



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra biomedicínské techniky

**Dynamická kultivace kmenových buněk
v porézních substrátech**

**Dynamic cultivation of stem cells in porous
substrates**

Bakalářská práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský technik

Autor bakalářské práce: Samuel Maduda

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Jana Štěpanovská

Kladno 2018/2019

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Maduda** Jméno: **Samuel** Osobní číslo: **459000**
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:

Dynamická kultivace kmenových buněk v porézních substrátech

Název bakalářské práce anglicky:

Dynamic cultivation of stem cells in porous substrates

Pokyny pro vypracování:

Realizujte úpravy software dynamického systému pro mechanickou stimulaci kmenových buněk "Dupátko" tak, aby na buňky po celou dobu experimentu bylo působeno se stejnou periodou namáhání a tím se předešlo zkracování této periody vlivem opotřebování třením. Dále navrhnete kultivační komoru pro dynamickou kultivaci buněk v porézních substrátech, aby buňky mohly být kultivovány buď tlakem, nebo průtokem. Porézní substráty slouží jako základní struktura pro vývoj tkáně hladké svaloviny in vitro. Stanovte optimální průtok, tlak a periodu namáhání, aby podmínky odpovídaly vývoji svaloviny v cévní stěně. Kultivační komora musí být netoxická pro buňky a kompletně sterilizovatelná, např. v autoklávu. Funkčnost komory ověřte při krátkodobých buněčných experimentech. Na základě analýzy diferenačních markerů zhodnoťte vliv stimulace na kulturu kmenových buněk v kultivační komoře a srovnajte výsledky se statickou kulturou.

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:

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 semestrální projekt s názvem „Dynamická kultivace kmenových buněk v porézních substrátech“ 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), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně 10. 5. 2019

.....

Samuel Maduda

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval Ing. Janě Štěpanovské za vedení práce a čas, který mi při konzultacích a tvorbě této práce věnovala.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NV18-02-00422.

ABSTRAKT

Dynamická kultivace kmenových buněk v porézních substrátech

V posledních 15 letech způsobují cévní onemocnění nejvíce úmrtí v globálním měřítku. Ucpání cévy, často způsobené aterosklerózou, která je nejčastější příčinou vzniku cévních onemocnění, se léčí implantací náhradní cévy, tzv. bypassem, kdy může být využita céva i z umělého materiálu, např. celulózy. Tkáňové inženýrství má velký potenciál pro tvorbu náhrad z vlastních buněk pacienta, osazených na umělý nosič. V rámci této práce byla navržena kultivační komora, ve které budou buněčné kultury uloženy v porézních substrátech a stimulovány tlakem nebo průtokem. V rámci práce byl také rozšířen systém mechanického namáhání o softwarové řešení úpravy periody stimulace. Navržená kultivační komora a provedené úpravy byly otestovány krátkodobými buněčnými experimenty. Ověřen byl také vliv průtokové a mechanické stimulace kmenových buněk do hladké svaloviny analýzou diferenciačních markerů vzniklých kultur porovnáním s kulturou statickou. Provedenými experimenty byl prokázáno, že komora je pro buňky netoxická a umožňuje proliferaci a diferenciaci kmenových buněk. Úpravy systému se prokázali jako funkční. Analýza diferenciačních markerů ukázala, že dynamická kultura vykazuje silnější, lépe definované buňky hladké svaloviny s uspořádaným nasměrováním než kultura statická.

Klíčová slova

dynamická kultivace, porézní substráty, kmenové buňky, mechanické namáhání, tkáňové inženýrství

ABSTRACT

Dynamic cultivation of stem cells in porous substrates

Cardiovascular diseases are the most common causes of death over last 15 years worldwide. A vascular blockage, mostly inflicted by atherosclerosis, is the main cause of a cardiovascular disease origin. It is treated with a blood vessel implantation, so called bypass, which might be manufactured from artificial material, e. g. cellulose. Tissue engineering appears to be a promising way of autologous grafts manufacturing. In this research a new design of a scaffold-supporting cultivation chamber providing pressure or flow mechanical stimulation was created. The goal also consists in enhancing the system of cyclic mechanical loading by creating a period controlling software. The cultivation chamber design and system enhancement were both verified during short-term cell experiments. Effect of pressure and flow stimulation were tested by differentiation markers analysis during the cell experiment as well. Results of experiments have proven nontoxicity of the chamber as well as creating good environment for cell proliferation and differentiation. System enhancement seems to be fully functional. Differentiation markers analysis showed better defined, stronger cells with order in their direction in dynamic cell culture.

Keywords

dynamic cultivation, porous scaffolds, stem cells, mechanical loading, tissue engineering

Obsah

Seznam symbolů a zkratk.....	9
1 Úvod	10
1.1 Cévní hladká svalovina	11
1.2 Kmenové buňky	12
1.3 Markery hladké svaloviny	13
1.4 Porézní substráty	14
1.5 Přehled současného stavu.....	15
1.5.1 Současný stav technického řešení mechanického stimulatoru	18
1.6 Cíle práce.....	19
2 Metody	20
2.1 Systém dynamické kultivace	20
2.1.1 Dynamický systém pro tlakovou stimulaci	20
2.1.2 Dynamický systém pro průtokovou stimulaci.....	21
2.2 Software pro úpravu periody namáhání	21
2.3 Deska plošných spojů tlakového senzoru.....	23
2.4 Komora pro dynamickou kultivaci kmenových buněk	25
2.4.1 Simulace distribuce tlaku	26
2.4.2 Simulace proudění média v komoře	26
2.5 Buněčné experimenty	28
3 Výsledky.....	29
3.1 Kultivační komora.....	29
3.2 Úpravy dynamického systému pro kultivaci buněk	30
3.2.1 Program upravující periodu mechanické stimulace	31
3.2.2 Deska plošných spojů	32
3.3 Buněčné experimenty	33

4	Diskuse	34
5	Závěr	37
	Seznam použité literatury	38
	Seznam příloh.....	42
	Obsah příloženého CD.....	57

Seznam symbolů a zkratek

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
ASC	Kmenové buňky izolované z tuku (<i>Adipose stem cells</i>)
BIOCEV	Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci
CFD	Software pro výpočet dynamiky kapalin (<i>Computational fluid dynamics</i>)
DAQ	Jednotka pro sběr dat (<i>Data acquisition</i>)
hADSC	Kmenové buňky izolované z lidské tukové tkáně (<i>Human adipose-derived stem cells</i>)
MSC	Mesenchymální kmenové buňky (<i>Mesenchymal stem cells</i>)
SMC	Buňky hladké svaloviny (<i>Smooth muscle cells</i>)
SM MHC	Těžký řetězec myosinu hladké svaloviny (<i>Smooth muscle myosin heavy chain</i>)

1 Úvod

Kardiovaskulární onemocnění jsou, navzdory klesající tendenci a zlepšující se zdravotnickou péčí, již 15 let nejčastější příčinou úmrtí v evropském, ale i globálním měřítku. Světová zdravotnická organizace odhaduje, že celosvětově zemře v důsledku těchto nemocí, za jejichž vznikem se skrývá špatný životní styl, 17,9 milionů lidí v průběhu jednoho roku, což činí přibližně 31% část všech ročně zemřelých [1]. V Evropě je tento procentuální podíl ještě vyšší – přibližně 45 % [2]. Mezi kardiovaskulární nemoci s nejvyšší mortalitou patří zejména ischemická choroba srdeční a cévní mozková příhoda, které jsou v součtu příčinou úmrtí přes 15 milionů lidí (údaje z roku 2016) [3]. V České republice zabíjí ischemická choroba srdeční a cévní mozková příhoda řádově desetitisíce lidí ročně, v roce 2016 to činilo více než 32 tisíc lidí [4].

Jednou z hlavních příčin vzniku kardiovaskulární onemocnění, konkrétně ischemické choroby srdeční a cévní mozkové příhody je ateroskleróza neboli kornatění tepen. Při ateroskleróze dochází k akumulaci a ukládání lipidových částic ve vnitřní vrstvě cévní stěny, které doprovází funkční změny střední vrstvy cévy. Aterosklerotické pláty, jak se tyto usazeniny označují, způsobují zúžení průsvitu a snížení průtoku krve tepnou. Úplné ucpaní nebo utržení sraženiny může mít za následek vznik infarktu myokardu nebo cévní mozkové příhody, které často končí úmrtím jedince. Ateroskleróza v pokročilém stavu se řeší tzv. bypassem – přemostěním postiženého místa náhradním štěpem. Štěpy z umělých materiálů ovšem nesou některá zdravotní rizika, které mohou skončit selháním bypassu. Řešením může být uměle vypěstovaný štěp z vlastních buněk pacienta, jehož výzkumem se zabývá tkáňové inženýrství [5].

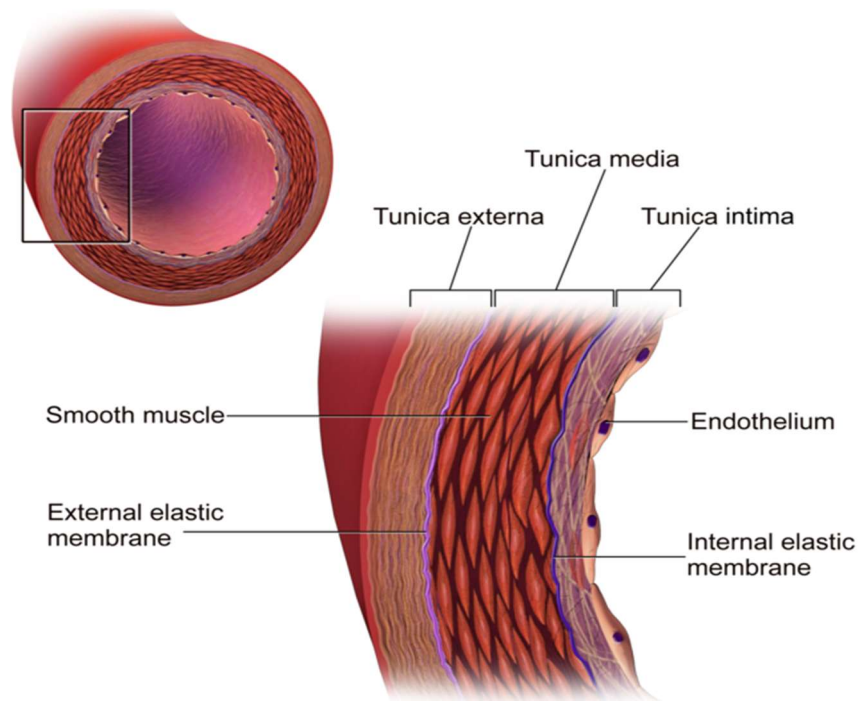
V této práci se věnuji úpravám systému dynamické kultivace, ve kterém by mohly být kultivované kmenové buňky stimulovány mechanickým namáháním, konkrétně tlakem a průtokem, za účelem zkoumání vlivu namáhání na diferenciaci buněk směrem k buňkám hladké svaloviny, které tvoří střední vrstvu cévní stěny – *tunicu medeu* [6]. To spočívá v návrhu, výrobě a otestování kultivační komory, které takové namáhání umožňuje, a upravení softwarového řízení stimulace.

1.1 Cévní hladká svalovina

Hladká svalová tkáň je tvořena, na rozdíl od příčně pruhované či srdeční svalové tkáně, podlouhlými buňkami větvenovitého tvaru, které jsou vzájemně propojeny vazivem. Buňky hladké svaloviny obsahují v cytoplasmě podélně rozložené myofibrily, které mají schopnost kontrakce, při které dochází k smrštění celé buňky. SMC mají dva fenotypy – kontraktilní a proliferační. V kontraktilním fenotypu je buňka schopna svalového stahu, čímž plní svojí funkci v organismu, v proliferačním fenotypu dochází k množení, ovšem kontraktilita v tomto fenotypu chybí. Hladká svalovina se nachází zejména ve stěnách dutých orgánů např., střev a žaludku, průdušnice a průdušek, močovodů či dělohy. Tvoří také svalovou vrstvu cévních stěn, a lze ji nalézt také v kůži, kde je připojena ke kořenům chlupů.

Buňky hladké svaloviny tvoří prostřední, nejsilnější vrstvu cévní stěny, tzv. *tunica media*, ve které jsou orientovány kruhovitě nebo ve spirálách. Vnitřní vrstva, *tunica intima*, je tvořena plochými endotelovými buňkami, které vytváří hladký a nesmáčivý povrch uvnitř cévy. Vnější vrstva, *tunica adventitia* (někdy také *tunica externa*), je tvořena vazivem s hojným obsahem elastických vláken, které zvyšují pružnost cévy. Vrstvy jsou mezi sebou odděleny elastickými membránami. V rámci těchto tří vrstev mají největší zastoupení buňky hladké svaloviny v prostřední vrstvě [6][7].

Ve fyziologii cév mají buňky hladké svaloviny podstatnou roli. Kontrakcí zmenšují průsvit a usměrňují průtok krve. Regulují také vasodilataci a vasokonstrikci.



Obrázek 1.1: Anatomie cévní stěny: tři vrstvy (tunica intima, tunica media, tunica externa) [24]

Buňky hladké svaloviny se také účastní kardiovaskulárních onemocnění a patofyziologických dějů cév jako je např. vysoký tlak (hypertenze), stenóza nebo ateroskleróza. Některé cévní nemoci způsobují snížení průtoku krve, vzniká ischemie a neléčená nemoc vede až k infarktu myokardu a případné smrti. Moderní medicína léčí podobné nemoci chirurgicky, buď pomocí stentu: trubice, která se zavede na postižené místo a mechanicky nedovolí cévě se dále zužovat, nebo přemostěním ucpané či zúžené části – tzv. bypass. Při řešení aterosklerózy pomocí bypassu je implantována do těla pacienta další céva, která vede krev do tkáně jinou cestou a obnovuje tak fyziologickou perfuzi. Cévní implantát může být dvojího typu – autologní štěp pacienta získaný z jiné části těla nebo céva umělá. Umělá céva z materiálů neživého původu bývá nejčastěji vyrobena z polymerů, kupř. polyethylentereftalátu (PET) či expandovaného polytetrafluorethylenu (ePTFE). Ovšem tyto materiály neposkytovaly dostatečně netečný vnitřní povrch, ale povrch, který přitahuje některé buněčné typy, včetně buněk hladké svaloviny, čím dochází k hromadění buněk, ucpávání cévy a následně stenóze či jiné komplikaci, která nakonec vede k selhání nepřirodního štěpu. [6][7][8]

Další možností je použití umělé vypěstované cévy vyrobené z buněk živočišného původu. Vývoji a výrobě umělých cév, ale i jiných biokompatibilních náhrad tkáně z živočišných buněk se věnuje tkáňové inženýrství, což je interdisciplinární vědní obor na pomezí biologie, medicíny a inženýrských oborů. Obecně je udáváno, že tkáňové inženýrství je nejvíce slibný způsob léčby selhávání orgánů či poškození tkání. Očekává se, že do budoucna by tkáňové inženýrství mohlo poskytnout řešení nedostatku dárců orgánů, problémů s biologickou nekompatibilitou náhrad či následků dlouhodobého užívání imunosupresiv. Náhradní tkáň je vyrobena v bioreaktoru z určeného druhu buněk na vhodném substrátu za vhodných biofyzických podmínek a s vhodnou buněčnou výživou. K vypěstování štěpu mohou posloužit buňky přímo z dané tkáně nebo buňky kmenové neboli buňky se schopností diferencovat se do jiných somatických buněčných typů. [9]

1.2 Kmenové buňky

Kmenové buňky se dělí na několik typů dle schopnosti diferenciaci. Buňka, která má schopnost diferencovat se do jakékoliv jiné somatické specializované buňky, včetně buněk placenty, je označena jako totipotentní (někdy také omnipotentní). Taková buňka je zygota, která vzniká splynutím vajíčka a spermie a je schopna vytvořit plně funkčního jedince se všemi druhy potřebných tkání spolu s placentou. Dalším druhem jsou buňky pluripotentní, které se dokáží diferencovat do jakékoliv ze tří zárodečných listů: ektodermu, endodermu a mesodermu, které generují všechny tkáně a orgány. Takovými buňkami jsou embrya – buňky z blastocystu. Odběr obou typů ze zárodků je problematický z hlediska etiky. Řešením mohou být tzv. indukované pluripotentní kmenové buňky, které jsou v laboratořích přeprogramovány a dediferenciovány z nižších

úrovni kmenových buněk na funkční pluripotentní buňky. Nižšími úrovněmi jsou multipotentní a oligopotentní kmenové buňky. Ty se mohou diferencovat pouze do určité skupiny resp. velmi úzce související skupiny buněk. Příkladem multipotentních buněk mohou být mesenchymální kmenové buňky, příkladem oligopotentních hematopoetické kmenové buňky. Mesenchymální kmenové buňky lze odebrat z kostní dřeně či z tukové tkáně. Odběr z tukové tkáně při liposukci (tzv. adipose stem cells) poskytuje dostatečný počet buněk za menší invazivity zákroku, což jej dělá v mnoha ohledech výhodný pro tkáňové inženýrství. [10, 11]

1.3 Markery hladké svaloviny

Při diferenciaci kmenových buněk do hladké svaloviny vznikají u zdravých buněk v klidovém, kontraktilním fenotypu proteiny, které signalizují tvorbu hladké svalové tkáně a také buněčný fenotyp. Tyto tzv. markery je možno sledovat a analyzovat. Markery je možné rozdělit do skupin podle toho, kdy se během vývoje vyskytují. Do skupiny raných markerů patří např. SM α -actin nebo SM22- α , mezi střednědobé patří h-caldesmon a calponin a mezi pozdní patří SM MHC a smoothelin. Některé markery nejsou dostatečně specifické a jejich nálezy v buněčné kultuře nemusí znamenat výskyt hladké svaloviny v kontraktilním fenotypu. [8]

Nejranějším známým markerem diferenciaci hladké svaloviny je SM α -actin, SM α -actin se nachází v tenkých vlákních buněk hladkých svalů spolu s dalšími markery (tropomyosin, troponin či calponin) a formami aktinu (β a γ) a značí dospělou a zdravou cévu. Ovšem SM α -actin není dostatečně specifický a jeho nálezy nedostačují k potvrzení diferenciaci směrem k buňkám hladké svaloviny. Specifickým raným markerem je myocardin, který je klíčový transkripční faktor diferenciaci do hladké svaloviny a indukuje expresi dalších proteinů. Caldesmon je střednědobý marker a jeho forma H-caldesmon je přítomna v zralých a plně diferencovaných buňkách. Calponin je také střednědobý marker. Oba proteiny jsou inhibitory aktivity aktinu a regulátory kontraktility hladké svaloviny. Calponin 1 je specifickým markerem SMC. Pozdními markery jsou desmin, SM-myosin heavy chain (SM-MHC) a smoothelin. SM-1 a SM-2 MHC se nacházejí v silných vlákních plně diferencovaných buněk hladké svaloviny. Všechny formy MHC klesají při cévních onemocněních. Smoothelin je protein cytoskeletu a vyskytuje se výhradně v buňkách hladké svaloviny v kontraktilním fenotypu. Formy smoothelinu jsou součástí kontraktilního aparátu SMC a zvyšují kontraktilní potenciál buňky a přispívají tak adaptaci cév na různé fyziologické či patologické podmínky. [8]

1.4 Porézní substráty

Důležitým faktorem pro správnou proliferaci a diferenciaci kmenových buněk je volba vhodného substrátu, na kterém dochází k růstu buněčné kultury. Při kultivaci planární buněčné kultury se používají rigidní nebo elastické materiály, na jejichž styčné ploše dochází k růstu kolonie. Pokud je cílem vypěstovat určitou tkáň, tedy prostorovou strukturu, používají se tzv. scaffoldy. [12]

Scaffoldy (z angl. lešení) jsou trojdimenzionální substráty s vysokou porézností, které poskytují vhodné prostředí pro vývoj buněk in vitro. Na tyto substráty se nasadí buňky, které strukturu typu scaffold prorostou. Systém buňky-substrát je nejčastěji umístěn v bioreaktoru - uzavřené komoře, která udržuje stálé podmínky a vytváří vnitřní prostředí pro kultivaci in vitro. Do bioreaktoru může být injektováno růstové médium či v něm může docházet k mechanické stimulaci, popř. kombinace obojího. Tato kombinace buněk, substrátu typu scaffold a růstového média nebo stimulace se někdy označuje jako triáda tkáňového inženýrství, která je základem uměle vypěstovaného štěpu. [13]

Při výrobě porézního substrátu je nutné brát na zřetel několik důležitých faktorů, které sehrávají ve funkčnosti scaffoldu velkou roli. Prvním důležitým kritériem je biokompatibilita. Porézní substrát by měl co nejvěrněji napodobňovat přirozenou extracelulární matici - buňky na něj musí adherovat a normálně proliferovat, prostředí nesmí být toxické. Celý štěp musí být netečný, tak aby nevyvolal imunitní reakci, která by mohla vést k odmítnutí štěpu tělem. Porézní substráty nejsou zamýšleny jako permanentní implantát, účel uměle vypěstovaného štěpu je pomoci tělu vytvořit prorůst kritické místo vlastními buňkami. Z tohoto důvodu je důležitá biodegradabilita. Scaffold by měl být z takového materiálu, který se postupně v těle, v průběhu času, rozloží a vstřebá a zanechá pouze funkční lidskou tkáň. Produkty rozkladu substrátu nesmí být toxické, by nedošlo k zánětlivé reakci. Implantovaný štěp musí mít také odpovídající mechanické vlastnosti. Cévy jsou zatěžovány neustálým namáháním. Buněčný konstrukt musí být tedy dostatečně odolné vůči vnějším mechanickým vlivům, jako je tlak, tah nebo smykové napětí. Velkou roli sehrává architektura substrátu. Poréznost scaffoldu musí být vysoká tak, aby umožňovala vnik buněk do hlubších vrstev a také odpovídající difuzi růstového média směrem dovnitř a odpadní produkty směrem ven. Podstatná je také velikost pórů. Volba materiálu je poměrně variabilní a záleží na účelu štěpu. Používají se např. kolagenové či fibrinové gely, nanovlákná nebo vlákná celulózy, decelularizovaná mimobuněčná matrice, zpeněný plyn. [13, 14]

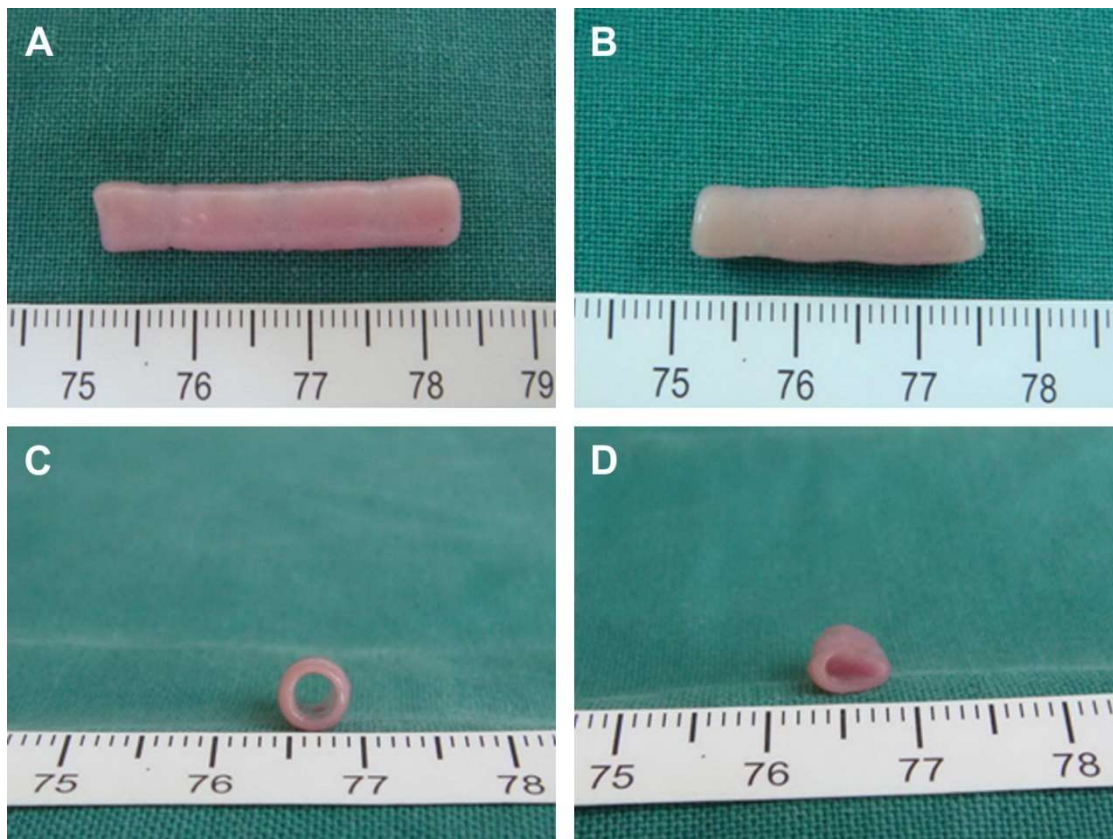
1.5 Přehled současného stavu

V současné době existuje mnoho výzkumů v oblasti tkáňového inženýrství, které se věnují používání kmenových buněk pro vypěstování náhradních tkání a orgánů a také tvorbě systémů a metodik, které by vedly k trvale přesvědčivým výsledkům. Řada prací se věnuje diferenciaci kmenových buněk do endotelu nebo hladké svaloviny, které tvoří první dvě vrstvy cév, zejména z důvodu, že tkáňové inženýrství má velký potenciál řešení cévních onemocnění a je velmi nadějným způsobem léčby, jak již bylo zmíněno výše. Diferenciace kmenových buněk do hladké svaloviny *in vitro* je velmi komplexní, stále ne zcela popsáný děj, který závisí na řadě faktorů. Výzkumy s cílem diferenciaci buněk hladké svaloviny z různých druhů kmenových buněk ukazují, že program přeměny prekursorových buněk je spouštěn a koordinován sítí molekul v okolí. Z toho důvodu je předmětem zkoumání diferenciální médium s výživou a různými růstovými faktory, ale také tzv. scaffold, podklad, na který se usazují buňky. Na samotný proces působí také biofyzikální vlivy, zejména mechanické zatížení. Cévní stěna je v *in vivo* prostředí neustále periodicky namáhána. Tlak působící v cévách se pohybuje u zdravého jedince v klidu kolem 120 a 80 mmHg, v případě arterie brachialis. Volba správného mechanického zatížení při diferenciaci kmenových buněk se proto stala předmětem mnoha studií. [15]

Studie z roku 2008 (Gong, 2008) se zabývala vývojem cévy s malým průměrem z buněk lidského původu. Volba diferencovaných buněk hladké svaloviny z cév nebyla vhodná z důvodu některých komplikací, které tyto buňky vyvolávají, např. zisk buněk proliferativního, nikoliv kontraktálního fenotypu. Takové buňky mají také pouze omezenou proliferativní kapacitu a redukovanou tvorbu kolagenu, což výrazně snižuje mechanické vlastnosti cévní stěny. Zdrojem buněk tedy byly mesenchymální kmenové buňky odebrané z kostní dřeně, které jsou multipotentní. Celý experiment se odehrával v bioreaktoru a po dobu pokusu bylo sledováno několik faktorů. Kultura byla namáhána cyklickým napínáním s frekvencí 0,5 Hz. Po 14 dnech se projevil SM- α aktin a calponin, dva markery hladké svaloviny v kontraktálním fenotypu. Studie ukázala, že lidské mesenchymální kmenové buňky mohou být do budoucna zdrojem pro tkáňové inženýrství cévních štěpů. [16]

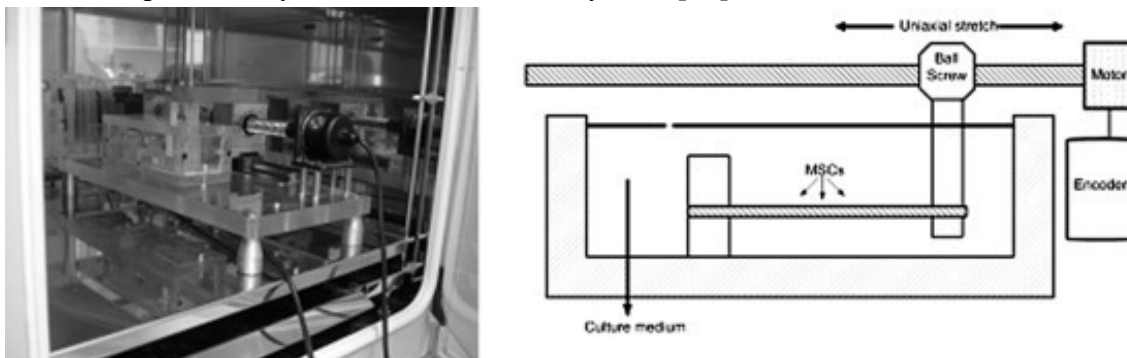
Cílem studie (Wang, 2010) bylo vyzkoušet proveditelnost konstrukce elastické cévní stěny z buněk hladké svaloviny, které byly diferenciovány z kmenových buněk tukové tkáně (tzv. ASC – adipose stem cells nebo hADSC – human adipose-derived stem cells). Experiment probíhal v bioreaktoru za mechanické pulzační, průtokové stimulace (frekvence 75 pulzů za minutu, objemový průtok stoupající ze 70 ml/min k 120 ml/min) s kombinací růstových faktorů TGF- β 1 a BMP4. Po sedmi dnech byly zjištěny SM- α aktin, calponin a SM-MHC (smooth muscle myosin heavy chain). Získané buňky byly nasazeny na scaffold z polyglykolické kyseliny a v bioreaktoru byly ponechány osm týdnů za stálé mechanické pulzační stimulace. Výsledný produkt (viz Obrázek 2)

vykazoval větší expresi proteinů typických pro kontraktilní fenotyp a také lepší biomechanické vlastnosti než u produktů získaných statickou kultivací. [17]



Obrázek 1.2: Uměle vyrobená céva v bioreaktoru [17]

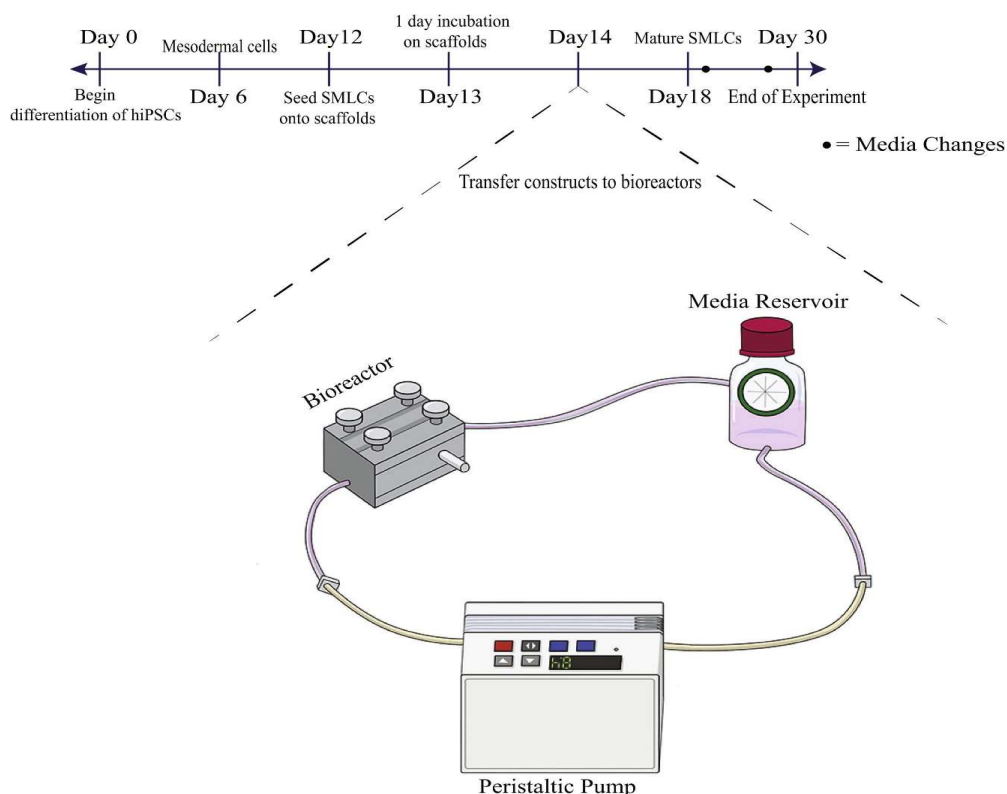
Samotný vliv mechanického namáhání byl zkoumán ve studii z roku 2009 (Ghazanfari, 2009). V rámci studie byly testovány různé podmínky namáhání na lidské mesenchymální kmenové buňky odebrané z kostní dřeni v upraveném bioreaktoru. Výsledky ukázaly, že periodické zatížení vede k zlepšení proliferaci. Cyklické natahování s frekvenčním rozsahem 1-3 Hz podpořilo diferenciaci směrem k hladké svalovině i bez přidání růstového faktoru. Závěr studie ukazuje, že použití správného mechanického namáhání v bioreaktoru zlepšuje proliferaci a diferenciaci a produkuje funkční hladkou svalovinu pro další využití v tkáňovém inženýrství. [18]



Obrázek 1.3: Aparatura pro dynamickou kultivaci periodickým namáháním [18]

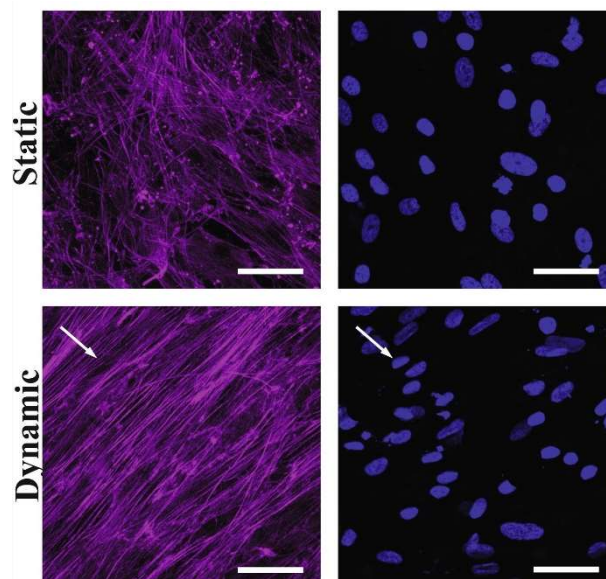
Studie (Li, 2018) se zabývala diferenciací MSC z kostní dřeně vedenou decelurizovanou mimobuněčnou maticí ve spojení s fibroblasty. V bioreaktoru během experimentu nepůsobilo žádné vyvolané mechanické zatížení, jako růstové faktory byly použity TGF β 1 a PDGF-BB. Porézní substrát byl vytvořen z decelularizované mezibuněčné hmoty. Výsledky ukázaly, že kombinace matrice spolu s fibroblasty zvýšila expresi kontraktálních proteinů a vykazuje vyšší potenciál vést diferenciaci MSC na hladkou svalovinu než přidávání růstových faktorů. Tato metodika by mohla vést k vytvoření stabilního zdroje buněk hladké svaloviny pro potřeby tkáňového inženýrství. [19]

Získání buněk hladké svaloviny s funkčními elastickými vlákny v extracelulárním prostoru je zásadní pro cévní tkáňové inženýrství. Nízká sekrece či špatná organizace elastinu zmenšuje flexibilitu cévy a vede ke snížení počtu buněk hladké svaloviny v kontraktálním fenotypu, což může způsobit selhání cévního štěpu. Na získání hladké svaloviny s dostatečným výskytem zralých a dobře organizovaných elastických vláken v extracelulárním prostoru se zaměřila studie z roku 2017 (Eoh, 2017). Z lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk byla v bioreaktoru průtokem 0,37 ml/min, resp. 0,74 ml/min diferenciována tkáň hladké svaloviny s vysokou hustotou zralých a funkčních elastinových a kolagenových vláken. Porézní substrát byl hybridního



Obrázek 1.4: Časová osa experimentu a schéma systému pro diferenciaci kmenových buněk [20]

typu z polydimethylkrylátu a polylaktické kyseliny. Růstové médium bylo do bioreaktoru pumpováno pulzně (viz Obr. 4), čím docházelo k tlakové stimulaci buněk. Studie ukázala, že správná mechanická stimulace spolu s vhodnou volbou dalších parametrů (růstové faktory, médium, materiál porézního substrátu) může výrazně zlepšit vlastnosti vyrobené hladké svalové tkáně, které jsou žádoucí pro tkáňové inženýrství. [20]



Obrázek 1.5: Rozdíl statické a dynamické kultivace. Fialově jsou zobrazeny aktinová vlákna, které vykazují vyšší hustotu a seřazení při dynamické kultivaci. Modře jsou zobrazeny buněčné jádra, která také vykazují vyšší míru seřazení při dynamické kultivaci. [20]

Některé další studie [21],[22],[23] se věnují dynamické kultivaci při mechanickém zatížení za použití porézních substrátů z různých materiálů, různých médií či rozdílných druhů kmenových buněk odebraných nejen od lidí, ale i od některých zvířecích zástupců. Výsledky těchto studií ukazují na zásadní vliv mechanické stimulace kmenových buněk za účelem zisku flexibilní, funkční a zralé tkáně hladké svaloviny.

1.5.1 Současný stav technického řešení mechanického stimulátoru

Experimentům s kmenovými buňkami v oboru tkáňového inženýrství se věnuje i tým z Fakulty biomedicínského inženýrství z ČVUT, který vytvořil dynamický systém pro kultivaci kmenových buněk s mechanickým namáháním. Buněčné pokusy probíhají v BIOCEV (Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci). V dynamickém systému je tlaková síla (popř. průtok či jiný druh stimulace) působící na buňky vytvořena posunem pístu stříkačky. U tohoto systému je možné nastavit amplitudu stimulace (horní/dolní mez, např. 120/80, 50/0 torr apod.). Tlaková amplituda je zpětnovazebně kontrolována a regulována. Nevýhodou současného řešení je chybějící možnost nastavit periodu namáhání. Momentálně systém funguje tak, že přidává tlak, dokud amplituda nedosáhne požadované hodnoty, konstantní rychlostí.

Dojde-li tedy k úniku tlaku v systému, k dosažení požadované tlakové amplitudy je potřeba více času (řádově desetiny sekund) a perioda je nestabilní. Nelze ani nastavit pevná perioda/frekvence stimulace, např. 0,5 Hz, tj. perioda 2 s. Proto byla jako jeden z cílů práce zvolena úprava řízení, aby bylo možné volit konstantní frekvenci namáhání.

Celý proces mechanické stimulace je aktuálně řízen programem, který je napsán v jazyce LabVIEW, navrženým Ing. Romanem Matějkou, konzultantem práce. Současný program zajišťuje celkový proces stimulace (posun pístu stříkačky pomocí krokového motoru a tím vytváření tlaku v systému) a ovládá ventily (řeší úniky tlaku v systému). Software pro úpravu periody mechanického namáhání musí komunikovat s tímto řídicím programem, skrze který bude měnit chod krokového motoru.

Vzhledem k tomu, že systém nebyl dosud publikován, ani na něj nebyl zatím udělen patent nebo užitný vzor, není prozatím možné zde uvádět jeho podrobný popis, fotografie apod.

1.6 Cíle práce

Cílem práce je navrhnout kultivační komoru, která umožňuje mechanickou stimulaci buněk tlakem nebo průtokem a je uzpůsobena pro kultivaci na porézních substrátech, tzv. scaffoldech. Komora nesmí být vyrobena z, pro buněčné kultury, toxického materiálu, který také musí být dostatečně odolný vůči podmínkám, ke kterým dochází při sterilizaci v autoklávu. Podmínky v komoře také musí odpovídat fyziologickým podmínkám, proto musí být před výrobou provedeny simulace na rozložení tlaku v komoře při tlakové stimulaci a také simulace rychlosti při průtokovém režimu. Dále je cílem navrhnout software v jazyce LabVIEW, který bude regulovat periodu namáhání tak, aby byla v celém průběhu pokusů konstantní.

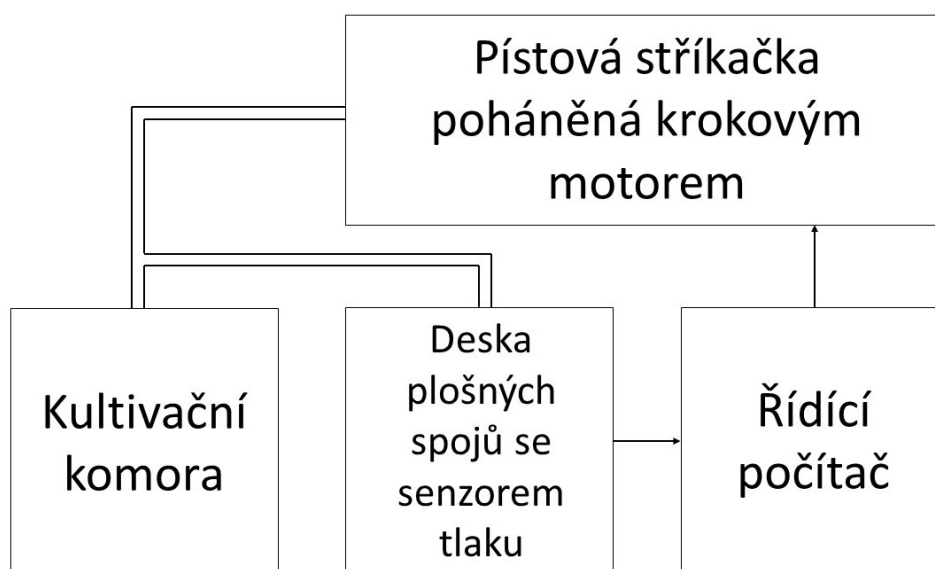
Kultivační komora i software pro úpravu periody mechanické stimulace budou otestovány krátkodobými pokusy. V rámci pokusů bude také otestován vliv mechanické zátěže na diferenciaci kmenových buněk do hladké svaloviny. Stimulovaná kultura bude následně srovnána se statickou kulturou analýzou diferenciacních markerů. Cílem je také stanovit na základě literatury parametry mechanického namáhání (perioda cyklického namáhání, maximální a minimální tlak, rychlost průtoku).

2 Metody

2.1 Systém dynamické kultivace

2.1.1 Dynamický systém pro tlakovou stimulaci

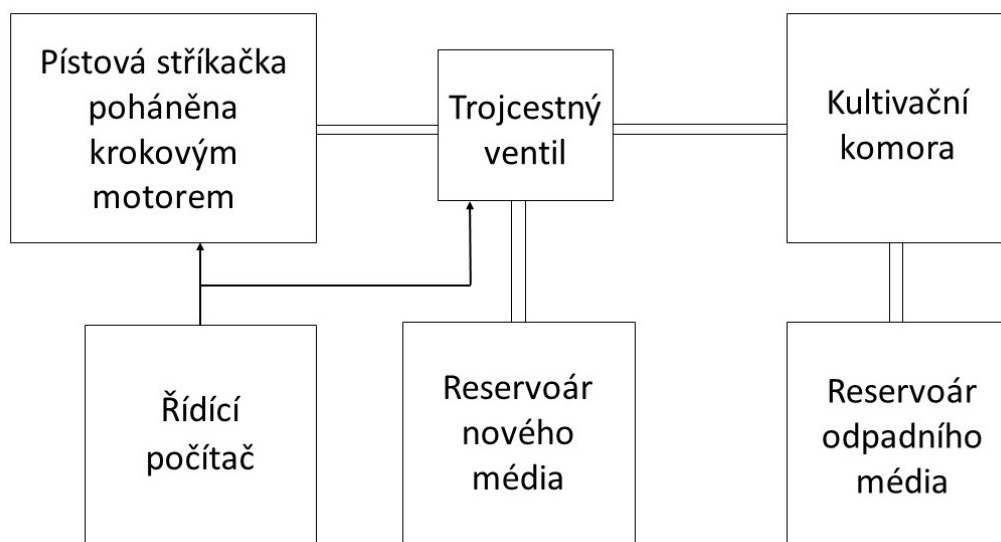
Dynamický systém pro kultivaci za stálého namáhání tlakem je vytvořen ze čtyř hlavních částí. Kultivační komora vytváří vnitřní prostředí pro procesy, kterými kmenové buňky během experimentů procházejí, proto je nutné, aby byla komora netoxická. Buňky jsou uloženy uvnitř komory v porézních substrátech, které tvoří základ budoucí tkáně. Mechanická stimulace je vytvářena pístovou stříkačkou, jejíž pohyb ovládá krokový motor. Stříkačka stlačuje kapalinu, čímž vytváří tlak, popř. průtok. Zprostředkovatelem přenosu tlaku je diferenciatní médium. Celý proces je řízen hlavním programem instalovaném v řídicím počítači. Hlavní program je napsán v jazyku LabVIEW (National InstrumentsTM, US). U tlakové stimulace je na řídicím počítači instalován také program pro úpravu periody, který dohlíží na konstantní hodnotu periody namáhání v průběhu dynamických buněčných experimentů. V případě časové nestálosti frekvence stimulace, poskytuje program pro úpravu periody hlavnímu programu data pro změnu rychlosti chodu motoru. Informace o tlakovém průběhu v dynamickém systému, potažmo kultivační komoře jsou řídicímu počítači poskytovány tlakovým senzorem na desce plošných spojů. Blokové schéma tlakové konfigurace je naznačeno na Obr. 2.1. Pro zajištění konstantních podmínek vnějšího prostředí v průběhu pokusů je komora vložena do inkubátoru.



Obrázek 2.1: Blokové schéma tlakového dynamického systému. Obrázek: autor

2.1.2 Dynamický systém pro průtokovou stimulaci

Dynamický systém pro kultivaci kmenových buněk za stálého namáhání průtokem se skládá z šesti částí. Podobně jako u tlakové konfigurace jsou buňky uloženy v porézních substrátech, které se nachází v kultivační komoře. Do komory proudí diferenciační médium, které protéká skrze póry substrátu a působí na buňky v něm zachycené. Průtok média je způsoben pohybem pístu stříkačky, jehož pohyb je ovládán krokovým motorem. Médium odtéká z kultivační komory do odpadního reservoáru. Při vyčerpání celého objemu stříkačky dochází obrácení chodu motoru, ventil přesměruje cestu do reservoáru čerstvého média, odkud je kapalina nasáta do stříkačky. Po naplnění stříkačky se znovu obrací chod motoru a ventil otevře přístup do kultivační komory. Ovládání ventilu i motoru je prováděno řídicím počítačem, resp. programem napsaném v jazyku LabVIEW. Stejně jako u tlakové konfigurace je komora vložena do inkubátoru. Blokové schéma průtokové konfigurace lze vidět na Obr. 2.2.



Obrázek 2.2: Blokové schéma průtokového dynamického systému. Obrázek: autor

2.2 Software pro úpravu periody namáhání

Volba maximálního tlaku či přesné periody cyklického namáhání je komplikovaná z důvodů úniků tlaku. Z tohoto důvodu byl vytvořen software pro úpravu periody cyklického tlakového namáhání, který je navržen tak, aby spolupracoval s již existujícím programem pomocí sdílených proměnných. V programu, který komunikuje s tímto řídicím programem je regulátor, který přes řídicí program empiricky upravuje chod motoru, tak aby reálná perioda s každou další iterací konvergovala k zvolené periodě uživatelem až po úplnou jejich shodu. Software byl napsán v jazyce LabVIEW.

Po spuštění programu a před spuštěním regulující části programu je nutné provést prvotní nastavení parametrů programu, které poté ovlivňují regulaci periody a samotný

chod programu. V grafickém uživatelském rozhraní (obrázek 3.3) zvolí uživatel datový kanál, přes který bude prováděna komunikace senzoru tlaku a programu. Skrze tento kanál budou transferovány data o průběhu tlaku v komoře. Následně zvolí požadovanou délku periody cyklu mechanické stimulace. Pro nastavení iniciálních hodnot dalších parametrů je nutná znalost chodu krokového motoru. ‘Úprava chodu motoru‘ je hodnota datového typu double, která je komunikována sdílenou proměnnou a , jak název napovídá, mění chod motoru v jednotlivých iteracích z hlediska periody jeho průběhu. Tato hodnota mění nastavení řídicího programu stimulace, konkrétně jeho nastavení tzv. duty cycle motoru. ‘Empirická konstanta‘ je hodnota také datového typu double, která se (celá popř. její část) v každé iteraci přičítá nebo odečítá od ‘úpravy chodu motoru‘. Právě touto změnou hodnoty ‘úpravy chodu motoru‘, která následně upravuje motor způsobující stimulaci, je možné reagovat na nerovnost mezi požadovanou periodou a reálnou periodou tlakové stimulace. Hodnota ‘úpravy chodu motoru‘ a ‘Empirická konstanta‘ je závislá na použitém motoru. V případě nesprávného zvolení obou proměnných, která upravují periodu stimulace, může dojít k velkému zrychlení či zpomalení periodického namáhání v průběhu prvních iterací. Při špatně zvolené empirické konstantě se může výrazně zvýšit počet iterací, než dojde k úplné shodě požadované periody a reálné periody v bioreaktoru, čímž se celá doba regulace prodlouží. Poslední nastavitelným parametrem je ‘Doba měření‘, který udává, jak dlouhou dobu bude sledován průběh tlaku v bioreaktoru (časový průběh tlaku je možné pozorovat v grafu v uživatelském rozhraní). Po tomto časový úsek bude snímaný tlak senzorem přenášen v podobě elektrického signálu přes desku plošných spojů a jednotku pro sběr dat DAQ do programu. Ze získaných dat je zjištěna reálná perioda v komoře a některé vedlejší údaje, např. maximální či průměrný tlak v komoře. Doba měření by měla být pro přesnější výsledky alespoň třikrát delší než požadovaná perioda stimulace, řádově se jedná o jednotky sekund. Po nastavení parametrů je možné stisknout tlačítko ‘Start‘, které spustí regulační činnost programu. Po spuštění regulace se volby hodnot ‘empirické konstanty‘, ‘úpravy chodu motoru‘ a ‘doby měření‘ znemožní a v průběhu pokusů je není možné dále měnit. Požadovaná perioda je měnitelná po celou dobu procesu. K regulaci a změně hodnoty ‘Úpravy chodu motoru‘ dochází, dokud se obě periody nerovnaj. V případě rovnosti obou period přestává program upravovat periodu stimulace, ovšem doba trvání reálné periody je nadále monitorována a porovnávána s požadovanou periodou. Pokud v průběhu buněčných pokusů dojde k rozdílu požadované a reálné periody i po jejich předchozí konvergenci, program vzniklý rozdíl znovu zreguluje. Činnost programu se zcela ukončí tlačítkem ‘Stop‘.

2.3 Deska plošných spojů tlakového senzoru

Pro správnou regulaci periody tlakového namáhání je potřeba znát časový průběh tlaku v komoře. Pro práci programu, který upravuje periodu, v reálném čase a ne na základě hodnot sdílených z řídicího programu Ing. Matějky, je nutné, aby software získával data o průběhu tlaku v kultivační komoře. Z tohoto důvodu byla vytvořena deska plošných spojů obsahující tlakový senzor MPX2050DP (Freescale, TX, USA), která bude tyto informace poskytovat. Senzor MPX2050DP měří tlak diferencně, tzn. rozdíl tlaků mezi dvěma vstupy. Rozsah čidla je 0-50 kPa, napájen je nesymetricky 10 V. Elektrický signál ze senzoru, který nabývá hodnot od 0 do 40 mV, je zesilován přístrojovým zesilovačem INA128 (Texas Instruments, USA, TX) [25]. Přístrojový zesilovač je napájen symetricky, rozsah napájení je od $\pm 2,25$ V do ± 18 V, pro účely zesílení signálu z tlakového senzoru bylo zvoleno napájení ± 15 V [26]. Minimální požadované zesílení signálu je 100, proto byl použit rezistor s nominální hodnotou 470Ω , dle vztahu zesílení, které uvádí výrobce [25].

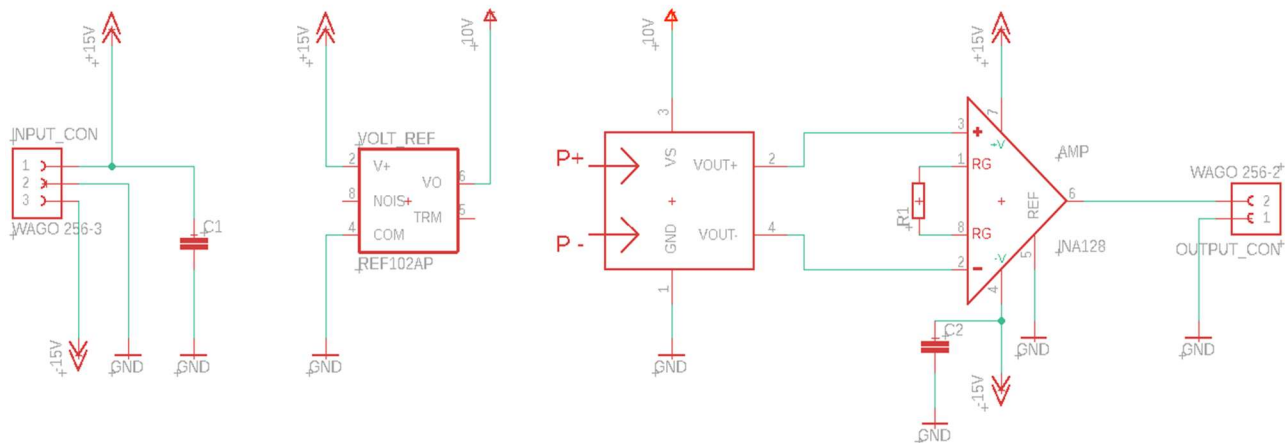
$$G = 1 + \frac{50k\Omega}{R_G}$$

kde G je zesílení (gain) a R_G je nominální hodnota rezistoru řídicího zesílení.

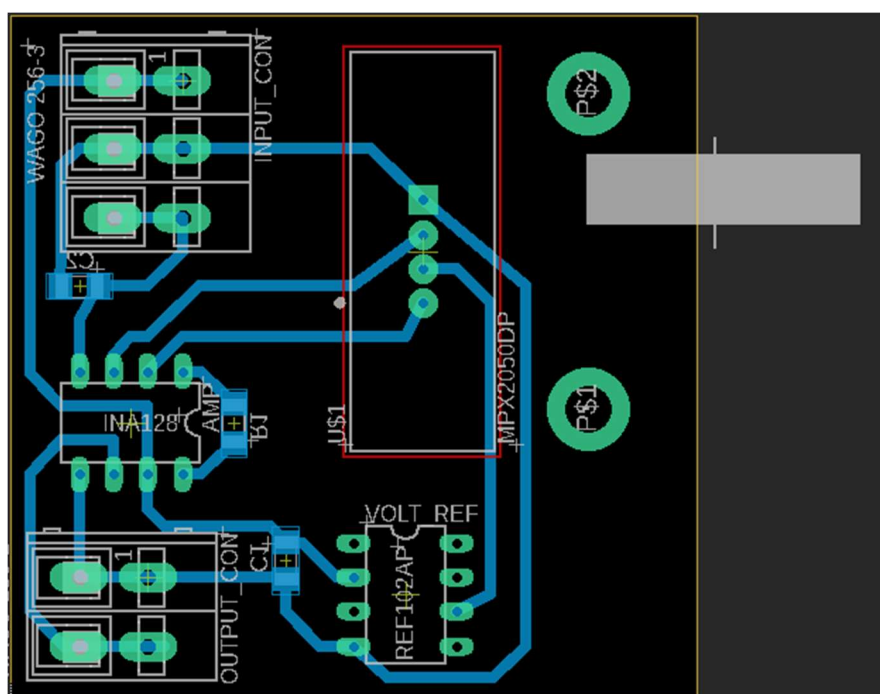
Výstup přístrojového zesilovače je přiveden na výstupní konektor, přes který jsou data o průběhu tlaku komunikována pomocí AD převodníku DAQ (National instruments, USA, TX) s programem pro úpravu periody. Referenční napětí 10 V, kterým je napájen tlakový senzor, poskytuje zdroj referenčního napětí REF102 (Texas Instruments, USA, TX) [27]. Součást REF102 byla použita z důvodu menší odchylky jmenovitého napětí. Data z tlakového senzoru jsou načítána AD převodníkem myDAQ (National instruments, USA, TX). Maximální vzorkovací frekvence převodníku je 200 vzorků za sekundu [28]. Deska plošných spojů má rozměry 50x50 mm. Program načítá a vyhodnocuje data tlaku získaných ze senzoru a na základě těchto hodnot určuje periodu tlakové stimulace v komoře v reálném čase, popř. měří maximální či průměrnou hodnotu tlaku v dynamickém systému. Celé schéma zapojení je zobrazené na obrázku 2.2

Tabulka 2.1: Přehled použitých součástek na desce plošných spojů s tlakovým senzorem

Označení součástky	Popis	Výrobce
MPX2050DP	Senzor tlaku	NPX USA
INA128	Přístrojový zesilovač	Texas Instruments
REF102	Zdroj referenčního napětí	Texas Instruments
Con_Wago_236	Vstupní konektor	Wago
Con_Wago_236	Výstupní konektor	Wago
CK 100n/63V	Stabilizační kondenzátory	-
RM 470R, 0207	Zesílení řídicí rezistor	-



Obrázek 2.4: Schéma zapojení tlakového senzoru v obvodu. Obrázek: Autor



Obrázek 2.5: Návrh desky plošných spojů s tlakovým senzorem. Obrázek: Autor

2.4 Komora pro dynamickou kultivaci kmenových buněk

Kultivační komora je navržena tak, aby umožňovala kultivaci na porézních, trojdimenzionálních substrátech, do kterých se buňky zanoří a následnou diferenciací vytvoří základ budoucí tkáně. Některé substráty mohou být i biodegradabilní, tedy časem dochází k rozpadu původního substrátu a buňky dále rostou ve vlastní vytvořené matrix. Navržená komora by měla být tedy univerzální, tedy měla by zajišťovat uchycení porézního substrátu o různé velikosti. Toto bylo při návrhu vyřešeno tak, že je možné pouhou výměnou středového dílu komory uchytit substrát různé velikosti. Vzhledem k povaze materiálu substrátu je komora navržena tak, že umožňuje dvojí typ periodické stimulace - tlakovou a průtokovou.

Návrh komory proběhl v programu Autodesk Inventor. Kultivační komora je navržena pro testování vlivu tlaku a průtoku na kmenové buňky na porézním substrátu s kruhovou podstavou, který kmenové buňky při kultivaci prorostou a vytvoří základ tkáně. Vzhledem k prostorové struktuře substrátu typu scaffold bude i výsledná tkáň trojrozměrná. Tento model je tak mnohem realističtější k dalšímu vývoji cévních náhrad. Buňky uchyceny ve struktuře scaffoldu budou stimulovány buď tlakem, nebo průtokem, zdrojem mechanické stimulace bude pístová stříkačka.

Kultivační komora se skládá z několika částí (viz Přílohy A). Díly nesoucí porézní substráty s buňkami, kterých lze na sebe vložit větší počet, se nacházejí uprostřed sestavy. V jejich středu je kruhový otvor s proděravěným dnem. Dlouhé tubusy ve dně středových dílů zajišťují laminární proudění diferenciačního média komorou, čímž simulují vnitřní prostředí cév, kde se také vyskytuje, při fyziologickém stavu, laminární proudění. Před středové díly ve směru průtoku je řazen kolimátor, který slouží k eliminaci turbulencí vznikajících při proudění média úzkým přívodem do rozměrnějšího prostředí komory. Tubusy kolimátoru, které jsou delší než tubusy středového dílu, také vytváří laminární proudění pro středové díly, ve kterých dochází ke kultivaci, jejíž proces by mohl být turbulentním prouděním negativně narušen. Víko a dno (vrchní a spodní díl) soustavy vytváří hermeticky uzavřené prostředí kultivační komory, je tak zajištěna sterilita a tlakově těsnící prostředí kultivační jamky se scaffoldy. Těsnost systému je zajištěna silikonovými O-kroužky, které se umísťují do drážek ve spodních a středových dílech komory.

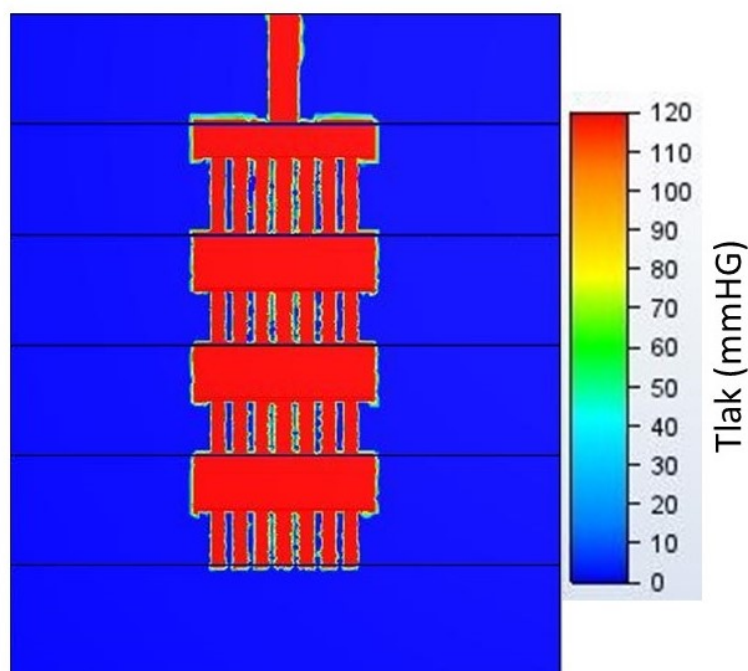
Ve víku, a při průtokové stimulaci také ve dně, lze v dílech uchytit hadicové sety, skrze které bude do komory přenášen tlak či vháněno médium. Při průtokové stimulaci bude médium cirkulovat komorou, přiváděno i odváděno bude hadicemi z víka, resp. dna komory. Při tlakové stimulaci nebude dno obsahovat otvor pro hadicové sety a bude tedy sestavu uzavírat. Sestava z jednotlivých dílů je zafixována nerezovými šrouby a křídlovými matkami.

Kultivační komora bude vyrobena z polykarbonátu, jež je snadno obrobitelný na CNC soustruhu, průhledný a snadno sterilizovatelný v autoklávu. Z důvodu

přítomnosti buněk musí být vnitřní prostředí i všechny díly komory sterilní. To je zajištěno možností všechny části komory, včetně šroubů a křídlových matic, vysterilizovat v autoklávu.

2.4.1 Simulace distribuce tlaku

Návrhy kultivační komory pro tlakovou i průtokovou stimulaci byly otestovány simulačním softwarem CFD (Computational Fluid Dynamics, Autodesk, US) z hlediska průběhu dějů v jejich vnitřním prostředí a na základě simulací byla komora upravována do finální podoby. Kultivační komora pro tlakovou stimulaci byla otestována z pohledu distribuce tlaku, který bude do vnitřního prostředí dodáván pístovou stříkačkou. Požadovaným stavem je konstantní rozložení tlaku po celém objemu tlakové komory, tak aby byly kmenové buňky ve všech středových dílech stimulovány stejným tlakem. Distribuce tlaku byla simulována s počáteční podmínkou 120 mmHg tlaku – fyziologická hodnota systolického tlaku v pažní tepně. Jako médium byla použita viskózní tekutina s podobnými parametry lidské krve.

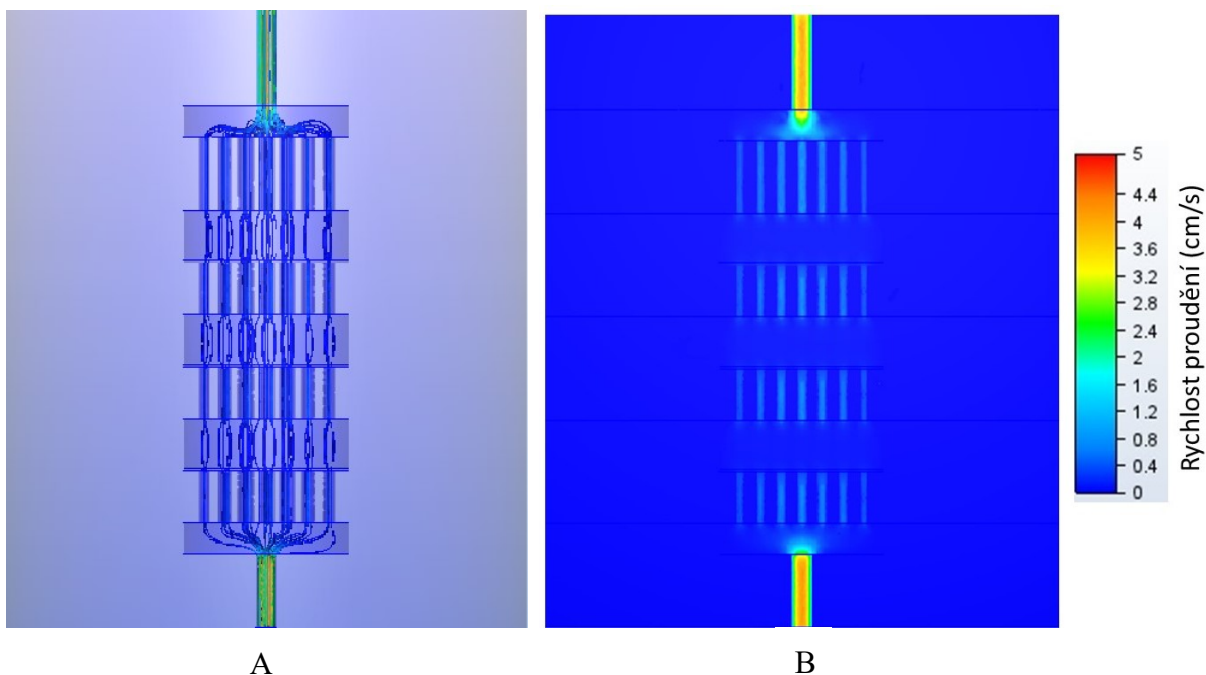


Obrázek 2.6: Distribuce tlaku v kultivační komoře při tlakové stimulaci. Obrázek: autor

2.4.2 Simulace proudění média v komoře

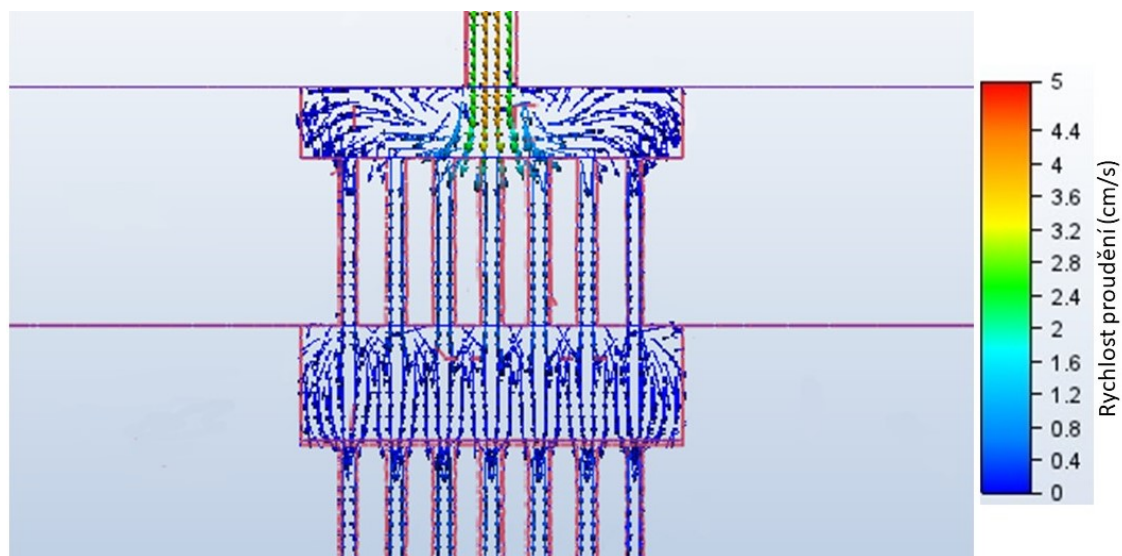
Při simulaci průtoku komorou pro průtokovou byla testována z hlediska rychlosti proudění média jednotlivými částmi komory a pozorován byl i charakter proudění ve vnitřním prostředí. Cílem je, aby proudění média bylo svým charakterem co nejbližší proudění laminárnímu. Zejména se týká středových dílů, uvnitř kterých se nacházejí porézní substráty s kultivovanými buňkami. Laminární proudění by mělo být dosaženo tenkými kapilárami, popř. je turbulentní proudění eliminováno v kolimátoru. Hodnota

počáteční podmínky objemového průtoku vtékajícího do komory byla stanovena na 5ml/min, což je přibližná hodnota perfuze v cévách s malým průměrem.



Obrázek 2.7: Simulace objemového průtoku komorou. Část A ukazuje trajektorii proudnic v komoře, část B rychlost proudění média v jednotlivých místech komory. (Program CFD na základě výpočtu objemu vnitřního prostoru komory uvádí výsledky v jednotkách cm/s).

Obrázek: autor



Obrázek 2.8: Detail vektorů rychlosti proudění v kolimátoru a středovém dílu. V otvoru pro vstup média dochází k turbulenci po stranách vnitřní dutiny, proto byl středovým dílům nesoucí porézní substráty předřazen kolimátor, ve kterém se turbulence eliminují a dlouhými kapilárami se tvoří laminární proudění pro středové díly. Obrázek: autor

2.5 Buněčné experimenty

Navržená kultivační komora byla ověřená při dynamických experimentech a výsledky byly srovnány se statickou kulturou. Primárním účelem experimentů je validace funkčnosti kultivační komory, testování manipulace s komorou a odolnosti sterilizace v autoklávu. Sekundárně lze pak stanovit vliv dynamické kultivace na diferenciaci kmenových buněk ve srovnání se statickými kulturami.

Pro tento účel byl jeden substrát kultivován dynamicky, jeden staticky, po dobu 9 dní, přičemž v případě dynamické kultury probíhala kultivace první dva dny staticky, aby došlo k uchycení buněk k poréznímu substrátu, které byly sterilizovány pomocí gama záření. Hybridní porézní substrát byl vyroben z kolagenu a oxycelulózy. Kdyby nedošlo k této počáteční statické fázi, buňky by se při působícím tlaku nebo průtoku hned od začátku kultivace nebyly schopné uchytit vláken scaffoldu a buď by rostly na dně komory, nebo by došlo k apoptóze (programované buněčné smrti). Po 2 dnech statické kultivace byla buněčná kultura 4 dny stimulována tlakem 120/80 torr (tj. 16,0/10,7 kPa) při periodě 1 Hz, další 3 dny průtokem 5 ml/min.

Byla použita třetí pasáž mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z tuku (ASC) z prasete domácího, přičemž buňky byly předem staticky rozpěstovány do dostatečného počtu pro násadu do dynamického systému. Pro dynamickou kultivaci i statickou kontrolu bylo použito kultivační médium DMEM s přísadami pro diferenciaci do hladké svaloviny (DMEM + 10% fetální bovinní sérum, 1% gentamycin, 50 ug/ml kyselina askorbová, 2,5 ng/ml TGF- β 1, 2,5 ng/ml BMP4). Buňky byly do substrátu nasazeny v koncentraci 0,5 mil/ml. Kultivace probíhala při konstantních podmínkách v inkubátoru – při 37 °C a 5% atmosféře CO₂.

Po ukončení kultivace byl substrát s buňkami z každé kultivace rozdělen na dvě poloviny. Jedna polovina byla dále zafixována metanolem a nabarvena barvami DAPI a phalloidin k zobrazení jader a cytoskeletu, druhá polovina byla zlyzována RIPA bufferem a byla provedena analýza proteinových markerů metodou Western blot, přičemž množství proteinu ve vzorku bylo stanoveno sadou Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher scientific, MA, US).

3 Výsledky

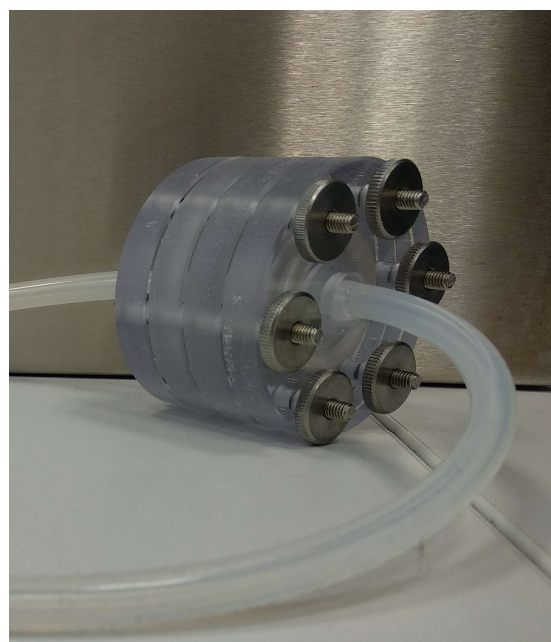
V rámci bakalářské práce projektu byl rozšířen současný systém pro mechanickou stimulaci na porézních substrátech novou kultivační komorou pro kombinovanou stimulaci tlakem a průtokem a programem pro úpravu periody cyklického namáhání buněk v kultivační komoře. Kultivační komora umožňuje stimulaci dvojího charakteru – průtokovou a tlakovou. Program v jazyce LabVIEW získává hodnoty z tlakového senzoru umístěné na desce plošných spojů, které následně zpracovává a na jejich základě upravuje chod motoru v řídicím programu mechanické zátěže. Úpravy systému byly následně ověřeny při buněčných experimentech na základě obrazových dat a analýzy diferenciačních markerů.

3.1 Kultivační komora

Komora byla zhotovena na CNC soustruhu. Je vyrobená z polykarbonátu. Prostředí komory se během pokusů projevilo jako netoxické k buněčným kulturám i díky možnosti kompletní sterilizace jednotlivých dílů v autoklávu bez poškození. Otestována byla funkčnost obou forem komory – její tlakové i průtokové verze.



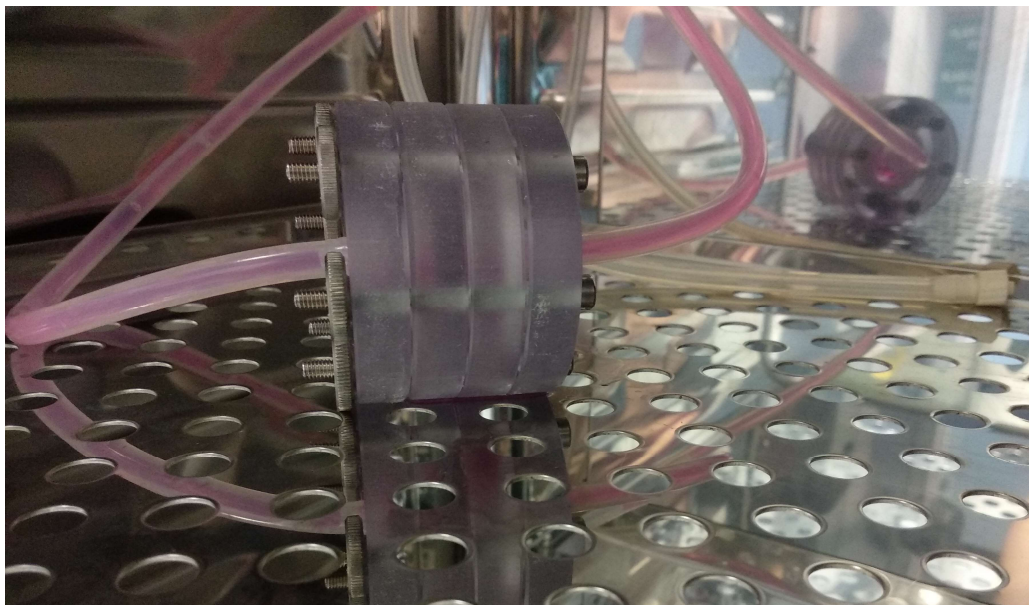
A



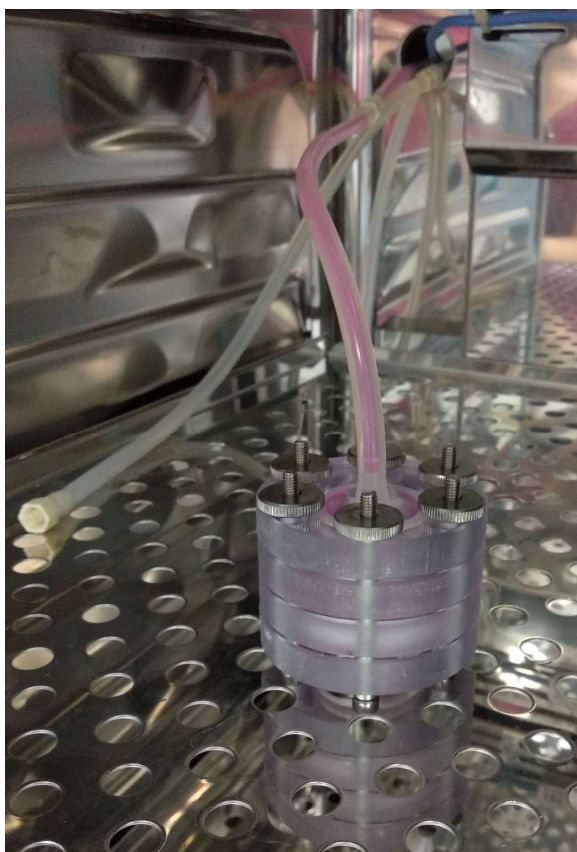
B

Obrázek 3.1: Kultivační komora. V části A je tlaková verze komory, V části B je průtoková verze komory. Obrázek: Ing. Jana Štěpanovská

3.2 Dynamický systém pro kultivaci buněk



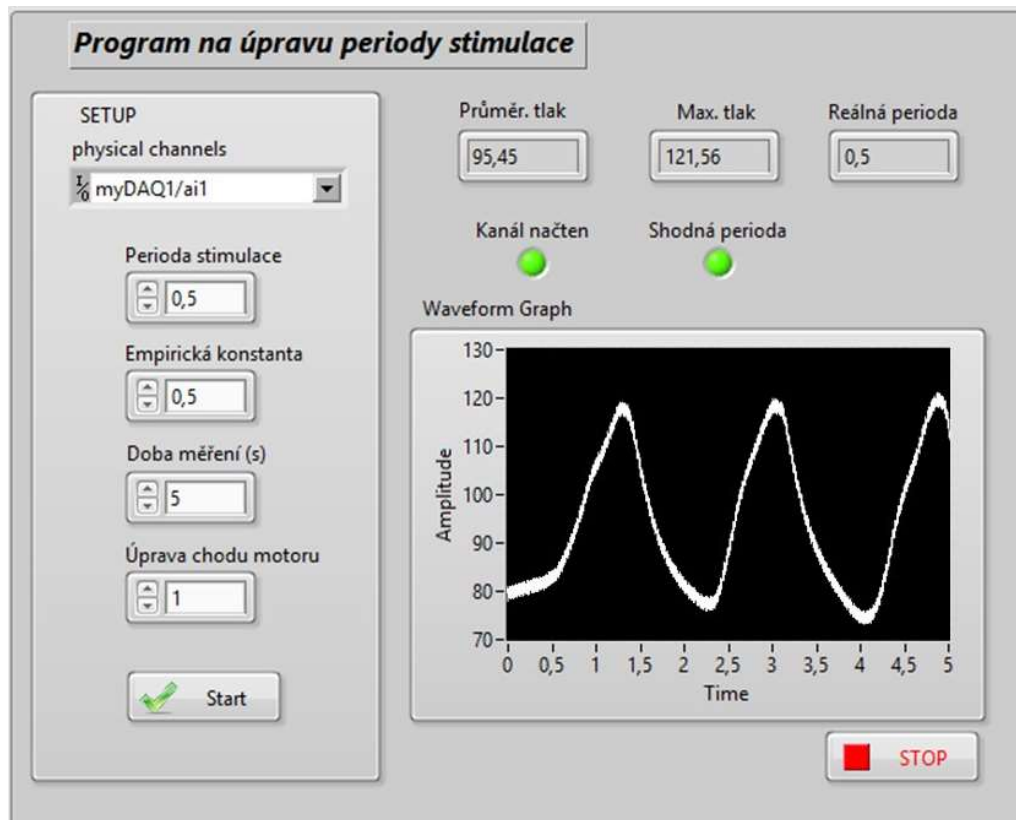
Obrázek 2.3: Průtoková kultivační komora vložena do inkubátoru. Obrázek: Ing. Jana Štěpanovská



Obrázek 2.4: Tlaková kultivační komora vložena do inkubátoru. Obrázek: Ing. Jana Štěpanovská

3.2.1 Program upravující periodu mechanické stimulace

Software pro úpravu periody stimulace byl vytvořen v jazyce Labview od National Instruments. Program komunikuje s hlavním řídicím softwarem pomocí sdílené proměnné. Data o průběhu tlaku v komoře načítá z desky plošných spojů se senzorem tlaku MPX2050DP. Na obrázku 2.3 je zobrazeno uživatelské prostředí vytvořeného programu. V jeho levé části je panel s nastavitelnými parametry, činnost se spouští tlačítkem ‘Start’. V pravé části se nachází indikátory parametrů stimulace a graf, který zobrazuje průběh tlaku v komoře.



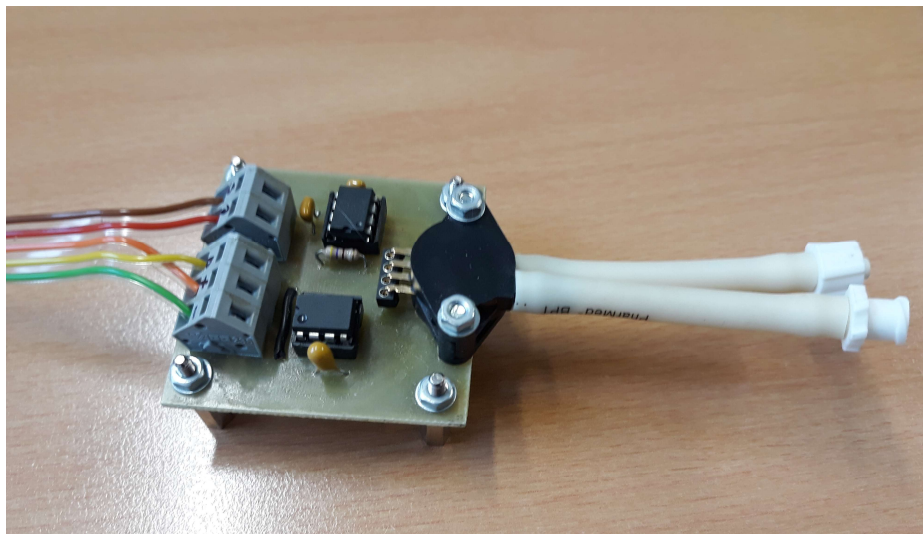
Obrázek 2.3: Uživatelské prostředí programu pro úpravu periody mechanické stimulace.

Obrázek: Autor

3.2.2 Deska plošných spojů

Deska plošných spojů byla navržena a vytvořena. Tlakový senzor MPX2050DP měří diferenciální tlak mezi oběma jeho vstupy. Z tohoto důvodu se na senzoru nacházejí dva náustky pro hadice pro přenos dvou různých tlaků. Pro potřeby experimentu vedl jeden vstup z kultivační komory a druhý byl otevřen. Tlak v komoře byl tedy měřen vůči atmosférickému tlaku. Závislost tlaku na napětí je lineární, proto je přepočten z napětí na tlak proveden pomocí kalibrační přímky. Kalibrační rovnice byla získána z hodnot kalibrátoru tlakového senzoru a pro vyrobenou desku plošných spojů se rovná:

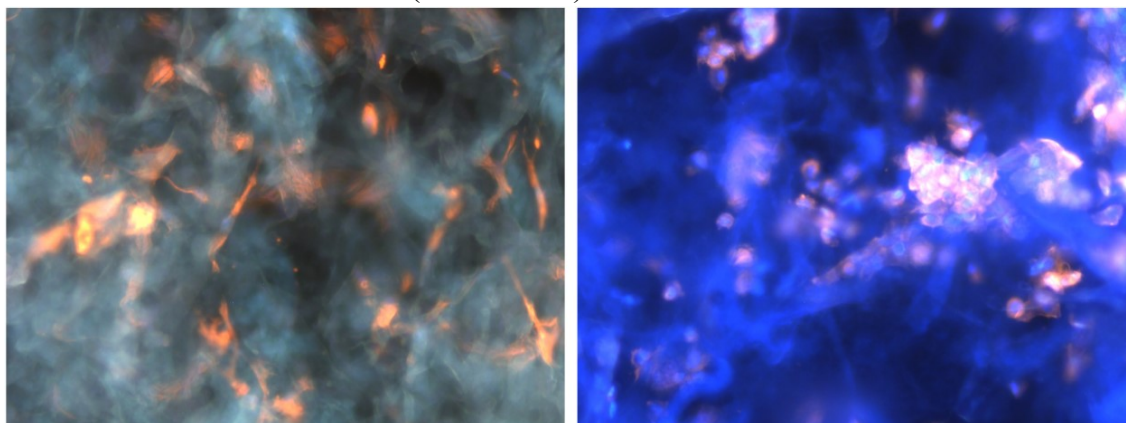
$$p = 81,462 \cdot U + 4,052$$



Obrázek 3.2: Deska plošných spojů se senzorem tlaku. Obrázek: Autor

3.3 Buněčné experimenty

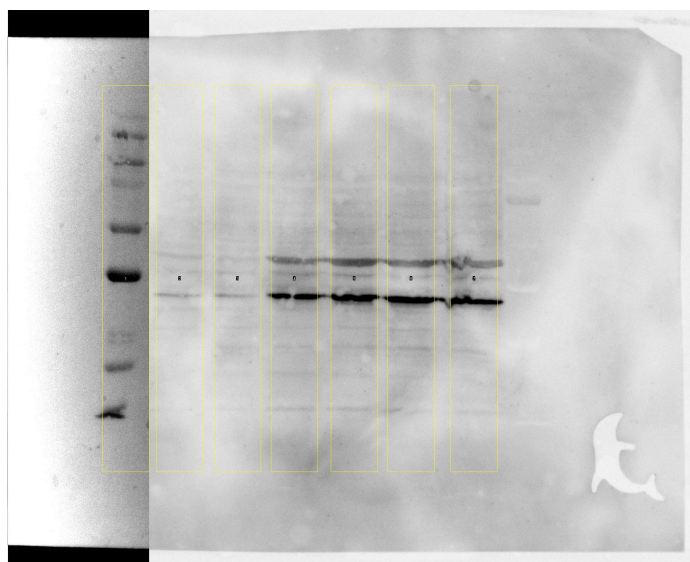
Primární cíl buněčných experimentů byl otestovat komoru a navržené úpravy systému. Sekundárním cílem bylo otestovat vliv tlakové simulace na diferenciaci kultury kmenových buněk směrem k buňkám hladké svaloviny. Vzorek substrátu statické kultivace byl 9 dní vložen v inkubátoru, vzorek substrátu dynamické kultivace byl stimulován kombinovaně tlakem a následně průtokem. Porovnání statické a dynamické kultury proběhlo dvěma metodami – zobrazením nabarvených, zafixovaných substrátů fluorescenčním mikroskopem (viz Obr. 3.3) a provedením analýzy diferenciačních markerů metodou Western blot (viz Obr. 3.4).



(a) Dynamická kultura

(b) Statická kultura

Obrázek 3.3: Buněčné kultury zobrazeny fluorescenčním mikroskopem po 9 dnech kultivace, oranžově jsou zbarveny buňky hladké svaloviny. V dynamické kultuře pozorujeme lépe tvarované a nasměrované buňky než ve statické kultuře, kde jsou buňky hladké svaloviny bez výrazného tvaru a nasměrování. Obrázek: Ing. Jana Štěpanovská



Obrázek 3.4: Analýza diferenciačních markerů. Byly použity dva vzorky – jeden statický (druhý a třetí sloupec zleva) a dynamický (čtyři sloupce napravo od statických kultivací). První sloupec je proteinový marker. Dva výrazné proužky uprostřed jsou markery connexin a α -aktin. Vyšší kontrast proužků u dynamické kultivace značí vyšší produkci proteinů, a tedy větší diferenciaci buněk k SMC. Obrázek: Ing. Jana Štěpanovská

4 Diskuse

Hlavní výsledkem práce je úprava dynamického systému s mechanickou kultivací vytvořeného v BIOCEV. Tato úprava spočívá ve vytvoření nové komory pro dynamickou kultivaci s mechanickou stimulací a tvorbou programu pro úpravu periody stimulace. Navržené úpravy byly otestovány při buněčných experimentech s tlakovou a průtokovou stimulací. Kultivační komora se skládá ze čtyř dílů: víka, kolimátoru, středového dílu a dna komory, které je rozdílné pro tlakovou a průtokovou stimulaci (viz přílohy). V průběhu tvorby návrhu komory bylo při simulaci průtoku v CFD zjištěno, že v místě vstupu média do vnitřního prostředí komory vzniká turbulentní proudění, které není v cévách za normálních podmínek fyziologické (viz obr. 2.8). Z tohoto důvodu byl do sestavy zařazen kolimátor jako předřadná součást k středovým dílům. Účelem kolimátoru je eliminovat turbulentní proudění a dlouhými kapilárami vytvořit proudění laminární pro ty části komory, ve kterých se vyskytují porézní substráty s nasazenými buňkami, pro něž je laminární proudění fyziologické.

Při buněčných experimentech bylo prokázáno, že polykarbonát je z materiálového hlediska vhodný pro kultivační komoru, protože vnitřní prostředí není toxické pro buněčné kultury, což je dáno možností opakovaně sterilizovat polykarbonátové díly v autoklávu bez jejich poškození. Stejně vlastnosti modulárních polykarbonátových komor uvádějí i [30] a [31]. Výhodou komory je její modularita, díky níž není nutné mít speciální bioreaktory pro průtokové i mechanické namáhání, změna charakteru komory se mění pouze použitím jiného typu dna komory. Modularita komory umožňuje i použití porézních substrátů různých velikostí, čehož se docílí použitím středových dílů s jinou velikostí lůžek pro scaffoldy. Komora by bylo možné vylepšit uzavíratelným otvorem na víku, které by sloužilo k vyrovnání tlaků při aplikaci buněčné suspenze do komory. Pro lepší manipulaci s díly komory při sestavování by do děr pro šrouby měly být vloženy závitové vložky, tak aby byly šrouby pevně přichycené v jednotlivých dílech.

Při buněčných experimentech v tlakovém dynamickém systému byl ověřeno, že software pro úpravu periody cyklického namáhání, který je navržen tak, aby reguloval chod motoru, skutečně udržuje periodu stimulace v průběhu experimentů, kromě krátkých momentů regulace, časově stálou. Z důvodu komplikovaného řešení oboustranné komunikace programů byla k softwaru pro úpravu periody stimulace navržena deska plošných spojů se senzorem tlaku, která poskytuje programu informace o průběhu tlaku v komoře. Software tedy pracuje v reálném čase na základě nezávisle získaných hodnot tlaku. Jednostranná komunikace desky plošných spojů a programu, která je realizována přes AD převodník myDAQ, funguje správně stejně jako jednostranná komunikace softwaru pro úpravu periody a řídicího programu přes sdílenou proměnnou. Do budoucna by bylo dobré vylepšit ovládání programu z hlediska parametrů, které nastavuje uživatel. V současném stavu je pro správné nastavení vstupních parametrů nutné znát vlastnosti použitého motoru, který pohání pístovou

stříkačku, a také jakým způsobem řídicí program ovládá chod motoru. Tohoto vylepšení by mohlo být docíleno např. automatickým dopočítáváním jednoho z parametrů na základě vztahu s parametrem zadaným uživatelem. Ke zlepšení programu by také vedlo přidání hlášek a komunikačních dialogů s uživatelem, které by uživatele lépe informovaly o probíhajícím procesu, popř. o případných problémech při práci softwaru. Pro lepší funkci je také nutné upravit časové řízení programu a návaznost procesů na sobě závislých (měření reálné periody z dat, porovnávání period, úprava chodu motoru).

Při buněčných experimentech v dynamických systémech bylo cílem, kromě ověření funkčnosti komory a systému pro úpravu periody namáhání, také pozorovat vliv mechanického namáhání na diferenciaci kmenových buněk do hladké svaloviny. Výsledky analýzy markerů (Obr. 3.3 a Obr. 3.4) ukazují, že buňky v celulóznicích substrátech kultivované v komoře s tlakovou i průtokovou stimulací dobře diferencují do hladké svaloviny lépe než v případě statické kultury. Buněčné kultury získané z experimentů s průtokovou stimulací vykazují více uspořádanou orientaci buněk korelující se směrem průtoku. Studie [32], která porovnávala vliv kultivace při pulzní průtokové stimulaci (frekvence 75 bpm, 70-80 ml/min) se statickou kulturou, udává stejné výsledky, navzdory použití jiné metody pulzní stimulace a volby jiných parametrů průtoku. Studie [23] používá podobný dynamický systém jako studie [32]. Výsledky této studie, která kromě statické kultury porovná také stimulaci s konstantním a pulzním průtokem, potvrzují lepší diferenciaci kmenových buněk ve srovnání stimulace konstantním průtokem a statickou kulturou. Ovšem také ukazují, že kultura kmenových buněk stimulována s dynamickým (pulzním) průtokem vykazuje lepší diferenciaci do hladké svaloviny než kultura stimulovaná statickým průtokem. Experimenty, které by srovnaly vliv pulzního a konstantního průtoku při kultivaci, by do budoucna mohly být provedeny také v dynamickém systému využitém v této práci. Obě práce, i některé další studie [17], používají jiné bioreaktory i parametry stimulace (vyšší frekvence, větší objemový průtok) než jaké byly použity v této studii, ovšem závěry studií z hlediska významu mechanické stimulace při experimentech jsou srovnatelné s touto prací. Pro porovnání významu parametrů stimulace s uvedenými výzkumy či efektivitu použitých bioreaktorů, by musely být provedeny delší pokusy. Ze studií nicméně vyplývá, že fyzikální vlastnosti prostředí má na chování buněk při kultivaci kritický vliv. V bioreaktorech, které podporují dynamickou kultivaci, dochází k lepšímu přenosu molekul v kapalném médiu do porézního substrátu, což vytváří vhodnější prostředí pro proliferaci buněk. Tlak či průtok zvyšují kromě proliferace buněk také syntézu proteinů mimobuněčné matrice. Důvodem, proč dynamické buněčné kultury vykazují zlepšené vlastnosti oproti statickým, může být fakt, že dynamické systémy lépe napodobují fyziologické prostředí pro tvorbu tkáně hladké svaloviny a moderují tak přirozené děje v lidském těle.

Použité porézní substráty vytvořené ze směsi oxycelulózy a kolagenu byly vybrány z důvodů vhodných vlastností pro tkáňové inženýrství uvedených v [13]. Kolagenová matrice podporuje adhezi buněk a poskytuje biochemické a fyzikální podněty pro nově vznikající buňky. Kolagenové i celulózní substráty jsou biokompatibilní a splňují požadované biomechanické vlastnosti a lze je kombinovat s jinými materiály při tvorbě hybridních substrátů. Výhodou kolagenového substrátu je také biodegradabilita v lidském těle, což jej činí vhodným materiálem pro tvorbu lidských štěpů [29].

5 Závěr

V rámci této práce byl upraven stávající systém stimulace kmenových buněk při jejich diferenciaci do hladké svaloviny. Navržena byla nová kultivační komora, která umožňuje stimulaci tlakem i průtokem. Softwarové i hardwarové úpravy systému zpřesňují parametry tlakové stimulace. Perioda mechanické namáhání je upravena programem tak, aby byla po její konvergenci k zadané periodě uživatelem, již dále neměnná a zůstala po celou dobu stimulace konstantní. K získání informací o hodnotě tlaku z kultivační komory byla vytvořena deska plošných spojů se senzorem tlaku, jehož hodnoty jsou posílány a zpracovávány v navrženém programu.

Komora i úpravy systému stimulace byly ověřeny krátkodobým buněčným experimentem, které potvrdily funkčnost úprav. Optimální parametry stimulace byly dle literární rešerše stanoveny na 120/80 mmHg s frekvencí 1 Hz při tlakové stimulaci [6] a 3-5 ml/min při průtokové stimulaci [33]. Během pokusů byla ověřena také biologická nezávadnost komory. Experiment také naznačil, že mechanická stimulace je podstatným faktorem při kultivaci buněčných kultur, který zlepšuje diferenciaci kmenových buněk směrem k buňkám hladké svaloviny. Pro potvrzení výsledku této je potřeba provést další pokusy.

Seznam použité literatury

- [1] The top 10 causes of death. *World Health Organization* [online]. 2018, 24 May 2018 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- [2] TOWNSEND, Nick, Lauren WILSON, Prachi BHATNAGAR, Kremlin WICKRAMASINGHE, Mike RAYNER a Melanie NICHOLS. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *European Heart Journal* [online]. 2016, **37**(42), 3232-3245 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw334. ISSN 0195-668X. Dostupné z: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1093/eurheartj/ehw334>
- [3] Cardiovascular diseases. *World Health Organization* [online]. WHO, 2017, 17 May 2017 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- [4] WHO Mortality Database. *World Health Organization* [online]. WHO, 2018, 2018 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: https://www.who.int/healthinfo/mortality_data/en/
- [5] RAFIEIAN-KOPAEI, Mahmoud, Mahbubeh SETORKI, Hamid NASRI a Abdollah BARADARAN. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med* [online]. 5 August 2014 [cit. 2019-05-10]. DOI: PubMed PMID: 25489440. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25489440>
- [6] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. 2. upr. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2001. ISBN 80-7169-970-5.
- [7] DYLEVSKÝ, Ivan. *Základy funkční anatomie člověka*. Praha: Manus, 2007. ISBN 978-80-86571-00-3.
- [8] BACAKOVA, Lucie, Martina TRAVNICKOVA, Elena FILOVA, Roman MATĚJKA, Jana STEPANOVSKA, Jana MUSILKOVA, Jana ZARUBOVA a Martin MOLITOR. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in the Physiology and Pathophysiology of Blood Vessels. SAKUMA, Kunihiro, ed. *Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field* [online]. InTech, 2018, 2018-10-10 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.5772/intechopen.77115. ISBN 978-1-78984-005-6. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/muscle-cell-and-tissue-current-status-of-research-field/the-role-of-vascular-smooth-muscle-cells-in-the-physiology-and-pathophysiology-of-blood-vessels>

- [9] BAIGUERA, Silvia, Luca URBANI a Costantino DEL GAUDIO. *Tissue Engineered Scaffolds for an Effective Healing and Regeneration: Reviewing Orthotopic Studies* [online]. 2014, **2014** [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1155/2014/398069. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4163448/>
- [10] HILDRETH, Cade. Do You Know The 5 Types Of Stem Cells?. *Bioinformant* [online]. 2017 [cit. 2018-11-07]. Dostupné z: <https://bioinformant.com/do-you-know-the-5-types-of-stem-cells-by-differentiation-potential/#blood>
- [11] Types of stem cells. *A closer look at stem cells* [online]. [cit. 2018-11-04]. Dostupné z: <http://www.closerlookatstemcells.org/learn-about-stem-cells/types-of-stem-cells>
- [12] BLEWITT, Matthew J. a Rebecca Kuntz WILLITS. The Effect of Soluble Peptide Sequences on Neurite Extension on 2D Collagen Substrates and Within 3D Collagen Gels. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. 2007, **35**(12), 2159-2167 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1007/s10439-007-9389-4. ISSN 0090-6964. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10439-007-9389-4>
- [13] O'BRIEN, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* [online]. 2011, **14**(3), 88-95 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X. ISSN 13697021. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S136970211170058X>
- [14] FAROOQUE, Tanya M., Charles H. CAMP, Christopher K. TISON, Girish KUMAR, Sapun H. PAREKH a Carl G. SIMON. Measuring stem cell dimensionality in tissue scaffolds. *Biomaterials* [online]. 2014, **35**(9), 2558-2567 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.092. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961213015883>
- [15] XIE, Chang-Qing, Raquel P. RITCHIE, Huarong HUANG, Jifeng ZHANG a Y. Eugene CHEN. Smooth muscle cell differentiation in vitro: Models and underlying molecular mechanisms. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 2011, **2011**, 1485–1494 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.221101. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3123451/>
- [16] GONG, Zhaodi a Laura E. NIKLASON. Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). *The FASEB Journal* [online]. 2008, **2008**(22) [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1096/fj.07-087924. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2605790/>
- [17] WANG, Chen, Lian CEN, Shuo YIN, Qihai LIU, Wei LIU, Lei CUI a Yilin CAO. 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, **2010**(4) [cit. 2018-11-07]. DOI:

- 10.1016/j.biomaterials.2009.09.086. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961209010540>
- [18] 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2009, **2009**(3) [cit. 2018-11-07]. DOI: 0.1016/j.bbrc.2009.08.072. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X09016404>
- [19] LI, Na, Hanna SANYOUR, Tyler REMUND, Patrick KELLY a Zhongkui HONG. Vascular extracellular matrix and fibroblasts-coculture directed differentiation of human mesenchymal stem cells toward smooth muscle-like cells for vascular tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2018, 1 December 2018, **2018**(93), 61-69 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1016/j.msec.2018.07.061. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493118319386>
- [20] EOH, Joon H., Nian SHEN, Jacqueline A. BURKE, Svenja HINDERER, Zhiyong XIA, Katja SCHENKE-LAYLAND a Sharon GERECHT. Enhanced elastin synthesis and maturation in human vascular smooth muscle tissue derived from induced-pluripotent stem cells. *Acta Biomaterialia* [online]. 2017, **52**, 49-59 [cit. 2018-11-21]. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.01.083. ISSN 17427061. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28163239>
- [21] LUO, Jiesi, Lingfeng QIN, Mehmet H. KURAL, et al. Vascular smooth muscle cells derived from inbred swine induced pluripotent stem cells for vascular tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2017, **147**, 116-132 [cit. 2018-11-21]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.09.019. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961217306026>
- [22] GHEZZI, Chiara E., Paul-André RISSE, Benedetto MARELLI, Naser MUJA, Jake E. BARRALET, James G. MARTIN a Showan N. NAZHAT. An airway smooth muscle cell niche under physiological pulsatile flow culture using a tubular dense collagen construct. *Biomaterials* [online]. 2013, **34**(8), 1954-1966 [cit. 2018-11-21]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.11.025. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961212012690>
- [23] MUN, Cho Hay, Youngmee JUNG, Sang-Heon KIM, Hee Chan KIM a Soo Hyun KIM. Effects of Pulsatile Bioreactor Culture on Vascular Smooth Muscle Cells Seeded on Electrospun Poly (lactide-co-ε-caprolactone) Scaffold. *Artificial Organs*. 2013, **37**(12), E168-E178. DOI: 10.1111/aor.12108. ISSN 0160564X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/aor.12108>

- [24] Blood Vessel Structure and Function. *Lumen Learning* [online]. [cit. 2018-11-21]. Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/boundless-ap/chapter/blood-vessel-structure-and-function>
- [25] *NXP USA Inc.* [online katalogový list]. MPX2050 Series. 2008 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.digikey.com/product-detail/en/nxp-usa-inc/MPX2050DP/MPX2050DP-ND/218653620>
- [26] *Texas Instruments Inc.* [online katalogový list]. INA12x Precision, Low-Power Instrumentation Amplifiers. 2019 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <http://www.ti.com/product/INA128/technicaldocuments>
- [27] *Texas Instruments Inc.* [online katalogový list]. 10V Precision Voltage Reference. 2009 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <http://www.ti.com/product/REF102>
- [28] *National Instruments Corporation* [online katalogový list]. NI myDAQ. 2014 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.ni.com/cs-cz/shop/select/mydaq-student-data-acquisition-device>
- [29] GLOWACKI, Julie a Shuichi MIZUNO. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers* [online]. 2008, **89**(5), 338-344 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1002/bip.20871. ISSN 00063525. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.20871>
- [30] KLOKE, A., S. RUBENWOLF, C. BÜCKING, J. GESCHER, S. KERZENMACHER, R. ZENGERLE a F. VON STETTEN. A versatile miniature bioreactor and its application to bioelectrochemistry studies. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2010, **25**(12), 2559-2565 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.1016/j.bios.2010.04.014. ISSN 09565663. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566310001843>
- [31] SCHOLZ, J. a S. SUPPMANN. A re-usable wave bioreactor for protein production in insect cells. *MethodsX* [online]. 2016, **3**, 497-501 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.1016/j.mex.2016.08.001. ISSN 22150161. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2215016116300280>
- [32] XU, Zhi C., Wen J. ZHANG, Hong LI, Lei CUI, Lian CEN, Guang D. ZHOU, Wei LIU a Yilin CAO. Engineering of an elastic large muscular vessel wall with pulsatile stimulation in bioreactor. *Biomaterials* [online]. 2008, **29**(10), 1464-1472 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.11.037. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961207009799>
- [33] SCHUERLEIN, Sebastian, Thomas SCHWARZ, Steffan KRZIMINSKI, et al. A versatile modular bioreactor platform for Tissue Engineering. *Biotechnology Journal* [online]. 2017, **12**(2) [cit. 2019-05-14]. DOI: 10.1002/biot.201600326. ISSN 18606768. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.201600326>

Seznam příloh

- A. Výkresy kultivačních komor
- B. Schéma desky plošných spojů se senzorem tlaku
- C. Obsah příloženého CD

Obsah přílohy A

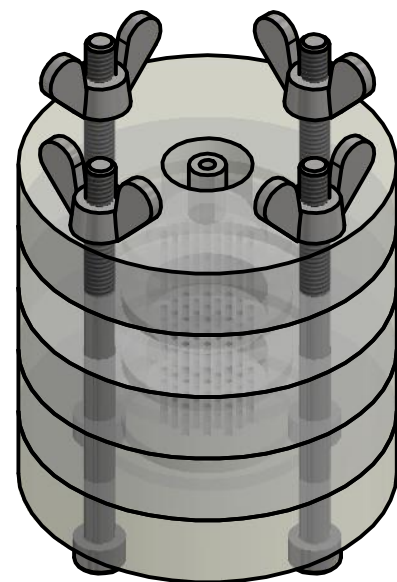
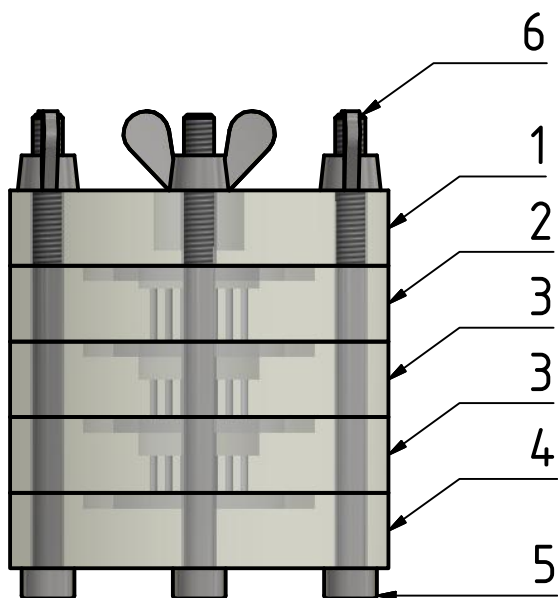
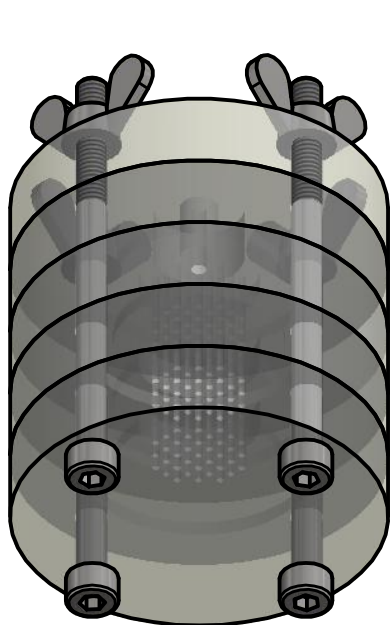
Tlaková komora


- Číslo výkresu 1 – Víko komory
- Číslo výkresu 2 – Kolimátor
- Číslo výkresu 3 – Středový díl
- Číslo výkresu 4 – Dno komory

Průtoková komora

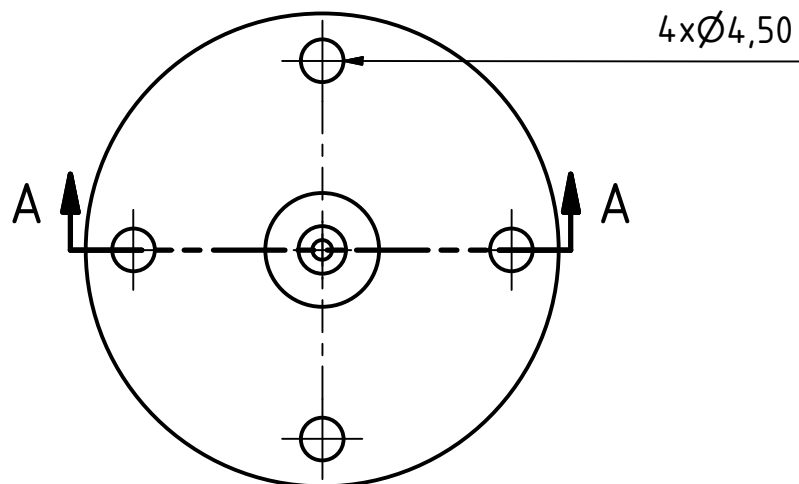
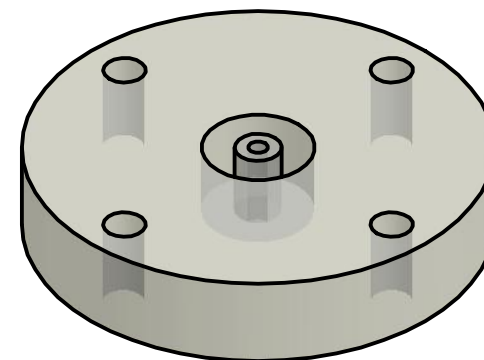
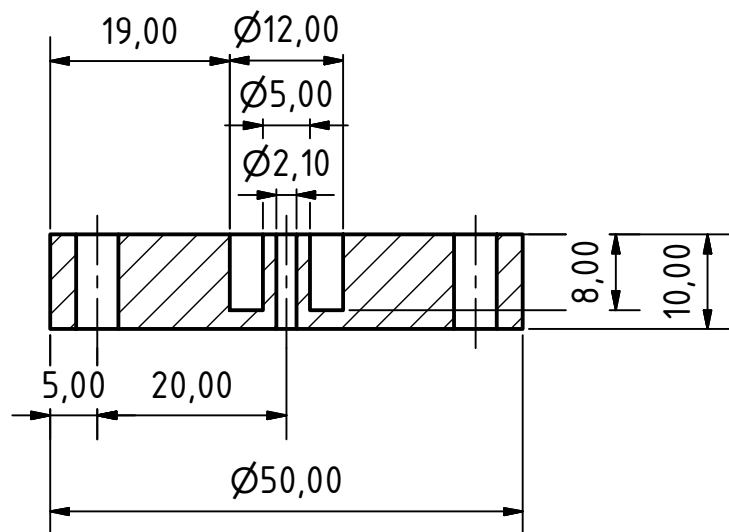
- Číslo výkresu 1 – Víko komory
- Číslo výkresu 2 – Kolimátor
- Číslo výkresu 3 – Středový díl
- Číslo výkresu 4 – Dno komory


KUSOVNÍK		
POLOŽKA	KS	ČÍSLO SOUČÁSTI
1	1	Víko komory
2	1	Kolimátor
3	2	Středový díl
4	1	Dno komory
5	4	Sroub M4x50
6	4	Křídlová matice



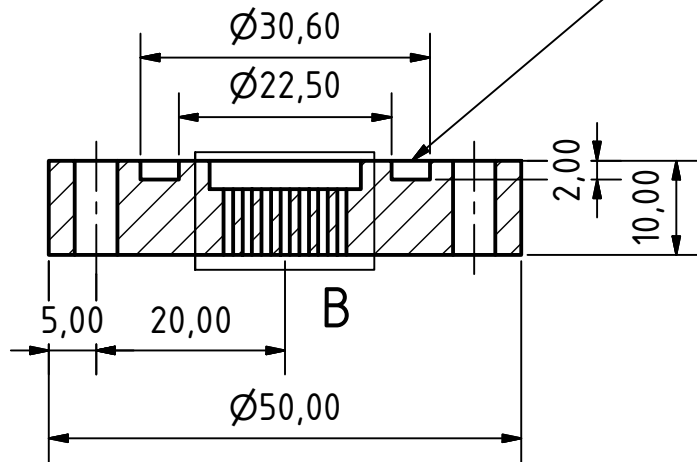
	Datum	Jméno	
Nakreslen	23. 4. 2019	Samuel Maduda	
Kontrola	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Schválil	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Tlaková komora			
			1 : 1
			A4

A-A (1,25 : 1)

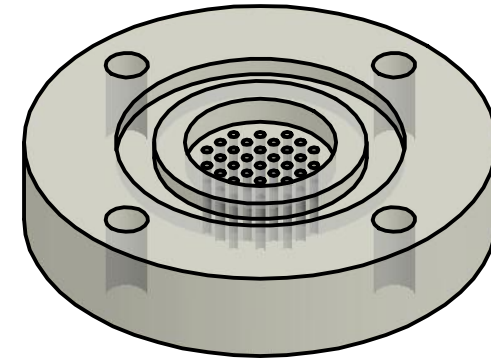


	Datum	Jméno	
Nakreslen	23. 4. 2019	Samuel Mařuda	
Kontrola	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Schválil	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Víko komory			1
			1,25 : 1 A4

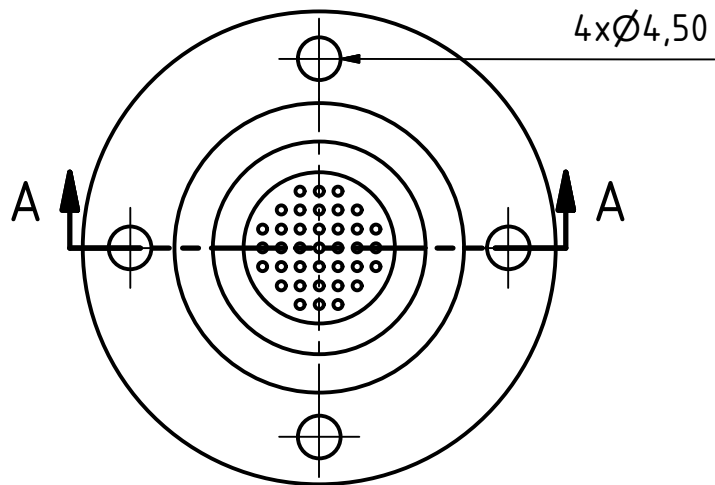
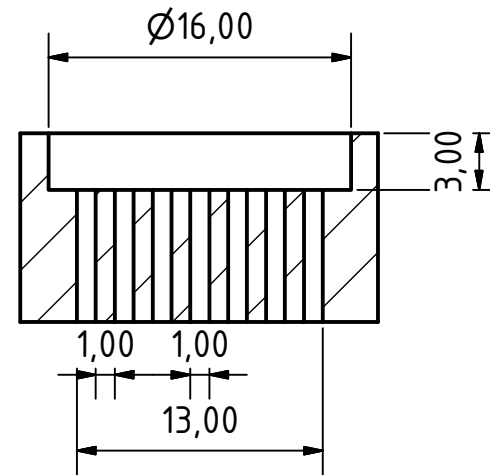
A-A (1,25 : 1)




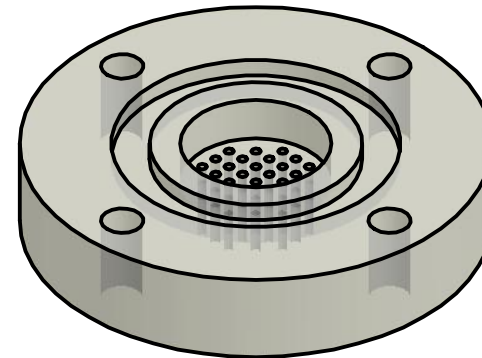
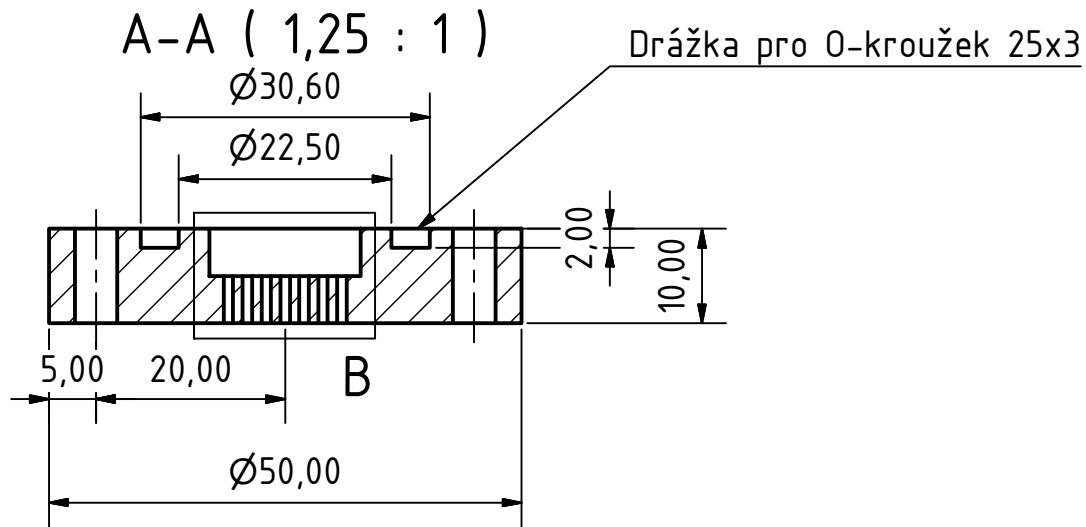
Drážka pro O-kroužek 25x3



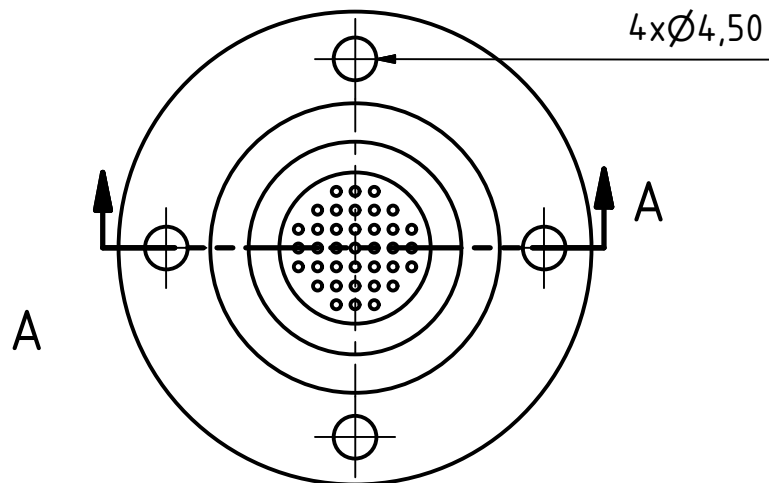
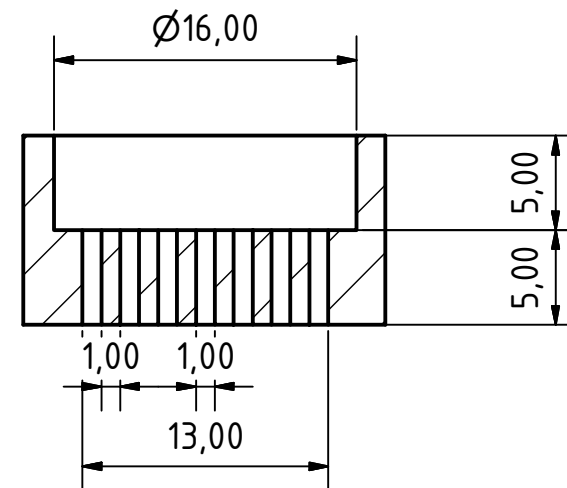
B (2,50 : 1)



	Datum	Jméno	
Nakreslen	23. 4. 2019	Samuel Maduda	
Kontrola	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Schválil	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Kolimátor			2
			1,25 : 1 A4



B (2,50 : 1)



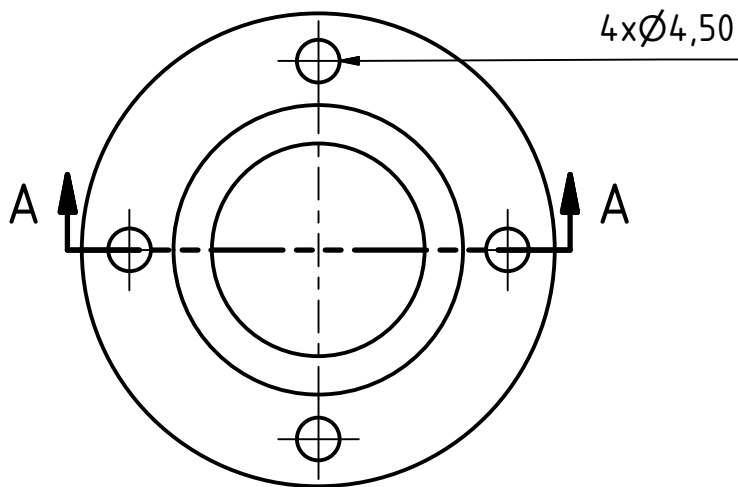
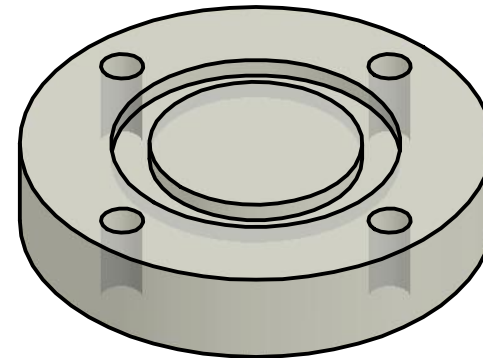
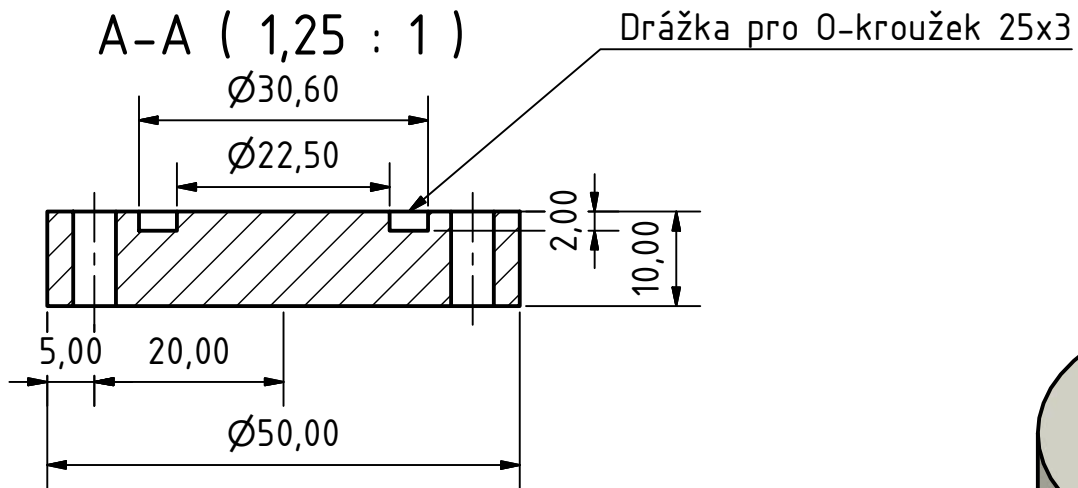
	Datum	Jméno
Nakreslen	23. 4. 2019	Samuel Maduda
Kontrola	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská
Schválil	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská

ČVUT
FBMI

Středový díl

3

1,25 : 1 | A4



	Datum	Jméno
Nakreslen	23. 4. 2019	Samuel Maduda
Kontrola	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská
Schválil	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská

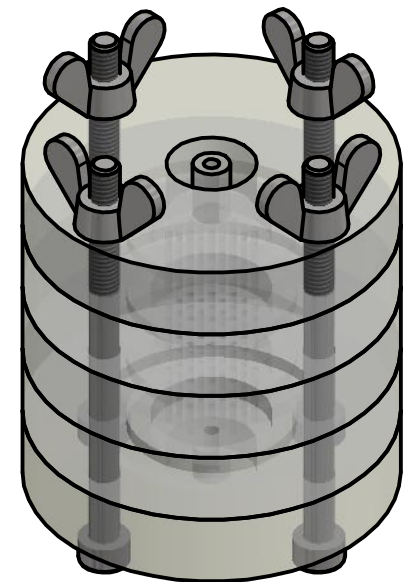
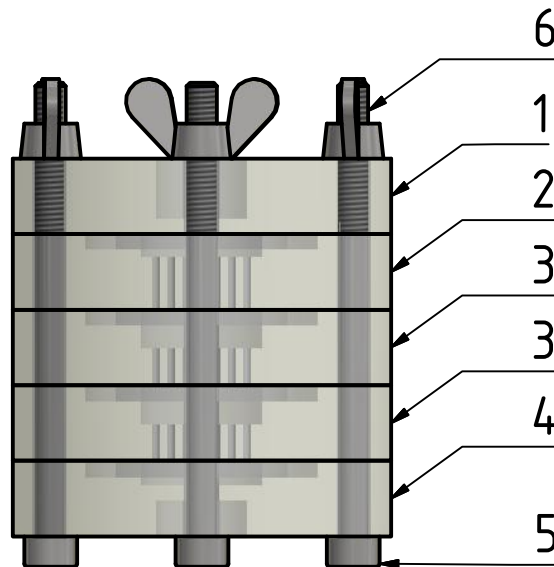
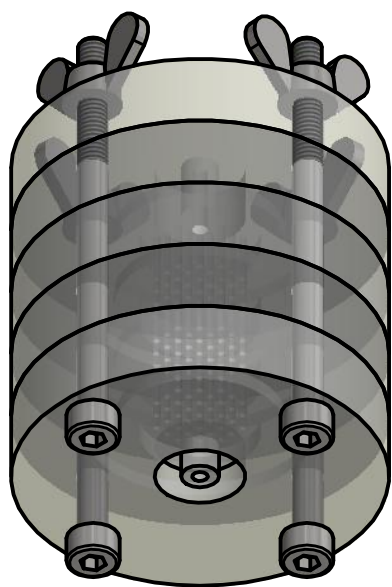
ČVUT
FBMI


Dno komory

4

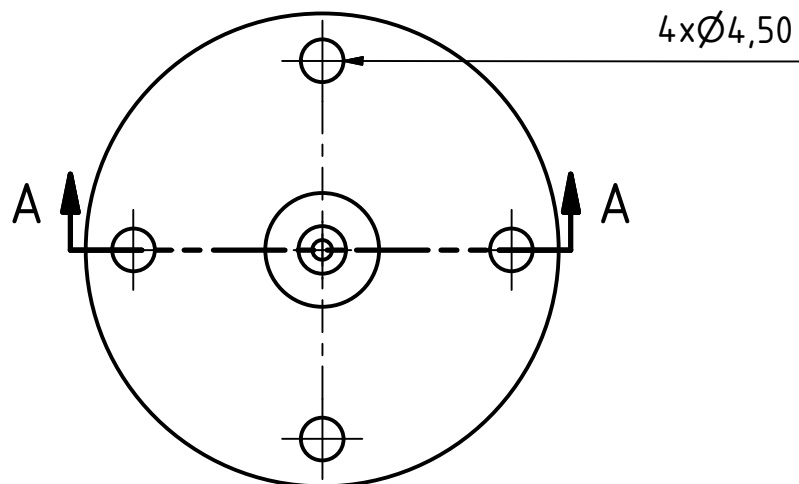
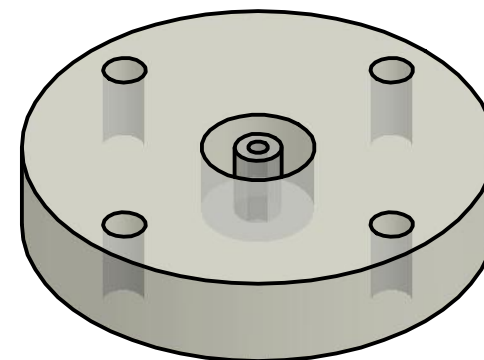
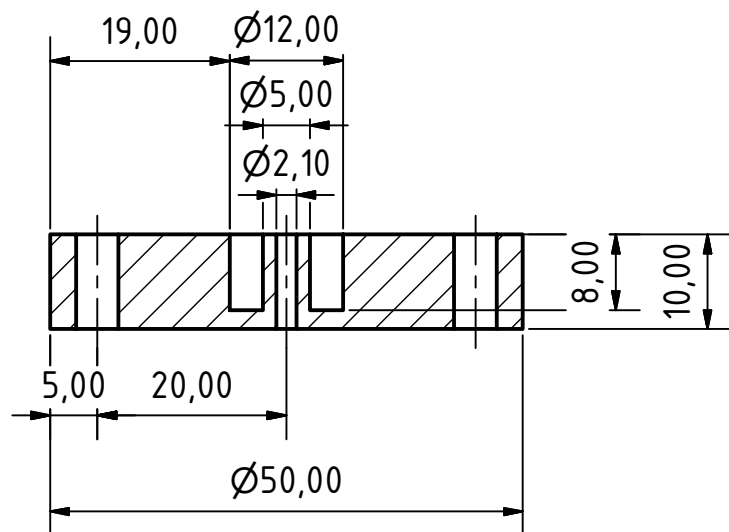
1,25 : 1 | A4

KUSOVNÍK		
POLOŽKA	KS	ČÍSLO SOUČÁSTI
1	1	Víko komory
2	1	Kolimátor
3	2	Středový díl
4	1	Dno komory
5	4	Šroub M4x50
6	4	Křídlová matice



	Datum	Jméno	
Nakreslen	23. 4. 2019	Samuel Maduda	
Kontrola	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Schválil	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Průtoková komora			
			1 : 1
			A4

A-A (1,25 : 1)



	Datum	Jméno
Nakreslen	23. 4. 2019	Samuel Mařuda
Kontrola	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská
Schválil	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská

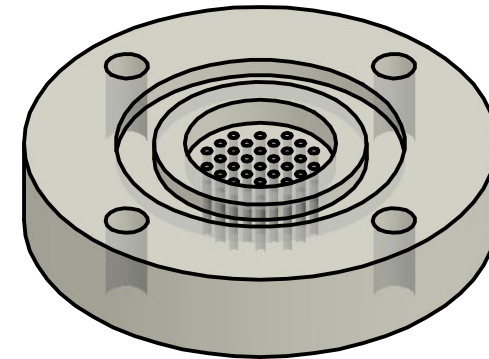
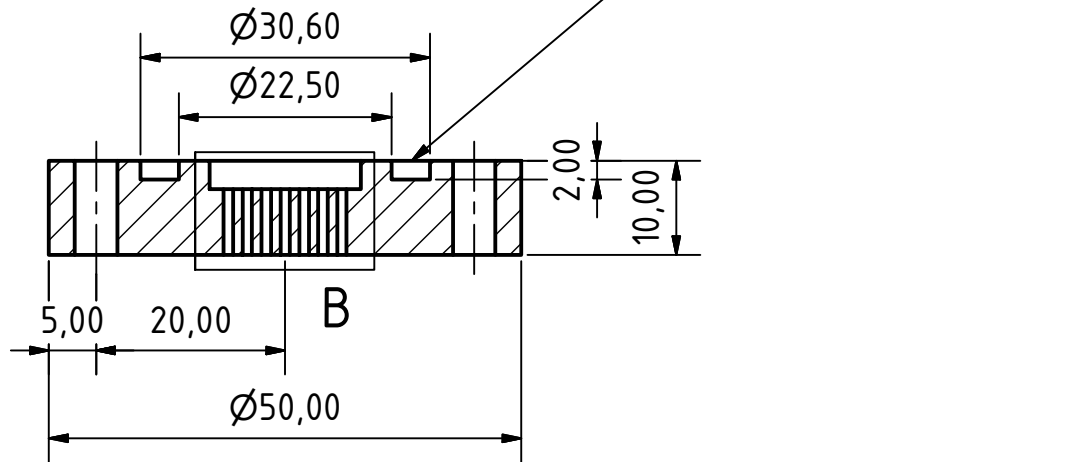


Víko komory

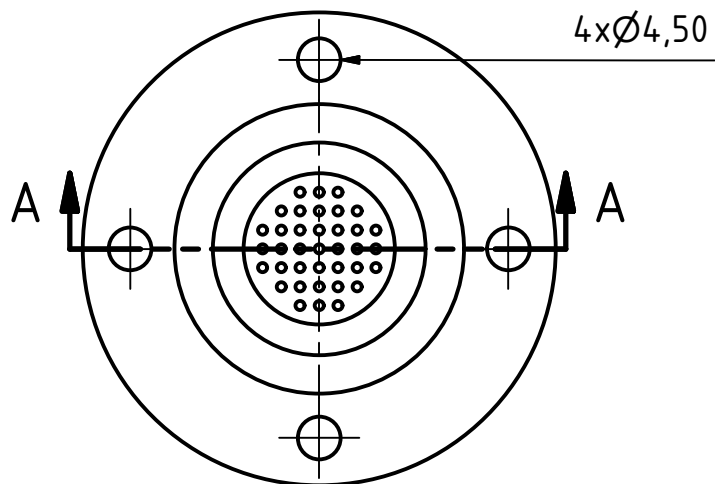
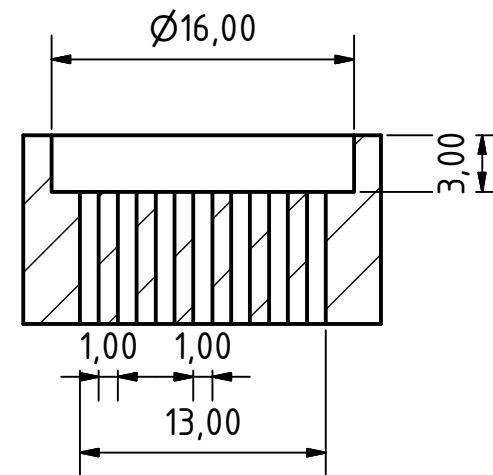
1


1,25 : 1 | A4

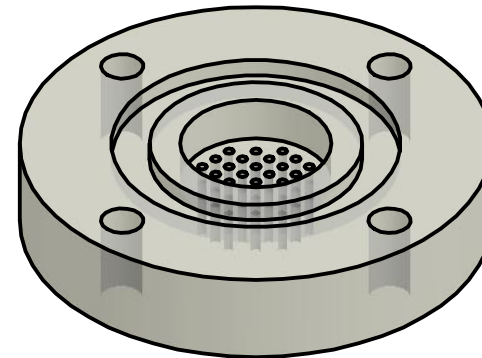
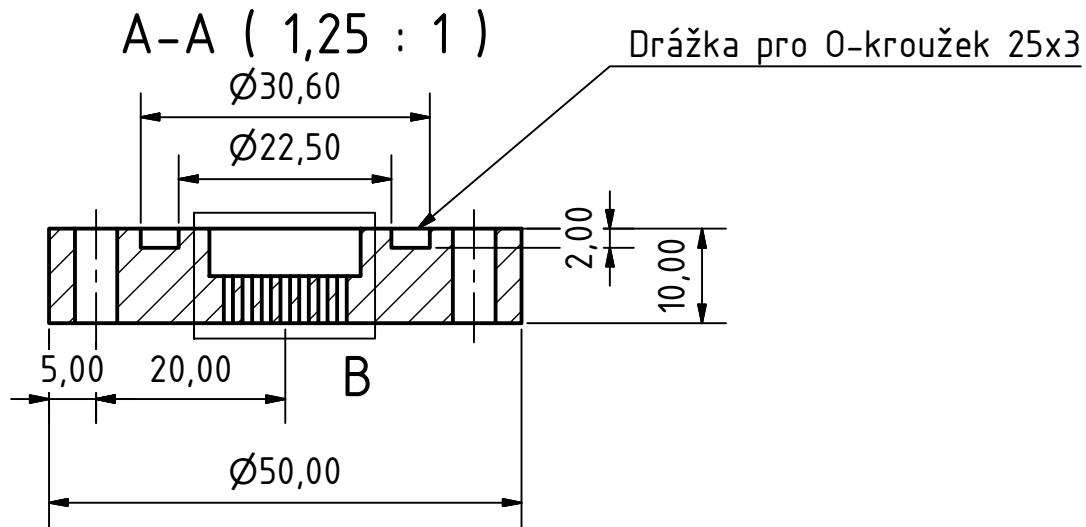
A-A (1,25 : 1)



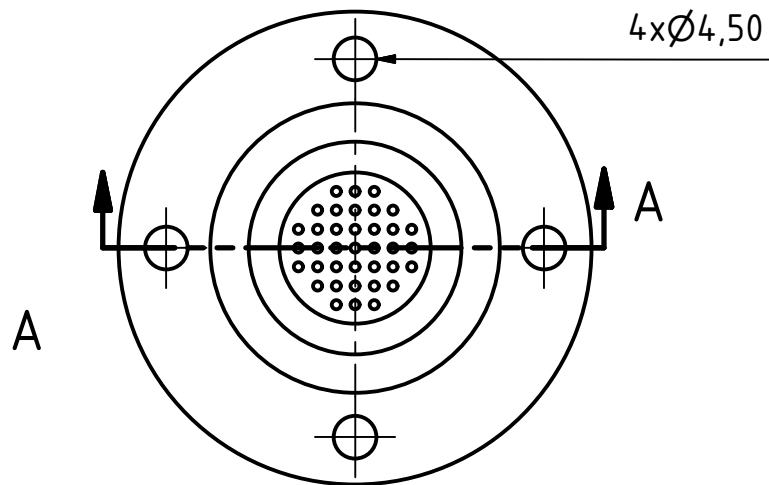
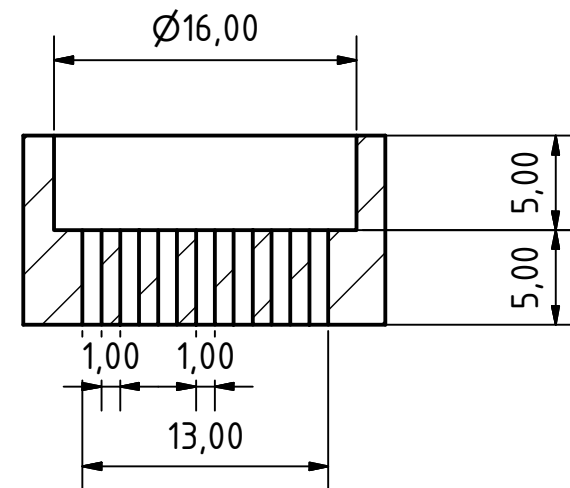
B (2,50 : 1)



	Datum	Jméno	
Nakreslen	23. 4. 2019	Samuel Maduda	
Kontrola	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Schválil	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská	
Kolimátor			2
			1,25 : 1 A4



B (2,50 : 1)



	Datum	Jméno
Nakreslen	23. 4. 2019	Samuel Maduda
Kontrola	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská
Schválil	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská

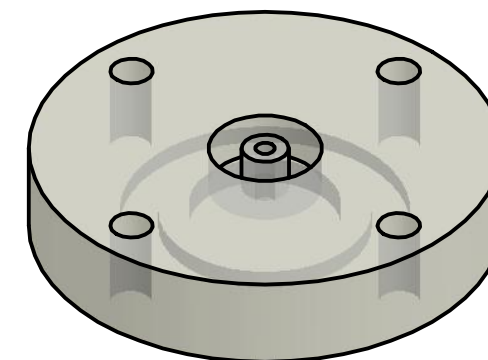
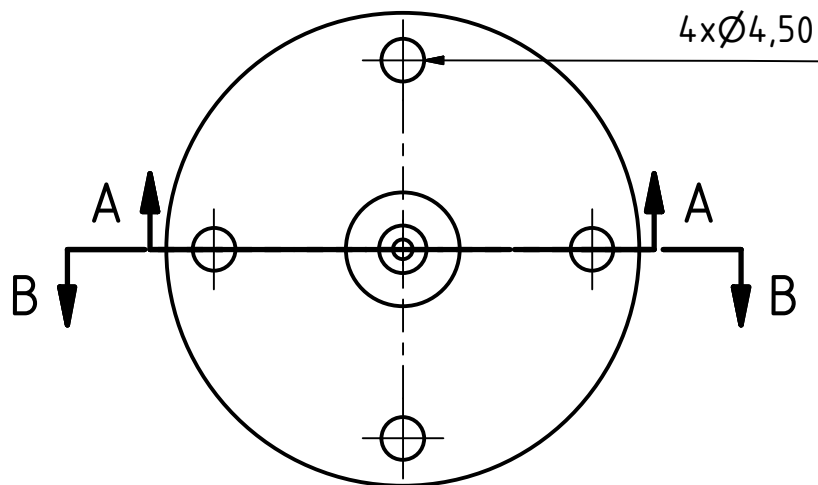
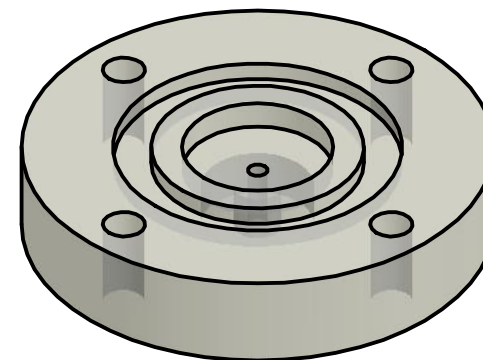
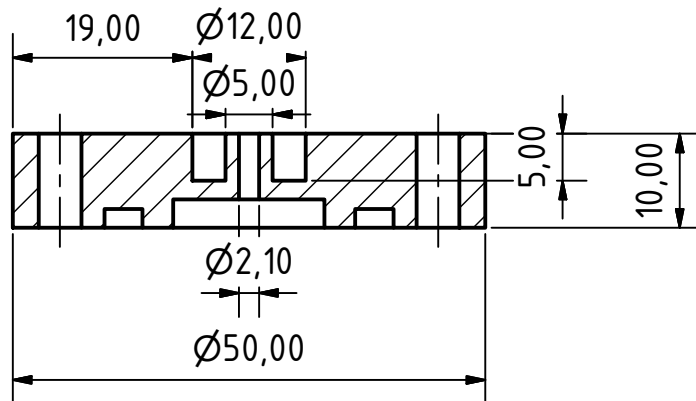
ČVUT
FBMI

Středový díl

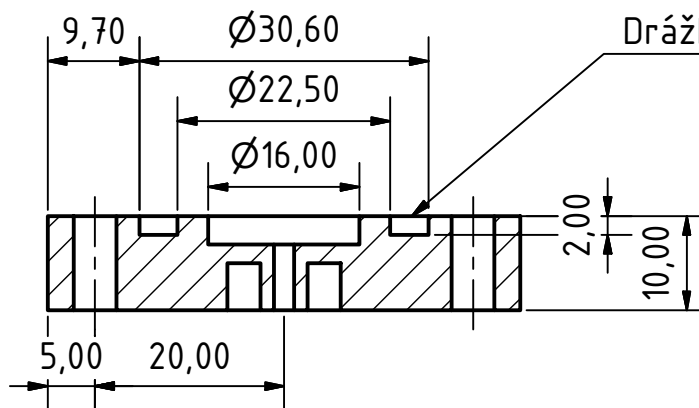
3

1,25 : 1 | A4

A-A (1,25 : 1)



B-B (1,25 : 1)



Drážka pro O-kroužek 25x3

	Datum	Jméno
Nakreslen	23. 4. 2019	Samuel Maduda
Kontrola	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská
Schválil	25. 4. 2019	Ing. Jana Štěpanovská

ČVUT
FBMI

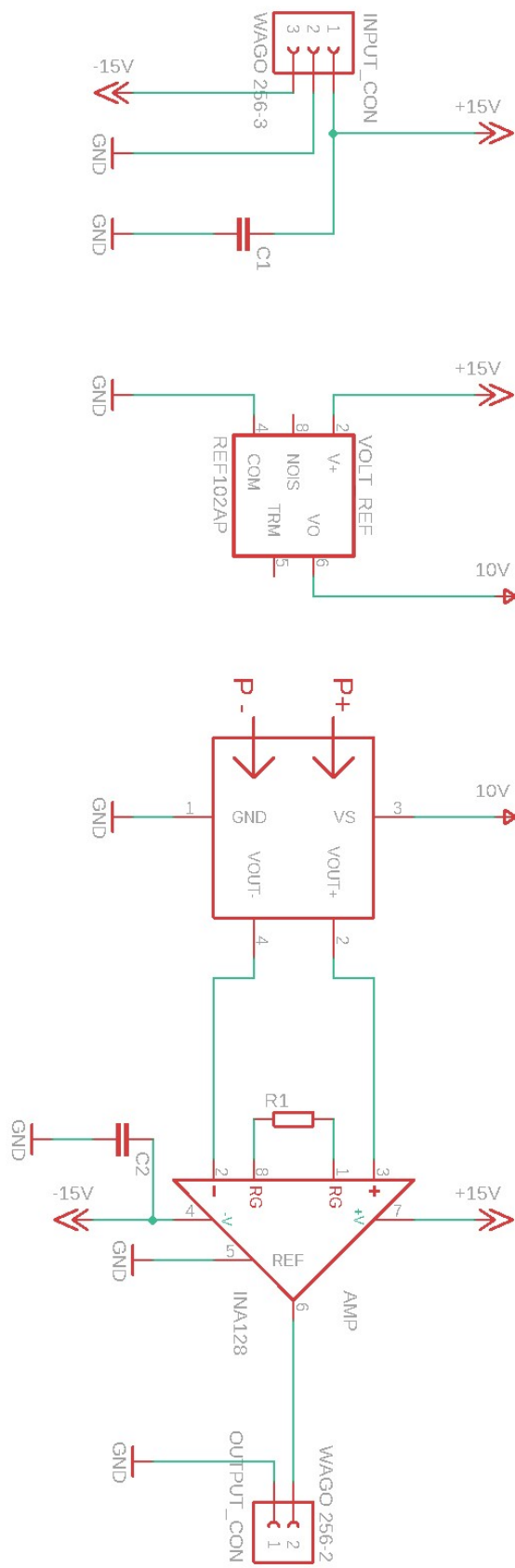
Dno komory

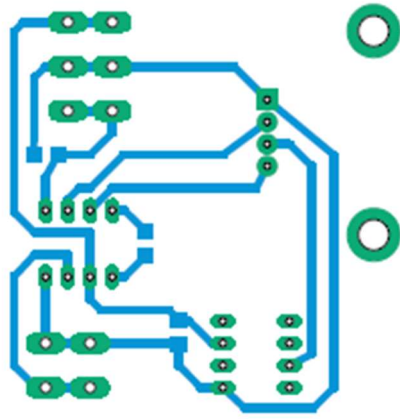
4

1,25 : 1 | A4

Obsah přílohy B

- Schéma desky plošných spojů
- Návrh desky plošných spojů





Obsah přiloženého CD

Název souboru	Popis
17PBBBP_459000_Samuel_Maduda.pdf	Kompletní bakalářská práce
Abstrakt.pdf	Abstrakt česky
Abstract.pdf	Abstrakt anglicky
Klicova_slova.pdf	Klíčová slova
Zadani_prace.pdf	Naskenované zadání práce
Regulator_periody	Program pro úpravu periody mechanického namáhání