.2 Snímač aplikovaného tlaku

Pro snímání aktuálních hodnot aplikovaného tlaku bylo nutno navrhnout a vyrobit desku plošných spojů s tlakovým senzorem schopným kontinuálně zaznamenávat hodnotu tlaku. Bylo zvoleno použití piezodporového tlakového senzoru MPX2050DP (Freescale, TX, USA) s měřicí oblastí 0-50 kPa (0-375 torr) poskytující přesný, kontinuální záznam aktuálního napětí. Senzor snímá aktuální tlak přivedený trubicí k jeho vstupu a porovnává jej s referenčním tlakem.

Pro snímání napětí generovaného tlakovými změnami na senzoru byl navrhnut obvod využívající přístrojového zesilovače INA128 (Texas instruments, TX, USA). Pro stabilizaci napájecího napětí bylo zvoleno použití napěťové reference REF102 (Texas instruments, TX, USA) poskytující stabilní napětí +10V, kterého je využito pro zajištění napájení tlakového senzoru MPX2050DP. Návrh desky plošných spojů byl vytvořen v softwarovém prostředí Autodesk Eagle.

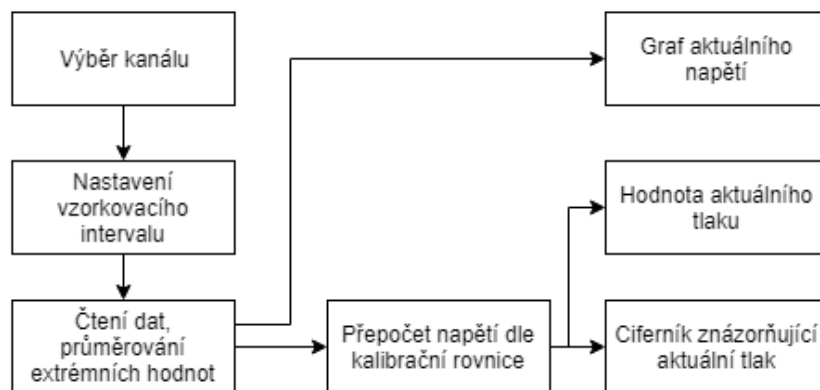


Obrázek 2.2: Schéma základních součástí obvodu snímače aplikovaného tlaku. Schéma bylo vytvořeno v softwarovém prostředí Autodesk Eagle.

2.3 LabVIEW aplikace tlakového snímače

Pro zobrazení aktuálního napětí z tlakového senzoru a následný převod na skutečnou hodnotu tlaku byla navržena aplikace v softwarovém prostředí LabVIEW. Připojení tlakového senzoru k aplikaci bylo realizováno pomocí přístroje NI myDAQ (National Instruments, TX, USA) s přidaným nepájivým polem myProto (Digilent, WA, USA).

Vyvinutá aplikace zaznamenává analogový napěťový signál vybraného kanálu dle stanovené vzorkovací frekvence z tlakového senzoru. Signál prochází procesem průměrování a poté je přepočten na hodnotu tlaku. Přepočet napětí na tlak je proveden za pomoci koeficientů kalibrační přímky. Hodnoty pro kalibrační rovnici byly získány využitím kalibrátoru tlakového senzoru. Po dosažení záznamu přesných tlakových hodnot byla kalibrace provedena vždy před začátkem měření.



Obrázek 2.3: Blokové schéma vytvořené LabVIEW aplikace snímající aktuální tlakové zatížení. Obrázek: Autor

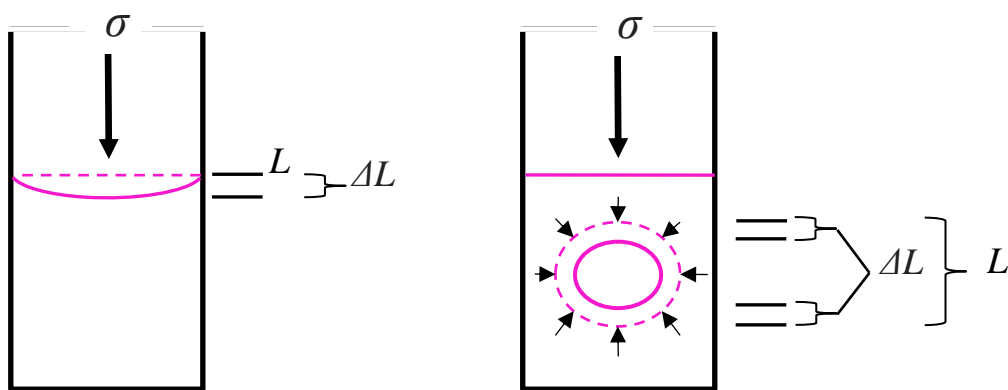
2.4 Mechanické testování fibrinových gelů

Na laboratorních pokusech byly vyzkoušeny dvě metody měření mechanických parametrů gelů v kyvetě. První metodou bylo měření poklesu hladiny gelu vlivem tlakového zatížení. V této metodě byl primární stanovovanou veličinou Youngův modul v tlaku. Před měřením byla kyveta s fibrinovým gelem upevněna do připraveného stojanu a digitální mikroskop byl doostřen. Celá souprava byla upevněna na společné dno pro zajištění konstantní vzdálenosti kamery od kyvety. Na každý z fibrinových gelů byl postupně vyvíjen tlak v rozmezí 0, 100, 200 a 300 torr. Na pořizovaných fotografiích byla poté vyhodnocována změna hladiny fibrinového gelu při aplikovaných hodnotách tlaků. Použitým vztahem pro výpočet Youngova modulu v kompresi je Hookův zákon:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{\sigma}{\Delta L/L_0} \quad (1)$$

Kde σ je hodnota tlakového napětí vyvíjeného na objekt a ε je podélná deformace, která se rovná podílu změny výšky hladiny ΔL a původní výšky hladiny fibrinového gelu L_0 .

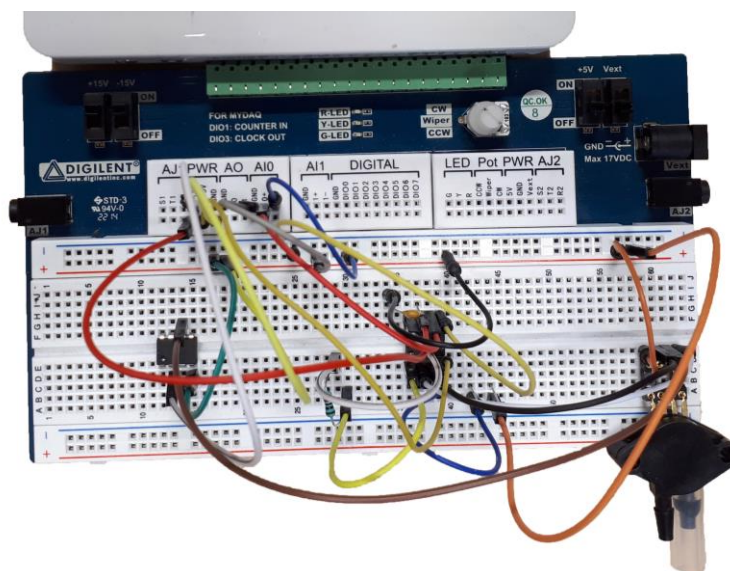
Druhou metodou bylo snímání vytvořené vzduchové bubliny uvnitř tuhnoucího gelu. Pro tuto metodu bylo stěžejní vystihnout správný moment tuhnutí gelu, ve který se dala v kyvetě vytvořit bublina, která nevypřehala a zároveň nepoškodila strukturu gelu podél vpichu. Při této metodě byla vyhodnocována změna objemu bubliny při aplikaci tlakové zátěže. Youngův modul v tomto případě nebylo možné dopočítat, jelikož na bublinu je působeno tlakem ze všech směrů, přičemž Youngův modul dle definice počítá s tlakem pouze v jednom směru.



Obrázek 2.4: Metody testování mechanických parametrů gelů v kyvetě. Vlevo metoda, při které byla posuzována změna hladiny fibrinových gelů. Vpravo metoda s uměle vytvořenou bublinou, na kterou bylo působeno tlakem. Obrázek: Autor

2.5 Zkušební aplikace tlakového zatížení

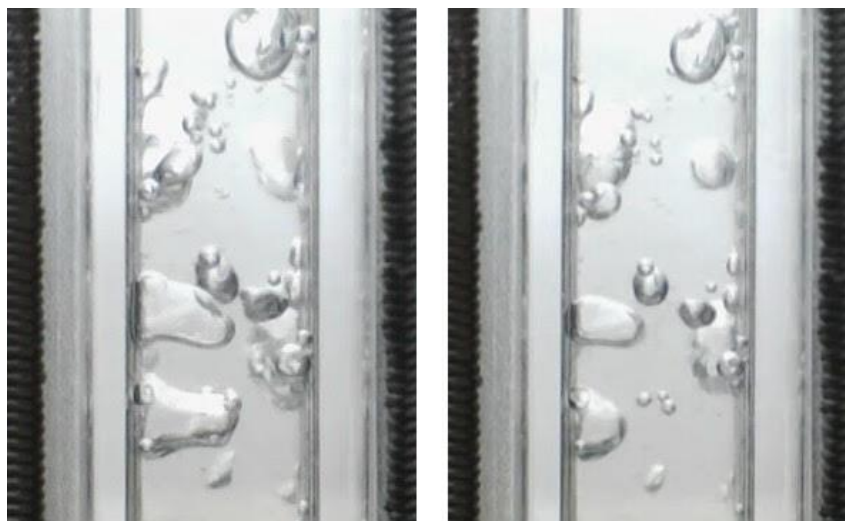
Pilotní ověření funkčnosti LabVIEW aplikace a navrženého obvodu pro tlakový senzor proběhlo za užití gelů připravených z agaru. Navržený elektrický obvod byl vyzkoušen v zapojení na nepájivém poli.



Obrázek 2.5: Testovací zapojení navrženého obvodu tlakového senzoru na nepájivém poli.

Fotografie: Autor

Na agarový gel v kyvetě bylo zkušebně vyvíjeno zatížení až do hodnoty 375 torr, což je horní mez citlivosti použitého tlakového senzoru. Bylo pozorováno jak stlačování bublin, tak pokles hladiny agarových gelů.



Obrázek 2.6: Ověření těsnění kyvety. Agarový gel při tlakové stimulaci 0 torr (vlevo) a 375 torr (vpravo). Fotografie: Autor

2.6 Příprava fibrinových gelů pro testování stlačení hladiny

Fibrinové gely byly připraveny za použití sady pro tvorbu tkáňového lepidla Tisseel Lyo (Baxter, USA) [25]. Souprava obsahuje čtyři injekční lahvičky se složkami pro výrobu tkáňového lepidla. Jsou to prášek Tisseel (lepící protein, fibrinogenum humanum, 91 mg/ml), prášek trombinu (trombinum humanum, 500 IU/ml), roztok aprotininu (syntetický aprotinin, 3000 KIU/ml) a roztok chloridu vápenatého (40 μ mol/ml).

První složkou fibrinového gelu je roztok fibrinogenu. Lahvička prášku Tisseel a roztok aprotininu byly zahřáty ve vodní lázni o teplotě 34°C a pomalu promíchávány. Poté byl za pomoci injekční jehly převeden roztok aprotininu do lahvičky s práškem Tisseel. Vzniklá látka byla zahřívána a opatrně promíchávána ve vodní lázni po dobu jedné minuty.

Jako druhá část byl připraven roztok trombinu. Při přípravě roztoku byl zahřátý prášek trombinu rozpuštěn v roztoku chloridu vápenatého. Pro rozpuštění lyofilizovaného materiálu bylo nutno opatrně kroužit lahvičkou. Roztok byl dále zahříván ve vodní lázni na teplotu 34°C.

Připravené roztoky fibrinogenu a trombinu byly pipetovány do kultivačního média. Jako kultivační médium je použito DMEM s přísadkami pro diferenciaci do osteoblastů (10% fetální bovinní sérum, 1% gentamycin, 50 μ g/ml kyselina askorbová, 10nM dexamethasone, 10 mM beta-glycerolfosfát). Pro každý fibrinový gel byl použit konstantní objem kultivačního média 0,3 ml.

Pro měření poklesu hladiny bylo celkem připraveno 25 fibrinových gelů a pro měření změny objemu bubliny bylo připraveno 10 fibrinových gelů. Gely byly uspořádány do sad po pěti gelech s konstantní koncentrací fibrinogenové složky a proměnnou koncentrací trombinu. V každé ze sad je ovšem zachován stejný poměr koncentračních složek pro možnost porovnání dat získaných z měření. Přehled připravených gelů, koncentrací jednotlivých složek, pipetovaných objemů a vzájemného poměru koncentrací fibrinogenu a trombinu je uveden v tabulkách 2.6.1. a 2.6.2.



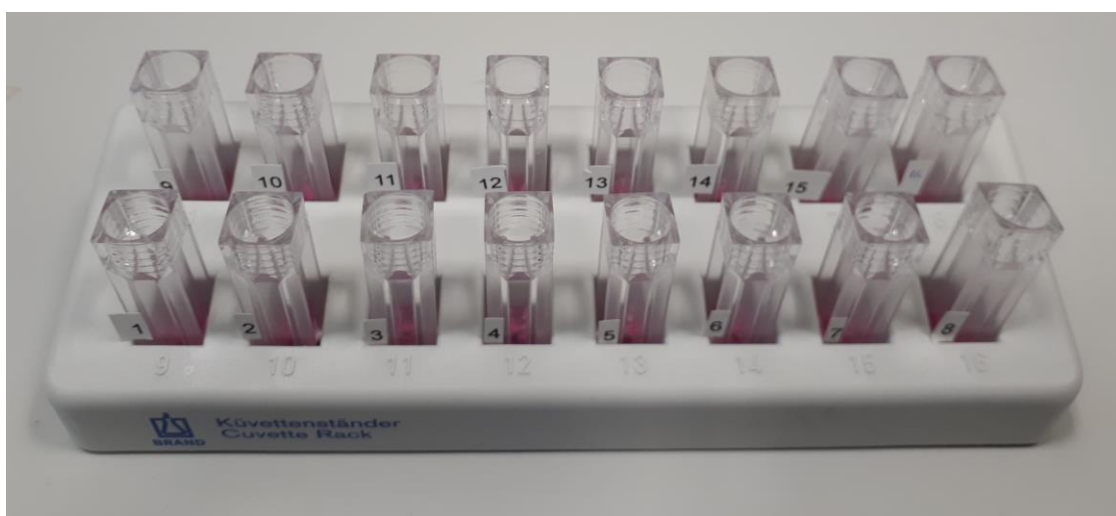
Obrázek 2.7: Použitý přípravek Tisseel Lyo. Fotografie: Autor

Tabulka 2.6.1: Parametry koncentrací a pipetovaných objemů fibrinogenu a trombinu v připravených fibrinových gelech pro testování změny objemu bubliny uvnitř gelu.

Číslo Gelu	c_f (mg/ml)	c_t (IU/ml)	V_f (μ l)	V_t (μ l)	$c_f : c_t$ (-)
1	1,0	0,4	3,30	0,24	0,4
2	1,0	0,8	3,30	0,48	0,8
3	1,0	1,2	3,30	0,72	1,2
4	1,0	1,6	3,30	0,96	1,6
5	1,0	2,0	3,30	1,20	2,0
6	5,0	2,0	16,48	1,20	0,4
7	5,0	4,0	16,48	2,40	0,8
8	5,0	6,0	16,48	3,60	1,2
9	5,0	8,0	16,48	4,80	1,6
10	5,0	10,0	16,48	6,00	2,0

Tabulka 2.6.2: Parametry koncentrací a pipetovaných objemů fibrinogenu a trombinu v připravených fibrinových gelech pro testování stlačení hladiny.

Číslo Gelu	c_f (mg/ml)	c_t (IU/ml)	V_f (μ l)	V_t (μ l)	$c_f : c_t$ (-)
1	1,0	0,4	3,30	0,24	0,4
2	1,0	0,8	3,30	0,48	0,8
3	1,0	1,2	3,30	0,72	1,2
4	1,0	1,6	3,30	0,96	1,6
5	1,0	2,0	3,30	1,20	2,0
6	3,0	1,2	9,89	0,72	0,4
7	3,0	2,4	9,89	1,44	0,8
8	3,0	3,6	9,89	2,16	1,2
9	3,0	4,8	9,89	2,88	1,6
10	3,0	6,0	9,89	3,60	2,0
11	5,0	2,0	16,48	1,20	0,4
12	5,0	4,0	16,48	2,40	0,8
13	5,0	6,0	16,48	3,60	1,2
14	5,0	8,0	16,48	4,80	1,6
15	5,0	10,0	16,48	6,00	2,0
16	7,0	2,8	23,08	1,68	0,4
17	7,0	5,6	23,08	3,36	0,8
18	7,0	8,4	23,08	5,04	1,2
19	7,0	11,2	23,08	6,72	1,6
20	7,0	14,0	23,08	8,40	2,0
21	10,0	4,0	32,97	2,40	0,4
22	10,0	8,0	32,97	4,80	0,8
23	10,0	12,0	32,97	7,20	1,2
24	10,0	16,0	32,97	9,60	1,6
25	10,0	20,0	32,97	12,00	2,0



Obrázek 2.8: Sada připravených a očíslovaných fibrinových gelů. Fotografie: Autor

2.7 Příprava fibrinových a agarových gelů pro testování stlačení bubliny

Při přípravě fibrinových gelů pro zkoušku mechanických vlastností vytvořené vzduchové bubliny se vyskytly neočekávané problémy s umístěním bubliny do prostoru tuhnutí gelu. Po vpichu jehly se vlákna tvořící se fibrinové síť přichytila na jehlu a začala na ní tuhnout. Při odstraňování jehly poté zůstala fibrinová vlákna na jehle a celý gel byl poškozen. Nakonec se podařilo připravit pouze jeden gel z každé testované koncentrace.

Z obavy z nízkého množství dat z měření s fibrinovými gely bylo rozhodnuto, že ověření funkčnosti aparatury pro měření mechanických parametrů gelu dle stlačování bubliny bude provedeno také na řadě gelů připravených z agaru. Použití agaru bylo zvoleno z důvodu vysoké dostupnosti a příznivé ceny suroviny. Každý z agarových gelů byl připraven třikrát a měření na každém bylo provedeno pětkrát.

Při přípravě agarových gelů byl agarový prášek smíchán s destilovanou vodou a umístěn do vodní lázně o teplotě 100°C. Agar byl v lázni ponechán po několik minut, poté byl vychlazen na teplotu pod 40°C, kdy začíná tuhnout. Gel byl převeden do měřicí kyvety, která byla utěsněna a připojena ke zbytku aparatury.

Tabulka 2.7.1 Parametry hmotnostní koncentrace a hmotnosti agaru připravené řady agarových gelů.

Číslo Gelu	w_{agar} (%)	m_{agar} (g)	V_{H_2O} (ml)
1	1,2	0,60	50
2	1,4	0,70	50
3	1,7	0,85	50
4	2,0	1,00	50
5	2,3	1,15	50
6	2,7	1,35	50
7	3,4	1,70	50

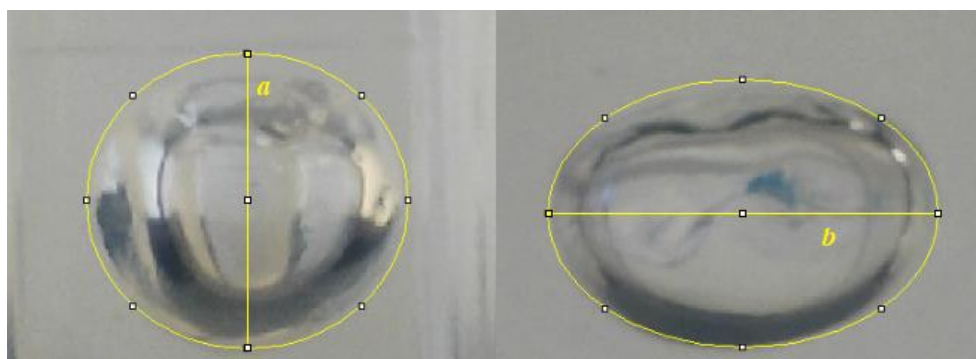
2.8 Stanovení Youngova modulu dle fotografií gelů

Vyhodnocení nasnímaných fotografií fibrinových a agarových gelů probíhalo v programu pro analýzu obrazových dat ImageJ. Jednotlivé fotografie byly uspořádány dle svých koncentrací a zobrazovány v sadách po čtyřech fotografiích. V každé sadě byla poté vyhodnocována změna výšky hladiny gelu podle vzdálenosti dna kyvety od hladiny gelu v hodnotě pixelů. Pro měření bylo stěžejní zajistit stabilitu digitálního mikroskopu a měřicí kyvety po celou dobu měření. Pro usnadnění sledování změny výšky hladiny a zkrácení časové doby potřebné ke zpracování velkého počtu fotografií byl v programu Matlab vytvořen skript, který do každé z fotografií fibrinového gelu vložil orientační měřítko ve zvolené oblasti hladiny gelu. Naměřené změny výšky hladiny fibrinových gelů byly přepočítány na podélnou deformaci a dále na výslednou hodnotu Youngova modulu za využití znalosti aplikovaného tlaku. Za účelem zvýšení přesnosti bylo měření každého z gelů desetkrát opakováno.



Obrázek 2.9: Pokles hladiny fibrinového gelu při tlakové stimulaci. Zleva pro tlakové stimule 0, 100, 200 a 300 torr. Fotografie: Autor

Youngův modul materiálu je možné měřit pouze pro stlačování v jednom směru. Jeho výpočet při snímání bubliny, na kterou je tlačeno ze všech stran, je proto problémový. Bylo proto rozhodnuto, že při druhém typu měření bude zjišťován procentuální pokles objemu bubliny v gelu při jednotlivých tlakových zatíženích. Snímání spektrofotometrické kyvety bylo provedeno jak z přední, tak z boční strany, čímž byly získány rozměry výšky a délky bubliny. Z takto stanovených hodnot byl poté objem bubliny vypočítán dle vztahu pro objem rotačního elipsoidu, jemuž je bublina tvarem podobná.



Obrázek 2.10: Měření rozměrů bubliny v agarovém gelu při stimulaci zatížením 100 torr. Získané koeficienty a a b byly využity pro výpočet objemu bubliny. Fotografie: Autor

2.9 Příprava buněčných experimentů

Pro kultivaci byly využity mezenchymální kmenové buňky, které byly izolovány z tukové tkáně prasete domácího (ASC). Pro buněčné experimenty byly zvoleny fibrinové gely o koncentraci fibrinogenové složky 1 a 5 mg/ml. Parametry připravených gelů jsou uvedeny v tabulce 2.9.1.

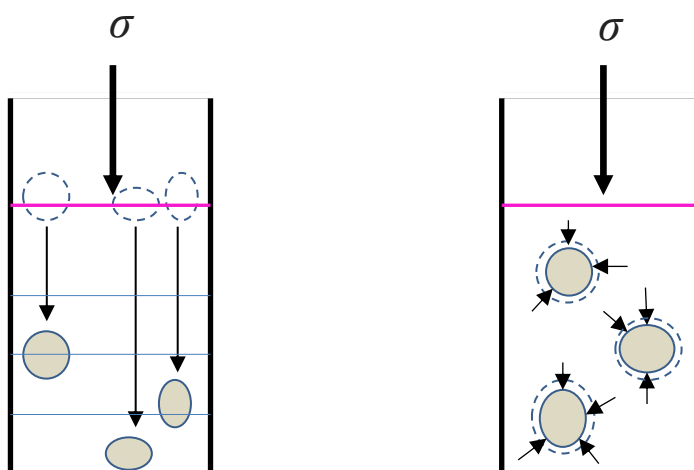
Tabulka 2.9.1: Fibrinové gely použité pro buněčné experimenty

Číslo Gelu	c_f (mg/ml)	c_t (IU/ml)	$c_f:c_t$
1	1,0	0,4	0,4
2	1,0	0,8	0,8
3	1,0	1,2	1,2
4	1,0	1,6	1,6
5	1,0	2,0	2,0
6	5,0	0,4	0,4
7	5,0	0,8	0,8
8	5,0	1,2	1,2
9	5,0	1,6	1,6
10	5,0	2,0	2,0

Pro kultivaci byly uvažovány dva možné přístupy. Prvním bylo nasazení buněk na hladinu gelů, v tomto případě by tlaková stimulace způsobila postupný průnik buněk do prostoru gelu, na základě kterého by na konci kultivace byl analyzován vliv tlakové stimulace na hloubku průniku buněk do gelu. Druhým přístupem bylo nasazení buněk přímo do prostoru fibrinového gelu, přičemž tlaková stimulace by poté působila na celou plochu buněk a mechanicky je stimulovala. Schéma obou těchto metod je znázorněno na obrázku 2.11.

Pro zvýšení počtu buněk byly buňky nejprve staticky metodou pasážování namnoženy. Pro následné pokusy s gely byla využita 3. pasáž buněk. Před namícháním vybraných gelů byla vytvořena buněčná suspenze v bezbarvém médiu DMEM a byla stanovena její koncentrace, která byla následně upravena na konečný počet 3 miliony buněk/ml. Fibrinogen obsažený ve fibrinových gelech začíná rychle gelovat již při prvním kontaktu s fetálním sérem, které je součástí kultivačního média. Proto byla buněčná suspenze nejprve smíchána s čerstvým kultivačním médiem do požadované konečné koncentrace. Následně byl přidán trombin a nakonec fibrinogen. Gel byl opatrně zamíchán špičkou pipety, aby nedošlo k vytvoření bublin. Ty by mohly negativně ovlivnit mechanické účinky tlakové stimulace absorbováním jeho části. Také by mohly zhoršit zorné pole při následném pozorování kultury v mikroskopu.

Zároveň s pokusy s fibrinovými gely byly nasazeny i kontrolní 2D vzorky, ve kterých byly buňky nasazeny přímo na sklo uvnitř kultivační jamky. Použité médium u všech vzorků (2D i 3D) bylo DMEM obsahující antibiotika, fetální sérum a přísady pro osteogenní diferenciaci (10% fetální bovinní sérum, 1% gentamycin, 50 $\mu\text{g/ml}$ kyselina askorbová, 10nM dexamethasone, 10 mM beta-glycerolfosfát).



Obrázek 2.11: Možnosti aplikace buněk při stimulaci tlakovým zatížením. Vlevo nasazení buněk na hladinu gelu s postupným prolézáním buněk hlouběji do gelu. Vpravo nasazení do prostoru gelu a aplikace tlakové stimulace po celé ploše buněk. Obrázek: Autor

2.10 Parametry buněčných experimentů

Připravené vzorky byly dynamicky kultivovány nepřetržitou pulsní tlakovou stimulací. Zároveň s kultivovanými vzorky byly také nasazeny kontrolní statické vzorky, ve 2D i 3D. Na základě výsledků měření mechanických vlastností gelů byla stanovena tlaková zátěž se sinusovou charakteristikou o amplitudě 0-400 torr a frekvenci 0,5 Hz. Oba typy vzorků byly po nasazení kultivovány po dobu sedmi dnů.

Po sedmi dnech od začátku kultivace byla část vzorků zafixována paraformaldehydem pro pozdější barvení. Druhá část byla zlyzována pomocí bufferu RIPA a následně bylo pomocí Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermofisher scientific, MA, US) stanoveno množství proteinu ve vzorcích.

U zafixovaných dynamických vzorků bylo provedeno barvení jader pomocí barviva DAPI a cytoskeletu pomocí barviva phalloidin. Dále byly všechny kultury nasnímány pomocí světelného mikroskopu s fázovým kontrastem a fluorescenčního mikroskopu. Některé kultury byly také nasnímány konfokálním mikroskopem.

2.11 Statistické zpracování naměřených dat

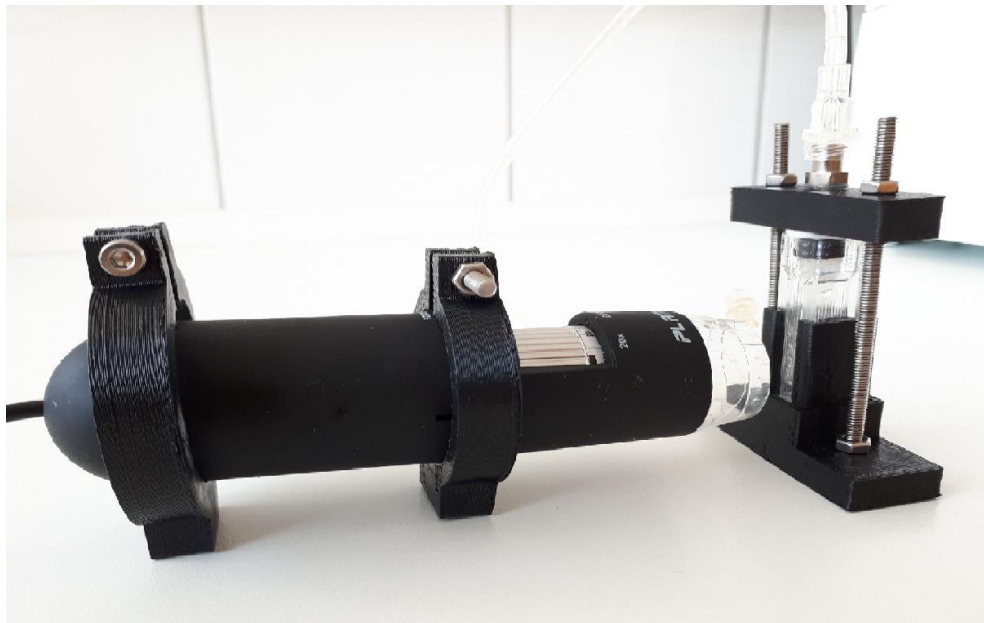
Hodnoty naměřené při sledování mechanických parametrů fibrinových gelů byly vyhodnoceny za pomoci programového prostředí MS Excel. Každý Youngův modul stanovený z měření poklesu hladiny fibrinových gelů byl desetkrát přeměřen, přičemž při vyhodnocování byla odstraněna minimální a maximální hodnota. Ke každé hodnotě Youngova modulu byla vypočítána výběrová směrodatná odchylka aritmetického výběru. Dále byla vypočítána nejistota typu A pro soubor dat o velikosti osmi dat. Z hodnot výběrové směrodatné odchylky aritmetického výběru a nejistoty typu A byla vypočítána kombinovaná nejistota u_c . Naměřené hodnoty Youngova modulu byly poté vyneseny do grafu jako $(\bar{x} \pm u_c)$ [26].

Pro data naměřená v rámci testování poklesu objemu bubliny fibrinových a agarových gelů byla vypočítána průměrná hodnota a směrodatná odchylka. Data byla do grafu vynesena jako $(\bar{x} \pm SD)$.

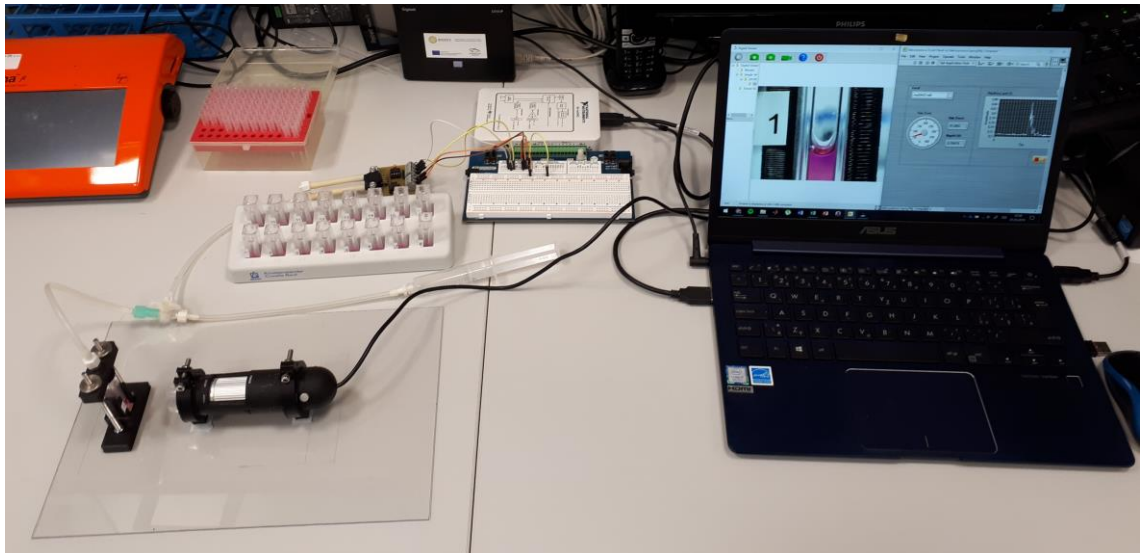
3 Výsledky

3.1 Sestavení měřicí aparatury

Vytvořené návrhy jednotlivých dílů aparatury pro snímání mechanických parametrů hydrogelů byly vytisknuty pomocí 3D tiskárny. Jako materiál pro tisk dílů byl použit akrylonitrilbutadienstyren (ABS). Po vytisknutí byly jednotlivé díly očištěny od přebývajících plastu a otvory pro šroubové spoje byly zprůchodněny. Kamera s mikroskopickým zvětšením byla umístěna do vytisknutých držáků a na pevně zajištěna šrouby situovanými na vrcholech držáků. Připojení víka kyvety ke dnu bylo zajištěno aplikací dvou závitových tyčí do krajních otvorů obou dílů. Do prostřední díry víka kyvety byla zavedena fitinka sloužící k propojení vnitřku kyvety se zbytkem tlakově izolovaného systému. Mezi fitinku a víko bylo nanášeno lepidlo. Slabým místem těsnění aparatury byl kontakt vrchu kyvety s víkem, proto zde byl přidán široký O-kroužek zajišťující potřebné těsnění. Trubice vedoucí z víka kyvety byla napojena na T spojku. Druhý vývod T spojky byl připojen ke snímacímu vstupu tlakového senzoru. Na třetí vstup T spojky byla připojena injekční stříkačka sloužící k aplikaci tlakového zatížení.



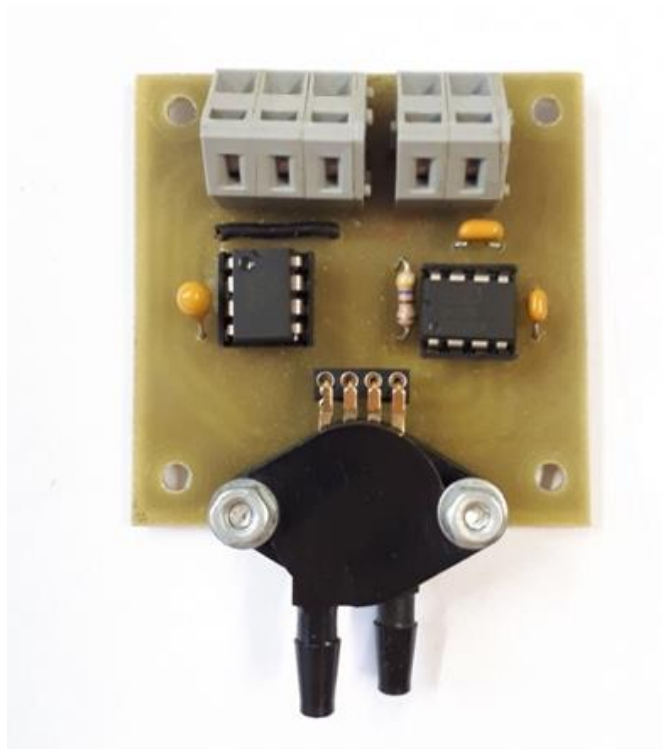
Obrázek 3.1: Digitální mikroskop (*Plugable USB 2.0 USB Microscope*) uchycený ve vytisknutých držácích spolu s upevněnou a utěsněnou měřicí kyvetou. Fotografie: Autor



Obrázek 3.2: Fotografie kompletně sestavené aparatury pořízená při laboratorním měření mechanických parametrů připravených fibrinových gelů. Na levé spodní části vytisknutá aparatura s měřicí kyvetou s fibrinovým gelem a digitální mikroskop. V horní části DPS s tlakovým senzorem napájená přes NI myDAQ s přidaným nepájivým polem myProto. Vpravo notebook se současným snímáním fotografií fibrinového gelu a aplikovaného tlaku pomocí aplikace v LabVIEW. Fotografie: Autor

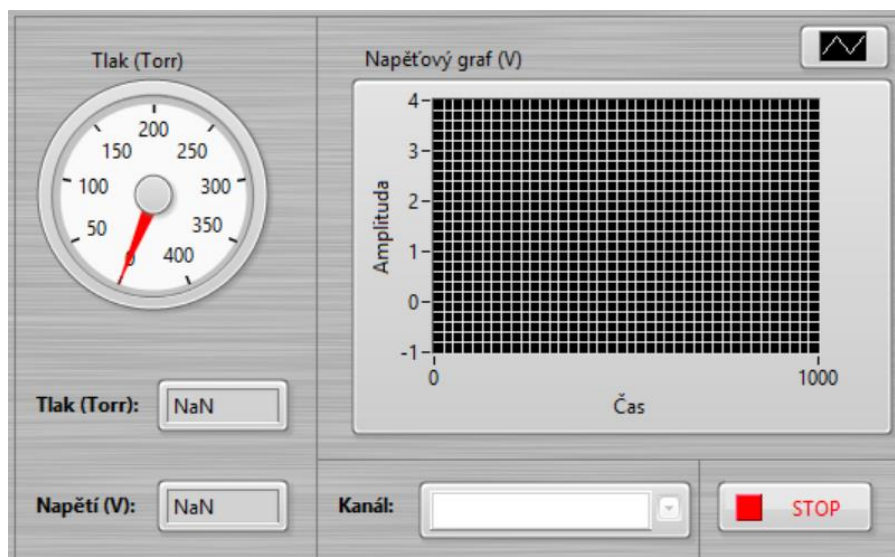
3.2 DPS a LabVIEW aplikace snímače tlaku

Po vyrobení desky plošných spojů byly podle návrhu metodou ručního pájení připájeny její součásti. Bylo zvoleno použití THT rezistoru, kondenzátorů a konektorů WAGO. Tlakový senzor MPX2050DP je na desku připojen pouze pomocí pinové lišty, aby v případě poškození, například vysokým tlakem, mohl být senzor jednoduše vyměněn. Na desce je senzor zajištěn dvěma šrouby M3.



Obrázek 3.3: Vyrobená a sestavená deska plošných spojů. Na dolní části tlakový senzor MPX2050DP se snímacím a referenčním přívodem tlaku. Fotografie: Autor

Pro vyvinutou aplikaci snímače tlaku sestavenou v LabVIEW bylo vytvořeno uživatelské rozhraní. Jeho součástí byla nabídka pro výběr pracovního kanálu, graf zobrazující napětí zaznamenávané z tlakového senzoru, dva displeje ukazující aktuální hodnotu napětí a tlaku a ručičkový ukazatel aktuálního tlaku s rozsahem 0- 400 torr.



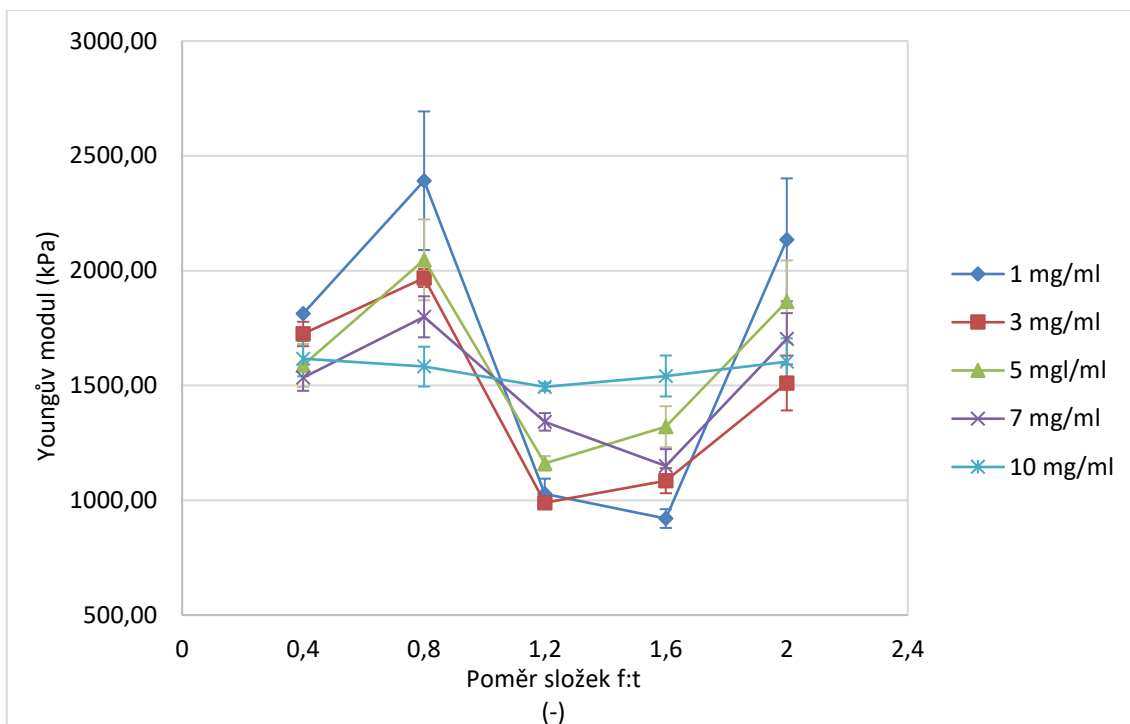
Obrázek 3.4: Uživatelské rozhraní LabVIEW aplikace pro snímání aplikovaného tlaku.

Obrázek: Autor

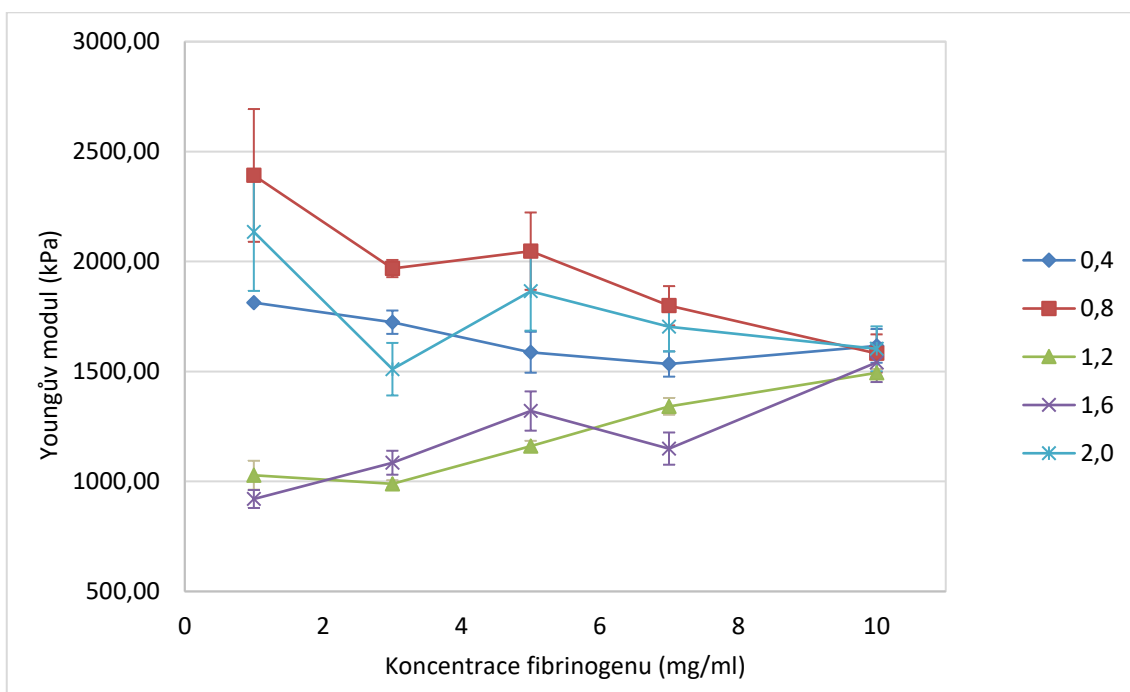
3.3 Mechanické testování fibrinových gelů dle poklesu hladiny

Při prvním měření byla pozorovanou vlastností tlakové stimulace deformace hladiny fibrinových gelů. Zaznamenání změny hladiny bylo provedeno kamerou s mikroskopickým zvětšením umístěnou na vytvořený držák. Na pořízených fotografiích se následně pomocí grafického editoru stanovila podélná deformace (změna výšky) hladiny při konkrétní tlakové zátěži. Ze znalosti hodnoty této veličiny a hodnoty aplikované tlakové zátěže byl dle vztahu pro Hookeův zákon (1) vypočítán Youngův modul daného fibrinového gelu.

V této části byly celkem vytvořeny dva grafy, přičemž v každém bylo vykresleno pět datových řad. První graf zobrazuje Youngův modul fibrinových gelů o různých koncentracích fibrinogenu v závislosti na poměru složek fibrinogen-trombin. Druhý graf dává zobrazení Youngova modulu fibrinových gelů v závislosti na koncentraci fibrinové složky, přičemž v jednotlivých datových řadách jsou vykresleny výsledky gelů se stejným poměrem složek fibrinogen-trombin.



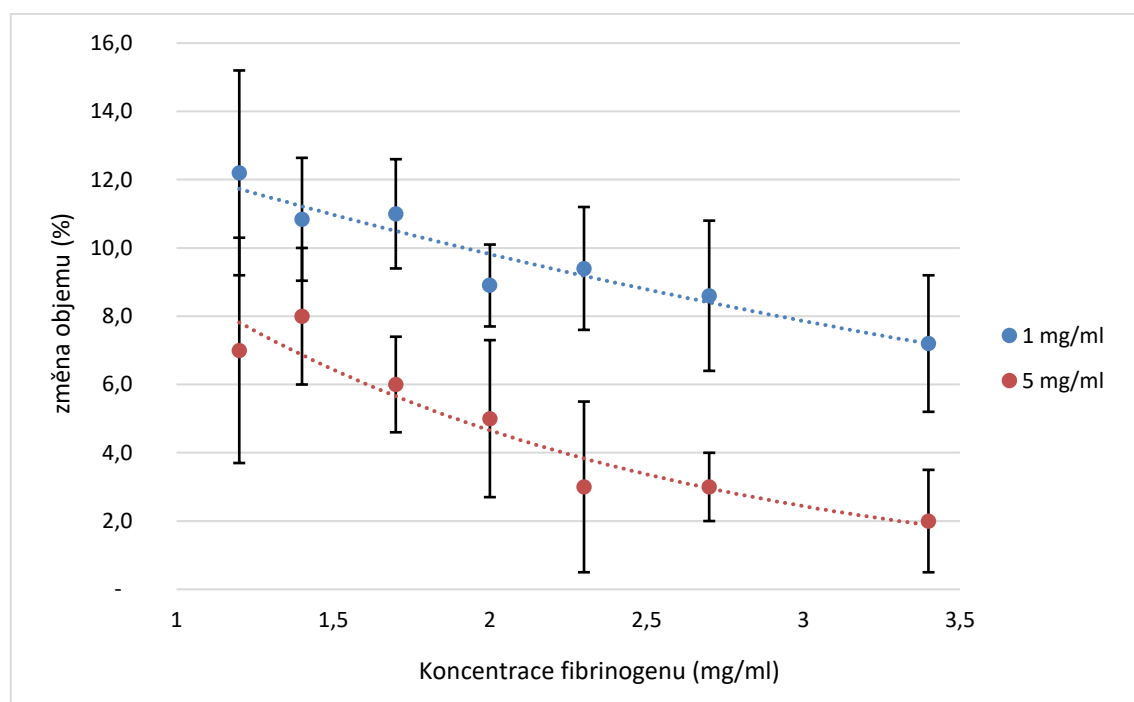
Graf 3.3.1: Průměrné hodnoty Youngova modulu fibrinových gelů při všech zkoušených tlakových zatíženích, pro různé poměry koncentrací fibrinogen-trombin. V datových řadách jsou vykresleny jednotlivé konstantní koncentrace fibrinogenu v gelech. ($\bar{x} + u_c$).



Graf 3.3.2: Průměrné hodnoty Youngova modulu fibrinových gelů při všech zkoušených tlakových zatíženích, pro různé koncentrace fibrinogenové složky. V datových řadách jsou vykresleny jednotlivé poměry fibrinogen-trombin. ($\bar{x} + u_c$).

3.4 Mechanické testování hydrogelů dle poklesu objemu bubliny

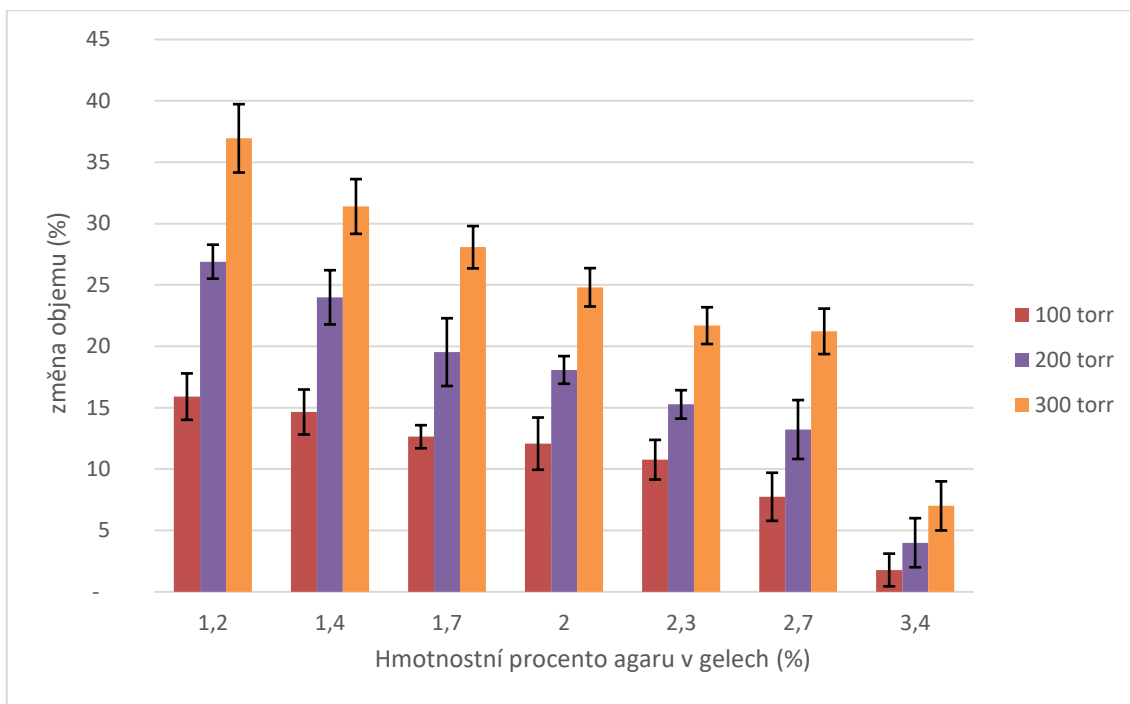
Pro mechanickou zkoušku poklesu objemu bubliny uvnitř fibrinových gelů bylo připraveno 10 gelů. Při měření vznikl problém při vytváření bubliny uvnitř gelu pomocí injekční stříkačky, což znemožnilo opakování měření na více gelech o stejných parametrech. Měření připravených fibrinových gelů bylo opakováno třikrát. Výsledky mechanické zkoušky jsou v grafu vyneseny jako průměrné hodnoty s \pm intervalem směrodatné odchylky ($\bar{x} \pm SD$) a proloženy nelineární charakteristikou.



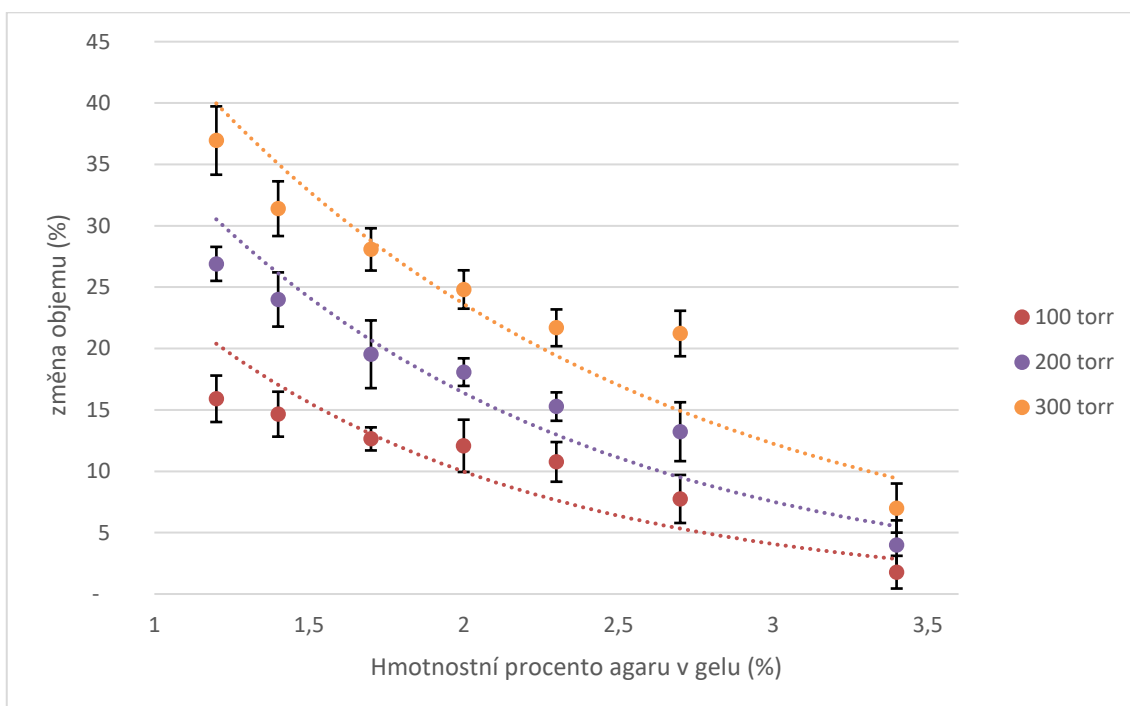
Graf 3.4.1: Procentuální pokles objemu bubliny vytvořené uvnitř fibrinových gelů v závislosti na poměru složek fibrinogen-trombin pro gely o fibrinogenové koncentraci 1 a 5 mg/ml.

Výsledky měření fibrinových gelů nepodalý spolehlivé výsledky. Z tohoto důvodu byla zkouška navrhnuté měřicí aparatury při měření poklesu objemu bublin vykonána také na gelech připravených z agaru.

Byla připravena řada agarových gelů s rostoucím hmotnostním procentem agarové složky mezi hodnotami 1,2 % a 3,4 %. Na každý z gelů byla vyvíjena stejná tlaková zátěž jako v předchozích měřeních (100, 200 a 300 torr). Výsledkem testování jsou dva grafy procentuálního poklesu objemu studované bubliny pro připravené gely při různých tlakových stimulacích. Získané hodnoty jsou v grafech vyneseny jako průměrné hodnoty s \pm intervalem směrodatné odchylky ($\bar{x} \pm SD$).



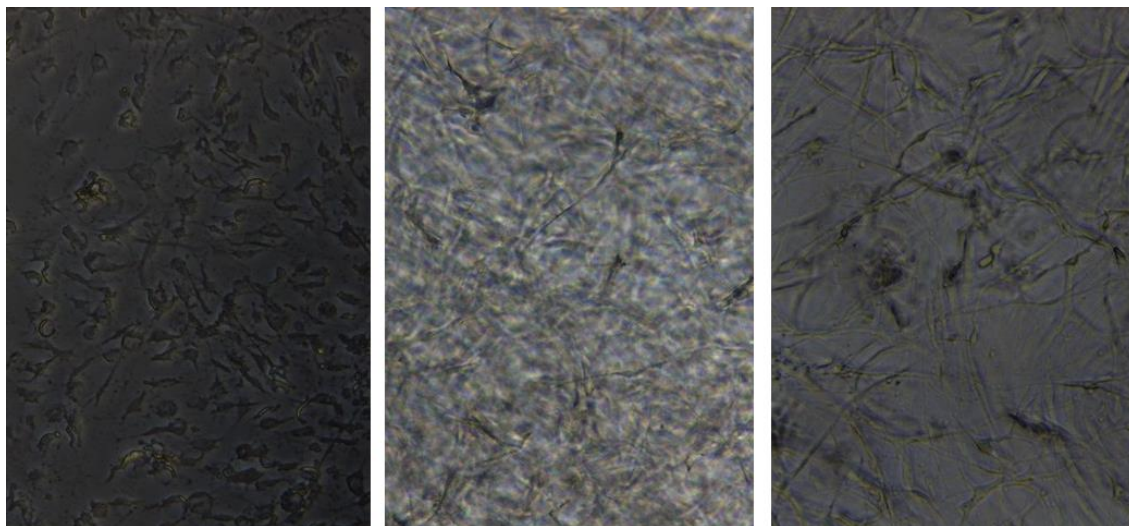
Graf 3.4.2: Sloupcový graf průměrné procentuální změny velikosti bubliny v gelech o různých hmotnostech agarové složky pro tlakové stimule 0, 100, 200 a 300 torr.



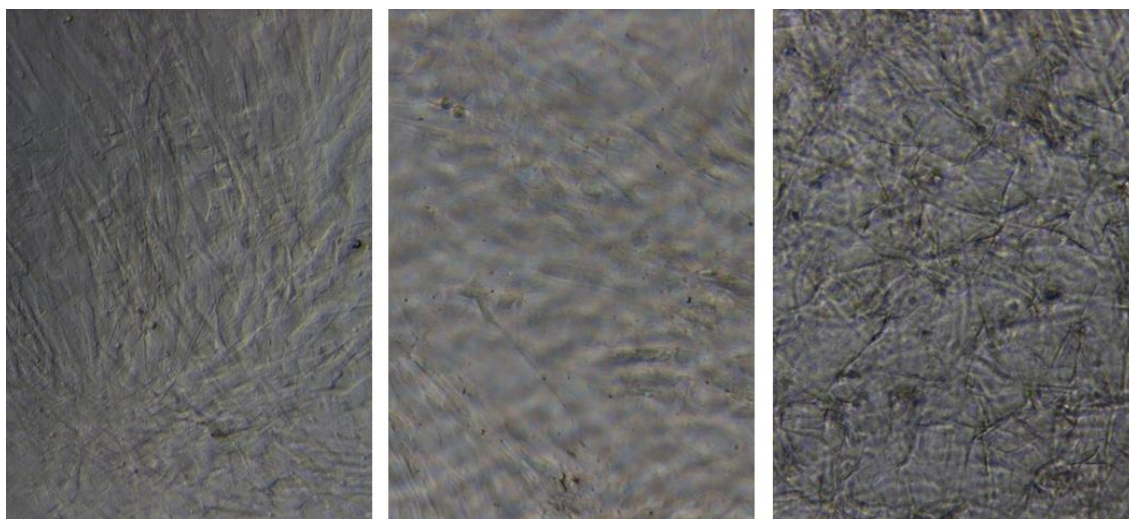
Graf 3.4.3: Bodový graf průměrné procentuální změny velikosti bubliny v gelech o různých hmotnostech agarové složky pro tlakové stimule 0, 100, 200 a 300 torr.

3.5 Výsledky buněčné kultivace

Jednotlivé buněčné kultury byly kultivovány po dobu sedmi dnů. První sada byla kultivována za dynamické stimulace. Druhá sada byla nasazena staticky bez tlakové stimulace a sloužila pro porovnání vlivu tlakové zátěže. Pro zobrazení vzniklých buněčných kultur byl použit světelný mikroskop s fázovým kontrastem.

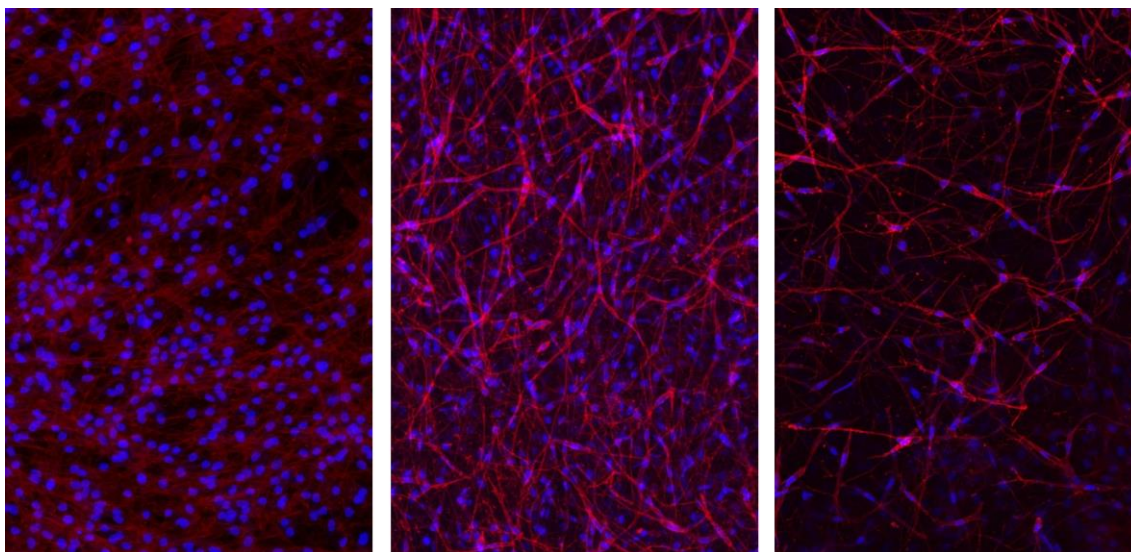


Obrázek 3.5: Buňky po 7-denní kultivaci bez dynamické stimulace. Zobrazení pomocí světelného mikroskopu. Vlevo 2D zobrazení buněk bez fibrinového gelu. Uprostřed buňky nasazené ve fibrinovém gelu o koncentraci fibrinogenu 1 mg/ml. Vpravo buňky v gelu o koncentraci fibrinogenu 5 mg/ml. Fotografie: Ing. Jana Štěpanovská



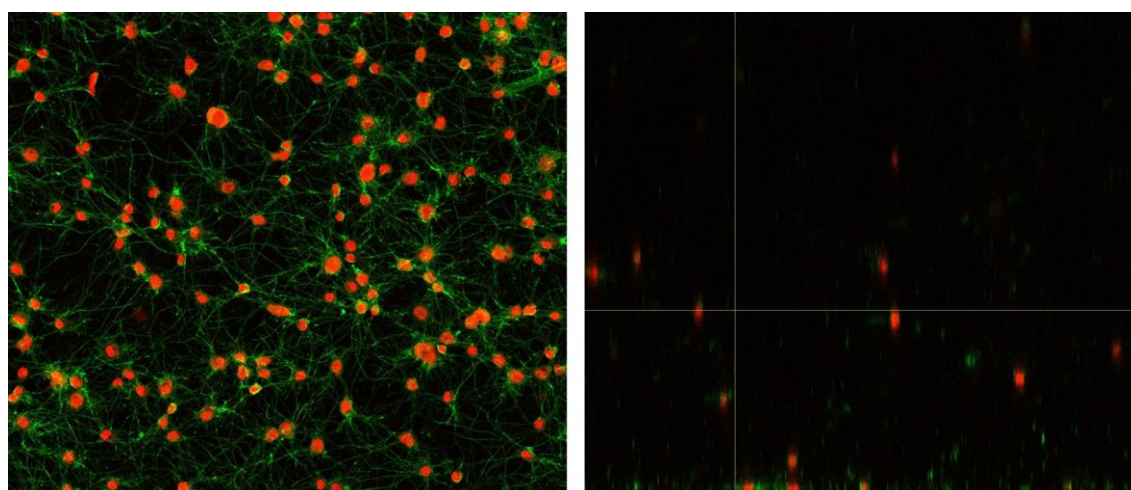
Obrázek 3.6: Buňky po 7-denní kultivaci s aplikací dynamického zatížení. Fotografie pořízené světelným mikroskopem. Vlevo 2D zobrazení buněk bez fibrinového gelu. Uprostřed buňky ve fibrinovém gelu o koncentraci fibrinogenu 1 mg/ml. Vpravo buňky v gelu o koncentraci fibrinogenu 5 mg/ml. Ing. Jana Štěpanovská

Druhým způsobem zobrazení vykultivovaných struktur bylo použití barvení a zobrazení konfokálním mikroskopem. Jádra buněk byla zvýrazněna pomocí barviva DAPI a na zbarvení cytoskeletu byl použit phalloidin.



Obrázek 3.7: Zobrazení kultivovaných buněk po 7-denní dynamické tlakové stimulaci. Vlevo 2D struktura bez použití fibrinových gelů. Uprostřed obrázek buněk ve fibrinovém gelu o koncentraci 1 mg/ml. Vpravo buňky ve fibrinovém gelu o koncentraci 5 mg/ml. Modré části znázorňují polohu jader a růžovo-červené ukazují cytoskelet buněk.

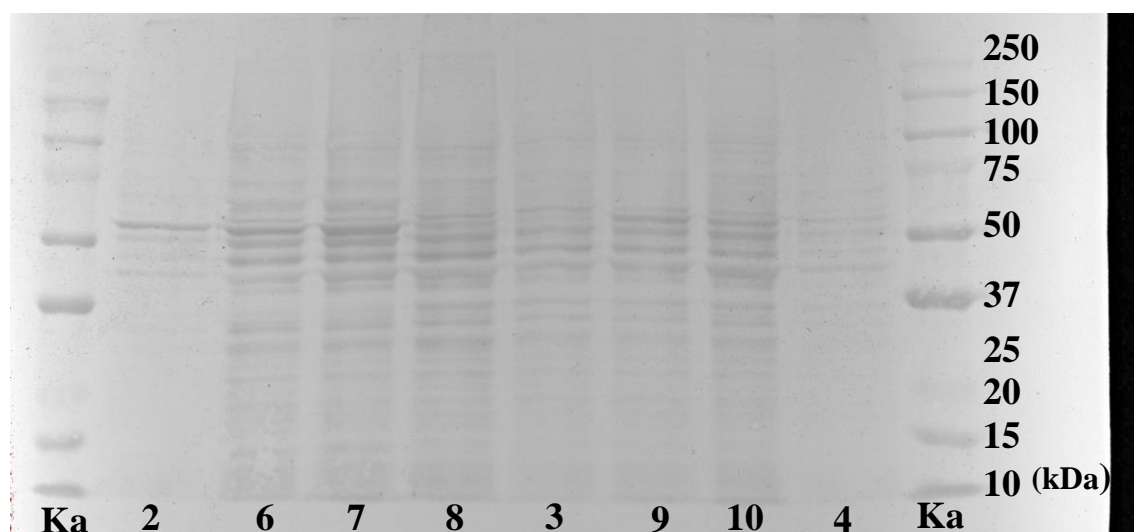
Fotografie: Ing. Jana Štěpanovská



Obrázek 3.8: Zobrazení kultivovaných buněk po tlakové stimulaci v prostředí fibrinového gelu o koncentraci fibrinogenu 5 mg/ml. Na obrázku vlevo je pohled na dno kultivační nádoby. Vpravo boční pohled s dnem nádoby ve spodní části. Červeně jsou zvýrazněna jádra buněk a zeleně buněčný cytoskelet. Fotografie: Ing. Jana Štěpanovská

3.6 Analýza buněčných experimentů

Po ukončení kultivace byla provedena analýza diferenciačních markerů na vykultivovaných osteoblastech. Analýza byla provedena stanovením proteinové exprese jednotlivých kultur za využití metody Western blot (Obrázek 3.9). Proužky byly stanoveny pomocí proteinového markeru Kaleidoscope (Bio Rad, CA, USA). Na membráně bylo možno detekovat proteinový marker Runx2, jehož molekulová hmotnost je přibližně 57 kDa, a marker ALP s molekulovou hmotností v rozmezí 60-70 kDa. Oba proteiny patří mezi primární markery rané diferenciace do osteoblastů.



Obrázek 3.9: Vyhodnocení proteinové exprese metodou Western blot. Na pravé a levé straně proteinový marker Kaleidoscope (Ka) určující molekulovou hmotnost zachycených proužků.

Uprostřed zobrazeny proteinové exprese jednotlivých buněčných kultur .

Fotografie: Ing. Jana Štěpanovská

4 Diskuze

Prvním z cílů této bakalářské práce bylo navrhnout metodu pro studium mechanických parametrů fibrinových gelů. Studovaným mechanickým parametrem byla tuhost gelu, která je reprezentována veličinou Youngův modul, což je hodnota, podle které je určována tuhost studovaného materiálu. Navržená metoda si kladla za cíl stanovení Youngova modulu výpočtem dle Hookeova zákona. Výpočet probíhal za využití hodnot získaných vizuálním snímáním připravených fibrinových gelů při tlakové stimulaci o známé hodnotě aplikovaného tlaku. Za tímto účelem byla v softwarovém prostředí Autodesk Inventor navržena aparatura skládající se z držáků sloužících ke stabilnímu uchycení digitálního mikroskopu, stojanu pro spektrofotometrickou kyvetu a víka na kyvetu. Do kyvety byly umístěovány testované fibrinové gely, které byly v kyvetě uzavřeny víkem. To utěsňovalo vnitřní prostředí utěsňovalo a obsahovalo otvor pro trubici přivádějící tlakovou zátěž. Tlak byl do soustavy přiveden injekční stříkačkou o objemu 50 ml. Současně s aplikací tlaku probíhala také jeho monitorace za pomoci tlakového senzoru zabudovaného na vytvořenou desku plošných spojů s obvodem pro převod naměřené hodnoty napětí do počítače. V softwarovém prostředí LabVIEW byla vytvořena aplikace schopná kontinuálně snímat přivedené hodnoty napětí z obvodu tlakového senzoru a přepočítávat je na jednotky tlaku. Těsnění připraveného systému bylo ověřeno na modelovém měření gelů připravených z agaru.

Samotné mechanické testování gelů probíhalo za použití dvou přístupů. Prvním přístupem bylo studium poklesu hladiny fibrinových gelů o různých koncentracích jejich složek, fibrinogenu a trombinu, při aplikaci tlakové zátěže 100, 200 a 300 torr. V rámci tohoto měření bylo reakcí fibrinogenu a trombinu v kultivačním médiu DMEM připraveno celkem 25 fibrinových gelů. Na základě gelových koncentrací byly gely rozřazeny do pěti sad dle koncentrace fibrinogenové složky (1, 3, 5, 7 a 10 mg/ml), každá ze sad se skládala z pěti gelů o rozdílných koncentracích trombinu. Přídavek trombinu k fibrinogenu byl vypočítán tak, aby vzájemný poměr koncentrací fibrinogenu a trombinu byl mezi jednotlivými sadami stejný (0,4 0,8 1,2 1,6 2,0). Tato skutečnost umožňovala porovnávání výsledků mechanického testování nejen na základě koncentrace fibrinogenu, ale také na základě poměrů koncentrací fibrinogen-trombin.

Hodnoty získané z měření poklesu hladiny fibrinových gelů byly přepočítány na hodnoty Youngova modulu a byly vyneseny do grafů (Graf 3.3.1, Graf 3.3.2). Výsledky měření nebyly uspokojivé, jelikož porovnáním s literaturou nebyla nalezena shoda s hodnotami naměřenými v ostatních studiích, hodnoty se lišily o několik řádů. Youngův modul fibrinových gelů se v odborné literatuře pro nižší koncentrace pohybuje v řádech jednotek tisíc pascalů [11]. Výsledky této práce ovšem udávají Youngův modul téměř tisíckrát vyšší. Co se týče tvaru křivky, byl očekáván růst Youngova modulu v sadách o

konstantní koncentraci fibrinogenu a přidávaném množství trombinu a následná stagnace, protože Youngův modul fibrinových gelů je považován za nelineární [11]. Graf vytvořený v této práci však ukazuje oscilaci hodnot Youngova modulu okolo střední hodnoty.

Druhým přístupem, který byl při měření mechanických vlastností fibrinových gelů vyzkoušen, bylo měření procentuálního poklesu objemu bubliny vytvořené uvnitř fibrinového gelu. Pokles objemu byl studován z důvodu rovnoměrného působení tlaku v celém objemu gelu. Působením tlaku na vytvořenou vzduchovou bublinu by v takovém případě mělo docházet k zmenšování objemu bubliny rovnoměrně ze všech stran. Tento model věrněji simuluje vliv tlaku na buňky zanořené v gelu, neboť podobně jako při působení tlaku na buňky v rigidní kultivační jamce ani zde nedochází ke kompresi a zvětšení rozměrů gelu v kolmém směru, ale veškerý tlak působí na objekty v gelu. Tato metoda tedy není primárně určena ke stanovení Youngova modulu, ale spíše ke zjištění působení tlakového namáhání na buňky zanořené v gelu. Tuhost gelu, tudíž i Youngův modul, však ovlivňují kompresi gelu a tedy změnu objemu bubliny. Charakteristika procentuální změny by tak měla odpovídat i charakteristice Youngova modulu.

V rámci laboratorního pokusu bylo připraveno 10 fibrinových gelů. Vytvoření bubliny uvnitř fibrinového gelu se ovšem ukázalo jako problematické, čehož hlavní příčinou bylo rychlé tuhnutí gelů v okolí jehly vytvářející vzduchovou bublinu. Při odstraňování jehly se tuhnutí fibrinová vlákna zachytila na jehle a byla z gelu odstraněna spolu s jehlou. Tak došlo ke zničení fibrinového gelu, a spolu s tím i ke zničení mnoha vzorků. Z tohoto důvodu nebylo připraveno stejné množství vzorků jako při měření stlačování hladiny, ale byly připraveny pouze vzorky o koncentraci fibrinogenu 1 a 5 mg/ml se vzájemným poměrem fibrinogen-trombin 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 a 2,0. Každý ze vzorků byl zastoupen pouze jednou. Měření na gelech, které se podařilo připravit, bylo třikrát opakováno.

Výsledky získané mechanickým testováním fibrinových gelů při stlačování bubliny ukázaly viditelný trend poklesu objemu bubliny, a to pro obě zkoušené koncentrace fibrinogenu. Nejvyšší změnu objemu 12,2 % vykazoval nejméně koncentrovaný gel ($c_f = 1 \text{ mg/ml}$, $c_f:c_t = 0,4$) a nejmenší změna činila 2 % u nejvíce koncentrovaného gelu ($c_f = 5 \text{ mg/ml}$, $c_f:c_t = 2,0$). Naměřená data se svým trendem přibližují teoretickým hodnotám [11], protože platí, že snižování objemu bubliny znamená zvyšování tuhosti a tím také Youngova modulu stanovovaného gelu. Data ovšem neposkytují spolehlivé výsledky, a to jednak z důvodu vysoké směrodatné odchylky vypočítané z porovnání naměřených dat, a také z důvodu vysoké saturace hodnot mimo spojnicí trendů.

Vzhledem k velmi málo vzorkům fibrinových gelů a jejich problematické přípravě byla metoda měření stlačování bublin ověřena pomocí agarových hydrogelů,

v nichž nebyl problém bublinu vytvořit. Cena materiálu byla navíc o několik řádů nižší než v případě komponent fibrinových gelů. Jelikož agarové gely o vyšších koncentracích velmi rychle tuhnou a vysychají [27], což bylo ověřeno i během měření, byla zvolena řada o nižších hmotnostních procentech agarů. Hmotnostní procenta připravených gelů z agarů se pohybovala mezi 1,2 % a 3,4 %. Pro zvýšení přesnosti měření byl každý z agarových gelů připraven třikrát a měření na každém z nich proběhlo pětkrát.

Data získaná studiem mechanických parametrů agarových gelů ukazují téměř lineární pokles v procentuální změně objemu vytvořené bubliny. Lineární pokles byl pozorován pro všechny testované typy tlakového zatížení. U nejvíce koncentrovaného agarového gelu byl ovšem pozorován nelineární pokles naměřených hodnot. To odpovídá závěrům studie [28], která popisuje nelineární nárůst Youngova modulu pro vyšší hmotnostní procenta agarů v gelu. U nejméně koncentrovaného agarového gelu ($w_{agar}=1,2\%$) byl zjištěn pokles objemu vytvořené bubliny o 15–35 % s rozdílem 10 % mezi každou tlakovou stimulací. U nejvíce koncentrovaného gelu ($w_{agar}=3,4\%$) se procentuální pokles objemu pohyboval v rozmezí 2–7 % s rozdílem cca 2 % mezi jednotlivými tlakovými zátěžemi.

Z předložených výsledků je možno říct, že navržená metoda měření mechanických parametrů gelů podala velmi dobré výsledky při měření procentuálního stlačení bubliny u gelů připravených z agarů. Byla získána nelineární charakteristika pro různá hmotnostní procenta agarů v gelech a orientačně správné výsledky měření stlačení bubliny ve fibrinových gelech, které z důvodu obtížnosti přípravy nebyly proměřeny v dostatečném počtu. Výsledky získané při měření stlačování hladiny fibrinových gelů ovšem neodpovídají hodnotám uváděným v literatuře [10] [11]. Výsledné hodnoty nesouhlasí s výsledky v literatuře ani tvarově, ani jednotkově. Neúspěch měření Youngova modulu pro stlačování hladiny byl zřejmě způsoben vysokou rigiditou kyvety, ve které měření probíhalo. Fibrinový gel a obecně hydrogely jsou nestlačitelné látky a při studiu tlakové komprese zřejmě vyžadují prostředí, které umožňuje roztažení do stran, jež kyveta neumožňovala. Jako další možnost proměření Youngových modulů fibrinových gelů se tedy nabízí využití komerčních metod dostupných v profesionálních laboratořích s odpovídajícím vybavením. Problémová se při měření poklesu hladiny ukázala být také použitá kamera, která měla pro daný experiment vysokou pracovní vzdálenost a nízké rozlišení.

Dalším cílem této práce bylo vybrat několik koncentrací fibrinových gelů a provést v nich kultivaci kmenových buněk typu ASC. Buňky využitě pro kultivaci byly odebrány z tukové tkáně prasete domácího. Narozdíl od lidských buněk byly tyto buňky odebrány mladým jedincům, což znamená, že jsou vitálnější a lépe reagují na impulsy tlakové stimulace. Bylo zvoleno použití fibrinových gelů o koncentracích fibrinogenu 1 a 5 mg/ml, přičemž poměr fibrinogen-trombin v gelech byl 0,8. Samotná kultivace kmenových buněk probíhala celkem třemi způsoby – a to na 2D povrchu bez použití

fibrinového scaffoldu a ve 3D fibrinovém prostředí za statických a dynamických kultivačních podmínek. Kultivace probíhala ve všech případech po dobu 7 dní. Na buňky byla vyvíjena pulsní tlaková zátěž o amplitudě 0-400 torr a frekvenci pulsů 0,5 Hz.

Z výsledků provedených buněčných experimentů je patrné, že buňky již po 7 dnech prorůstají vytvořeným gelem a vytvářejí komplexní strukturu signalizující základ budoucí tkáně. Porovnáním fotografií z kultivací bez dynamické stimulace a s dynamickou stimulací (Obrázek 3.5, Obrázek 3.6) byl patrný vliv tlakové zátěže na rychlost proliferace buněk. Efekt byl nejlépe pozorovatelný na fotografiích gelů o fibrinogenové koncentraci 5 mg/ml, kdy je síť podlouhlých buněk silnější a hustší ve vzorku s aplikovanou dynamickou stimulací.

Ve vzorcích se liší také počet buněk v kultuře. Na ten má vliv zejména prostředí a způsob kultivace. U statických vzorků je počet buněk vyšší než u dynamické kultury. Tento jev je způsoben tím, že ve statické kultuře dochází k větší proliferaci buněk, spíše než k diferenciaci [10]. Naopak při působení tlakové zátěže buňky tolik nerostou, ale vytvářejí více diferenciacních proteinů. Nepříznivě působí na počet buněk také hustota použitého gelu, kdy v hustším gelu trvá dělení buněk déle. Toto tvrzení je v rozporu se studií [18], ve které se uvádí, že zvyšující se tuhost gelu neovlivňuje proliferaci nebo migraci buněk při kultivaci. Vysvětlením těchto rozdílů ve výsledcích může být použití jiného 3D scaffoldu, jelikož ve jmenované studii byly použity hydrogely připravené z alginátů.

Lépe vypovídající informaci o úspěšnosti kultivace poskytly fotografie pořízené konfokálním mikroskopem. Na obrázku 3.7 je viditelné, že ve 2D kultuře bez použití fibrinových scaffoldů buňky vytvářejí ploché útvary, které spolu hraničí a souvisle vyplňují celý prostor určený pro kultivaci. Na obrázcích buněk kultivovaných ve fibrinových gelech je tvar buněk jiný – buňky jsou protáhlé, nerozprostřené a postupně prostupující jedním směrem v objemu celého gelu. To je zvlášť viditelné u gelu s koncentrací fibrinogenu 1 mg/ml. V průběhu kultivace jsou buňky schopné prostupovat gelem, čímž dochází k postupnému přetváření materiálu fibrinového gelu na vlastní extracelulární matrix buněk. Z porovnání fotografií (Obrázek 3.7, uprostřed a vpravo) provedených experimentů bylo vyvozeno, že k tomuto jevu dochází snáze při použití méně koncentrovaného gelu.

Analýza buněčného vzorku s gelem o fibrinogenové koncentraci 5 mg/ml na konfokálním mikroskopu (Obrázek 3.8) ukázala hustou síť buněk rozprostřenou po celém objemu gelu. Při obarvení cytoskeletu pomocí barviva phalloidin byly zaznamenány výběžky buněk prostupující skrze gel. Při bočním pohledu na kultivační jamku byl pozorován zajímavý jev, který je popsán v literatuře a svědčí o vytvoření kvalitní kultury osteoblastů. Tento jev je pozorovatelný na pravé části obrázku 3.8. Jedná se o zřejmou

orientaci buněk proti směru působení tlakové zátěže. Tento jev nebyl pozorován pro gel o fibrinogenové koncentraci 1 mg/ml.

V poslední části byla provedena analýza diferenciačních markerů na vykultivovaných kulturách. Analýza byla provedena metodou Western Blot s využitím proteinového markeru Kaleidoscope. Výsledky analýzy (Obrázek 3.9) ukázaly přítomnost transkripčního faktoru Runx2 a diferenciačního markeru ALP, které oba signalizují probíhající ranou fází osteogeneze [24]. Na proužcích jednotlivých buněčných kultur je patrné, že větší množství diferenciačních proteinů je přítomno v kulturách, ve kterých byly použity fibrinové scaffoldy o koncentraci fibrinogenu 5 mg/ml. Nejvíce zabarvený byl vzorek číslo 7, ve kterém byl poměr fibrinogen-trombin 0,8. Tento poměr koncentrací může být považován za nejideálnější pro kultivaci osteogenní buněčné kultury.

5 Závěr

V rámci této bakalářské práce byla navržena metodika zkoumání mechanických vlastností fibrinových gelů. Pro potřeby studia mechanických parametrů byla navržena, vyrobena a sestavena měřicí aparatura umožňující vizuální snímání hydrogelů na základě aplikovaného tlaku, který byl zároveň monitorován pomocí vyrobeného elektrického obvodu pro tlakový senzor a aplikace vyvinuté v softwarovém prostředí LabVIEW. Ověření metodiky bylo provedeno pro dva typy sledování změn mechanických parametrů fibrinových gelů. Získaná data neposkytla přesvědčivé informace o funkčnosti navržené metody sledování mechanických parametrů fibrinových gelů, ovšem data získaná ze studia gelů připravených z agaru byla v souladu s hodnotami uváděnými v literatuře.

V druhé části bakalářské práce bylo využito fibrinových gelů o koncentraci fibrinogenové složky 1 a 5 mg/ml jako kultivačního prostředí pro kultivaci MSC kmenových buněk do osteoblastů za tlakové stimulace. Analýzou vykultivovaných kultur byl zjištěn vliv koncentrace gelu na proliferaci buněk, kdy nižší koncentrace fibrinového prostředí znamenala vyšší proliferaci buněk. Naproti tomu vyšší koncentrace gelu stimulovala buňky k diferenciaci do počínající osteogenní tkáně. Zároveň byla pozorována reakce buněk na tlakovou zátěž jejich orientací proti vektoru zatížení. Vhodnost použití vyšších koncentrací fibrinových scaffoldů byla ověřena také analýzou buněčných markerů metodou Western blot, kdy bylo pozorováno větší zastoupení markerů Runx2 a ALP.

Seznam použité literatury

- [1] GABBAY, Joubin, Justin HELLER, Scott MITCHELL et al. Osteogenic Potentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells in a 3-Dimensional Matrix. *Annals of Plastic Surgery*. 2006, **57**(1), 89-93. DOI: 10.1097/01.sap.0000205378.89052.d3. ISSN 0148-7043. Dostupné také z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00000637-200607000-00018>
- [2] KRUGER, Thomas, Andrew MILLER a Jinxi WANG. Collagen Scaffolds in Bone Sialoprotein-Mediated Bone Regeneration. *The Scientific World Journal*. 2013, **2013**, 1-6. DOI: 10.1155/2013/812718. ISSN 1537-744X. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/812718/>
- [3] CASTILLO DIAZ, Luis, Mohamed ELSAWY, Alberto SAIANI, Julie GOUGH a Aline MILLER. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells promotes mineralization within a biodegradable peptide hydrogel. *Journal of Tissue Engineering*. 2016, **7**. DOI: 10.1177/2041731416649789. ISSN 2041-7314. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2041731416649789>
- [4] STEINMETZ, Neven, Elizabeth AISENBREY, Kristofer WESTBROOK a H. QI. Mechanical loading regulates human MSC differentiation in a multi-layer hydrogel for osteochondral tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2015, **21**, 142-153. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.04.015. ISSN 17427061.
- [5] YANG, Y., J. MAGNAY, L. COOLING, J. COOPER a A. HAJ. *Effects of substrate characteristics on bone cell response to the mechanical environment*. 2004, **42**(1), 22-29. DOI: 10.1007/BF02351007. ISSN 0140-0118. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02351007>
- [6] *Strain Gauge: What is the gauge factor and strain units* [online]. Northbank, Irlam, Manchester, M44 5BD, United Kingdom: OMEGA Engineering inc., 2003-2019 [cit. 2019-01-06]. Dostupné z: <https://www.omega.co.uk/literature/transactions/volume3/strain.html>
- [7] *Stress, Strain and Young's Modulus* [online]. Engineering ToolBox, 2005 [cit. 2019-01-06]. Dostupné z: https://www.engineeringtoolbox.com/stress-strain-d_950.html
- [8] Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy. *JPK* [online]. b.r. [cit. 2019-04-26]. Dostupné z: <https://www.jpk.com/app-technotes-img/AFM/pdf/jpk-app-elastic-modulus.14-1.pdf>

- [9] A practical guide to AFM force spectroscopy and data analysis. *JPK* [online]. b.r. [cit. 2019-04-26]. Dostupné z: <https://www.jpk.com/app-technotes-img/AFM/pdf/jpk-tech-force-spectroscopy.14-2.pdf>
- [10] BROUWERS, Julienne. *Influence of fibrinogen concentration on the Young's modulus in fibrin gels*. Eindhoven, 2002. Protokol. Eindhoven university of technology.
- [11] DUONG, Haison, Benjamin WU a Bill TAWIL. Modulation of 3D Fibrin Matrix Stiffness by Intrinsic Fibrinogen–Thrombin Compositions and by Extrinsic Cellular Activity. *Tissue Engineering Part A*. 2009, **15**(7), 1865-1876. DOI: 10.1089/ten.tea.2008.0319. ISSN 1937-3341. Dostupné také z: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tea.2008.0319>
- [12] FLANAGAN, Thomas, Jörg SACHWEH, Julia FRESE et al. In Vivo Remodeling and Structural Characterization of Fibrin-Based Tissue-Engineered Heart Valves in the Adult Sheep Model. *Tissue Engineering Part A*. 2009, **15**(10), 2965-2976. DOI: 10.1089/ten.tea.2009.0018. ISSN 1937-3341. Dostupné také z: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tea.2009.0018>
- [13] JANMEY, P., J. WINER a J. WEISEL. Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *Journal of The Royal Society Interface*. 2009, **6**(30), 1-10. DOI: 10.1098/rsif.2008.0327. ISSN 1742-5689. Dostupné také z: <http://rsif.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsif.2008.0327>
- [14] JELÍNEK, Richard. *Histologie embryologie* [online]. 1. Praha: 3. Lékařská Fakulta UK, b.r. [cit. 2018-11-21]. Dostupné z: <http://histologie.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf>
- [15] YOUNG, Barbara. *Wheater's functional histology: a text and colour atlas*. 5th ed. Edinburgh?: Churchill Livingstone/Elsevier, 2006. ISBN 978-0-443-068-508.
- [16] COWIN, Stephen. *Bone mechanics handbook*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2001. ISBN 08-493-9117-2.
- [17] GARDINIER, Joseph, Shyama MAJUMDAR, Randall DUNCAN a Liyun WANG. Cyclic Hydraulic Pressure and Fluid Flow Differentially Modulate Cytoskeleton Re-Organization in MC3T3 Osteoblasts. *Cellular and Molecular Bioengineering*. 2009, **2**(1), 133-143. DOI: 10.1007/s12195-008-0038-2. ISSN 1865-5025. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12195-008-0038-2>

- [18] MCGOWAN, Brittany. *The Effects of Applied Hydrostatic Pressure on Osteogenic Differentiation of Mouse Mesenchymal Stem Cells in an In Vitro 3D Culture*. Clemson, 2004. Dissertation. Clemson University.
- [19] FRITTON, Susannah a Clinton RUBIN. Measurement of Bone Deformations Using Strain Gauges. *Bone Mechanics Handbook, Second Edition*. CRC Press, 2001, , 8-1-8-41. DOI: 10.1201/b14263-11. ISBN 978-0-8493-9117-0. Dostupné také z: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/b14263-11>
- [20] MCGOWAN, Brittany. *The Effects of Applied Hydrostatic Pressure on Osteogenic Differentiation of Mouse Mesenchymal Stem Cells in an In Vitro 3D Culture*. Clemson, 2004. Disertace. Clemson University.
- [21] VENÄLÄINEN, M.S., M.E. MONONEN, S.P. VÄÄNÄNEN, J.S. JURVELIN, J. TÖYRÄS, T. VIRÉN a R.K. KORHONEN. Effect of bone inhomogeneity on tibiofemoral contact mechanics during physiological loading. *Journal of Biomechanics*. 2016, **49**(7), 1111-1120. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2016.02.033. ISSN 00219290. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021929016301890>
- [22] *Do You Know The 5 Types Of Stem Cells?* [online]. Stafford: Bioinformant.com, 2017 [cit. 2018-11-23]. Dostupné z: <https://bioinformant.com/do-you-know-the-5-types-of-stem-cells-by-differentiation-potential/#blood>
- [23] HEJČL, A., P. JENDELOVÁ, M. SAMEŠ a E. SYKOVÁ. Experimentální a klinické aplikace mezenchymálních kmenových buněk u míšního poranění. *Cesk Slov Neurol*. 2014, **1**(77110), 560-567.
- [24] RUTKOVSKIY, Arkady, Kåre-Olav STENSLØKKEN a Ingvar VAAGE. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Medical Science Monitor Basic Research*. 2016, (22), 95-106. DOI: 10.12659/MSMBR.901142. ISSN 2325-4416. Dostupné také z: <http://www.basic.medscimonit.com/abstract/index/idArt/901142>
- [25] *Příbalový list Tissel Lyo*. Praha, 2018. Dostupné také z: http://baxter-vpois.cz/spc/tisseel_spc.pdf
- [26] ŠŤASTNÝ, František. *Zpracování experimentálních dat*. Brno, 1997. Skripta. PřF MU.
- [27] SUNG-JIN PARK, , M.B. GOODMAN a B.L. PRUITT. Measurement of Mechanical Properties of *Caenorhabditis elegans* with a Piezoresistive Microcantilever System. *2005 3rd IEEE/EMBS Special Topic Conference on*

Microtechnology in Medicine and Biology. IEEE, 2005, , 400-403. DOI: 10.1109/MMB.2005.1548488. ISBN 0-7803-8711-2. Dostupné také z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/1548488/>

- [28] NAYAR, V.T., J.D. WEILAND, C.S. NELSON a A.M. HODGE. Elastic and viscoelastic characterization of agar. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2012, **7**, 60-68. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2011.05.027. ISSN 17516161.

Seznam příloh

Přílohy této bakalářské práce obsahují:

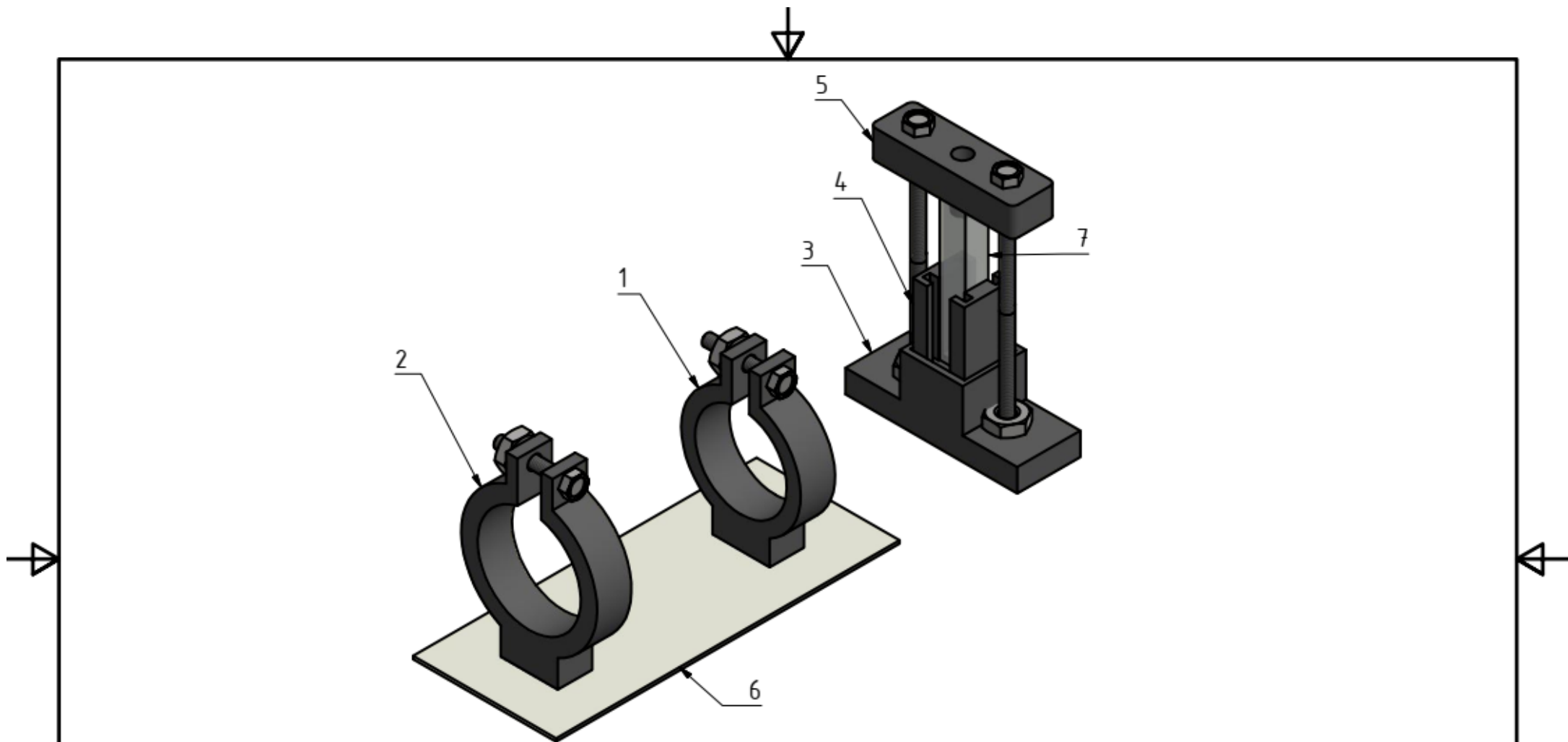
- Příloha A Technické výkresy navržené aparatury
- Příloha B Schéma navrženého elektrického obvodu a desky plošných spojů
- Příloha C Obsah přiloženého CD

Příloha A: Technické výkresy navržené aparatury

Příloha obsahuje tyto technické výkresy:

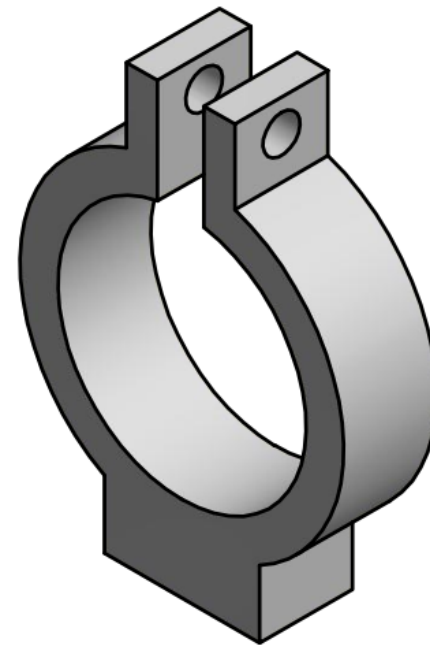
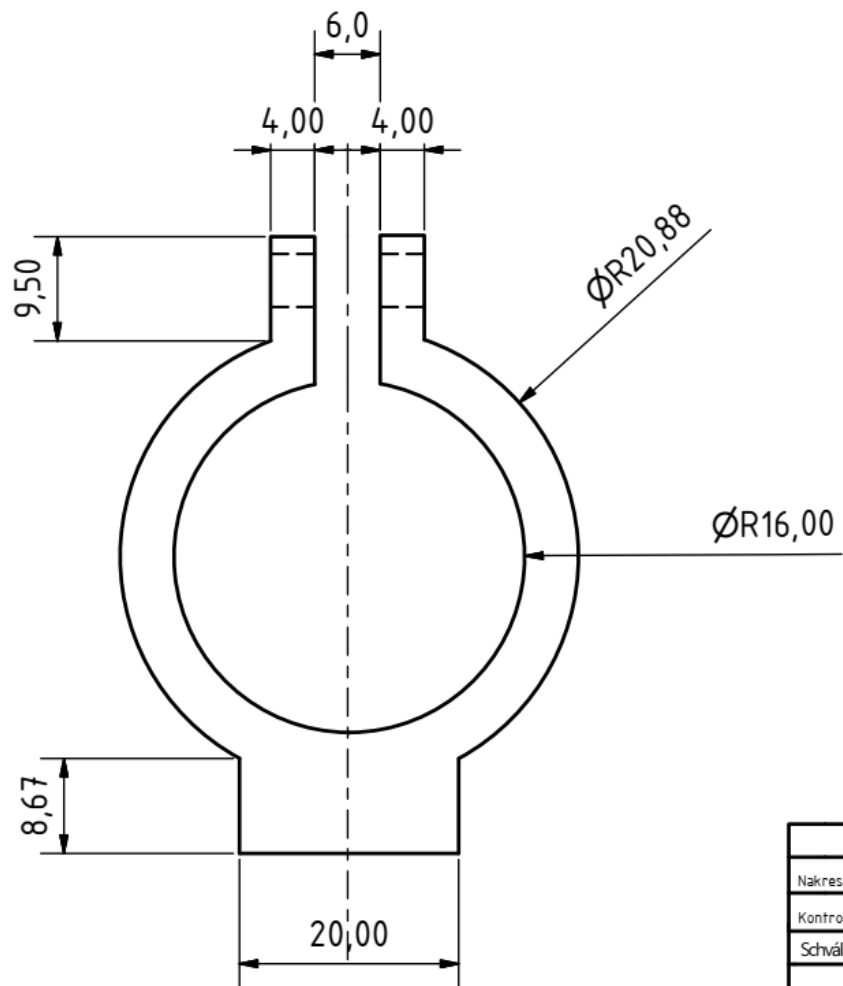
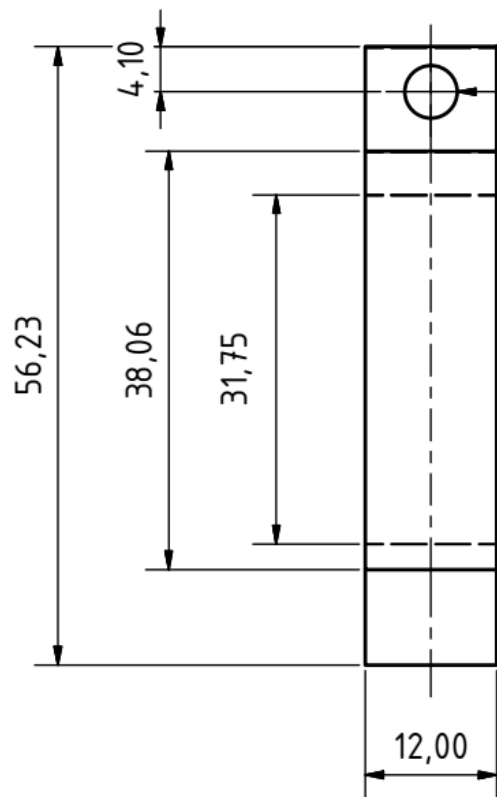
Hlavní výkres aparatury s očíslovanými součástmi

- 1 Výkres předního stojanu pro digitální mikroskop
- 2 Výkres zadního stojanu pro digitální mikroskop
- 3 Výkres dna držáku spektrofotometrické kyvety
- 4 Výkres držáku spektrofotometrické kyvety
- 5 Výkres víka spektrofotometrické kyvety

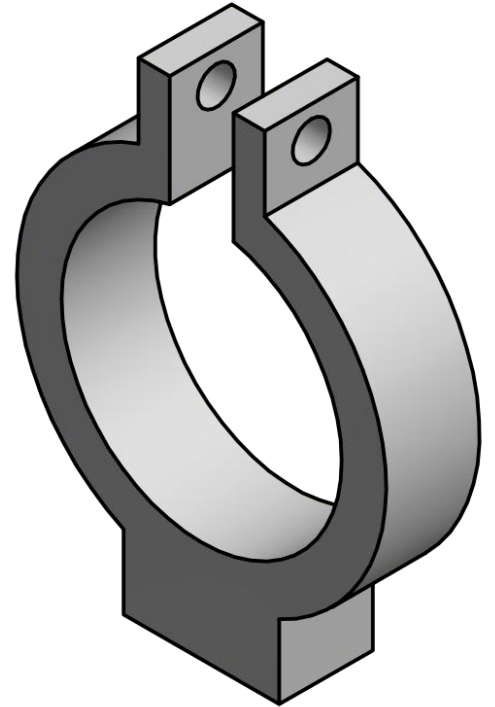
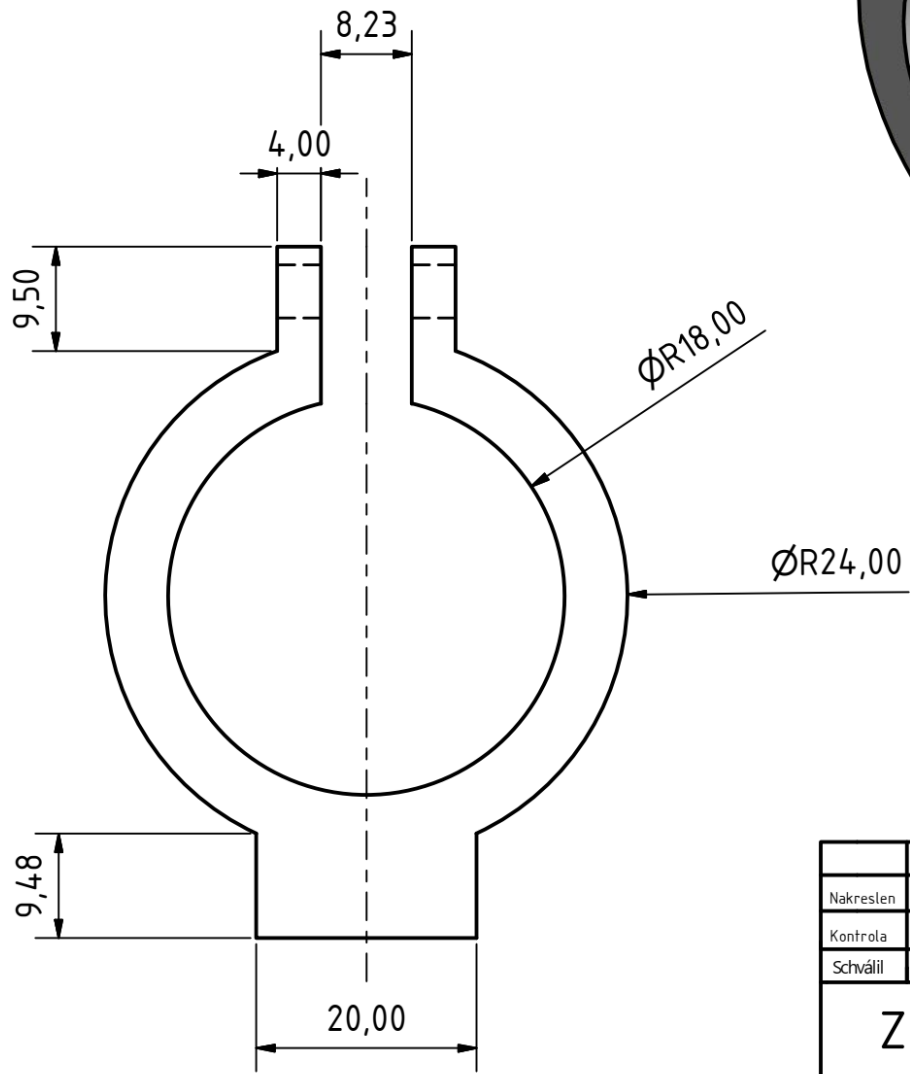
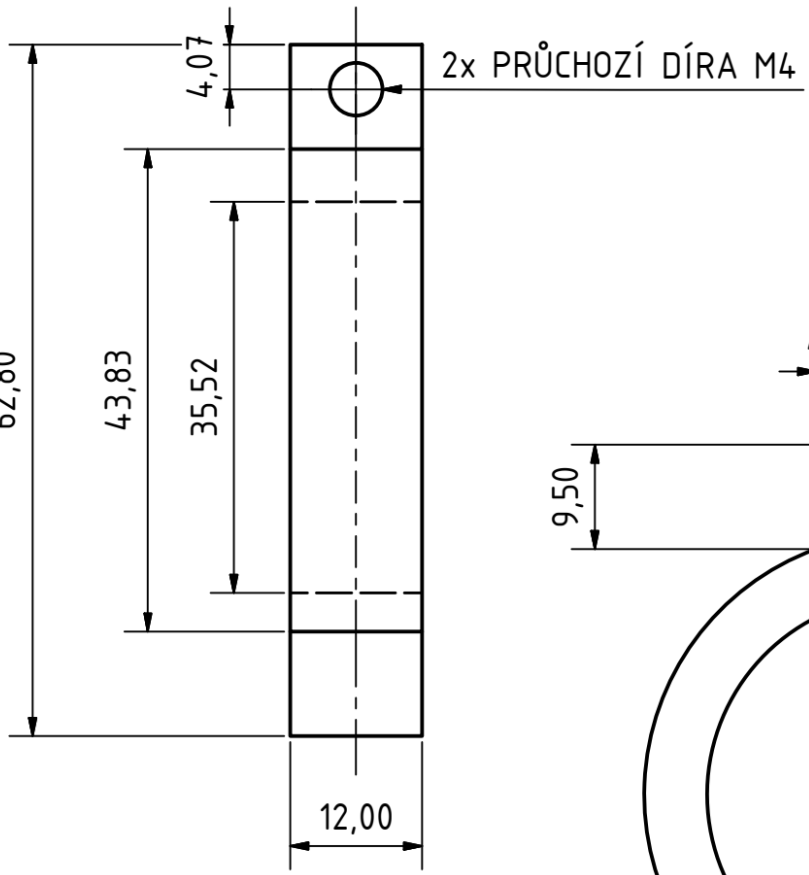


KUSOVNÍK

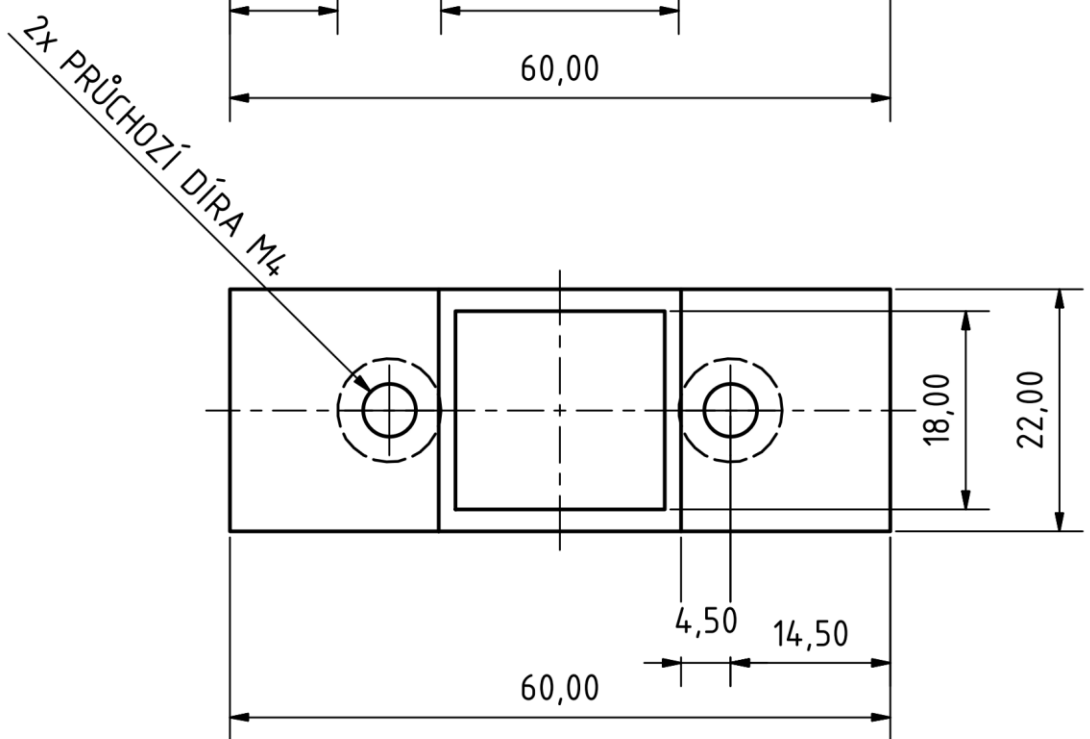
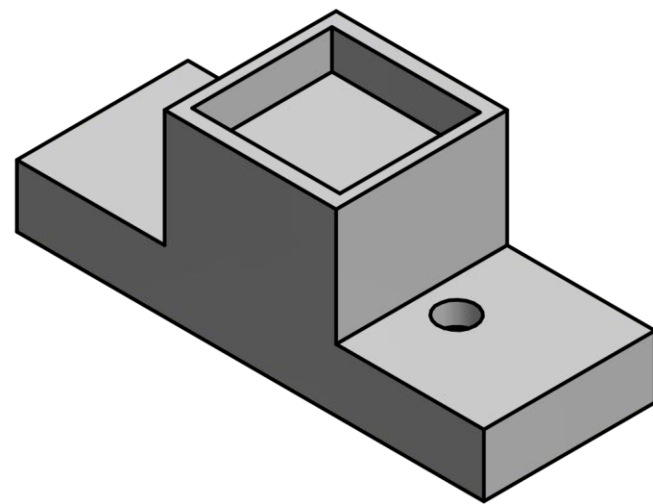
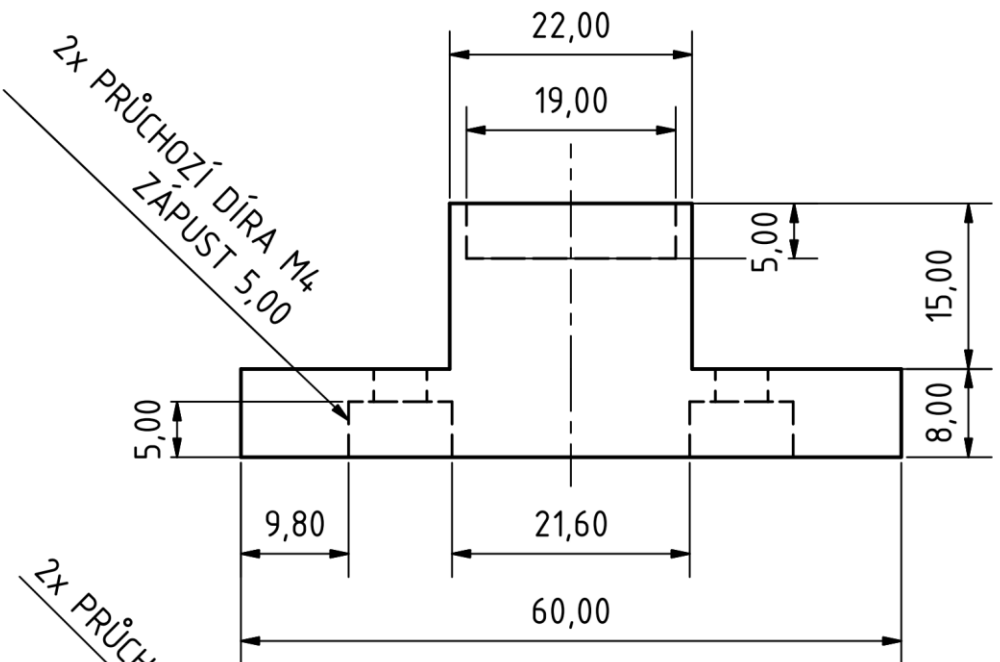
POLOŽKA	ČÍSLO SOUČÁSTI	POPIS
Přední stojan	1	Přední držák na digitální mikroskop
Zadní stojan	2	Zadní držák na digitální mikroskop
Dno kyvety	3	Základna pro uchycení kyvety
Držák na kyvetu	4	Držák pro zajištění stabilní polohy kyvety
Víko kyvety	5	Úzavěr kyvety s otvorem pro aplikaci tlakové stimulace
Dno	6	Společná základna pro stojany na kameru z transparentního plastu
Kyveta	7	Místo pro umístění spektrofotometrické kyvety VERKON



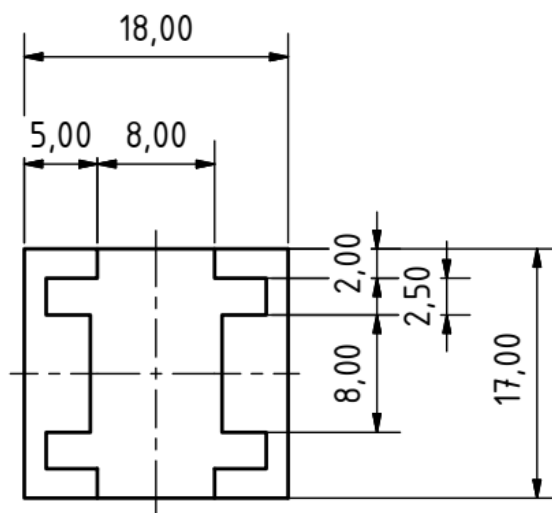
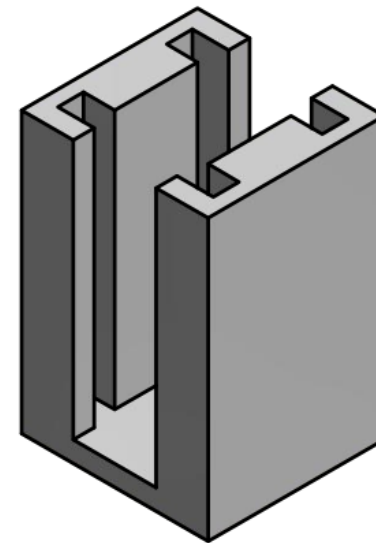
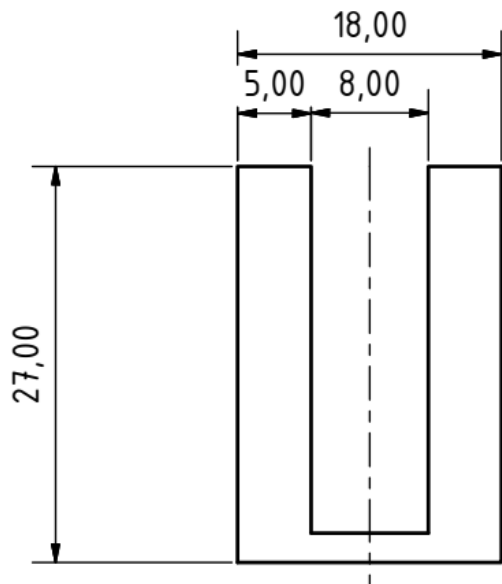
	Datum	Jméno	ČVUT FBMI
Nakreslen	21.04.2019	Filip Černý	
Kontrola	23.4.2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Schválil	23.4.2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Přední stojan			1
			1,5:1 A4



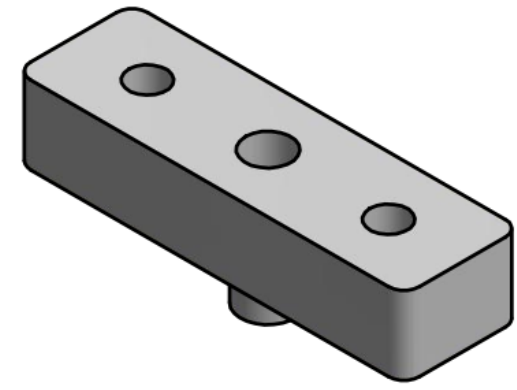
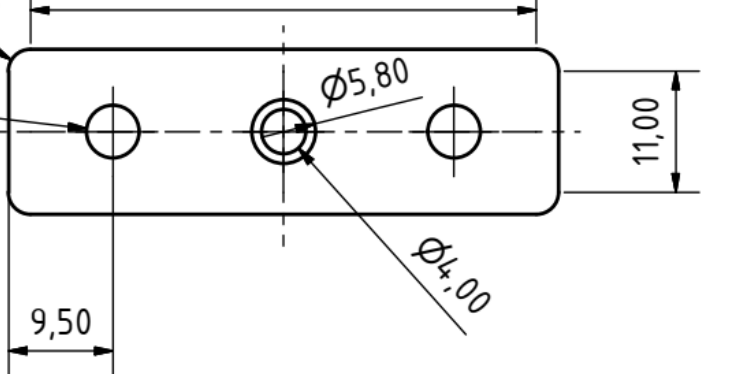
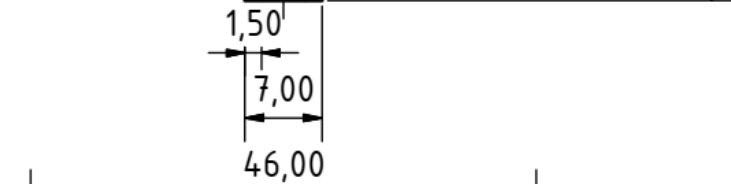
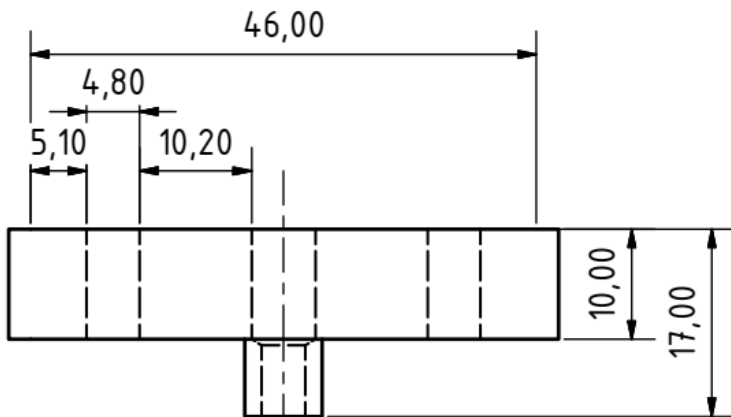
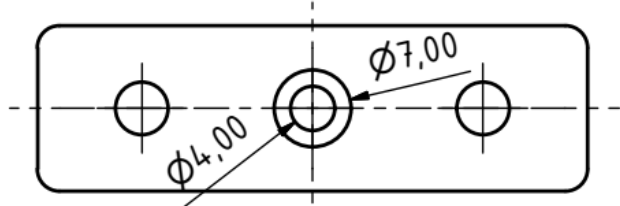
	Datum	Jméno	
Nakreslen	21.04.2019	Filip Černý	
Kontrola	23.4.2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Schválil	23.4.2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Zadní stojan			2
			1,5:1 A4



	Datum	Jméno	
Nakreslen	21.04.2019	Filip Černý	
Kontrola	23.4.2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Schválil	23.4.2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Dno kyvety			3
			1,5:1 A4



	Datum	Jméno	ČVUT FBMI
Nakreslen	21.04.2019	Filip Černý	
Kontrola	23.4.2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Schválil	23.4.2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Držák květy			4
			2:1 A4



4x R2,00
2x PRŮCHOZÍ DÍRA M4

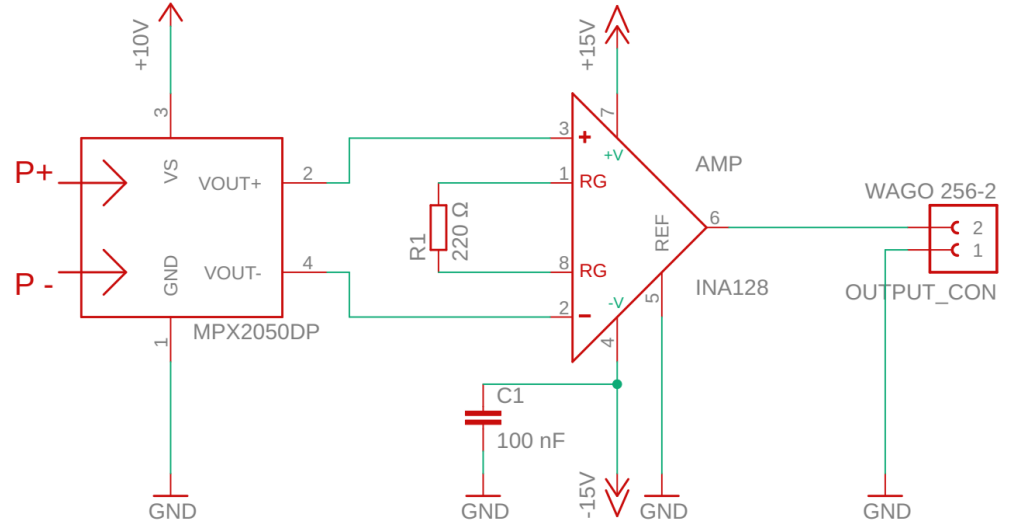
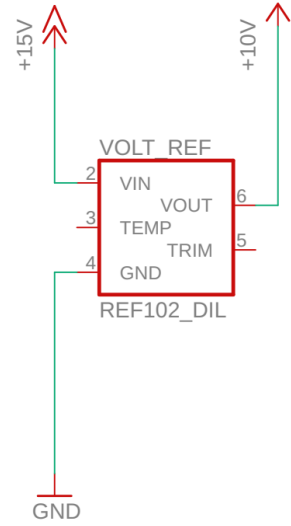
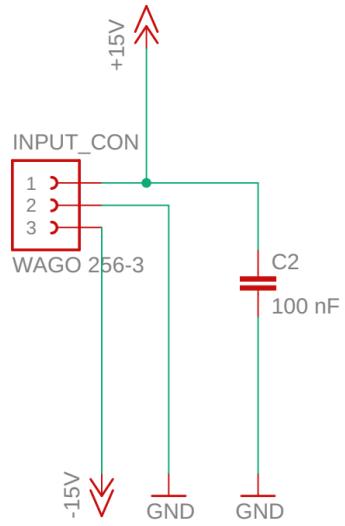
	Datum	Jméno	
Nakreslen	21.04.2019	Filip Černý	
Kontrola	23.4.2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Schválil	23.4.2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Víko kyvety			5
			1,5:1 A4

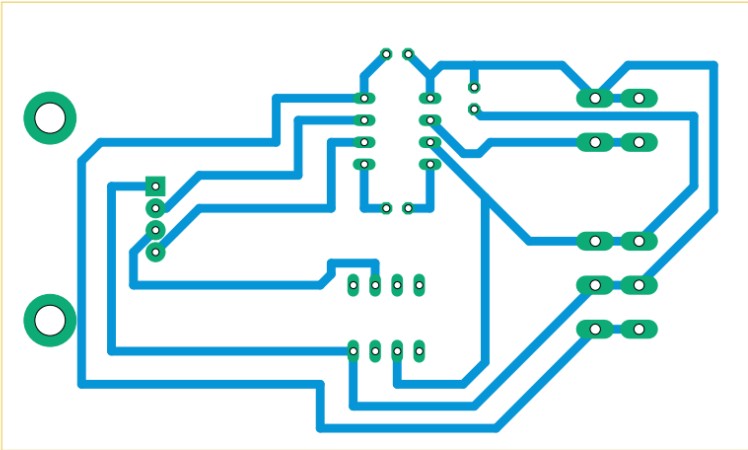
Příloha B: Schéma navrženého elektrického obvodu a desky plošných spojů

Příloha obsahuje následující schémata:

Schéma zapojení elektrického obvodu pro tlakový senzor

Návrh desky plošných spojů pro elektrický obvod tlakového senzoru





Příloha C: Obsah přiloženého CD

Součástí přiloženého CD je:

Klíčová slova práce v českém a anglickém jazyce

Abstrakt práce v českém jazyce

Abstrakt práce v anglickém jazyce

Zadání bakalářské práce

Elektronická verze bakalářské práce

LabVIEW aplikace snímače aplikovaného tlaku