ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE
FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra biomedicínské techniky

Hodnocení metabolismu buněk v komoře bioreaktoru v reálném čase

Cell metabolism evaluation in bioreactor chamber in real-time

Diplomová práce

Studijní program:	Biomedicínská a klinická technika
Studijní obor:	Biomedicínský inženýr

Autor diplomové práce:	Bc. Klaudie Černovská
Vedoucí diplomové práce:	Ing. Roman Matějka

Kladno 2019

ČVUT
ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení:	**Černovská**	Jméno:	**Klaudie**	Osobní číslo:	**434129**
Fakulta:	**Fakulta biomedicínského inženýrství**				
Garantující katedra:	**Katedra biomedicínské techniky**				
Studijní program:	**Biomedicínská a klinická technika**				
Studijní obor:	**Biomedicínský inženýr**				

II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

Hodnocení metabolismu buněk v komoře bioreaktoru v realném čase

Název diplomové práce anglicky:

Cell metabolism evaluation in bioreactor chamber in real-time

Pokyny pro vypracování:

Upravte konstrukční řešení kultivační komory pro dynamickou kultivaci při tlakové stimulaci. Optimalizujte elektroniku pro použití v CO2 inkubátoru. Navrhněte software pro průběžné kolorimetrické snímání kultivačního média a implementujte do stávajícího systému kultivačního bioreaktoru. Systém ověřte při buněčných experimentech a korelujte s imunoflurescenčním hodnocením (extracelulární proteiny typu kolagen 1/fibronektin/elastin) a metabolickým testem (typu Resazurin/MTS/MTT).

Seznam doporučené literatury:

[1] Lucie Bacakova, Martina Travnickova, Elena Filova, Roman Matejka, Jana Stepanovska, Jana Musilkova, Jana Zarubova and Martin Molitor, Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field, ed. 1, kapitola Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs) in Blood Vessel Tissue Engineering: The Use of Differentiated Cells or Stem Cells as VSMC Precursors, 2018, IntechOpen
[2] Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J., Principles of Tissue Engineering, ed. 3rd Edition , Elsevier Academic Press, 2007, ISBN 978-0123706157

Jméno a příjmení vedoucí(ho) diplomové práce:

Ing. Roman Matějka

Jméno a příjmení konzultanta(ky) diplomové práce:

Ing. Jana Štěpanovská

Datum zadání diplomové práce: **18.02.2019**
Platnost zadání diplomové 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 diplomovou práci s názvem „Hodnocení metabolismu buněk v komoře bioreaktoru v reálném čase“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně 16. 5. 2019 …..……..……...

Bc. Klaudie Černovská

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce panu Ing. Romanovi Matějkovi za odbornou pomoc, jež mi byla poskytnuta, a za předání vědomostí v oboru tkáňového inženýrství.

Ráda bych též poděkovala paní Ing. Janě Štěpanovské za pomoc v kritických případech, kdy technika nechtěla spolupracovat.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 15-29153A a NV18-02-00422.

ABSTRAKT

Hodnocení metabolismu buněk v komoře bioreaktoru v reálném čase

Diplomová práce se zabývá návrhem elektronického zařízení, které by umožňovalo hodnocení metabolismu kmenových buněk v bioreaktoru v reálném čase. Součástí práce bylo ověření myšlenky, že metabolismus kmenových buněk lze vyhodnotit za pomoci kultivačního média a transmisního jevu. Cílem práce bylo navržení a realizace hardwaru pro jednokanálové snímání, jeho ověření na různých kultivačních médiích a návrh a realizace hardwaru pro vícekanálové hodnocení stavu metabolismu. Během práce došlo k úpravám stávající kultivační komory za účelem upevnění LED diod (budičů) a fotodiod (snímačů), co nejblíže k buněčným kulturám. Za účelem komunikace se zařízením byl navržen jednoduchý software. Navržený systém byl ověřen na sérii buněčných experimentů (na médiích DMEM +10% FS, DMEM + FGF, DMEM obohacený o růstové faktory podporující růst osteoblastů a DMEM obohacený o růstové faktory podporující růst SMC). Výsledky experimentu byly korelovány s metabolickým testem MTT a imunofluorescenčním hodnocením.

Klíčová slova

Kmenové buňky, metody stanovení metabolické aktivity, spektrální odezva kultivačních médií, hardware pro hodnocení metabolismu v reálném čase, buněčné experimenty

ABSTRACT

Cell metabolism evaluation in bioreactor chamber in real-time

In my dissertation I deal with a proposal of an electrical device, what could enable metabolism rating of stem cells in bioreactor in a real time. A part of my work included a verification of an idea, that stem cells metabolism can be evaluated with the aid of cultivation medium and transmission phenomenon. The aim of this work was to design and realize a hardware for single-channel scanning, its verification on various cultivating medias and design and implementation of a hardware for multi-channel evaluation of metabolism status. During the work the existing cultivation chamber was modified for the purpose of strengthening LED diodes (drivers) and photodiodes (sensors) as close to cell cultures as possible. A simple software was designed in order to communicate with device. The designed system was verified on series of cell experiments (on medias DMEM + 10% FS, DMEM + FGF, DMEM enriched with growth factors supporting growth of osteoblasts and DMEM enriched with growth factors supporting growth of SMC). Results of an experiment were correlated with the MTT metabolic test and immunofluorescence evaluation.

Keywords

Stem cells, methods for determining metabolic activity, spectral response of culture medium, hardware for real-time evaluation of metabolism, cellular experiments

Obsah

Seznam symbolů a zkratek **9**

Seznam obrázků **10**

1 Úvod **12**

1.1 Přehled současného stavu 13

1.1.1 Kmenové buňky 13

1.1.2 Děje v buňkách 15

1.1.3 Kultivace buněk in vitro 16

1.1.4 Růstová křivka buněčné kultury 16

1.1.5 Podmínky pro kultivaci 17

1.1.6 ASC 18

1.1.7 Metody stanovení metabolické aktivity 19

1.2 Cíle práce 21

2 Metody řešení **22**

2.1 Spektrální odezva kultivačních médií 23

2.2 Hardware pro jednokanálové hodnocení metabolismu kmenových buněk 25

2.2.1 Desky plošných spojů 26

2.2.2 Ověření funkčnosti systému pro jednokanálové snímání 29

2.3 Hardware pro vícekanálové hodnocení metabolismu kmenových buněk 31

2.3.1 Úprava kultivační komory 32

2.3.2 Úprava a návrh desek plošných spojů 34

2.3.3 Hardwarová sestava 37

2.3.4 Finální úprava kultivační komory 38

3 Výsledky **40**

3.1 Surová data poskytovaná fotodiodou 40

3.2 Data z oblasti před výměnou kultivačního média 41

3.3 Data z oblasti po výměně kultivačního média 45

3.4 Imunofluorescenční hodnocení 49

4 Diskuse **50**

4.1 Spektrální odezva kultivačních médií 50

4.2 Hardware pro jednokanálové hodnocení metabolismu kmenových buněk 51

4.3 Hardware pro vícekanálové hodnocení metabolismu kmenových buněk 52
4.4 Buněčné experimenty 55
5 Závěr 59
6 Seznam použité literatury 60
Příloha A: Technické výkresy 65
Příloha B: Obsah přiloženého CD 71

Seznam symbolů a zkratek

Seznam symbolů

Symbol	Jednotka	Význam
α	°	Zorný úhel
β	°	Vyzařovací úhel
λ	m	Vlnová délka
A	-	Absorbance
C	F	Elektrická kapacita
f_c	Hz	Mezní frekvence *(cut-off frequency)*
I	cd	Svítivost
I	A	Elektrický proud
R	Ω	Elektrický odpor
U	V	Elektrické napětí

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
ASC	Mesenchymální kmenové buňky z tukové tkáně *(Adipose derived Stem Cells)*
DMEM	Dulbeccovovo modifikované Eaglovo médium *(Dulbecco's Modified Eagle Medium)*
ECC	Embryonální karcinomové buňky *(Embryonic Carcinoma Cells)*
EGC	Embryonální zárodečné buňky *(Embryonic Germ Cells)*
ESC	Embryonální kmenové buňky *(Embryonic Stem Cells)*
FGF	Fibroblastové růstové faktory *(Fibroblast Growth Factor)*
FS	Fetální sérum *(Fetal Serum)*
MSC	Mezenchymální kmenové buňky *(Mesenchymal Stem Cells)*
SMC	Hladké svalové buňky *(Smooth Muscles Cells)*
VEGF	Vaskulární endotelové růstové faktory *(Vascular Endothelial Growth Factor)*
VSMC	Vaskulární hladké svalové buňky (*Vascular Smooth Muscle Cells*)

Seznam obrázků

Obrázek 1.1: Typy kmenových buněk a jejich výskyt v lidském organismu během vývoje; převzato a upraveno z [9] 14

Obrázek 1.2: Růstová křivka buněčné kultury; převzato a upraveno z [19] 17

Obrázek 1.3: ASC po třídenní statické kultivaci (A) a ASC po třídenní dynamické kultivaci (B); převzato z [21] 18

Obrázek 2.1: Část navrženého aparátu sloužící pro kultivaci kmenových buněk a pro snímání metabolického stavu; autor: Roman Matějka 22

Obrázek 2.2: Schéma navrženého aparátu hodnotícího metabolismus kmenových buněk za pomoci optoelektronických členů 23

Obrázek 2.3: Závislost absorbance na vlnové délce I 23

Obrázek 2.4: Závislost absorbance na vlnové délce II 24

Obrázek 2.5: Závislost absorbance na vlnové délce III 24

Obrázek 2.6: Závislost absorbance na vlnové délce IV 25

Obrázek 2.7: Schéma hardwarové soustavy pro jednokanálové hodnocení metabolismu 26

Obrázek 2.8: Zapojení LED diody a fotodiody na nepájivém poli 26

Obrázek 2.9: Schéma zapojení budiče LED diody s proudovým zdrojem 27

Obrázek 2.10: Schéma zapojení fotodiody s transimpedančním zesilovačem 27

Obrázek 2.11: Pilotní desky plošných spojů LED diody (vlevo) a fotodiody (vpravo) 28

Obrázek 2.12: Stojánek na spektrofotometrickou kyvetu 28

Obrázek 2.13: Závislost absorbance na vlnové délce V 30

Obrázek 2.14: Závislost absorbance na vlnové délce VI 30

Obrázek 2.15: Závislost absorbance na vlnové délce VII 31

Obrázek 2.16: Prvotní hardware pro vícekanálové snímání 32

Obrázek 2.17: Upravená kultivační komora s nástavci pro LED diody a fotodiody 33

Obrázek 2.18: Deska plošných spojů fotodiod 34

Obrázek 2.19: Schéma zapojení budičů LED diod s tranzistory v roli spínačů 35

Obrázek 2.20: Deska plošných spojů LED diod 36

Obrázek 2.21: Deska plošných spojů pro Arduino Micro 36

Obrázek 2.22: Deska pro upevnění LED diod k polykarbonátovému nástavci 39

Obrázek 2.23: Deska pro upevnění fotodiod k polykarbonátovému nástavci.....39

Obrázek 3.1: Surová data ze snímačů (fotodiod) 40

Obrázek 3.2: Hodnoty elektrického napětí U generovaného fotodiodou pro jednotlivá kultivační média po srovnání offsetů I 41

Obrázek 3.3: Střední hodnoty elektrického napětí U pro jednotlivá kultivační média z oblasti před jejich výměnou včetně chybových úseček 41

Obrázek 3.4: Polynomy 1.stupně pro střední hodnoty elektrického napětí U kultivačních médií 42

Obrázek 3.5: Normalizované hodnoty elektrického napětí U pro jednotlivá kultivační média v 55 hodině od počátku kultivace 43

Obrázek 3.6: Grafické znázornění mediánů, interkvartilových rozpětí, minim a maxim pro jednotlivá kultivační média v 55 hodině od počátku kultivace pro MTT testy 44

Obrázek 3.7: Porovnání normalizovaných dat z fotodiody a MTT testů v 55 hodině od počátku kultivace 44

Obrázek 3.8: Hodnoty elektrického napětí U generovaného fotodiodou pro jednotlivá kultivační média po srovnání offsetů II 45

Obrázek 3.9: Střední hodnoty elektrického napětí U pro jednotlivá kultivační média včetně chybových úseček 45

Obrázek 3.10: Polynomy 1.stupně středních hodnot elektrického napětí U pro vyměněná kultivační média 46

Obrázek 3.11: Normalizované hodnoty elektrického napětí U pro jednotlivá kultivační média ve 118 hodině od počátku kultivace.....47

Obrázek 3.12: Grafické znázornění mediánů, interkvartilových rozpětí, minim a maxim pro jednotlivá kultivační média ve 118 hodině od počátku kultivace pro MTT testy 48

Obrázek 3.13: Porovnání normalizovaných dat z fotodiody a MTT testů ve 118 hodině od počátku kultivace.....48

Obrázek 3.14: Porovnání produkce extracelulárních proteinů pro kultivaci probíhající v proliferačním médiu (vlevo) a diferenciačním médiu směrem k SMC (vpravo); autor: Roman Matějka 49

Obrázek 3.15:Porovnání diferenciačních markerů kultivace ASC za použití proliferačního média (vlevo) a diferenciačního média směrem k SMC (vpravo); autor: Roman Matějka 49

1 Úvod

Kmenové buňky lze definovat jako jednotky organismu, které jsou zodpovědné za regeneraci a vývoj orgánů a tkání. V podstatě se jedná o nediferencované živočišné buňky mající unikátní schopnost obnovovat části organismu, které vykazují známky poškození nebo opotřebovanosti, a udržovat stálé vnitřní prostředí (homeostázu). Těchto schopností lze dosáhnout díky dvěma základním vlastnostem kmenových buněk. Jedná se o schopnost vytvářet další kmenové buňky a schopnost kmenových buněk diferencovat směrem ke specializovaným buňkám s přesně danou funkcí v organismu např. ve SMC (hladké svalové buňky). Diferenciace kmenových buněk směrem k vysoce specializovaným buňkám může být ovlivněna např. složením kultivačních médií, architekturou a tuhostí skeletů, mechanickými a fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Např. přidáním VEGF (vaskulární endotelové růstové faktory) do kultivačního média zapříčiní diferenciaci kmenových buněk směrem k endotelovým buňkám, nebo působení vibrací na kmenové buňky zapříčiní jejich diferenciaci směrem k osteoblastům. [1; 2; 3; 4]

Vysoce specializované neboli fenotypizované buňky mohou být v budoucnu využity v sektoru zdravotní péče. Uplatnění by nalezly např. při léčbě degenerativních poruch, nebo při regeneraci dlouhých defektů kostí a ve spoustě dalších případech. [5; 6] V současné chvíli se však pohybujeme na poli vývoje. Aby bylo v budoucnu možné kmenové buňky v medicíně použít, je nezbytné proces jejich množení, diferenciace a osidlování umělých náhrad vyvinout k dokonalosti. Jednou z oblastí, které je třeba ještě zefektivnit, je sledování metabolické aktivity kmenových buněk. V současné době se pro sledování metabolické aktivity využívají testy životaschopnosti kmenových buněk nebo testy zjišťující koncentraci proteinů v extracelulární tekutině. Nevýhodami těchto testů jsou např.: nutnost vyjmutí kultivovaných buněk z bioreaktoru (změny teploty, relativní vlhkosti atmosféry atd), donucení je k interakci s chemickými sloučeninami umožňujícími zhodnocení jejich stavu, časová náročnost, podrobení se spektrofotometrickému vyhodnocení (buňky jsou citlivé na světlo) a absence možnosti snímání metabolické aktivity v reálném čase. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k návrhu a realizaci zařízení fungujícího principu transmise, které by veškerá výše jmenovaná negativa nemělo. Toto zařízení by mělo vědeckým pracovníkům pomoci snadno určit dobu, kdy je vhodné vyměnit kultivační médium, nebo kdy je třeba provést pasážování.

1.1 Přehled současného stavu

1.1.1 Kmenové buňky

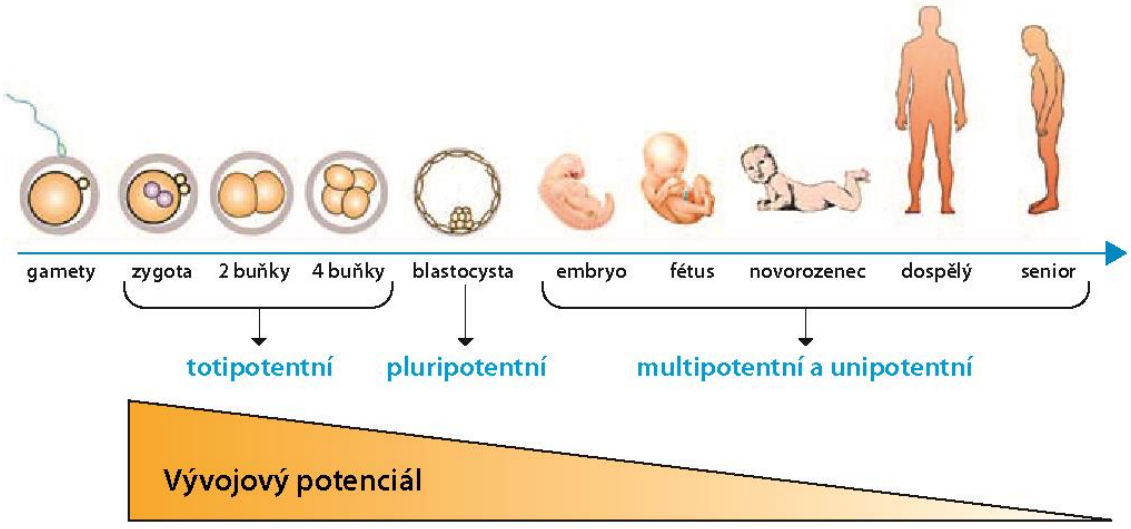
Kmenové buňky lze rozdělit na čtyři typy dle jejich budoucích specifických funkcí. Jedná se o typ totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní. Totipotentní kmenové buňky, známé též pod označením omnipotentní, jsou buňky, které mohou diferencovat v celý lidský organismus (v embryonální i trofoblastické buňky). Příkladem těchto buněk je zygota. Druhým typem jsou kmenové buňky pluripotentní, které dokáží diferencovat v jakýkoliv druh buněk, avšak schopnost tvořit organismus je jim cizí (např. buňky pupeční šňůry). Multipotentní kmenové buňky jsou charakteristické tím, že mohou dát za vznik více než jednomu diferencovanému buněčnému typu, avšak tento typ musí být blízký svými vlastnostmi (např. z kmenových buněk mozku mohou vznikat pouze buňky nervového systému). Příkladem multipotentních buněk mohou být buňky tukové tkáně. Posledním typem kmenových buněk jsou buňky unipotentní, které jsou charakteristické tím, že jsou určeny pro jedinou a specifickou činnost. Jedná se např. o spermatogonie nebo hepatoblasty. [2; 7; 8; 9]

Pro potřeby tkáňového inženýrství a buněčné terapie lze kmenové buňky získat ze čtyř zdrojů. Jedná se o embryonální tkáně, fetální tkáně (např. placenta), specifická místa v dospělém lidském organismu (kostní dřeň, tuková tkáň, kůže, kosterní svaly, srdce, játra, nervová tkáň, krev atd) a ve specifických somatických buněčných kulturách, jež byly geneticky pozměněny. Jednotlivé zdroje kmenových buněk a jejich specifické funkce je možné pozorovat v tabulce 1.1. [4]

Tabulka 1.1: Kmenové buňky, jejich zdroje a specifické funkce; převzato a upraveno z [4]

Kmenové buňky	Zdroj kmenových buněk	Specifická funkce
Embryonální	Morula	Totipotentní
	Blastocyst	Pluripotentní
Fetální	Fetus	Multipotentní, pluripotentní
	Placenta	Multipotentní, pluripotentní
	Plodová voda	Multipotentní, pluripotentní
	Whartonův rosol	Multipotentní, pluripotentní
	Pupečníková krev	Multipotentní
Dospělé	Mezenchymální kmenové buňky kostní dřeně	Multipotentní, pluripotentní
	Ostatní tkáně a orgány	Multipotentní, oligopotentní, bipotentní a unipotentní
IPS	Somatické diferencované buňky	Pluripotentní

Další rozdělení kmenových buněk lze provést na základě místa a času jejich výskytu v organismu. Jedná se především o kmenové buňky embryonální (ESC – embryonic stem cells), fetální kmenové buňky a dospělé. V lidském organismu lze nalézt i další kmenové buňky např. embryonální zárodečné buňky (EGC – embryonic germ cells) nebo embryonální karcinomové buňky (ECC – embryonic carcinoma cells), avšak dříve zmíněné kmenové buňky mají z hlediska potencionálního užití v oblasti medicíny větší význam. ESC vznikly jako deriváty vnitřní buněčné hmoty blastocytu. Jedná se o buňky pluripotentní, které mají schopnost vyvinout se až do 200 buněčných typů dospělého lidského organismu (buněčný typ je závislý na dostatečné a specifické stimulaci kmenových buněk). Z tohoto pohledu jsou ESC pro tkáňové inženýrství a buněčnou terapii velmi výhodné. Jejich nevýhodou je fakt, že v souvislosti s jejich použitím je třeba uvážit i etickou otázku. Z tohoto pohledu na věc jsou fetální kmenové buňky výhodnější. Jedná se o buňky, které mají vynikající specifické funkce (multipotentní/pluripotentní – viz tabulka 1). K jejich odběru slouží tkáně ukončených plodů, tedy tkáně, které by neměly žádné další využití. Díky této vlastnosti není třeba uvažovat nad etickou stránkou pohledu jako u embryonálních kmenových buněk. Dospělé kmenové buňky jsou velmi vzácné buňky, které mají schopnost diferencovat v předurčené buněčné linie, avšak v případě správné stimulace mohou diferencovat v jiné buněčné linie (např. ve svalové, jaterní nebo mozkové). [7; 10] Tyto pozitivní vlastnosti kmenových buněk by v budoucnu mohly nalézt uplatnění v mnohých medicínských problémech. Jednalo by se např. o terapeutické léčení genetických či degenerativních poruch (Parkinsonova choroba), léčbu akutních chorob za pomoci autologních štěpů (srdeční choroby), farmakologický a toxikologický screening, regenerativní medicínu (mozkové a míšní zranění, transplantace), buněčnou terapii (diabetes mellitus, popáleniny). Dle literatur se však v současné chvíli omezujeme pouze na experimenty. [7; 10; 11; 12; 13]



Obrázek 1.1: Typy kmenových buněk a jejich výskyt v lidském organismu během vývoje; převzato a upraveno z [9]

1.1.2 Děje v buňkách

Přeměna biologických látek a energie, tedy metabolismus, probíhá ve všech buňkách živého organismu, ale i v buňkách kultivovaných. Metabolismus lze rozdělit na dva druhy reakcí, na katabolické a anabolické. Katabolické reakce za pomoci enzymů rozkládají složité organické látky na jednodušší látky se současným uvolňováním energie (např. rozklad proteinů na volné aminokyseliny, buněčné dýchání). Opačným druhem k reakcím katabolickým jsou reakce anabolické. Tyto reakce, které jsou známy i pod názvem biosyntetické dráhy, využívají energii a syntetizují z jednoduchých biologických látek složitější molekuly (např. z jednotlivých volných aminokyselin dávají za vznik tělu vlastním proteinům nebo hormonům). [14]

Kromě již zmíněných metabolických procesů probíhají na buněčné úrovni i další procesy, které jsou důležité pro přežití organismu jako celku. Jedná se o tzv. morfogenetické procesy mezi něž patří především proliferace, buněčná migrace, buněčná smrt a buněčná asociace. Proliferace, také známá pod pojmem mitotická aktivita, je proces, během kterého si organismus vytváří materiál pro jeho růst. Za počátek proliferace lze označit první mitotické dělení oplozeného vajíčka. Její markantní růst je zaznamenán v průběhu embryogeneze a postupně dohází k jejímu úpadku. Proliferaci lze nalézt i u dospělých organismů, především v tkáních s neustálou obnovou buněčné populace, kde dochází k náhradě poškozených či ztracených buněk novými (např. buňky epidermis). V jiných tkáních probíhá proliferace méně. Jedná se např. o hepatocyty, které zaznamenají proliferaci pouze v okamžiku regeneračních procesů (ztráta části orgánu, poškození orgánu). Existují i tkáně, v nichž proliferace postnatálně neprobíhá (neurony, jádra svalových vláken) a jejich regenerace je závislá na dospělých kmenových buňkách. Další morfogenetický proces je buněčná migrace. Jedná se o aktivní nebo pasivní proces, během kterého dochází k přemisťování jednotlivých buněk, nebo celých jejich skupin. V dospělosti se uplatňuje při zánětech a hojení ran. Buněčná asociace umožňuje spojení jednotlivých buněk ve vyšší funkční celky a zároveň jim tak umožňuje komunikaci a vzájemné ovlivňování. I buněčná smrt je dalším morfogenetickým procesem a je přirozenou součástí vývoje organismu. Umožňuje odstranění vadných nebo redundantních elementů a modelování tvarů. Lze rozeznat programovatelnou buněčnou smrt (apoptózu) a neprogramovanou smrt (nekrózu). [15; 16]

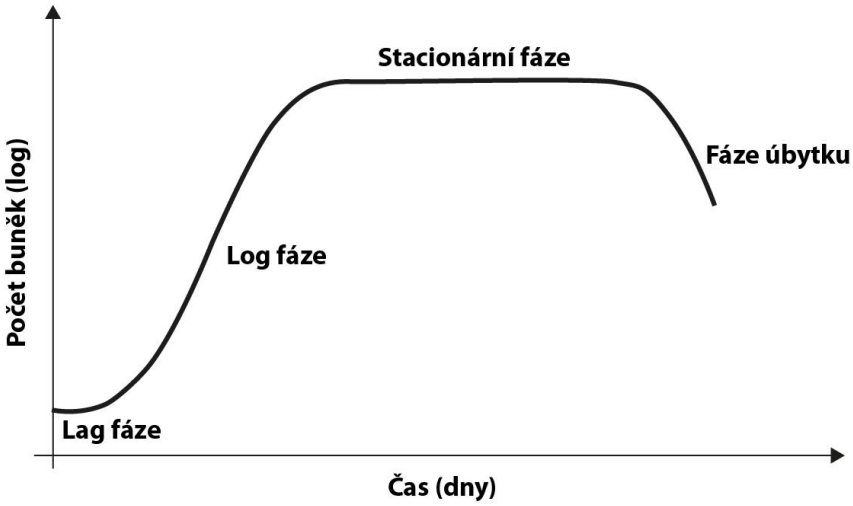
Mezi další pro vývoj organismu důležité děje patří i exprese genu a diferenciace. Proces, během kterého dochází k převodu genetické informace uložené v DNA do molekuly proteinu, se nazývá exprese genu. Jedná se o proces, jenž podléhá přísné regulaci, neboť jeho vychýlení může zapříčinit různé vývojové vady. Diferenciace buněk je proces, při němž z totipotentních buněk vznikají vysoce specializované buňky (fenotypizované nebo fenotypicky maturované). Tato specializace je v průběhu vývoje ovlivňována velkým množstvím genů. [2; 15; 16]

1.1.3 Kultivace buněk in vitro

Buněčné kultury se v dnešní době staly nedílnou součástí vědeckého výzkumu. Jejich úkolem je tvorba materiálu pro výzkum a zároveň mohou sloužit jako model, což je výhodné především v případě, kdy by modelem mohlo být zvíře, či člověk (tento model přináší etické problémy). Dle stáří a schopnosti se množit rozlišujeme tři druhy buněčných kultur: primární kultury, buněčné linie a buněčné kmeny. Kultura nesoucí označení primární, známá též pod názvem primokultura, se skládá z jednotlivých izolovaných buněk z dárce. Příkladem tohoto typu buněčné kultury jsou ASC (mezenchymální kmenové buňky z tukové tkáně) a MSC (mezenchymální kmenové buňky). Pasážováním (přenos namnožených a naředěných buněk do nových kultivačních nádob) dostáváme z primární kultury buněčné kmeny. Jedná se o skupiny buněk, které prošly alespoň jednou procesem pasážování a které po 40–50 namnoženích zanikají. Buněčné linie jsou skupiny buněk, jejichž hlavní schopnost tkví v neomezené životnosti a schopnosti se množit (např. rakovinné buňky). Buněčnou kulturu lze získat několika způsoby. Některé kultury jsou schopny vyrůstat z kultivované tkáně (např. fibroblasty), avšak většina kultur vzniká z buněk izolovaných z tkání. Tato izolace probíhá na principu mechanického uvolnění a následného enzymatického štěpení mezibuněčného matrixu nebo ve zvláštních případech perfuzí orgánu médiem. Takto připravené buňky jsou za pomoci centrifugy odděleny a přemístěny do kultivační nádoby obsahující kultivační médium. [17; 18]

1.1.4 Růstová křivka buněčné kultury

Buněčnou kulturu lze popsat pomocí křivky růstu, která je rozdělena do čtyř oblastí. Lag-fáze je počáteční fáze, v níž dochází k mírnému poklesu počtu buněk vlivem změny prostředí. Následuje log-fáze (logaritmická, či exponenciální fáze), která je charakteristická tím, že v ní dochází k exponenciálnímu růstu buněčné kultury. V této fázi růstové křivky probíhá proliferace kmenových buněk. Během této fáze by mělo nastat pasážování, aby bylo možné dále buněčnou kulturu dále rozmnožovat. Stacionární fáze je třetí v pořadí. Během ní nedochází k nárůstu počtu buněk. Naopak jejich počet stagnuje vlivem vyčerpání živného média, vznikajícího v důsledku aplikace tlaku a teploty na buněčnou kulturu, vlivem pH a vlivem nedostatku prostoru. V této fázi je majoritním procesem diferenciace kmenových buněk směrem ke specializovaným buňkám. Poslední fází je fáze úbytku, která má za následek vymírání buněk vlivem nedostatku živin, pH nebo toxických metabolických produktů. [17; 19]



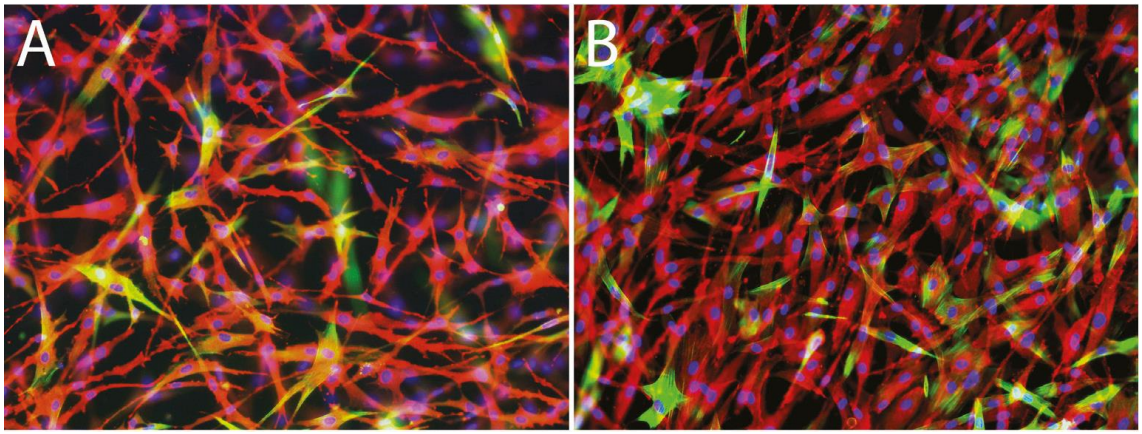
Obrázek 1.2: Růstová křivka buněčné kultury; převzato a upraveno z [19]

1.1.5 Podmínky pro kultivaci

Aby bylo zajištěno množení buněk in vitro, je třeba nastolit vhodné podmínky. Jednou z těchto podmínek je i povrch kultivační nádoby. Dle náročnosti buněčné kultury a jejího druhu je nutné volit druh nádob. Většina kultur nenáročných na povrch nádoby se spokojí s polystyrenovými kultivačními nádobami, jejichž povrch je upraven, aby byl hydrofilní. Náročnější kultury vyžadují, aby povrch nádob byl obohacen ještě o další organické složky usnadňující jejich adhezi (kolagen, polylysin, fibrinogen, laminin atd.). Ve vzácných případech se lze setkat s buněčnými kulturami vyvíjejícími se v prostoru celé nádoby. Existují však i kultury, které je možné stimulovat k množení pouze v suspenzi (např. buňky krevního původu). Suspenze lze docílit umístěním kultivační nádoby na kývací míchačku, výstelkou vnitřního povrchu z látek, které zabraňují adhezi (např. agarosou), nebo speciálním postupem zvaným mikroenkapsulace, kde se kolem jednotlivých buněk vytvoří obal z polymeru, jenž zabraňuje adhezi buněk na povrchu nádoby. Další podmínkou je vhodné okolní prostředí, především teplota a složení atmosféry. Jedná se o teplotu 37 °C, 5% atmosféru CO_2 a relativní vlhkost atmosféry kolem 90 %. Poslední podmínkou je výběr vhodného média, což je tekutina napodobující extracelulární tekutinu a obsahující vysoký podíl živin. Média lze rozdělit do dvou hlavních skupin dle jejich obsahu séra, což je zdroj biologicky významných organických látek. Může obsahovat stopové prvky, inhibitory proteáz, růstové faktory, vitamíny atd. Hlavní nevýhodou séra je nepřesná definovanost jeho složení a možnost přenosu infekce na buněčnou kulturu. Média neobsahující sérum jsou dobře definována a obsahují významné organické látky, avšak jejich výroba je složitější a buněčné kultury u nich proliferují pomaleji. Součástí médií jsou anorganické soli, anorganické a biologické pufry, acidobazický indikátor (např. fenolová červeň), zdroj energie (např. glukosa), esenciální i další aminokyseliny, vitamíny, růstové faktory, bílkoviny, lipidy, stopové prvky a někdy i antibiotika (např. penicilín). [18; 20]

1.1.6 ASC

V regenerativní medicíně se dospělé kmenové buňky jeví jako jeden z nejslibnějších typů buněk pro buněčné terapie. Mezi tyto druhy buněk patří především ASC (mezenchymální kmenové buňky odvozené z tukové tkáně). Z hlediska etické otázky, invazivity, doby rekonvalescence, bolestivosti odběru, nízké morbidity a množství odebraných buněk se jeví jako vhodnější v porovnání s kmenovými buňkami odebranými z kostní dřeně. Dalšími výhodami jsou i jejich imunosupresivní vlastnosti, nízká imunogenicita, jednoduchý postup izolace, kvalita kmenových buněk a schopnost proliferace, která se vzrůstajícím věkem pacienta neklesá. Vhodnou stimulací těchto buněk lze dosáhnout jejich diferenciace směrem k tukovým tkáním, kostním buňkám, chrupavkám, neuronům nebo k hladkým svalovým buňkám. Příkladem těchto buněk mohou být i vaskulární hladké svalové buňky (VSMC – vascular smooth muscle cells), což jsou buňky mesodermálního a neuroektodermálního původu hrající důležitou roli ve vasokonstrikci a vasodilataci cév. Experimenty bylo prokázáno, že dynamická kultivace mající charakter pulzatilního stresu a cyklického namáhání má v kombinaci s 3D architekturou skafoldu pozitivní vliv např. na životaschopnost, proliferaci, diferenciační potenciál, parakrinní účinky atd. Během dynamické kultivace byla u buněk zjištěna vyšší produkce kontraktilních proteinů než u buněčné kultury podrobené statické kultivaci. Zároveň bylo zjištěno, že při dynamické kultivaci došlo k jednotné orientaci buněčné kultury radiálně ke směru jejich roztažení, k zvýšení mechanické pevnosti napjatých vzorků a k rovnoměrnému šíření buněčné kultury. Na obrázku 1.3 lze pozorovat dva vzorky ASC, které byly kultivovány na fibrinovém gelu na skle, jeden za statických podmínek a druhý za dynamických podmínek. Na rozlišení kalponinu (zelená barva) a SM α-aktinu (červená barva) bylo využito imunofluorescenční barvení. [21; 22; 23; 24]



Obrázek 1.3: ASC po třídenní statické kultivaci (A) a ASC po třídenní dynamické kultivaci (B); převzato z [21]

1.1.7 Metody stanovení metabolické aktivity

Existuje široká škála testů, které je v tkáňovém inženýrství možné využít. Jedná se např. o testy biologické, které jsou založené na možnosti kvantifikovat matrice, testy životaschopnosti založené na schopnosti určit životaschopnost buňky nebo testy kvantifikační matrice založené na barvení matricových složek. Mezi testy kvantifikační matrice patří např. test využívající barvivo Krystalová violeť nebo Syto9. Obě tato barviva jsou schopná se navázat na buňky, jak živé, tak mrtvé. Z tohoto důvodu je nelze využít pro stanovení metabolické aktivity kmenových buněk. Mezi testy biologické patří např. test využívající barviva DMMB (1,9-dimethyl-methylenová modř), který uvnitř kultury odráží množství sulfátových polysacharidů. Jako nejvhodnější testy pro metabolickou aktivitu se jeví testy životaschopnosti buňky, neboť jsou schopny rozlišit živé buňky od mrtvých. Mezi tyto testy patří např. test s označením XTT, test MTT, test využívající FDA nebo resazurin. XTT test využívá ve vodě rozpustné soli XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid), která je v živé buňce pomocí enzymu mitochondriální dehydrogenáza redukována na formazan. Množství živých buněk lze vyhodnotit s pomocí spektrofotometru, neboť intenzita zabarvení odpovídá množství metabolizujících mitochondrií. Nevýhoda tohoto testu spočívá v ne příliš velké ochotě buněk redukovat XTT, ve výrazné časové náročnosti a nákladnosti. Aby byla redukce podpořena, přidává se do reakce fenazin methosulfát (PMS). MTT test je modifikací testu XTT. Během MTT testu je žlutá sůl MTT (3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromid) redukována na fialový formazan. Rychlost, s níž formazan vzniká, odpovídá aktivitě dýchacího řetězce. Testy využívající FDA jsou založeny na faktu, že životaschopné buňky jsou schopny převést nebarevný fluorescin-dicetát (FDA) na žlutý fluorescenční fluorescin. Nejčastěji využívaným testem, prováděným na živočišných buněčných kulturách je resazurinový test. Jedná se o test, během kterého jsou metabolicky aktivní buňky za pomoci mitochondriálních, mikrozomálních a cytosolových oxidoreduktáz schopny zredukovat modře zabarvený resazurin na růžový rezofurin. Výhodou resazurinového testu je jeho poměrně nízká cena, jednoduchost, vysoká rychlost a nedestruktivní účinky na buněčné kultury. [25; 26; 27]

Druhou velkou skupinou testů, které lze použít při stanovování metabolické aktivity buněčných kultur, jsou testy zjišťující koncentrace proteinů v extracelulárním prostoru buňky. Mezi nejznámější testy zaměřující se na koncentraci proteinů ve vzorcích jsou následující testy: Biuretův test, Lowryho proteinový test, metoda dle Bradfordové nebo BCA test. Ne všechny z těchto metod však lze využít na stanovení metabolické aktivity buněčných kultur. Mezi tyto metody patří Biuretův a Lowryho test. Jedná se o testy, při nichž dochází k interakcím proteinů a měďnatých iontů, což zapříčiní vznik světle modrého komplexu. Jejich hlavní nevýhodou je vysoká závislost na zásaditém pH (10,0-10,5), což je v rozporu s podmínkami potřebnými pro buněčnou kultivaci. BCA test je založen na reakci měďnatého iontu, proteinu a kyseliny bicinchoninové za vzniku

fialového komplexu, který lze spektrofotometricky vyhodnocovat. Přestože se jedná o velice citlivou metodu, nelze ji použít pro buněčnou kultivaci. Stejně jako předchozí metody je závislá na zásaditém okolním prostředí. Metoda dle Bradfordové je též kolorimetrická metoda, avšak není založena na interakci měďnatých iontů s proteinem, nýbrž na interakci barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 a proteinů. Tato reakce zapříčiní barevnou změnu úměrnou množství proteinů ve vzorku (spektrofotometrické vyhodnocení). Její výhodou je snadnost použití, vysoká rychlost, schopnost reagovat při běžných podmínkách a kompatibilita s látkami, které běžně v médiích přítomny. [28; 29; 30]

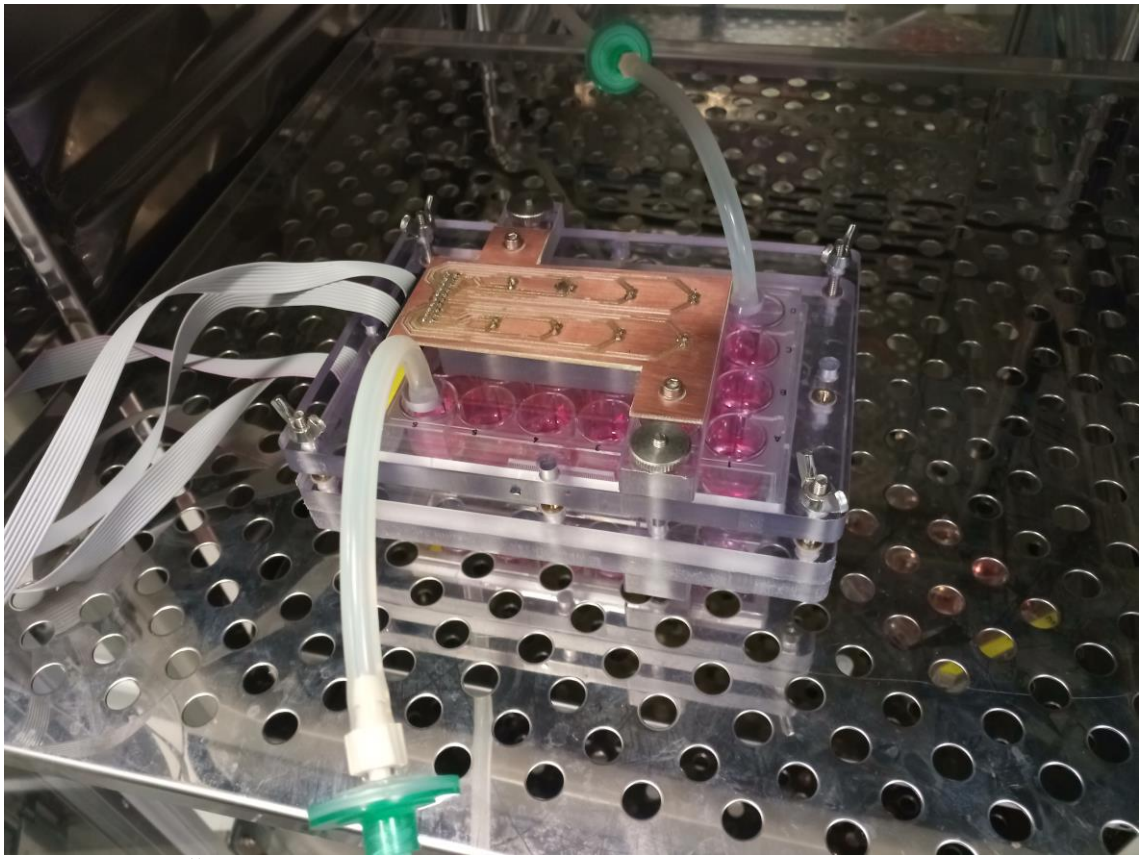
1.2 Cíle práce

Cílem diplomové práce je navrhnout elektronické zařízení, které by poskytovalo možnost snímání metabolického stavu kmenových buněk v reálném čase a které by buněčnou kulturu nevystavovalo negativním vlivům (přílišné osvětlení, prudké změny teploty atd). Pozornost v diplomové práci bude zaměřena na následující body:

- ověření spektrální odezvy kultivačních médií,
- úpravu stávajícího řešení kultivační komory pro dynamickou kultivaci při tlakové stimulaci,
- návrh a realizaci hardwaru pro jednokanálové snímání metabolického stavu kmenových buněk,
- návrh a realizaci hardwaru pro vícekanálové hodnocení metabolismu kmenových buněk,
- navržení softwaru pro průběžné snímání metabolického stavu kultivačního média,
- ověření funkčnosti navrženého aparátu využívajícího pro hodnocení stavu metabolismu optoelektronické členy na buněčných experimentech.

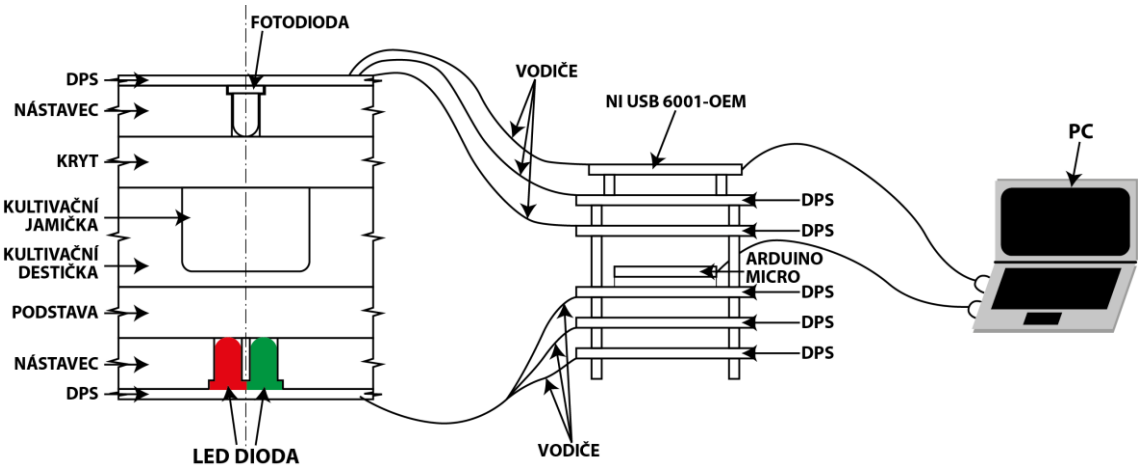
2 Metody řešení

Kompletní aparát pro snímání metabolického stavu kmenových buněk byl navržen takovým způsobem, aby poskytoval možnost vícekanálového snímání. Část skládající se z elektroniky obsahovala dvě desky plošných spojů LED diod, desku plošných spojů pro Micro Arduino a samotnou desku Micro Arduina, dvě desky plošných spojů pro fotodiody a zařízení NI USB-6001 OEM. Tuto část sestavy lze nalézt vně bioreaktoru. Druhá část sloužící pro kultivaci buněčných kultur a snímání metabolického stavu kmenových buněk se skládala z 24jamičkové kultivační destičky, kultivační komory a nástavců pro připevnění LED diod a fotodiod. Tuto sestavu lze nalézt v bioreaktoru a na obrázku 2.1.



Obrázek 2.1: Část navrženého aparátu sloužící pro kultivaci kmenových buněk a pro snímání metabolického stavu; autor: Roman Matějka

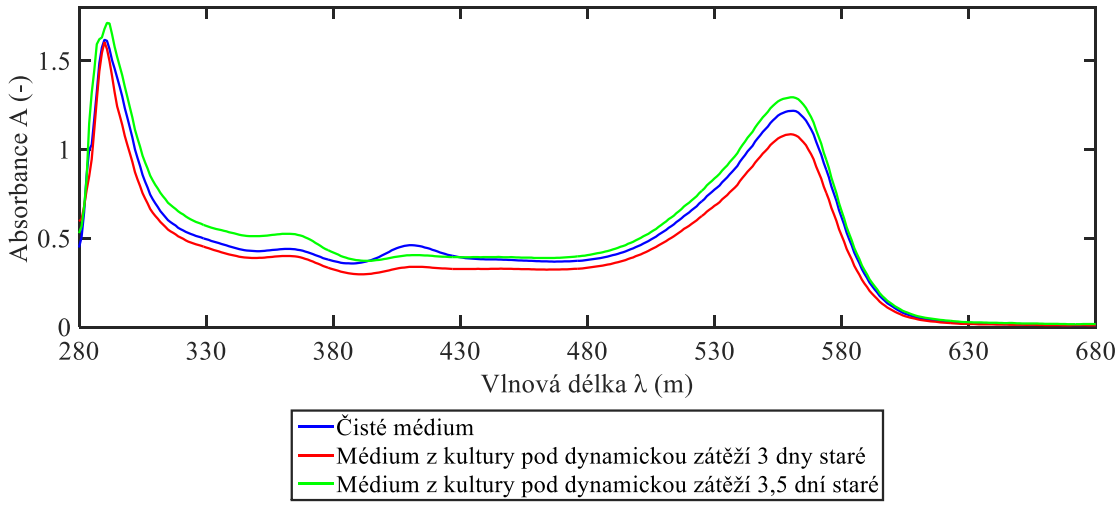
Na obrázku 2.2 je možné pozorovat schéma navrženého aparátu určeného pro hodnocení metabolismu kmenových buněk. Lze zde pozorovat řez kultivační komorou a nástavci pro fotodiody a LED diody na jednom kanálu.



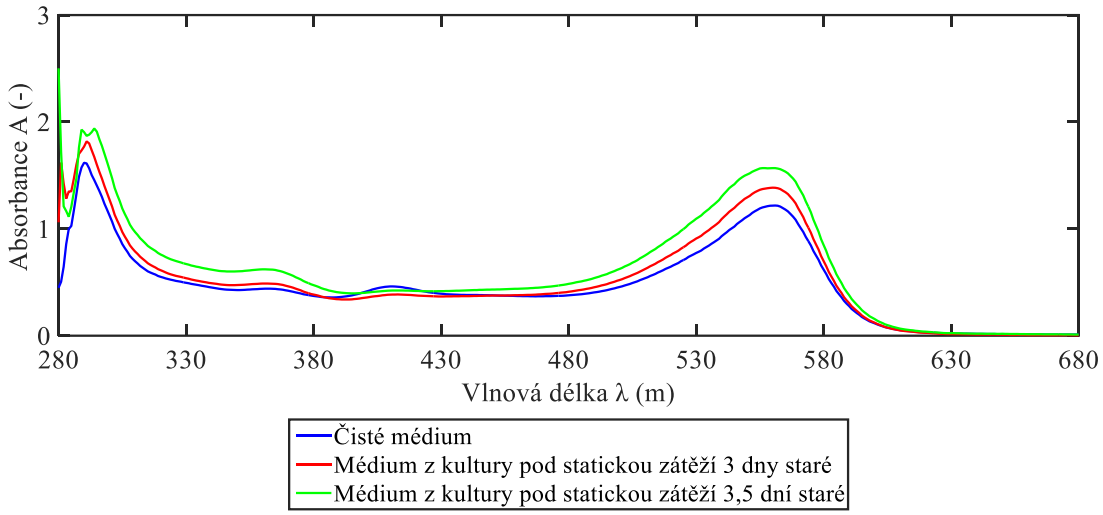
Obrázek 2.2: Schéma navrženého aparátu hodnotícího metabolismus kmenových buněk za pomoci optoelektronických členů

2.1 Spektrální odezva kultivačních médií

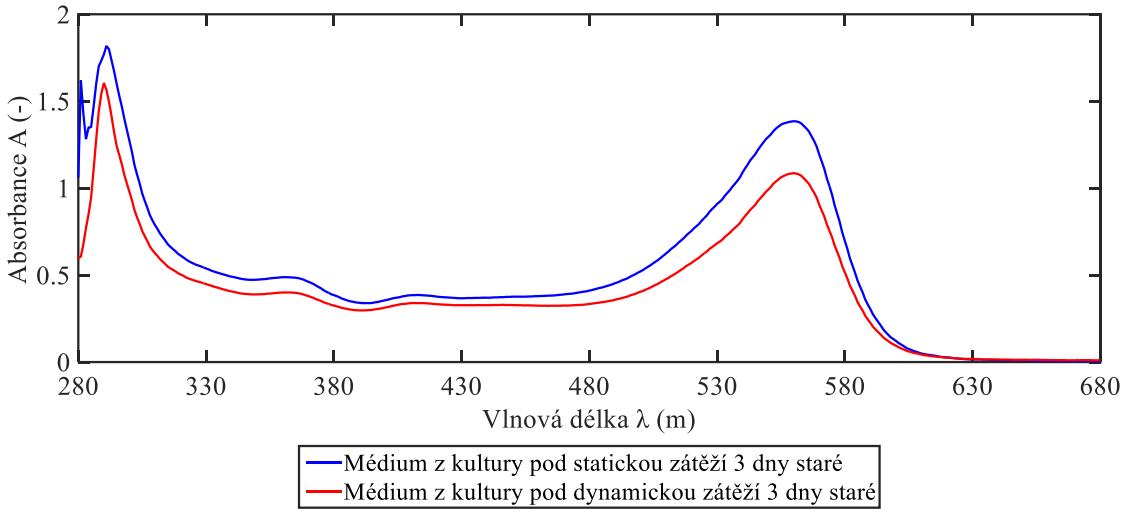
Jednou z metod, které mají potenciál stanovovat metabolickou aktivitu buněčných kultur je kolorimetrie. Za účelem ověření tohoto tvrzení byly odebrány vzorky médií z kultivačních komor a byly podrobeny spektrofotometrickému zkoumání. Jednalo se o čtyři různé vzorky, dva z kultur kmenových buněk podrobených statické zátěži a dva z kultur pod dynamickou zátěží. První z obou vzorků byl odebrán po uplynutí 3 dnů od nasazení buněčné kultury a druhý byl odebrán po 3,5 dnech od výměny původního kultivačního média za nové. Výsledky tohoto pilotního měření provedeného za použití spektrofotometru je možné pozorovat na obrázcích 2.3, 2.4, 2.5 a 2.6.



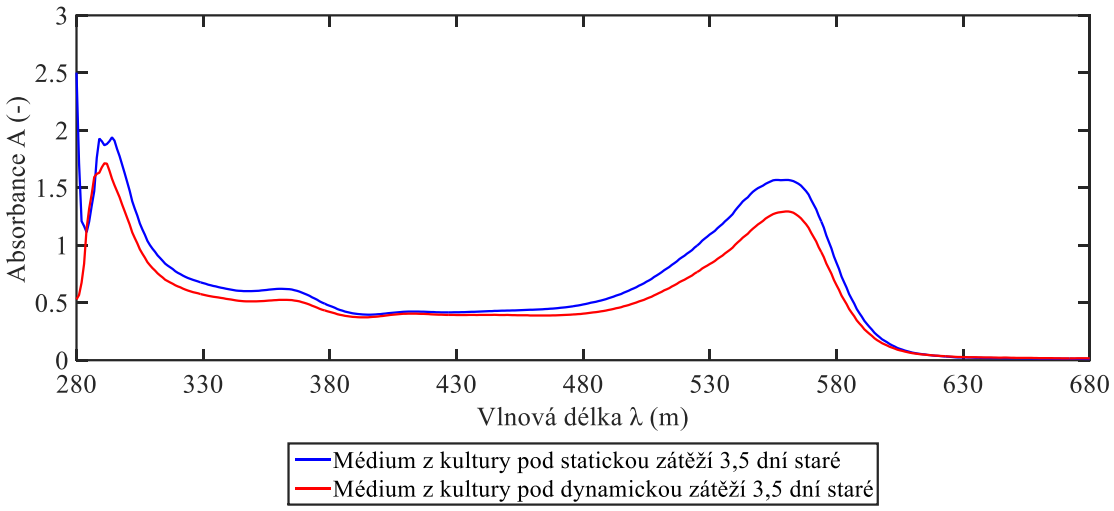
Obrázek 2.3: Závislost absorbance na vlnové délce I



Obrázek 2.4: Závislost absorbance na vlnové délce II



Obrázek 2.5: Závislost absorbance na vlnové délce III

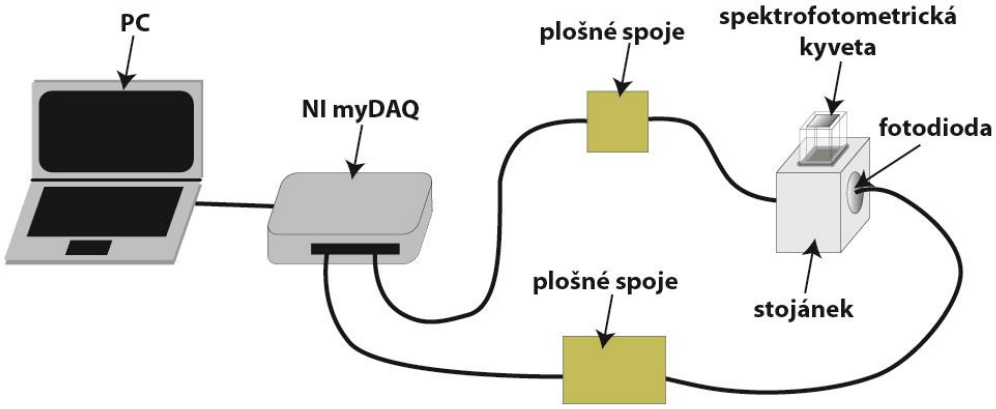


Obrázek 2.6: Závislost absorbance na vlnové délce IV

Oblast vlnových délek, v níž byla prokázána spektrální odezva byla vytyčena v pásmu viditelného světla v rozmezí 280 nm až 630 nm. Na základě posouzení tvaru absorpčních spekter (obrázky 5-8) byly vybrány oblasti zájmu, v nichž by bylo možné stanovovat metabolickou aktivitu kmenových buněk. Jednalo se o oblast fialové barvy (λ = 380–450 nm), modré barvy (λ = 450–510 nm), zelené barvy (λ = 510–550 nm) a zeleno-žluté barvy (λ = 550–575 nm). [31]

2.2 Hardware pro jednokanálové hodnocení metabolismu kmenových buněk

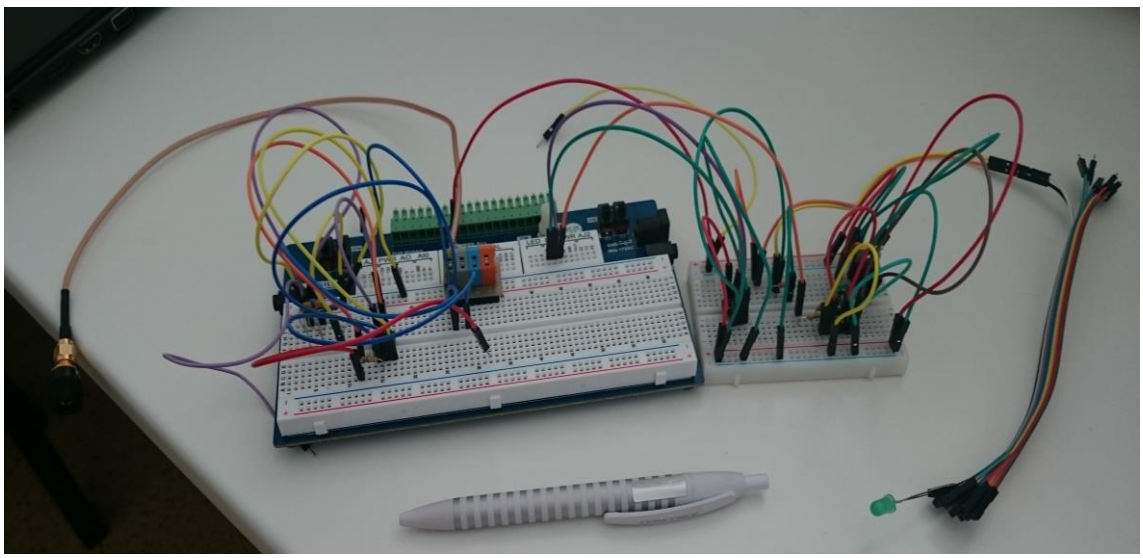
Po identifikaci oblastí vlnových délek, v nichž by bylo možné vyhodnocovat metabolický stav kmenových buněk, bylo přikročeno k řešení problému spojeného s konstrukcí stabilního zdroje světla a senzoru. Výsledkem této činnosti byla konstrukce hardwaru, který poskytuje možnost jednokanálového hodnocení jejich metabolismu. Kompletní jednokanálové hardwarové řešení skládající se ze stabilního zdroje světla, snímacího prvku, stojánku, spektrofotometrické kyvety a zařízení NI myDAQ, sloužícího pro napájení realizovaných obvodů a pro převod měřených veličin do počítačového prostředí, je možné pozorovat na obrázku 2.7. Jednotlivé kroky, které byly učiněny za účelem konstrukce tohoto zařízení, lze nalézt v následujících podkapitolách.



Obrázek 2.7: Schéma hardwarové soustavy pro jednokanálové hodnocení metabolismu

2.2.1 Desky plošných spojů

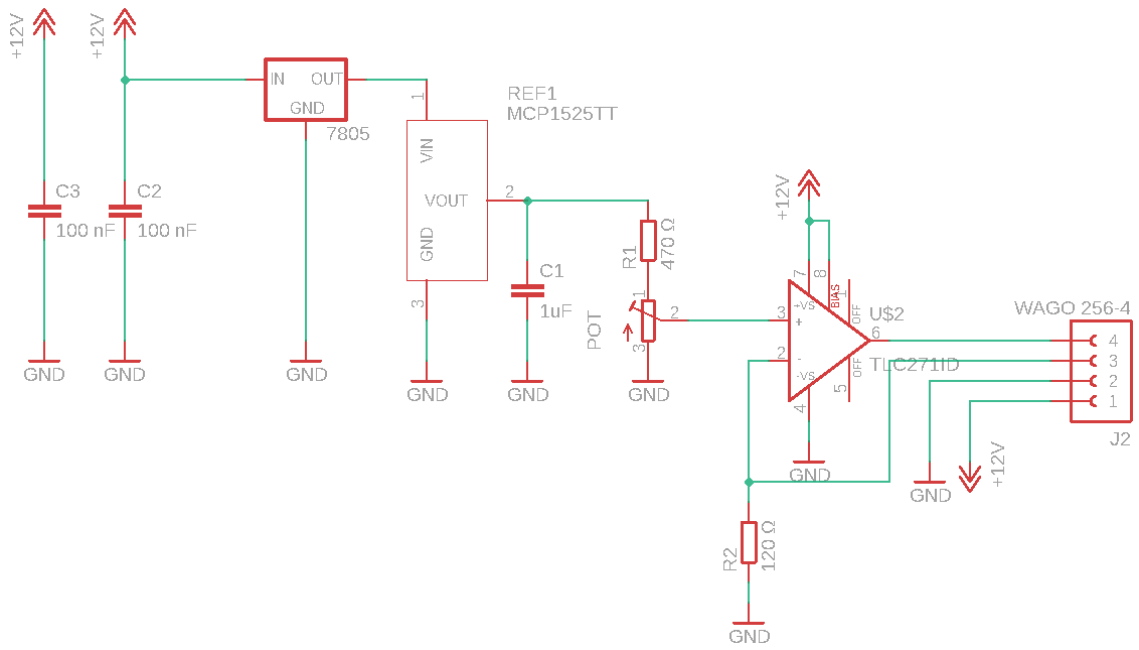
Jako zdroj světla byla zvolena LED dioda. Aby bylo zajištěno její stabilní vyzařování, byl do jejího obvodu implementován proudový zdroj a za účelem její regulovatelnosti byl do obvodu zařazen regulátor napětí a potenciometr, na jehož výstup byl přidán transimpedanční zesilovač. Anoda LED diody byly propojena s výstupem transimpedančního zesilovače a katoda byla připojena k invertující svorce, před rezisotor. Jako senzor byla zvolena fotodioda, která byla zapojena ve fotovodivostním (odporovém) režimu. Součástí obvodu fotodiody byla plovoucí země, která byla propojena s katodou fotodiody, a transimpedanční zesilovač, jehož invertující svorka brala signál z umělé země a neinvertující svorka brala signál vystupující z fotodiody. V prvním kroku byla schémata realizována na nepájivém poli, aby byla ověřena jejich funkčnost (viz obrázek 2.8). [32; 33; 34; 35; 36]



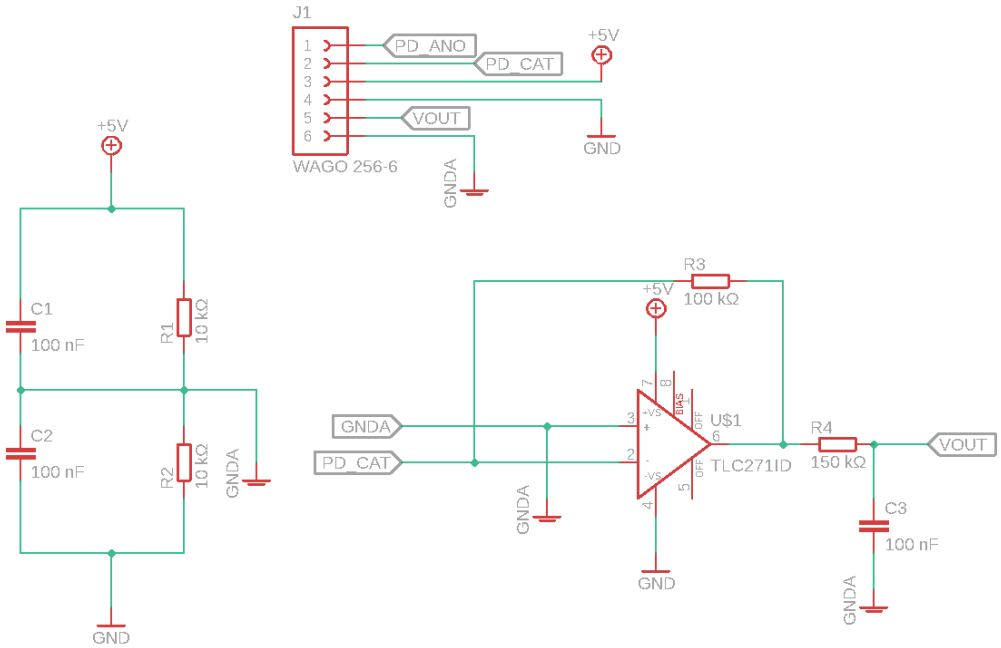
Obrázek 2.8: Zapojení LED diody a fotodiody na nepájivém poli

Tato schémata byla posléze navržena v programu Eagle (Autodesk, Kalifornie, USA, 2018). Dle nich byly navrženy a vyrobeny desky plošných spojů. Po ověření funkčnosti schémat na nepájivém poli bylo schéma s fotodiodou obohaceno o integrační článek (R = 150 kΩ, C = 100 nF, f_c = 10,61 Hz). Takto připravené desky byly precizně osazeny SMD a THT součástkami. Jednotlivá navržená schémata a desky plošných spojů je možné pozorovat na obrázcích 2.9, 2.10 a 2.11.

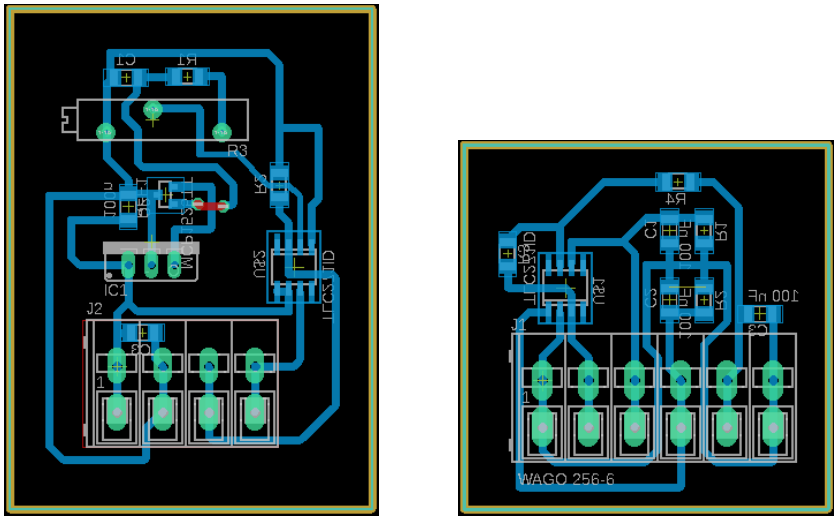
.



Obrázek 2.9: Schéma zapojení budiče LED diody s proudovým zdrojem

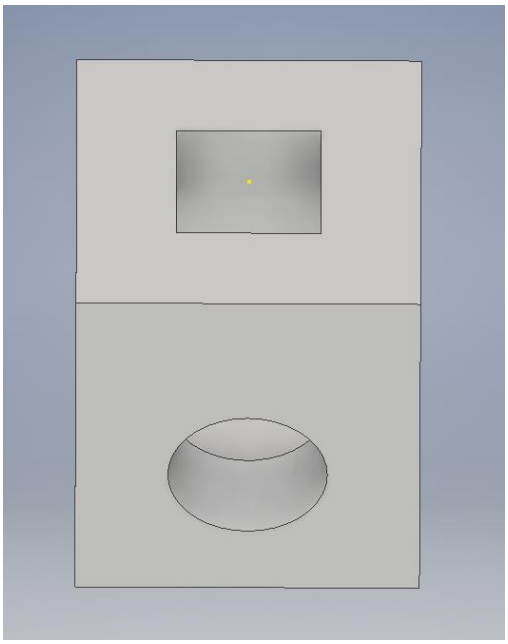


Obrázek 2.10: Schéma zapojení fotodiody s transimpedančním zesilovačem



Obrázek 2.11: Pilotní desky plošných spojů LED diody (vlevo) a fotodiody (vpravo)

Dalším krokem bylo vytvoření stojánku, do kterého by bylo možné umístit LED diodu, fotodiodu a spektrofotometrickou kyvetu, jež by obsahovala zkoumaný vzorek analytu. Tento stojánek byl navržen za pomoci programu Autodesk Inventor Professional 2018 (Autodesk, Kalifornie, USA, 2018) a vytisknut na 3D tiskárně. Stojánek byl navržen jako kvádr, do jehož středu lze z vrchu zasunout spektrofotometrickou kyvetu se zkoumaným analytem. Na bocích kvádru byly umístěny otvory pro budič a pro snímač. Otvory pro optoelektronické součástky byly umístěny tak, aby vyhodnocovaly analyt ve spodní části kyvety. Technický výkres lze nalézt v přílohách diplomové práce pod názvem Stojánek pro spektrofotometrickou kyvetu. Samotný stojánek je možné pozorovat na obrázku 2.12.



Obrázek 2.12: Stojánek na spektrofotometrickou kyvetu

2.2.2 Ověření funkčnosti systému pro jednokanálové snímání

Dalším krokem bylo připojení zkonstruovaných desek k proudovým a napěťovým zdrojům a přivedení výstupního napětí snímače na voltmetr. Funkčnost sestrojených obvodů byla ověřena na 15 vzorcích různého původu. Jednalo se o: destilovanou vodu, vzorek čistý (vzorek 1), filtrovaný (vzorek 2) a obohacený o 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5% a 4,0% dextran 1MDa (vzorek s označením 3-10, vzrůstající koncentrace obohacení dextranem vzrůstá s pořadovým číslem vzorku), endotelové médium, DMEM + FS, DMEM XTT a fetální sérum. Zároveň s ověřováním funkčnosti bylo zjišťováno, jaká z dříve stanovených oblastí zájmu (vlnové délky) bude pro stanovování nejvhodnější a zdali bude patrný rozdíl mezi médii obohacenými a neobohacenými o CO_2. Pro účely identifikace vhodné vlnové délky byly použity LED diody následujících barev: fialové (L5VIOL-LC, λ = 395–405 nm), modré (L5BLU120018, λ = 460–475 nm), zelené (λ ~ 540 nm) a zeleno-žluté (L-53SGC, λ = 565 nm). Jako fotodioda pro účely experimentu posloužila fotodioda s označením SM05PD1A. Vybrané hodnoty snímaného napětí pro různě barevné LED diody a atmosféry lze pozorovat v tabulce 2.1 a 2.2.

Tabulka 2.1: Hodnoty elektrického napětí U pro modrou a fialovou LED diodu pro normální i obohacenou atmosféru

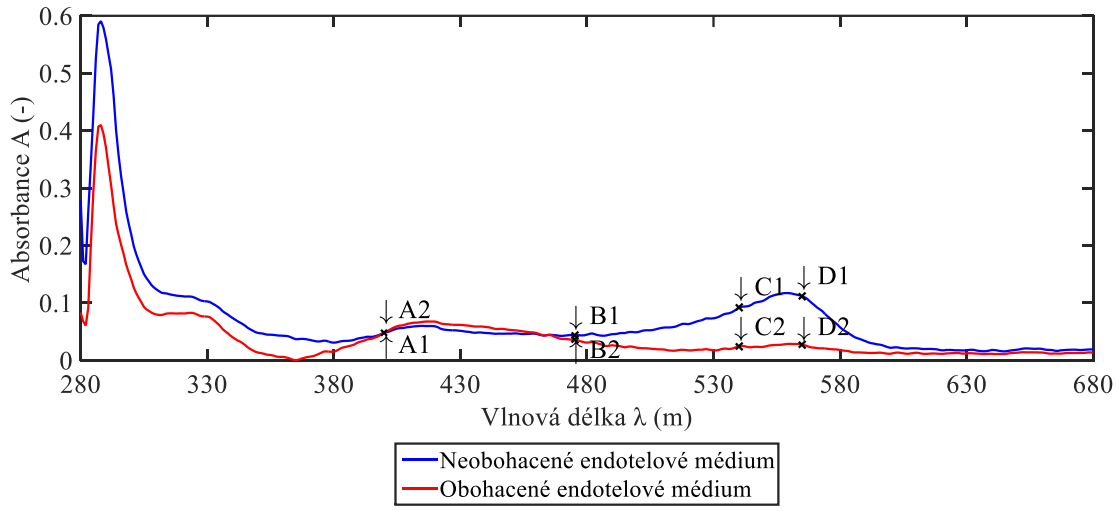
Barva diody	Fialová		Modrá	
Atmosféra CO_2	Normální	Obohacená	Normální	Obohacená
Vzorek	Napětí U (V)	Napětí U (V)	Napětí U (V)	Napětí U (V)
Endotelové médium	0,434	0,450	1,580	-
DMEM + FS	0,140	0,109	1,580	-
DMEM XTT	0,460	0,491	1,580	-

Tabulka 2.2: Hodnoty elektrického napětí U pro zelenou a zeleno-žlutou LED diodu pro normální i obohacenou atmosféru

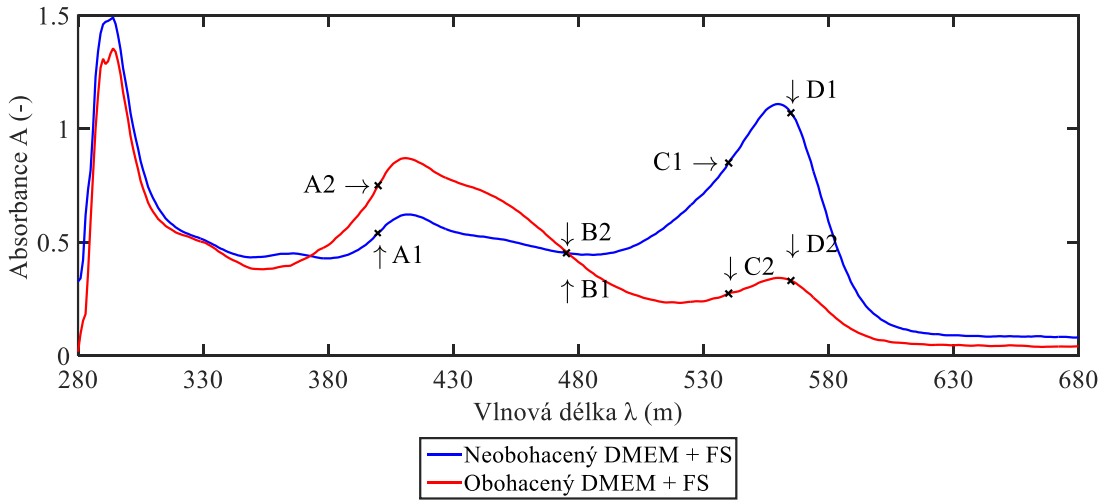
Barva diody	Zelená		Zeleno-žlutá	
Atmosféra CO_2	Normální	Obohacená	Normální	Obohacená
Vzorek	Napětí U (V)	Napětí U (V)	Napětí U (V)	Napětí U (V)
Endotelové médium	0,061	0,214	0,481	0,583
DMEM + FS	0,030	0,192	0,135	0,275
DMEM XTT	0,069	0,216	0,548	0,590

Díky tomuto měření bylo možné z barevných oblastí zájmu vybrat ty, které budou pro měření aktivity metabolismu kmenových buněk nejvhodnější. Jako potenciálně použitelné se jevila fialová, zelená a zeleno-žlutá dioda, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo s poslední jmenovanou a z tohoto důvodu byla využita v následujících aplikacích.

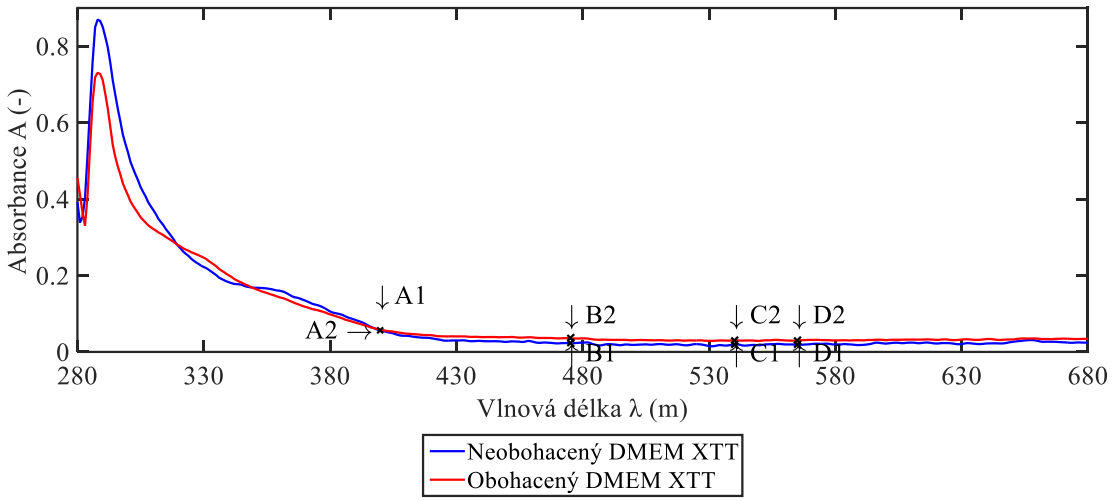
Zároveň s tímto měřením bylo provedeno i spektrofotometrické měření v tabulkách uvedených médií, jehož výsledky lze pozorovat na obrázcích 2.13, 2.14 a 2.15. Jsou zde vyneseny také body A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 a D2. Jedná se o body, jejichž vlnová délka odpovídá vlnové délce výše uvedených LED diod. Bod A odpovídá diodě fialové barvy, bod B odpovídá diodě modré barvy, bod C odpovídá diodě zelené barvy a bod D odpovídá diodě zeleno-žluté barvy. Pořadové číslo, které následuje za písmenem, vypovídá o stavu média. Pokud je médium neobohacené o CO_2, pak nese označení číslicí 1. Je-li tomu naopak, tedy médium je obohacené, nese označení číslicí 2. Jinými slovy lze tvrdit, že v bodech A, B, C a D bylo provedeno ověřování funkčnosti systému jednokanálového snímání, jehož výsledky jsou uvedeny v tabulkách 2.1 a 2.2.



Obrázek 2.13: Závislost absorbance na vlnové délce V



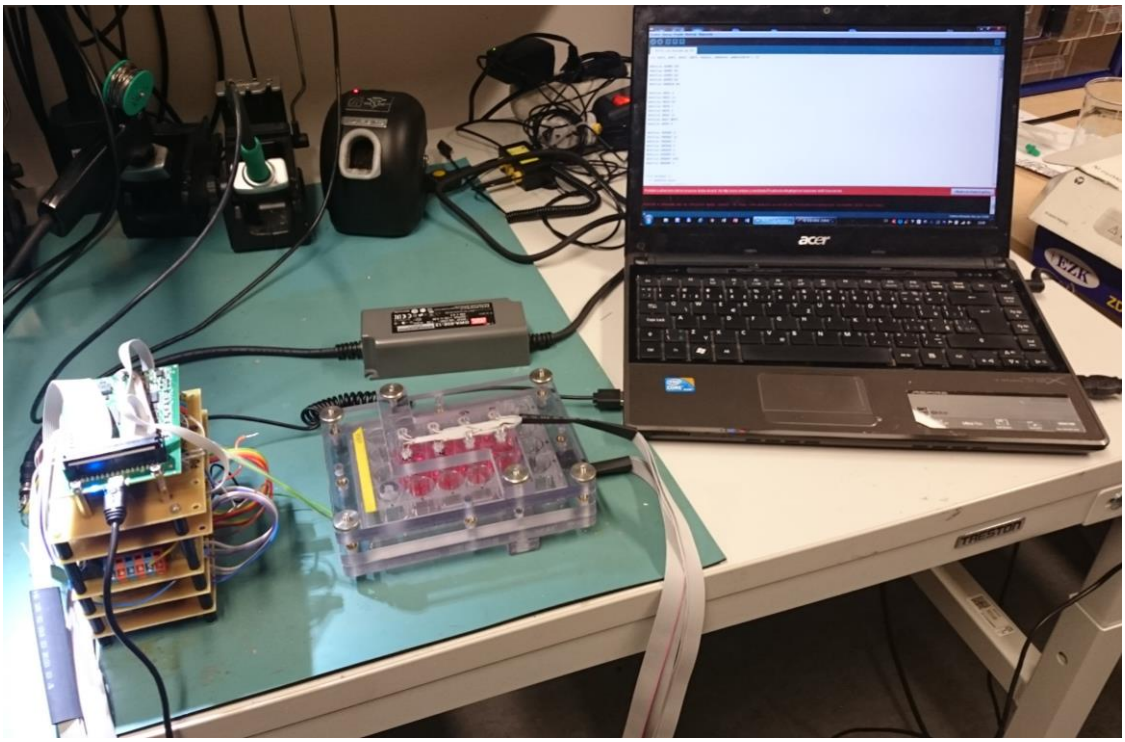
Obrázek 2.14: Závislost absorbance na vlnové délce VI



Obrázek 2.15: Závislost absorbance na vlnové délce VII

2.3 Hardware pro vícekanálové hodnocení metabolismu kmenových buněk

Po provedení spektrofotometrického měření kultivačních médií, které potvrdilo, že metabolické změny v kultivačních roztocích lze na určitých vlnových délkách vyhodnocovat, a po realizaci jednokanálového hardwarového řešení, bylo přistoupeno k výrobě zařízení pro vícekanálové snímání. Prvotně byla pozornost zaměřena na úpravu stávající kultivační komory a následně na návrh a výrobu desek plošných spojů pro zdroj světla o dané λ a pro snímače. Výsledkem tohoto snažení byla sestava hardwaru, které se skládala ze dvou desek plošných spojů budících LED diody, dvou desek plošných spojů snímačů (fotodiod), desky plošných spojů pro připojení Ardiuna Micra (řízené spínání LED diod), a zařízení NI USB-6001 OEM, které umožňovalo vyčítání hodnot elektrického napětí U z fotodiod. Prvotní hardwarovou sestavu pro snímání buněčného metabolismu lze pozorovat na obrázku 2.16.



Obrázek 2.16: Prvotní hardware pro vícekanálové snímání

V souvislosti s hardwarem nelze opomenout ani software, který byl pro účely použití zařízení v bioreaktoru vyvinut. Jednotlivé a jednoduché kódy, které byly vytvořeny pro účely řízení LED diod a pro vyčítání elektrického napětí U z fotodiod, je možné nalézt v přiloženém CD.

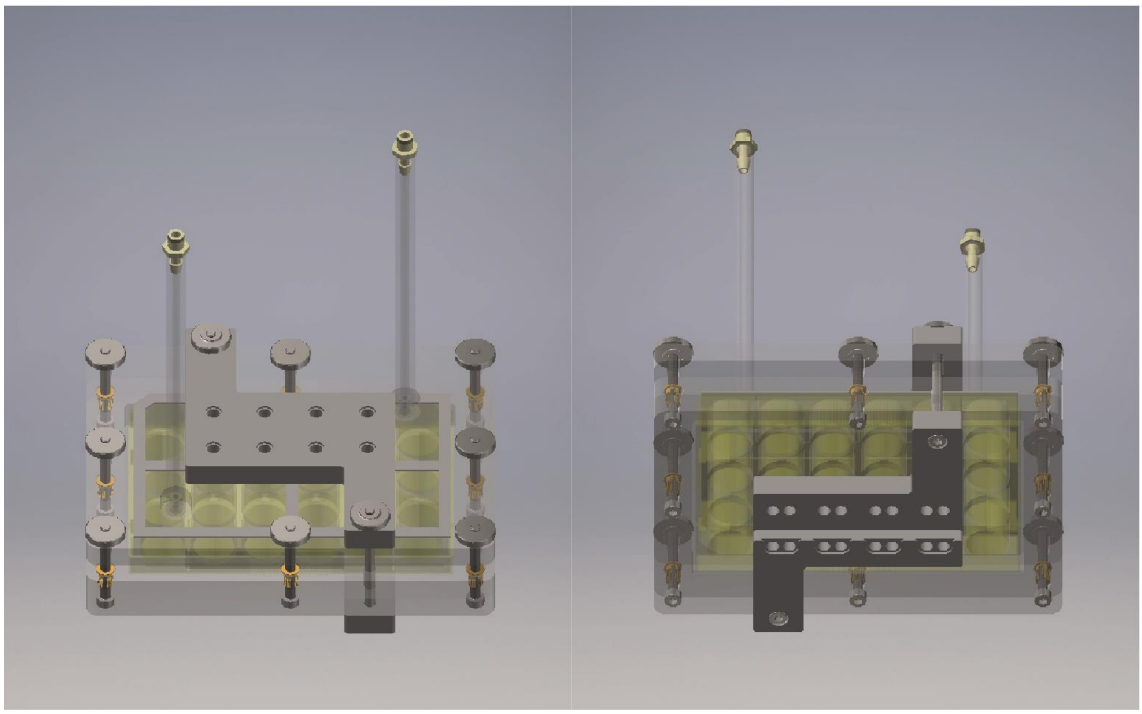
2.3.1 Úprava kultivační komory

Pro dynamickou kultivaci kmenových buněk v bioreaktoru byla již dříve navržena kultivační komora skládající se z krytu, mezivrstvy, podstavy, těsnění a kultivační destičky. Spodní vrstvu tvořila podstava, do které bylo možné vložit kultivační destičku. Na podstavu byla umístěna mezivrstva, na kultivační destičku bylo upevněno těsnění a na vrchol byla dán kryt. Takto sestavená soustava byla spojena pomocí šroubů s hlavou s vnitřním vybráním DIN219 M4x50 a rýhovaných matic DIN467 M4. Za účelem zajištění fixace nástavců pro fotodiody i pro LED diody ke kultivační komoře, byly polykarbonátové součásti kultivační komory obohaceny o díry pro šrouby.

Pro kultivaci kmenových buněk se využívá široká škála kultivačních destiček. Liší se od sebe jak rozměry a povrchovými úpravami jamiček, tak i jejich počtem. Volba kultivační destičky, jež umožňovala kultivaci kmenových buněk v bioreaktoru a která zároveň poskytovala možnost reálného hodnocení jejich metabolismu, podléhala kompromisu. Po uvážení požadavků a kritérií byla zvolena 24jamičková kultivační destička a pro snímání bylo použito pouze 8 vnitřních jamiček. Za účelem upevnění diod

a fotodiod, co nejblíže k buněčným vzorkům, byly navrženy nástavce z polykarbonátu, které bylo možné s pomocí šroubů s hlavou s vnitřním vybráním DIN912 M4x60 a rýhovaných matiček M4 DIN 467 připevnit ke kultivační komoře. Technické výkresy těchto nástavců lze nalézt v přílohách pod názvem Nástavec pro LED diody verze 1 a Nástavec pro fotodiody verze 1.

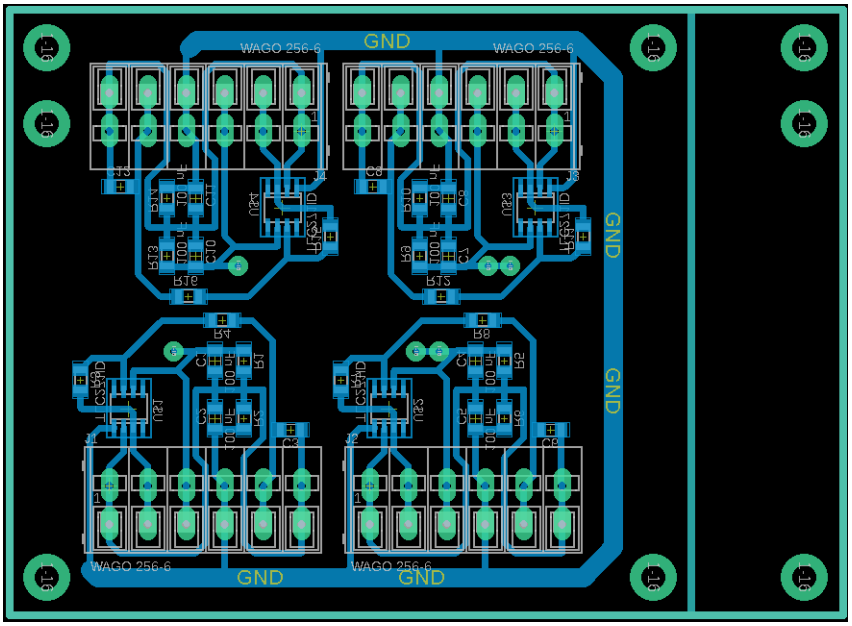
Fotodiody (BPV10, α = 40°, λ_p = 380–1100 nm) byly v nástavci umístěny tak, aby byly na středu jamiček kultivační destičky. Z ověřování funkčnosti systému pro jednokanálové snímání vyplynulo, že nejvhodnější barva LED diody pro hodnocení stavu metabolismu média je zeleno-žlutá. Z tohoto důvodu byla na nástavec umístěna LED dioda této barvy (L-53GD, λ = 565 nm, β = 60°, I = 5–32 mcd) a byla tam též umístěna LED dioda tmavě červené barvy (L-53HD, λ = 700 nm, β = 60°, I = 3–8 mcd). LED diody byly ve svém nástavci umístěny tak, aby vždy jedna fotodioda snímala signál ze dvou různě barevných LED diod. V nástavci pro LED diody byla vytvořena drážka, která zde byla za účelem zanoření kabeláže do nástavce a ponechání jeho stability. Na obrázku 2.17 je možné pozorovat kultivační komoru, včetně navržených nástavců. [37; 38; 39]



Obrázek 2.17: Upravená kultivační komora s nástavci pro LED diody a fotodiody

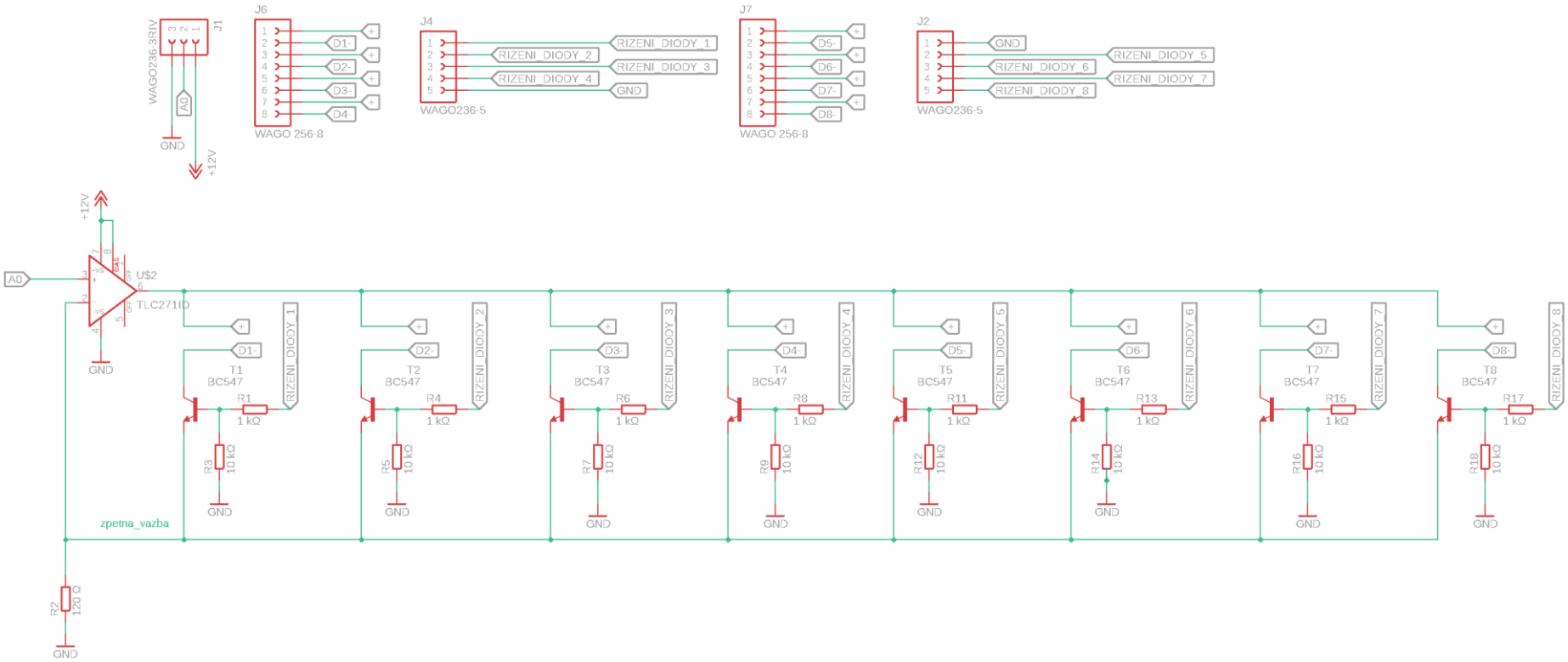
2.3.2 Úprava a návrh desek plošných spojů

Následně bylo přikročeno k úpravě stávajících pilotních desek plošných spojů v desky, které by umožňovaly osmikanálové snímaní. Byly vytvořeny dvě desky pro snímače, z nichž každá obsahovala čtyři jednotlivé již dříve zmíněné obvody s fotodiodami a transimpedančními zesilovači. Země na desce byly propojeny v jednu centrální a s pomocí vodičů bylo vytvořeno i centrální napájení U = 12 V. Zároveň byl rezistor ve zpětné vazbě vyjmut a nahrazen rezistorem o hodnotě R = 10 MΩ. Takto navržené desky byly vyrobeny a precizně osázeny THT a SMD součástkami. Navíc byly do desek vytvořeny otvory, aby bylo možné je v budoucnu navrstvit nad sebe. Desku plošných spojů lze pozorovat na obrázku 2.18.

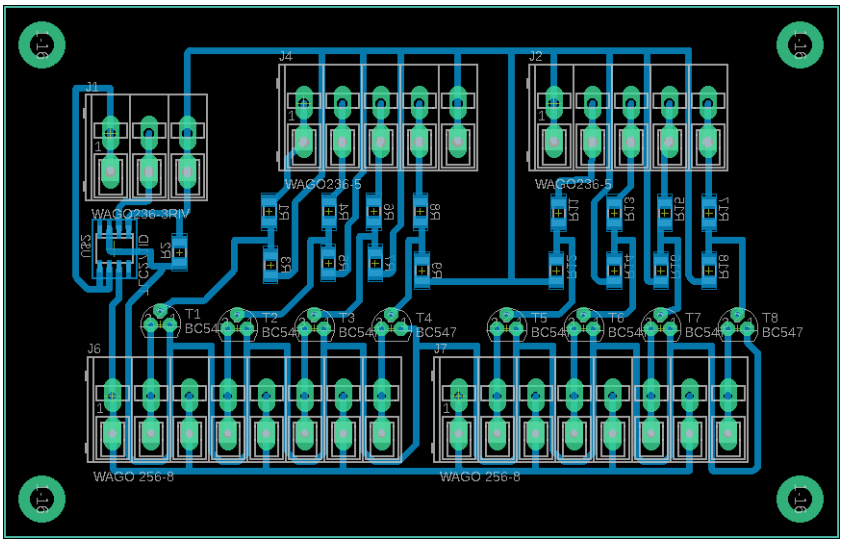


Obrázek 2.18: Deska plošných spojů fotodiod

Dále byly vytvořeny dvě desky pro LED diody. Každá deska byla osazena trans-impedančním zesilovačem, na jehož výstupu bylo v paralelním uspořádání umístěno osm diod, aby je bylo možné jednotlivě budit. Tohoto buzení bylo dosaženo za pomoci osmi tranzistorů BC547B, které v obvodu plnily funkci spínače. Takto navržené desky byly vyrobeny a byly za pomoci pájení osázeny součástkami. Do jejich rohů byly umístěny otvory pro budoucí spojení desek. Schéma obvodu lze pozorovat na obrázku 2.19 a desku plošných spojů na obrázku 2.20. [40]

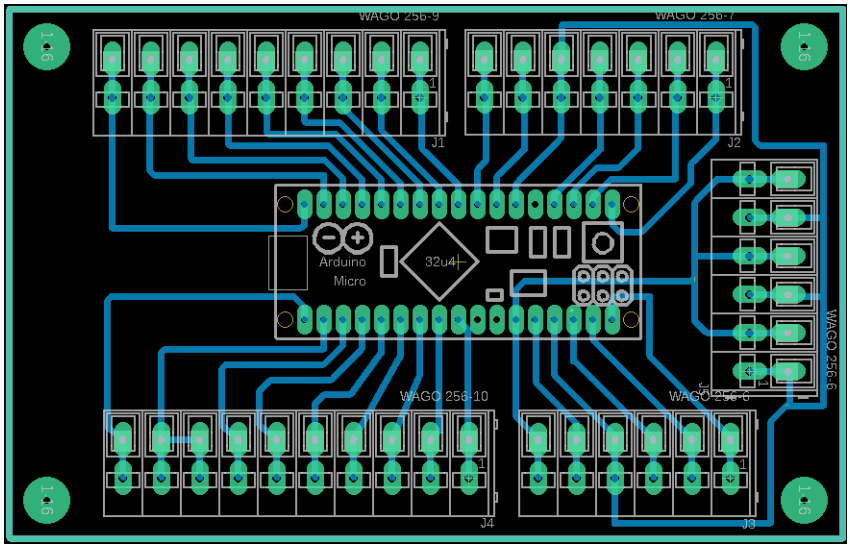


Obrázek 2.19: Schéma zapojení budičů LED diod s tranzistory v roli spínačů



Obrázek 2.20: Deska plošných spojů LED diod

Jako poslední byla navržena a vyrobena deska pro Arduino Micro. Deska byla navržena tak, aby její středobod tvořily patice a samotné zařízení Arduino Micro. Deska byla vyrobena a precizně osázena THT součástkami. Je možné jí pozorovat na obrázku 2.21. Pro účely spínání LED diod byl navržen v programu Arduino (Atmel, Ivrea, Itálie, 2019) dekodér s čtyřmi vstupními signály a šestnácti výstupními. Následně byly v programovacím prostředí LabView (National Instruments, Texas, USA, 2019) vytvořeny jednoduché kódy pro digitální řízení elektrického proudu umožňujícímu svit LED diod. Maximální hodnoty tohoto proudu byly nastaveny na I = 20 mA. Nebyl opomenut ani kód pro vyčítání hodnot elektrického napětí na výstupu fotodiod, ani kód pro možnost výběru LED diody. [41]



Obrázek 2.21: Deska plošných spojů pro Arduino Micro

2.3.3 Hardwarová sestava

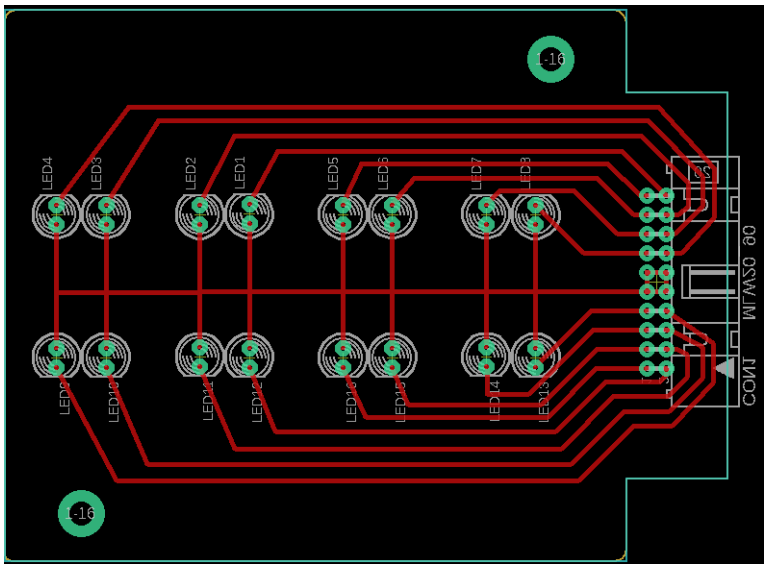
Po vyrobení veškerých desek a po jejich osázení součástkami bylo přistoupeno k jejich propojení. Finální soustava desek byla propojena pomocí kabelů a jednotlivé desky byly nad sebe navrstveny s pomocí šroubů s hlavou s vnitřním vybráním M3x50 a distančních sloupků. Na vrchol celé soustavy bylo umístěno zařízení NI USB-6001 OEM, které bylo k soustavě připojeno s pomocí podložek, matiček a šroubů s hlavou s vnitřním vybráním M2x15. Jako zdroj elektrického napětí U = 12 V byl použit DC/DC měnič, který toto elektrické napětí poskytoval pro účely napájení fotodiodových a diodových desek plošných spojů. Pro řízení spínání tranzistorů BC547B byly využity porty Arduina Micra s následujícím označením: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, MOSI, SS a SCK. Port GND na tomto zařízení byl propojen s libovolnou zemí na deskách pro LED diody. Digitální vstup na transimpedanční zesilovače na těchto deskách LED diod byly řízeny pomocí portů AO0 a AO1 na zařízení NI USB-6001 OEM. Pro vyčítání elektrického napětí U z fotodiod byly využity porty AI0, AI1, AI2, AI3, AI4, AI5, AI6 a AI7. Zároveň byl port AO GND a AI GND z tohoto zařízení propojen se zemí na jedné diodové desce. Veškeré země na deskách, jak na diodových, tak na fotodiodových, byly následně pomocí kabelů propojeny, aby nedošlo k výskytu různých potenciálů na zemích. [41; 42]

Následujícím krokem po dokončení soustavy desek bylo upevnění LED diod a fotodiod do polykarbonátových nástavců. Tato činnost byla provedena s pomocí kyanoakrylátového lepidla (známého především pod názvem sekundové, či vteřinové). Lepidlo bylo opatrně umístěno na podstavce v oblasti lemu diod/fotodiod, do drážky pro kabely a na vrchol nástavce pro fotodiody, za účelem upevnění kabelů na stálou pozici. Na propojení fotodiod s wagy na destičkách plošných spojů byl použit 16žilový plochý vodič, který byl rozdělen na dvě skupiny vždy po 8 vodičích. První skupina vodičů sloužila pro vyčítání hodnot elektrického napětí U ze 4 fotodiod nejvíce vzdálených od levého okraje nástavce (4 vodiče pro katody a 4 vodiče pro anody). Druhá skupina vodičů sloužila pro vyčítání zbylých 4 fotodiod a byla umístěna s pomocí kyanoakrylátového lepidla na první skupinu vodičů, avšak dosahovala svojí délkou pouze do poloviny délky první skupiny vodičů. Na propojení LED diod s deskou plošných spojů byl využit 20žilový plochý vodič, rozdělený do dvou skupin po 10 vodičích. První skupina byla umístěna na dno drážky a řídila 8 LED diod nejvzdálenějších od levého okraje nástavce (2 vodiče pro anody a 8 vodičů pro katody). Druhá skupina 10žilového vodiče byla nalepena do nad první a dosahovala opět pouze do poloviny délky vodičů umístěných na dno drážky. Takto připravené vodiče byly k fotodiodám a LED diodám připájeny. Oba ploché vodiče, jak 20žilový, tak 16žilový byl propojen s odpovídajícími wagy na deskách plošných spojů.

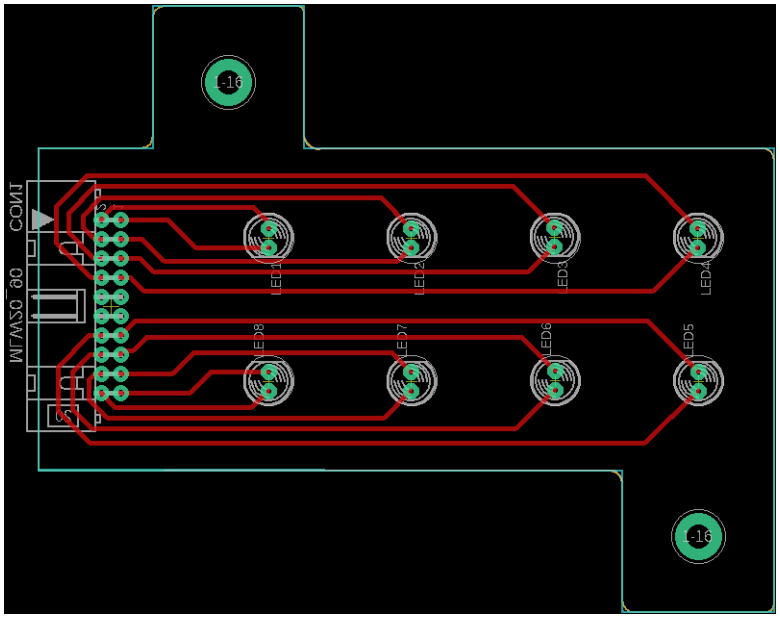
Dalším důležitým krokem bylo testování výše popsaného zařízení. Smyslem tohoto testování bylo naplnění 24jamičkové kultivační destičky živným médiem, její umístění do kultivační komory a snímání metabolického stavu média za pomoci hardwaru pro vícekanálové hodnocení stavu metabolismu kmenových buněk. Jednotlivé LED diody byly buzeny, aby poskytovaly světlo o dané λ, a s pomocí aplikace NI MAX (National Instruments, Texas, USA, 2019) bylo hodnoceno elektrické napětí U na fotodiodách. Během testování se však projevily konstrukční vady v upevnění LED diod a fotodiod na nástavce z polykarbonátu a bylo nutné přistoupit k novému návrhu kultivační komory. Současně se s konstrukčními vadami projevil i nedostatečný odstup signálu od šumu a integrační článek (filtr dolní propust) musel být inovován a jeho cut-off frekvence musela být snížena (R = 680 kΩ, C = 100 nF, fc = 2,34 Hz).

2.3.4 Finální úprava kultivační komory

Úprava kultivační komory spočívala v drobném posunutí otvorů pro diody a fotodiody, neboť v prvotně navrhovaných nástavcích nebyly vycentrované do středu jamiček. Technické výkresy nových nástavců lze nalézt v přílohách pod názvem Nástavec pro LED diody verze 2 a Nástavec pro fotodiody verze 2. Druhou úpravou byl způsob upevnění LED diod a fotodiod do nástavců. Použití kyanoakrylátového lepidla se projevilo jako nevhodné, a proto bylo přistoupeno k efektivnější možnosti. Ta spočívala v návrhu a výrobě desek plošných spojů, v nichž byla vysílací a snímací zařízení pevně upevněna, a jež bylo možné k polykarbonátovým nástavcům připevnit za pomoci šroubů a závitových vložek. Do polykarbonátových nástavců byly vytvořeny otvory pro závitové vložky a na deskách plošných spojů byly vytvořeny otvory pro šrouby. Desky byly navrženy tak, aby jejich rozměry byly o trošku menší než rozměry nástavců (tato varianta je příjemnější z hlediska práce se zařízením). Na desce plošných spojů s LED diodami byla použita společná anoda. Po výrobě desek byly pečlivě osázeny vysílacími a snímacími zařízeními a s pomocí 16žilového a 10žilového vodiče připojeny k již dříve vyrobených deskám. Následně byla sestava desek plošných spojů a nástavců pro LED diody a fotodiody opětovně podrobena experimentu s živným médiem. Během tohoto testu se žádné konstrukční vady neprojevily. Na obrázcích 2.22 a 2.23 lze pozorovat desky plošných spojů sloužící k upevnění fotodiod a LED diod do polykarbonátových nástavců.



Obrázek 2.22: Deska pro upevnění LED diod k polykarbonátovému nástavci



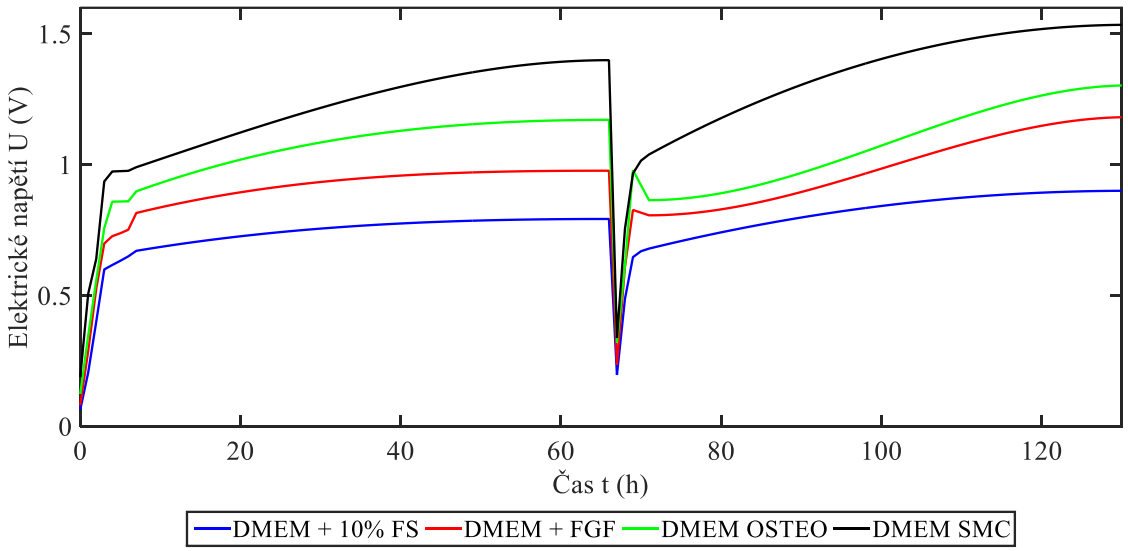
Obrázek 2.23: Deska pro upevnění fotodiod k polykarbonátovému nástavci

Následujícím krokem bylo umístění navrženého elektronického zařízení do kultivačního bioinkubátoru. Zařízení bylo navrženo tak, aby většina desek plošných spojů byla mimo inkubátor (kvůli bezpečnosti). Zbylé desky umožňující pevné spojení s polykarbonátovými nástavci byly umístěny do inkubátoru, včetně 24jamičkové kultivační destičky a komory.

3 Výsledky

3.1 Surová data poskytovaná fotodiodou

Navržený aparát snímající stav metabolismu pomocí optoelektronických členů byl umístěn do bioreaktoru a s jeho pomocí byly provedeny buněčné experimenty. Do kultivační destičky byly umístěny mesenchymální kmenové buňky původem z tukové tkáně a byly podrobeny dynamické kultivaci s různými typy kultivačních médií. Na obrázku 3.1 lze pozorovat ukázku surových dat poskytnutých fotodiodou.



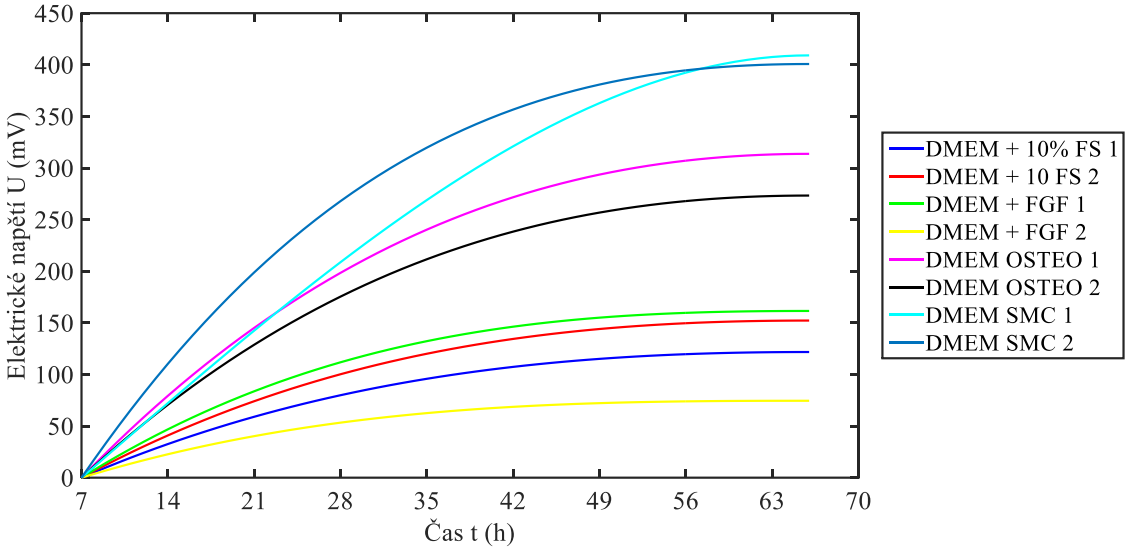
Obrázek 3.1: Surová data ze snímačů (fotodiod)

Buněčné experimenty byly prováděny na 4 různých kultivačních médiích. Jednalo se o DMEM obohacený o 10% fetální sérum (v grafu pod označením DMEM + 10% FS), DMEM obohacený o fibroblastové růstové faktory (DMEM + FGF), DMEM obohacený o růstové faktory podporující růst osteoblastů (DMEM OSTEO) a o DMEM obohacený o růstové faktory podporující růst hladkých svalových buněk (DMEM SMC). Od každého média byly vždy zaznamenány hodnoty elektrického napětí U ze 2 zkoumaných analytů.

Prvním krokem bylo rozdělení si surových dat do dvou oblastí. Jedna oblast byla v rozmezí 0–67 a druhá byla v rozmezí 68–130 hodin. Na počátku první oblasti lze pozorovat postupný nárůst elektrického napětí U a jeho chvění. Tato oblast byla z vyhodnocování vyjmuta. Na rozhraní první a druhé oblasti lze pozorovat výrazný pík, který odpovídá výměně kultivačního média. Hodnoty elektrického napětí U pro tento pík byly z vyhodnocování stavu metabolismu kmenových buněk též vyjmuty.

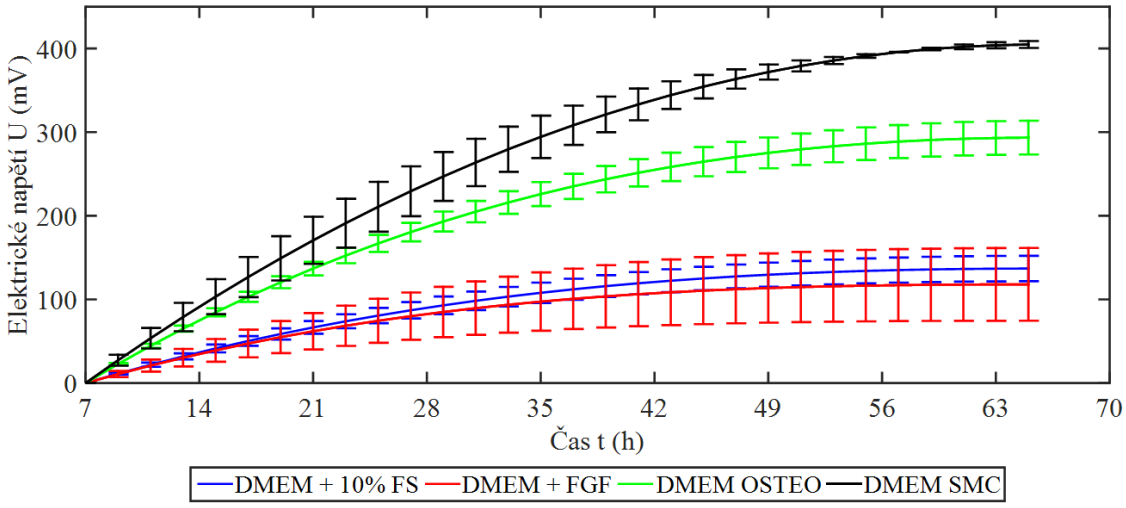
3.2 Data z oblasti před výměnou kultivačního média

Z první oblasti zájmu byla vybrána data v časovém rozmezí 7–66 hodina. Po výběru dat následovalo srovnání offsetů (viz obrázek 3.2).



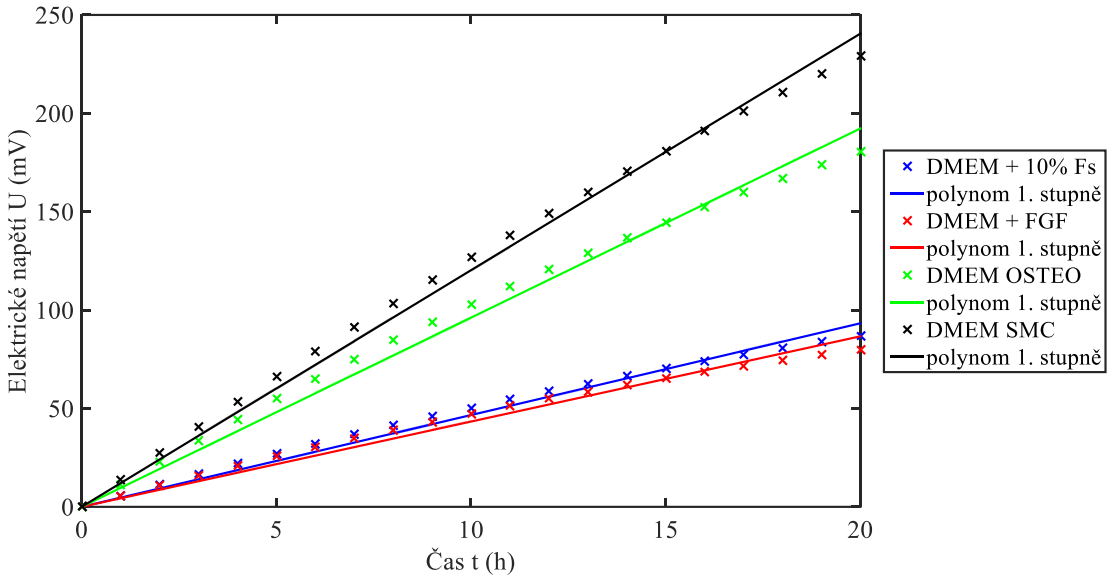
Obrázek 3.2: Hodnoty elektrického napětí U generovaného fotodiodou pro jednotlivá kultivační média po srovnání offsetů I

Z hodnot elektrického napětí U pro kultivační roztoky stejné charakteristiky byly vypočítány střední hodnoty. Po jejich zjištění byly do grafického znázornění vyneseny odchylky, které byly do grafu zaneseny za účelem určení, zdali jsou mezi kultivačními médii v čase 55 hodin od počátku kultivace signifikantní rozdíly. Na obrázku 3.3 lze pozorovat střední hodnoty pro jednotlivá kultivační média a jejich chybové úsečky.



Obrázek 3.3: Střední hodnoty elektrického napětí U pro jednotlivá kultivační média z oblasti před jejich výměnou včetně chybových úseček

Následně byla z dat generovaných fotodiodou vybrána oblast, již by bylo možné proložit polynomem 1. stupně. Tato oblast odpovídala časovému rozsahu 7–27 hodin od počátku kultivace. Poté byla upravena časová osa, aby bylo možné proložit data polynomem 1.stupně, který by byl charakteristický tím, že by obsahoval pouze hodnotu směrnice a proměnnou t. Z takto připravených hodnot elektrického napětí U byly opětovně vypočítány střední hodnoty – viz obrázek 3.4.



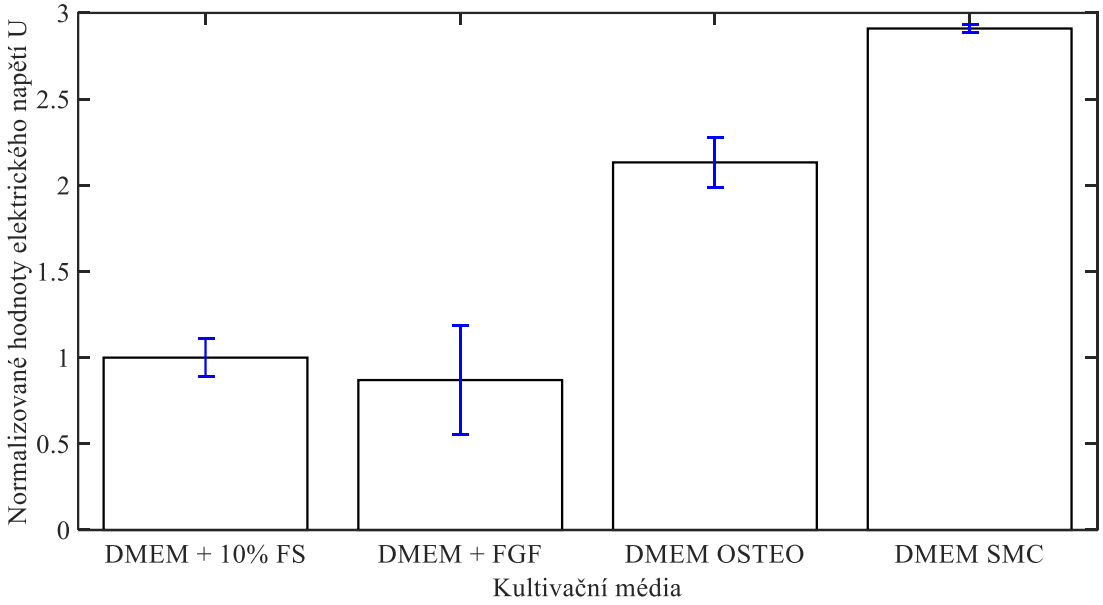
Obrázek 3.4: Polynomy 1.stupně pro střední hodnoty elektrického napětí U kultivačních médií

Z polynomů 1.stupně bylo posléze možné určit jejich rovnice. Díky jejich směrnicím bylo možné zjistit jejich trend a provést jejich vzájemné porovnání v souvislosti s buněčným růstem. Tyto rovnice lze nalézt v tabulce 3.1.

Tabulka 3.1: Rovnice polynomů 1.stupně středních hodnot elektrického napětí U pro jednotlivá kultivační média

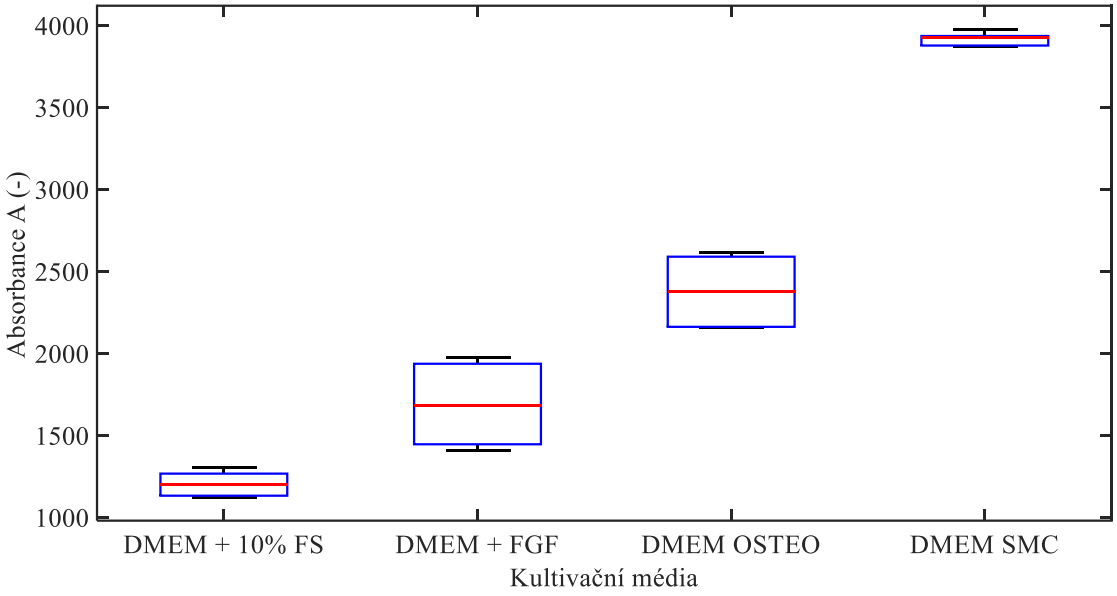
Kultivační médium	Rovnice polynomů 1.stupně
DMEM + 10% FS	$U = 4{,}66 \cdot t$
DMEM + FGF	$U = 4{,}33 \cdot t$
DMEM OSTEO	$U = 9{,}61 \cdot t$
DMEM SMC	$U = 12{,}03 \cdot t$

Dále byly ze středních hodnot elektrického napětí U generovaného fotodiodami určeny hodnoty napětí, které byly zaznamenány v 55 hodině od počátku kultivace ASC. Tyto hodnoty pro jednotlivá kultivační média, včetně chybových úseček, byly vyneseny do sloupcového grafu, který byl posléze znormalizován – viz obrázek 3.5.



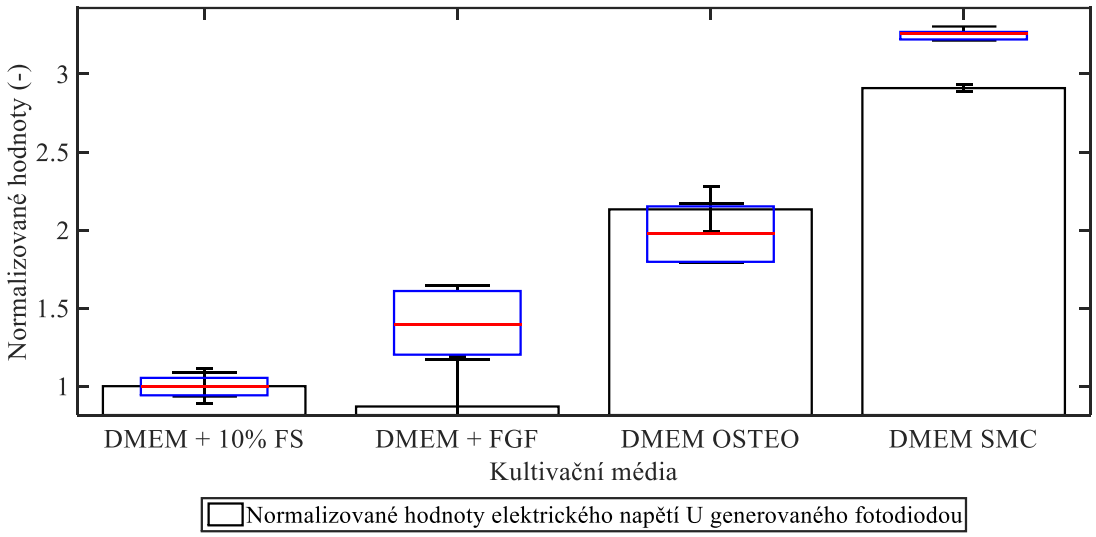
Obrázek 3.5: Normalizované hodnoty elektrického napětí U pro jednotlivá kultivační média v 55 hodině od počátku kultivace

Následně byly provedeny testy životaschopnosti kmenových buněk (ASC), konkrétně MTT testy. Byly provedeny v na 4 druzích kultivačních médií. Jednalo se o kultivační médium DMEM obohacené o 10% fetální sérum, o DMEM obohacený o fibroblastové růstové faktory, DMEM obohacený o růstové faktory podporující vývoj osteoblastů a o DMEM obohacený o růstové faktory podporující diferenciaci směrem k hladkým svalovým buňkám. Od každého média bylo MTT testu podrobeno 10 vzorků a s pomocí spektrofotometru byla po 55 hodinách od počátku kultivace zjištěna jejich absorbance. Z hodnot absorbance pro jednotlivá kultivační média byly zjištěny mediány, interkvartilová rozpětí, minima a maxima, která byla vynesena do boxplotů – viz obrázek 3.6.



Obrázek 3.6: Grafické znázornění mediánů, interkvartilových rozpětí, minim a maxim pro jednotlivá kultivační média v 55 hodině od počátku kultivace pro MTT testy

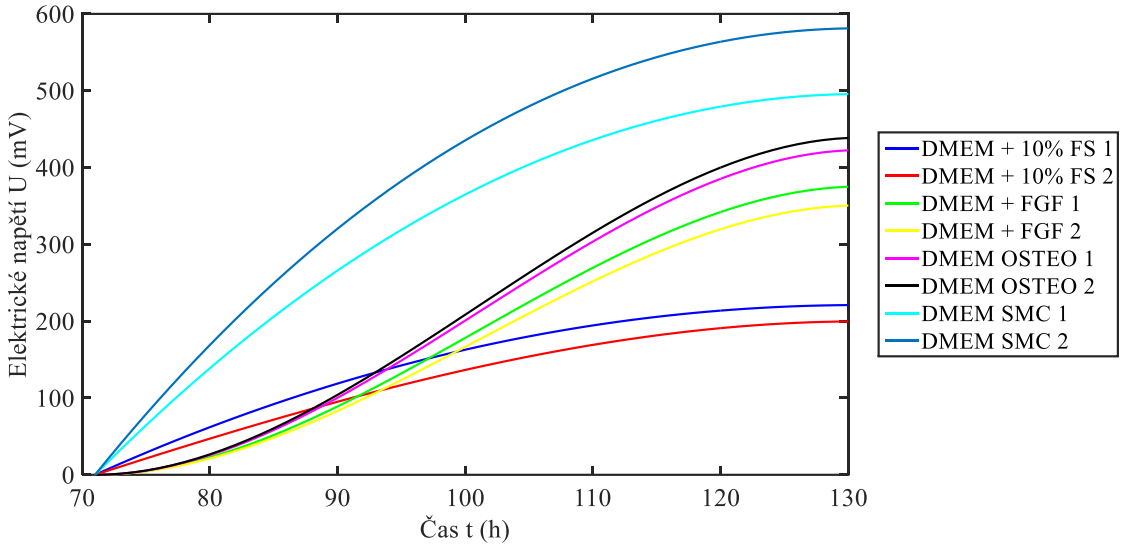
Výše uvedené grafické znázornění mediánů pro jednotlivá kultivační média bylo znormalizováno, aby jej bylo možné porovnat s hodnotami elektrického napětí získaného fotodiodou – viz obrázek 3.7.



Obrázek 3.7: Porovnání normalizovaných dat z fotodiody a MTT testů v 55 hodině od počátku kultivace

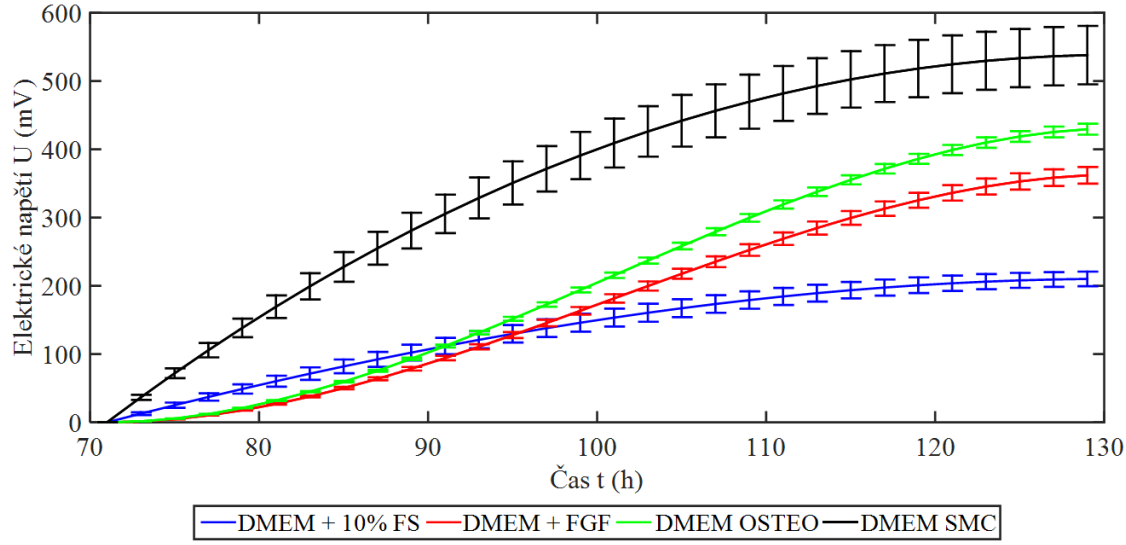
3.3 Data z oblasti po výměně kultivačního média

V druhé oblasti, kterou lze na obrázku identifikovat jako oblast po výrazném propadu elektrického napětí U, bylo postupováno obdobně jako v oblasti před výměnou kultivačního média. Byla vybrána data v oblasti zájmu v rozmezí 71–130 hodin. Poté proběhlo srovnání offsetů pro jednotlivá kultivační média – viz obrázek 3.8.



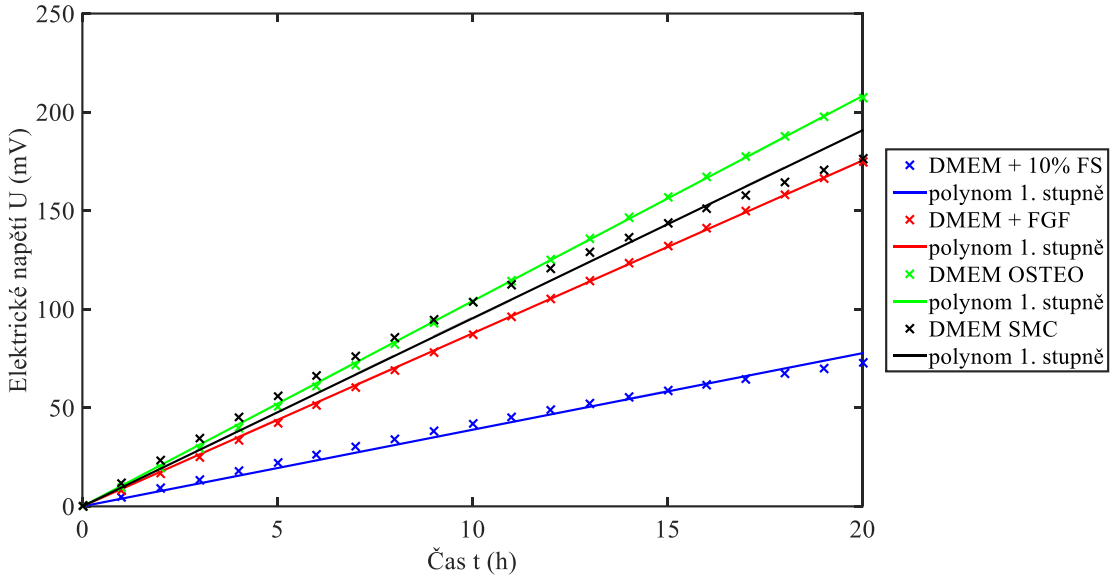
Obrázek 3.8: Hodnoty elektrického napětí U generovaného fotodiodou pro jednotlivá kultivační média po srovnání offsetů II

Následně byly vypočítány střední hodnoty elektrického napětí U pro jednotlivá kultivační média. Do jejich grafického znázornění byly zaneseny odchylky od středních hodnot, což je možné pozorovat na obrázku 3.9.



Obrázek 3.9: Střední hodnoty elektrického napětí U pro jednotlivá kultivační média včetně chybových úseček

Následně byla z hodnot elektrického napětí U generovaného fotodiodou vybrána oblast lineárního charakteru. Tato oblast odpovídala rozsahu časů t = 91–101 h. Časová osa byla upravena, aby bylo možné naměřená data z fotodiody proložit přímkou procházející počátkem souřadnicového systému. Z hodnot elektrického napětí U byly vypočítány střední hodnoty, které byly zaneseny do grafu a proloženy polynomem 1.stupně – viz obrázek 3.9.

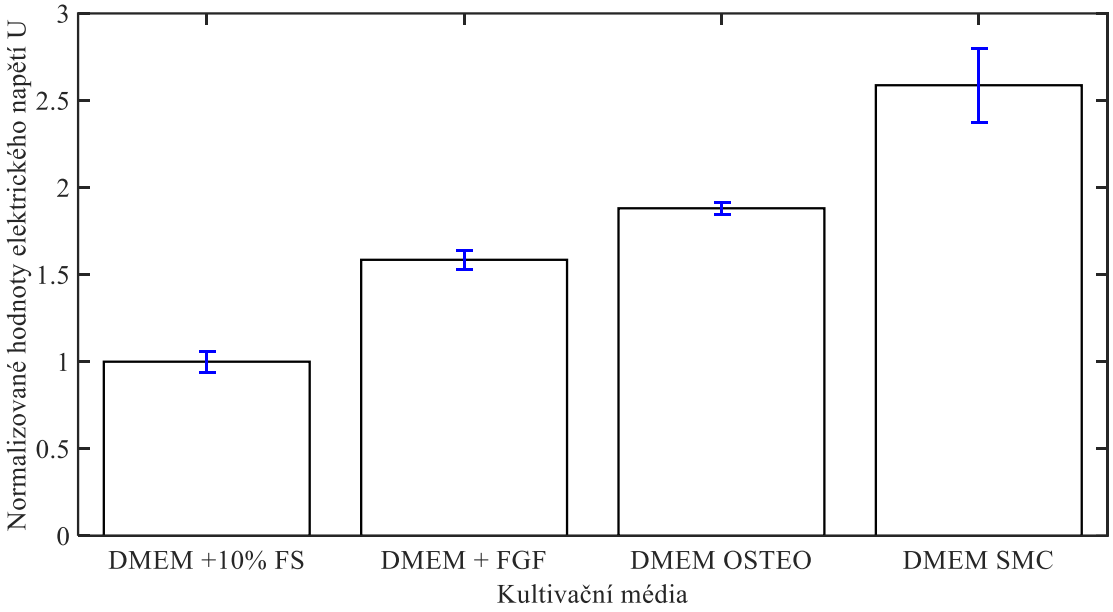


Obrázek 3.10: Polynomy 1.stupně středních hodnot elektrického napětí U pro vyměněná kultivační média

Tabulka 3.2: Rovnice polynomů 1.stupně středních hodnot elektrického napětí U pro jednotlivá kultivační média

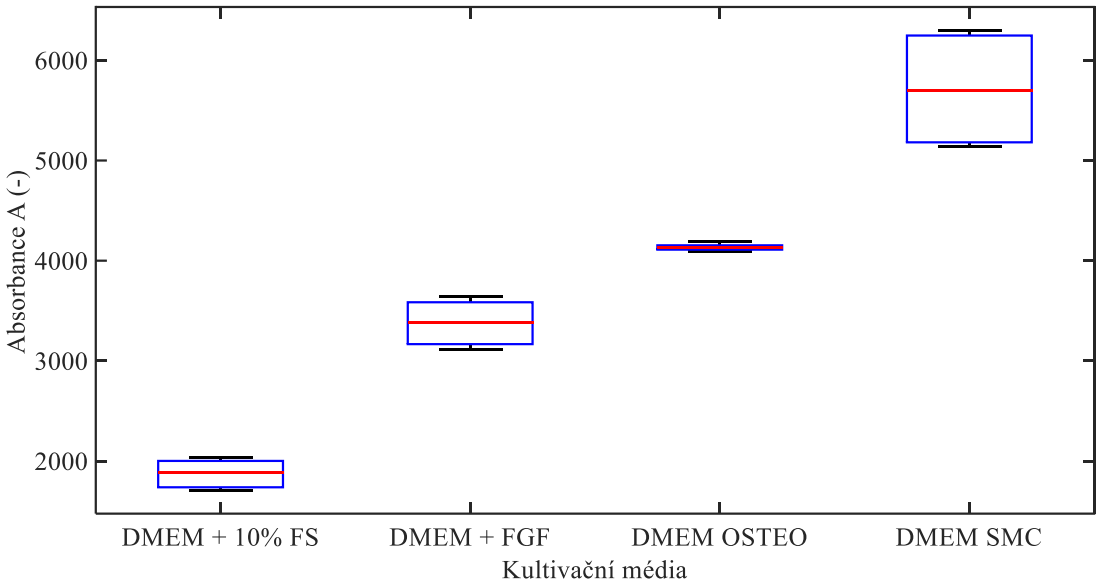
Kultivační médium	Rovnice polynomů 1.stupně
DMEM + 10% FS	$U = 3{,}88 \cdot t$
DMEM + FGF	$U = 8{,}71 \cdot t$
DMEM OSTEO	$U = 10{,}41 \cdot t$
DMEM SMC	$U = 9{,}54 \cdot t$

Dále byly ze středních hodnot elektrického napětí U vybrány hodnoty napětí, které byly vygenerovány fotodiodou ve 118 hodině od počátku kultivace kmenových buněk. Toto hodnoty byly vyneseny do krabicového grafu. Zároveň s nimi byly zobrazeny i odchylky. Následně bylo grafické zobrazení znormalizováno – viz obrázek 3.11.



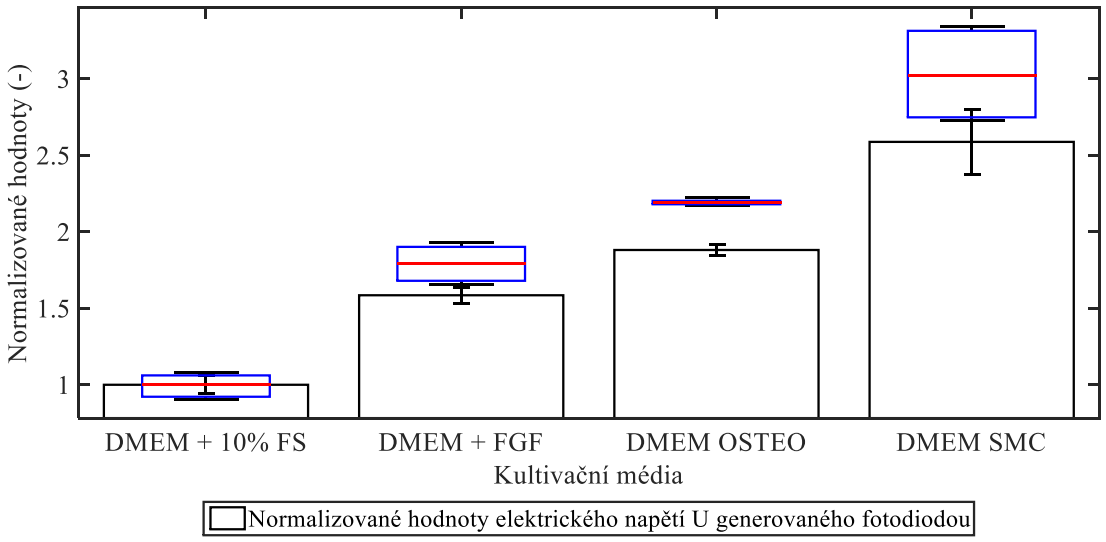
Obrázek 3.11: Normalizované hodnoty elektrického napětí U pro jednotlivá kultivační média ve 118 hodině od počátku kultivace

Dalším krokem bylo provedení testů životaschopnosti kmenových buněk (MTT testů). Jako buněčná kultura opětovně posloužily mesenchymální kmenové buňky tukové tkáně. Testy byly provedeny na již dříve zmíněných 4 druzích média. Od každého média se testu podrobilo 10 vzorků, které byly po 118 hodině od počátku kultivace vyhodnoceny za pomoci spektrofotometru. Z hodnot absorbance byly zjištěny mediány, interkvartilová rozpětí, minima a maxima. Veškeré zjištěné statistické údaje vypovídající o absorbancích jednotlivých kultivačních médií byly zaneseny do grafů s pomocí boxplotů.



Obrázek 3.12: Grafické znázornění mediánů, interkvartilových rozpětí, minim a maxim pro jednotlivá kultivační média ve 118 hodině od počátku kultivace pro MTT testy

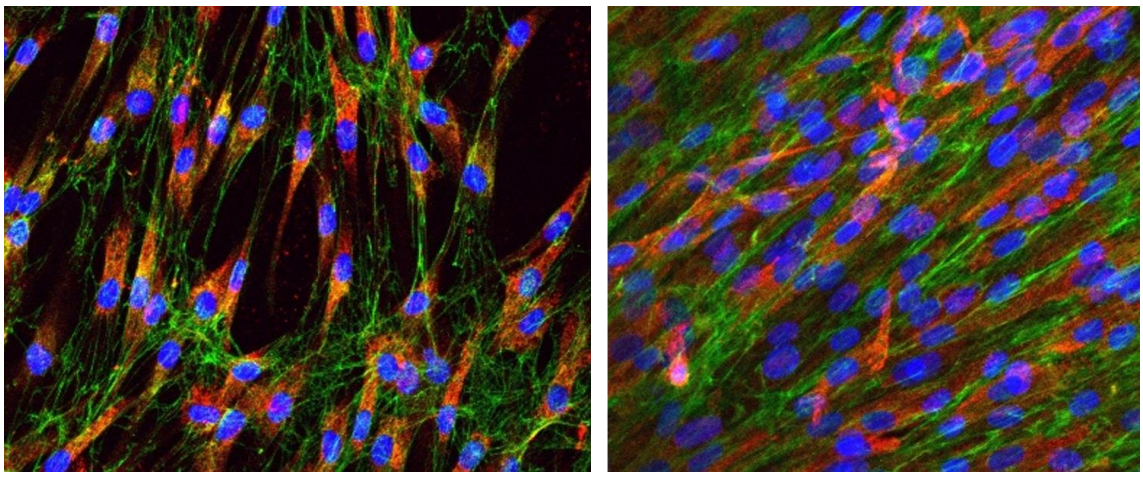
Toto grafické znázornění statistických ukazatelů (obrázek 3.12) bylo za účelem porovnání s hodnotami poskytovanými fotodiodou normalizováno. Porovnání je možné pozorovat na obrázku 3.13.



Obrázek 3.13: Porovnání normalizovaných dat z fotodiody a MTT testů ve 118 hodině od počátku kultivace

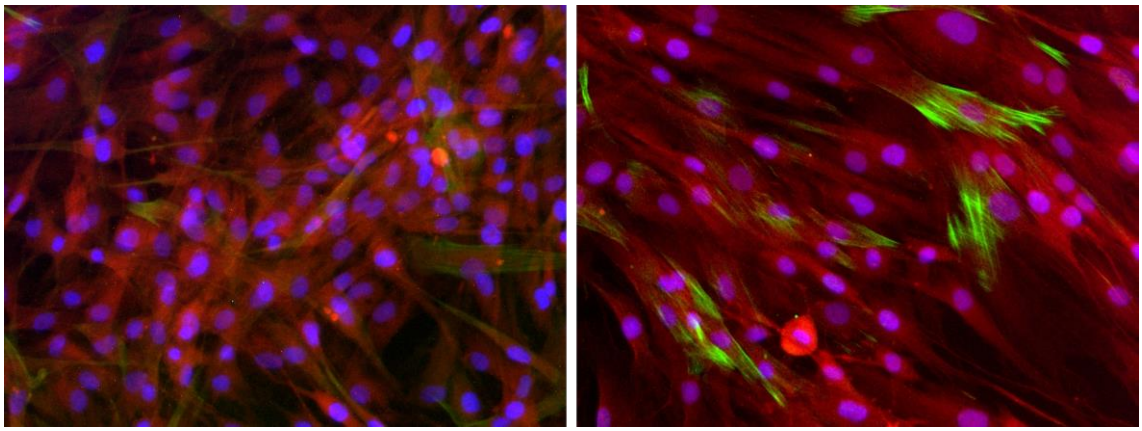
3.4 Imunofluorescenční hodnocení

Po provedení MTT testů jednotlivých kultivačních médií bylo přistoupeno k imunofluorescenčnímu hodnocení. Na obrázku 3.14 lze pozorovat porovnání extracelulárních proteinů pro ASC po třídenní pulzatilní zátěži v bioreaktoru stimulované pomocí proliferačního média a diferenciačního média směrem k SMC. Extracelulární proteiny byly zobrazeny pomocí fluorescenčního barvení: kolagen 1 (červená barva), fibrinektin (zelená barva) a jádra DAPI (modrá barva). Fotografie byla pořízena za pomoci konfokálního mikroskopu Carl Zeiss LSM 800 (obj. 25x).



Obrázek 3.14: Porovnání produkce extracelulárních proteinů pro kultivaci probíhající v proliferačním médiu (vlevo) a diferenciačním médiu směrem k SMC (vpravo); autor: Roman Matějka

Dále bylo provedeno porovnání proliferačního média a diferenciačního média směrem k SMC na úrovni aktinového skeletu. Na obrázku 3.15 lze pozorovat kultivaci ASC ve výše uvedených kultivačních médiích po dobu 3 dní pod pulzatilní zátěží. Calponin (zelená barva), F-actin (červená barva) a jádra DAPI (modrá barva) byly zobrazeny fluorescenčním barvením a pomocí mikroskopu Leica DMI b (obj. 8x).



Obrázek 3.15:Porovnání diferenciačních markerů kultivace ASC za použití proliferačního média (vlevo) a diferenciačního média směrem k SMC (vpravo); autor: Roman Matějka

4 Diskuse

4.1 Spektrální odezva kultivačních médií

Prvním důležitým krokem, který byl za účelem návrhu elektronického zařízení snímajícího metabolickou aktivitu kmenových buněk učiněn, bylo ověření myšlenky, že by bylo možné vyhodnocovat metabolismus na základě fungování transmisního jevu, tedy na základě průchodu světla přes kultivační médium a jeho vyhodnocování. Ověření této myšlenky bylo provedeno za pomoci spektrofotometru a kultivačních médií. Jednalo se o čerstvé kultivační médium, 3 dny staré kultivační médium od statické a od dynamické kultivace a o 3,5 dní staré kultivační médium, které nahradilo v kultivační komoře již dříve zmíněná média, též od buněčné kultury podrobené statické i dynamické kultivaci. Porovnání spektrofotometrické odezvy čistého média, média 3 dny starého pod dynamickou kultivací a 3,5 dní staré pod dynamickou kultivací je možné pozorovat na obrázku 2.3. Na obrázku jsou patrné rozdíly mezi médii, které mají odlišný projev na různých vlnových délkách. Grafické znázornění spektrální odezvy lze pomyslně rozdělit do čtyř oblastí, v nichž se nachází píky absorbance jednotlivých médií. V první oblasti píků pohybující se v rozmezí vlnových délek $\lambda = 280–330$ nm jsou spektrální čáry podobného charakteru a z tohoto důvodu se pro hodnocení metabolismu jeví jako nevhodné. V druhé oblasti, jejíž vlnové délky se pohybují v rozmezí $\lambda = 330–380$ nm, jsou již rozdíly mezi jednotlivými médii patrné a z tohoto důvodu by ji bylo možné použít. Důvodem, proč byla tato oblast z potencionálně použitelných vyjmuta, byl charakter těchto vlnových délek, které by na buněčnou kulturu v případě aplikace měly negativní účinek. Třetí oblast mající vlnové délky v rozmezí $\lambda = 380–430$ nm byla z hlediska použitelnosti výhodnější. Poskytovala možnost odlišení metabolického stavu jednotlivých kultivačních médií a v případě jednorázové a krátkodobé aplikace světla poskytovala i bezpečné hodnocení z pohledu buněčné kultury. Poslední oblast měla vlnové délky v rozmezí $\lambda = 430–600$ nm a poskytovala největší a nejlépe rozlišitelné píky. Na obrázcích 2.4, 2.5 a 2.6 lze pozorovat obdobné výsledky jako na obrázku 2.3. Jsou zde patrné píky, které je možné rozdělit do čtyř již výše zmíněných oblastí. Jediný rozdíl, který je možné spatřovat, je v první oblasti výskytu píků. Zde je možné jednotlivé píky velmi dobře odlišit. Tato vlnová délka by však měla negativní vliv na buněčnou kulturu, a proto ji nelze použít při hodnocení stavu metabolismu kmenových buněk.

Spektrální odezva jednotlivých kultivačních médií byla tedy vytyčena na rozmezí vlnové délky $\lambda = 280–680$ nm. Jako potenciálně použitelné pro hodnocení metabolického stavu kmenových buněk se však jevilo pouze rozmezí $\lambda = 380–600$ nm, což odpovídá fialové, modré, zelené a zeleno-žluté barvě viditelného světla.

4.2 Hardware pro jednokanálové hodnocení metabolismu kmenových buněk

Po identifikaci vlnových délek, na kterých by bylo možné vyhodnocovat stav metabolismu kmenových buněk bylo přistoupeno k návrhu a výrobě elektronického zařízení, jenž by poskytovalo možnost jednokanálového hodnocení. Prvotně byla pozornost soustředěna na výběr vhodných budičů světla a senzorů a na návrh elektronických obvodů, v nichž by zvolené elektronické součástky byly využity. Jako zdroj světla byla zvolena LED dioda, a to především díky vysoké účinnosti, mechanické odolnosti, širokému spektru vyzařovaných vlnových délek a své velikosti, která bude při implementaci do kultivační komory poskytovat výhodu. Za účelem dodávání stabilního elektrického proudu do LED diody byl do elektrického obvodu dodán proudový zdroj. Do obvodu byl dodán i regulátor napětí a potenciometr, aby bylo možné regulovat intenzitu svitu LED diod (viz obrázek 2.9). Do role snímače byla zvolena fotodioda, jejíž plusy tkví v rychlé reakci na změnu osvětlení, ve velkém rozsahu výstupního signálu při jejím zapojení ve fotovodivostním (odporovém) režimu a v lineárním růstu anodového proudu při rovnoměrném zvětšování osvětlení. Z tohoto důvodu bylo využito zapojení fotodiody v odporovém režimu. Katoda fotodiody byla propojena s virtuální zemí, invertující svorka transimpedančního zesilovače brala signál z virtuální země a neinvertující brala signál po průchodu fotodiodou. Na výstup tohoto obvodu byl následně přidán filtr typu dolní propust, aby bylo zabráněno průniku nepotřebného šumu do signálu z fotodiody (viz obrázek 2.10). Takto navržené elektronické obvody byly realizovány na nepájivém poli, čímž byla ověřena jejich funkčnost. Následně byly navrženy a vyrobeny desky plošných spojů (viz obrázek 2.11).

Dalším krokem bylo navržení 3D stojánku, který by umožňoval umístění spektrofotometrické kyvety, LED diody a fotodiody. Tento stojánek byl navržen jako malý kvádr, který svými rozměry malinko převyšuje rozměry spektrofotometrické kyvety. Do vrchní části kvádru byl umístěn otvor pro vsunutí kyvety a do boků byly umístěny otvory pro fotodiodu a LED diodu (vycentrovaná na střed fotodiody, naproti fotodiodě) – viz technické výkresy. Po vytisknutí stojánku bylo nutné otvor pro kyvetu trochu zbrousit, neboť v jeho návrhu nebylo počítáno s rozpínavostí materiálu pro 3D tisk.

Po návrhu a výrobě stojánku bylo přikročeno k ověření funkčnosti hardwaru pro jednokanálové hodnocení metabolického stavu kmenových buněk. Do stojánku byla vložena kyveta, do bočních otvorů stojánku byly umístěny odpovídající elektronické součástky (LED dioda a fotodioda) a byly zde upevněny pomocí lepicí pásky, která zabraňovala průchodu viditelného světla. Desky plošných spojů byly za účelem jejich napájení propojeny se zařízením NImyDAQ, jež bylo propojeno pomocí USB konektoru s laptopem. Výstupní napětí získané z fotodiody bylo přivedeno na digitální voltmetr a stojánek včetně kyvety se zkoumaným analytem byl umístěn do krabice, aby pronikání světla k snímacímu prvku bylo co nejmenší (simulace bioreaktoru). Postupně docházelo k obměňování barevných LED diod. Pro snímání byly použity LED diody fialové, modré,

zelené a zeleno-žluté barvy, které svými vlnovými délkami pokrývaly oblast λ, jež bylo možné použít pro hodnocení metabolismu kmenových buněk. Ověření funkčnosti bylo provedeno na 15 různých vzorcích, avšak pro účely reprezentace dat byly vybrány pouze následující zajímavé analyty: endotelové médium, DMEM + FS a DMEM XTT. Tyto vzorky byly podrobeny experimentu během jejich normální a obohacené hladiny o CO_2. Výstupní hodnoty elektrického napětí U snímaného z fotodiody pro různé analyty a LED diody lze pozorovat v tabulkách 2.1 a 2.2. Je zde patrný rozdíl mezi médii s normální a obohacenou atmosférou o CO_2. V případě fialové diody se jedná pouze o malé napěťové rozdíly, což značí, že pro hodnocení stavu metabolismu není vhodná. Modrá dioda se též jevila jako nevhodná, neboť hodnoty snímaného elektrického napětí U různých analytů při neobohacené atmosféře byly identické, což bylo pravděpodobně zapříčiněno interakcemi modrého světla a spektrofotometrické kyvety. Lepších výsledků bylo dosaženo pomocí zelené a zeleno-žluté LED diody. Zelená dioda poskytovala velký napěťový rozdíl, avšak její hodnoty elektrického napětí U analytů neobohacených o CO_2 byla poměrně nízká, což by v případě hodnocení metabolismu mohlo působit problémy. Zeleno-žlutá LED dioda měla dobře rozeznatelné napěťové rozdíly a její hodnoty elektrického napětí analytů neobohacených o CO_2 byla vysoká. Díky těmto pozitivním vlastnostem byla vyhodnocena, jako vhodná pro použití v bioreaktoru při hodnocení metabolického stavu kmenových buněk.

Současně s ověřováním hardwaru pro jednokanálové hodnocení stavu metabolismu proběhlo spektrofotometrické hodnocení výše zmíněných médií. Tyto výsledky lze pozorovat na obrázcích 2.13, 2.14 a 2.15. Na každém obrázku lze nalézt porovnání analytu s normální a obohacenou atmosférou o CO_2. Zároveň jsou zde zaneseny body A, B, C a D, které odpovídají svojí vlnovou délkou barvám použitých LED diod. Pořadové číslo u bodu značí, zdali se jedná o atmosféru neobohacenou (1) nebo obohacenou (2) o CO_2. V těchto bodech bylo provedeno ověřování funkčnosti hardwaru pro jednokanálové hodnocení stavu metabolismu, jehož výsledky jsou uvedeny výše. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnové délce lze porovnávat s elektrickým napětím U získaným z fotodiody. Největší rozdíly v absorbanci analytu neobohaceného a obohaceného o CO_2 byly zaznamenány u vlnové délky, která svojí barvou odpovídá zeleno-žluté LED diodě, což je LED dioda, která byla při ověřování funkčnosti jednokanálového hardwaru pro hodnocení metabolismu označena za vhodnou.

4.3 Hardware pro vícekanálové hodnocení metabolismu kmenových buněk

Prvním krokem, který bylo nutné při návrhu elektronického zařízení, jenž by sloužilo pro vícekanálové hodnocení stavu metabolismu kmenových buněk, udělat, byla úprava stávající kultivační komory. Tato kultivační komora se skládala z krytu, mezivrstvy, podstavy, kultivační destičky, těsnění, závitových vložek Simaf Serplast C040H080, šroubů s hlavou s vnitřním vybráním DIN219 M4x50 a rýhovaných matic DIN467 M4.

Stávající forma kultivační komory se již při buněčných experimentech projevila jako vhodná a z tohoto důvodu nebylo do její formy nijak zasahováno. Pouze v ní byly vyhloubeny díry pro stabilizaci nástavců pro fotodiody a pro LED diody na jednom místě – viz technické výkresy. Tyto nástavce byly ke kultivační komoře připevněn pomocí šroubů s hlavou s vnitřním vybráním DIN219 M4x60 a rýhovaných matic DIN467 M4.

Při návrhu nástavce pro fotodiody bylo třeba uvážit několik požadavků, které na něj byly kladeny. Z hlediska počtu jamiček kultivační destičky, byla snaha o vyhodnocování stavu metabolismu kmenových buněk v co největším jejich počtu, neboť takováto kultivační destička by poskytovala možnost výběru nejlepších kultivačních jamiček. Počet fotodiod byl však zároveň omezován rozměry použitých diod a fotodiod. Druhým omezovací kritériem byla pozice kultivačních jamiček na destičce. Jako nevhodné pozice jamiček se jevily jamičky na okrajích, protože snímání na těchto pozicích by z konstrukčního hlediska bylo problémové a zároveň by byla reálná možnost výskytu odrazů světla vznikajících na okrajích kultivační destičky, což by do procesu hodnocení metabolismu zanášelo chyby. Jako nejvhodnější se tedy jevila kultivační destička, která má 24 kultivačních jamiček. Na této destičce bylo možné nalézt osm vnitřních jamiček a z tohoto důvodu byl navržen nástavec na fotodiody obsahující osm otvorů pro snímače. V případě, že by nástavec byl obdélníkového tvaru, došlo by ke kolizi s hadičkami. Z tohoto důvodu byl navržen nástavec atypického tvaru, který je na svých okrajích připevněn ke kultivační komoře a v jeho střední části jsou umístěny otvory pro fotodiody – viz technické výkresy. Jako fotodiody byly zvoleny fotodiody s označením BPV10, neboť jejich velikost je stejná jako velikost používaných LED diod, rozmezí vlnových délek, které je schopna snímat je široké (λ = 380–1100 nm), a zorný úhel $\alpha = 40°$ je pro toto použití dostatečný. Nástavec na LED diody byl obdobného tvaru, avšak obsahoval 16 otvorů pro budiče. Tyto otvory byly do nástavce umístěny takovým způsobem, aby vždy jedna fotodioda snímala signál ze dvou LED diod (červené i zelené). Jako zeleno-žlutá LED dioda byla zvolena L-53GD vyzařující na λ = 565 nm a s poměrně širokým vyzařovacím úhlem $\beta = 60°$. Pro účely experimentu byla přidána i LED dioda temně červené barvy L-53HD s λ = 700 nm a širokým vyzařovacím úhlem $\beta = 60°$. Do soustavy byla přidána, neboť lze očekávat, že v důsledku přítomnosti bílkovin (kolagen atd) lze počítat se změnami absorbance. Zároveň byla do nástavce přidělána drážka, aby bylo možné zanořit kabeláž a neohrožovat stabilitu celého zařízení. Podobné opatření bylo provedeno i v souvislosti se šrouby s hlavou s vnitřním vybráním DIN219 M4x60, jejichž hlava byla též do materiálu zanořena pro účely stability – více informací viz technické výkresy.

Dalším krokem byl návrh a výroba dvou desek plošných spojů pro fotodiody. Původní návrh použitý při jednokanálovém hodnocení metabolismu se osvědčil a z tohoto důvodu byl s drobnými obměnami použit i pro vícekanálové snímání. Desky byly navrženy tak, aby na jedné desce bylo možné nalézt čtyři původní schémata – viz obrázek

2.18. Země jednotlivých schémat byly propojeny v jednu centrální, aby byl snížen počet potřebných kabelů. Napájení bylo změněno na U = 12 V a odpor ve zpětné vazbě transimpedančního zesilovače byl zvednut na R = 10 MΩ. Tyto změny byly provedeny za účelem zvýšení hodnot výstupního elektrického napětí z fotodiod. Desky plošných spojů pro LED diody, také dvě, využívaly transimpedanční zesilovač, jehož vstup byl digitálně řízen. Na výstupu tohoto zesilovače byly v paralelním zapojení umístěny LED diody, které byly spínány s pomocí tranzistorů BC547B (přivedení elektrického napětí na bázi umožnilo tok elektrického proudu přes kolektor a emitor) – viz obrázky 2.19 a 2.20. Zreplikovat původní schéma používané při jednokanálovém hodnocení by bylo možné, avšak vyžadovalo by větší množství použitých součástek a zabíralo by spoustu místo. Z tohoto důvodu bylo přikročeno k návrhu a výrobě nových schémat a desek plošných spojů. Dále byla navržena a vyrobena deska plošných spojů pro Arduino Micro, které bylo do soustavy přidáno za účelem řízení spínání LED diod. Tato deska (viz obrázek 2.21) měla ve svém středu připájené patice, aby v případě nutnosti bylo možné Arduino Micro vyjmout a nahradit jej novým. Do všech desek byly vyhloubeny otvory, aby je při kompletaci bylo možné navrstvit na sebe a tím šetřit jejich okolní prostor. Pro řízené spínání LED diod s pomocí Arduina Micra a tranzistorů byl naprogramován dekodér se čtyřmi vstupními a šestnácti výstupními signály. Posléze byly navrženy jednoduché softwary pro řízení toku elektrického proudu I přes LED diody, pro řízení spínání LED diod a pro odečítání hodnot elektrického napětí U z fotodiod – viz přiložené CD.

Následujícím krokem byla kompletace sestavy (soupis jednotlivých portů, které byly použity lze nalézt v kapitole 2.3.3. Hardwarová sestava). Na vrchol sestavy desek plošných spojů bylo umístěno zařízení NI USB-6001 OEM, které bylo do sestavy přidáno za účelem digitálního řízení neinvertujícího vstupu transimpedančního zesilovače na deskách plošných spojů s LED diodami. Toto zařízení zde hrálo ještě jednu důležitou roli. Sloužilo také pro odečítání hodnot elektrického napětí U z fotodiod. Poté bylo přikročeno k připevnění LED diod a fotodiod do polykarbonátových nástavců a propojení nástavců s elektronickou sestavou. LED diody a fotodiody, včetně jejich kabeláže, byly k povrchu nástavců připevněny pomocí kyanoakrylátového lepidla. LED diody byly propojeny se sestavou pomocí 20žilového plochého vodiče a fotodiody byly propojeny pomocí 16žilového plochého vodiče, neboť tato možnost připevnění představovala nejvhodnější způsob z hlediska budoucí manipulace se zařízením. Následně byla sestava podrobena testu v podobě naplnění kultivační destičky čerstvým kultivačním médiem. V průběhu testování však bylo zjištěno, že fotodiody, které měly být v ose jamiček, byly vyosené. Tato chyba vznikla v důsledku přebrání schémata 24jamičkové kultivační destičky. Druhou chybou, která byla v průběhu experimentu objevena, bylo použití kyanoakrylátového lepidla. Přestože manipulace s lepidlem byla velmi opatrná, došlo k jeho nerovnoměrnému zaschnutí, což se projevilo, jako různě silná amplituda výstupního signálu z fotodiod. V důsledku toho nebylo možné dostat u všech fotodiod stejnou hodnotu signálu při použití jednotného média. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno

k následujícímu řešení. Byly navrženy a vyrobeny desky plošných spojů podobného tvaru jako polykarbonátové nástavce, na které byly pevně umístěny LED diody a fotodiody. Do těchto desek byly vyvrtány otvory, aby je bylo možné připevnit k polykarbonátovým nástavcům. Do polykarbonátových nástavců byly umístěny otvory na závitové vložky a na obou nástavcích byly vycentrovány otvory pro LED diody a fotodiody na středy kultivačních jamiček – viz technické výkresy. Poslední obměnou v porovnání s původním návrhem nástavce pro LED diody je absence drážky pro kabeláž. Kabely byly umístěny na okraj desek plošných spojů, a tudíž nebylo nutné ukládat kabely do drážky. Posledním krokem byla kompletace celé sestava a podrobení se testu. Tentokrát se však v průběhu testu neprojevily žádné konstrukční vady.

Hardware pro vícekanálové hodnocení metabolického stavu kmenových buněk je v současné podobě pro snímání postačující, avšak prostor pro zdokonalení zde lze pořád nalézt. V současné chvíli jsou desky plošných spojů fotodiod, LED diod a Arduina Micra propojeny pomocí wag a kabelů. Toto spojení by v budoucnu mohlo zapříčinit vznik problému (přerušení spojení), který by byl způsobem častým používáním a manipulací se zařízením. Dalo by se mu předejít návrhem desek, které by s jednotlivými deskami byly na pevno spojené a které by mezi sebou byly propojeny pomocí plochých kabelů. Druhou oblastí, kterou by bylo ještě možné zlepšit je software sloužící pro komunikaci se sestavou. V současné chvíli je rozdělen do tří kódů v programovacím prostředí LabView. Jeho zlepšení by spočívalo v prolnutí těchto tří programů do jednoho, který by měl jednoduché a uživatelsky přívětivé rozhraní.

4.4 Buněčné experimenty

Po implementaci navrženého hardwaru do kultivační komory bylo přistoupeno k buněčným experimentům. Do kultivační komory byly umístěny mesenchymální kmenové buňky původem z tukové tkáně (ASC) a byly podrobeny dynamické kultivaci. Tato kultivace probíhala za použití následujících kultivačních médií: DMEM obohacený o 10% fetální sérum (v práci vystupuje pod označením DMEM + 10% FS), DMEM obohacený o růstové faktory podporující růst fibroblastů (DMEM + FGF), DMEM obohacený o růstové faktory podporující diferenciaci směrem k osteoblastům (DMEM OSTEO) a DMEM obohacený o růstové faktory podporující růst hladkých svalových buněk (DMEM SMC). Od každého kultivačního média proběhlo snímání za pomoci fotodiody 2x a pro osvícení kmenových buněk byla využita pouze zeleno-žlutá LED dioda, protože dle získaných informací z ověřování hardwaru pro jednokanálové snímání buněčného metabolismu vyšla nejlépe. Temně červená LED dioda byla do sestavy přidána, neboť by jí teoreticky pro vyhodnocování stavu metabolismu kmenových buněk též šlo využít, avšak v současné chvíli byla pozornost primárně soustředěna na zeleno-žlutou LED diodu.

Na obrázku 3.1 lze pozorovat ukázku surových dat z fotodiody pro čtyři různá kultivační média. Grafické znázornění elektrického napětí U generovaného fotodiodou v závislosti na čase t lze pomyslně rozdělit do dvou oblastí. První oblast byla v rozsahu 0–67 hodina a druhá oblast byla v rozsahu 68–130 hodina. První oblast svým rozsahem odpovídá času před výměnou kultivačního média. Na počátku této oblasti (0–7 hodina) byl zaznamenán prudký nárůst elektrického napětí U a jeho chvění, což bylo pravděpodobně zapříčiněno postupným usazováním kmenových buněk. Tuto oblast bylo nutné z vyhodnocení vynechat. Následně byly srovnány offsety jednotlivých křivek (viz obrázek 3.2). Tyto offsety mohly být zapříčiněny např. malým posunutím. Dále byly z hodnot elektrického napětí U pro roztoky stejné charakteristiky vypočteny střední hodnoty a včetně odchylek byly zaznamenány do grafu (obrázek 3.3). Tento krok byl učiněn, aby bylo možné určit, zda jsou rozdíly mezi hodnotami elektrického napětí U pro jednotlivá kultivační média signifikantní. Na obrázku 3.3 lze pozorovat výrazné rozdíly mezi elektrickým napětím U pro kultivační médium DMEM OSTEO a DMEM SMC. Naopak u kultivačních médií s označením DMEM + 10% FS a DMEM + FGF nejsou tyto rozdíly patrné. Tato situace byla zapříčiněna jedním vzorkem kultivačního média DMEM + FGF, kde se dle hodnot elektrického napětí U generovaného fotodiodou buněčná kultura vyvíjela velmi pomalu.

Dalším krokem bylo vybrání z hodnot elektrického napětí U oblast, již by bylo možné proložit polynomem 1.stupně. Tato oblast se pohybovala v rozmezí 7–27 hodiny od počátku buněčné kultivace. Data byla posunuta do počátku souřadnicového systému, aby po proložení křivkou obsahovala jejich rovnice pouze směrnici a proměnnou veličinu. Z dat byly vypočteny střední hodnoty pro adekvátní kultivační média a tyto střední hodnoty byly proloženy pomocí polynomu 1.stupně, který byl následně popsán pomocí rovnic (viz obrázek 3.4). Tyto rovnice lze nalézt v tabulce 3.1. Teoretickým předpokladem bylo, že nejmenší směrnice bude zaznamenána u kultivačního média DMEM + 10% FS a zbylá média budou mít směrnice vyšší. Tato situace se však v důsledku vzorku DMEM + FGF, který dle hodnot elektrického napětí U nevykazoval velký buněčný růst, neprojevila. Kultivační médium DMEM + FGF vykazovalo směrnici nižší hodnoty, než byla směrnice média DMEM + 10% FS. Zbylá obohacená média (DMEM OSTEO a DMEM SMC) však vykazovala směrnice vyšší. Růst kmenových buněk byl tedy v porovnání s růstem buněk živenými kultivačním médiem DMEM + 10% FS vyšší.

Do sloupcového grafu byly vyneseny střední hodnoty elektrického napětí generovaného fotodiodou v 55 hodině od počátku kultivace pro jednotlivá kultivační média. Pro účely porovnání hodnot generovaných fotodiodou s hodnotami testů životaschopnosti (testy MTT) byly hodnoty elektrického napětí U znormovány (viz obrázek 3.5).

Testy životaschopnosti ASC, konkrétně testy MTT, byly provedeny na čtyřech druzích kultivačních médií. Jednalo se o již dříve zmíněná kultivační média, z nichž bylo vždy zkoumáno 10 vzorků. ASC byly nasazeny do kultivační komory a byly podrobeny

dynamické kultivaci při tlakové stimulaci. Po 55 hodině od počátku kultivace byly vzorky vyhodnoceny za pomoci spketrofotometru (byla zjištěna absorbance jednotlivých vzorků). Z takto získaných dat byly s pomocí boxplotů zjištěny hodnoty mediánů, interkvartilových rozpětí, minim a maxim pro jednotlivá kultivační média (viz obrázek 3.6). Tyto hodnoty byly následně normalizovány, aby je bylo možné porovnat s normalizovanými hodnotami poskytovanými fotodiodou. Toto porovnání lze pozorovat na obrázku 3.7. V roztocích DMEM + 10% FS, DMEM + FGF a DMEM OSTEO byly zaznamenány průniky mezi normalizovanými hodnotami elektrického napětí U a mezi normalizovanými hodnotami poskytnutými MTT testy. U kultivačního média DMEM + FGF byla v důsledku vzorku s nižší proliferací snížena hodnota normované hodnoty elektrického napětí, avšak díky vysoké odchylce došlo k průniku normalizovaných dat. U kultivačního média DMEM SMC nedošlo k průniku normalizovaných hodnot. Normalizované hodnoty absorbance byly velmi těsné, což znamenalo, že buněčná kultura ve zkoumaných vzorcích se vyvíjela podobným tempem.

V oblasti hodnot elektrického napětí U po výměně kultivačního média bylo postupováno obdobným způsobem. Z této oblasti byly vyjmuty hodnoty elektrického napětí U generovaného fotodiodou odpovídající výměně kultivačního média (pík na obrázku 3.1) a které odpovídají usazování kmenových buněk (časové rozmezí 68–72 hodina), neboť by do měření zanesly nepřesnosti. U dat byly srovnány offsety (viz obrázek 3.8) a z kultivačních médií majících stejnou charakteristiku byly vypočítány střední hodnoty. Tyto střední hodnoty byly vyneseny do grafického znázornění, včetně odchylek (viz obrázek 3.9), aby bylo možné určit, zda jsou rozdíly mezi kultivačními médii signifikantní. Hodnoty elektrického napětí U na počátku snímané oblasti pro kultivační roztoky DMEM + FGF a DMEM OSTEO mají pozvolnější nárůst než roztoky DMEM + 10% FS a DMEM SMC. Tato situace byla nejspíše zapříčiněna šokem buněčné kultury. Z tohoto důvodu nejsou na počátku měření mezi těmito dvěma kultivačními médii signifikantní rozdíly. Postupem času se však buněčná kultura vzpamatovala a projevila dle hodnot elektrického napětí U generovaného fotodiodou rapidní růst.

Dále bylo z hodnot elektrického napětí U vybráno časové rozpětí v rozmezí 91–109 hodiny, aby bylo možné proložení polynomem 1. stupně. Tato data byla posunuta do počátku souřadnicového systému, aby se rovnice polynomu 1.stupně skládala pouze ze směrnice a proměnné veličiny. Následně byly z kultivačních médií identického složení vypočteny střední hodnoty, které byly proloženy polynomy 1.stupně (viz obrázek 3.10). Rovnice popisující polynomy 1.stupně pro jednotlivá kultivační média lze nalézt v tabulce 3.2. V tomto případě bylo zjištěno, že dle předpokladu má nejnižší směrnici kultivační roztok s označením DMEM + 10% FS a zbylá obohacená média mají směrnici vyšší (byl u nich zaznamenán i vyšší buněčný růst).

Ze středních hodnot elektrického napětí poskytovaného fotodiodou byly vybrány hodnoty napětí ve 118 hodině od počátku kultivace ASC a byly vyneseny do sloupcového

grafu (včetně chybových úseček), který byl posléze znormalizován, aby bylo možné porovnat hodnoty poskytované fotodiodou s hodnotami poskytovanými MTT testy.

Byly provedeny MTT testy na mezenchymálních kmenových buňkách odvozených z tukové tkáně. Experimentu byla podrobena stejná kultivační média, jako v předchozí oblasti, a i počet jejich vzorků byl identický. Z hodnot absorbance byly určeny s pomocí boxplotů mediány, interkvartilová rozpětí, minima a maxima a následně byla provedena normalizace za účelem porovnání dat s hodnotami poskytovanými fotodiodou (viz obrázek 3.13). Na grafickém znázornění je patrné, že u kultivačních médií DMEM + 10% FS, DMEM + FGF a DMEM SMC došlo k průniku normalizovaných dat. Tato skutečnost nebyla zaznamenána u kultivačního roztoku DMEM OSTEO, což by mohlo být zapříčiněno vývojem buněčné kultury. Normalizované hodnoty absorbance poskytnuté MTT testy byly velmi těsné, což znamenalo, že buněčná kultura se ve vzorcích vyvíjela stejným tempem.

Bylo provedeno porovnání dat poskytovaných fotodiodou a dat poskytovaných MTT testy, aby byla ověřena funkčnost navrženého aparátu využívajícího optoelektronické členy za účelem hodnocení metabolického stavu kmenových buněk. Na základě současně dostupných dat lze tvrdit, že navržený aparát svoji funkci plní. Velké rozdíly mezi normalizovanými daty byly zaznamenány v případě, kdy normalizované hodnoty z MTT testů byly velmi těsné. Je tedy možné, že buněčná kultura použitá pro hodnocení MTT měla odlišný vývoj od buněčné kultury použité u dynamické kultivace vyhodnocované s pomocí fotodiod. Z tohoto důvodu je nutné provést další experimenty.

Následně bylo provedeno imunofluorescenční hodnocení. Princip hodnocení spočívá v navázání fluorescenčních látek na specifické molekuly, které buňka produkuje. Bylo zobrazeno porovnání ASC stimulovaných k růstu po dobu 3 dní za pomoci proliferačního média a diferenciačního média směrem k SMC. Nejprve byly porovnány jejich extracelulární proteiny (viz obrázek 3.13). Je zde patrné, že produkce extracelulárních proteinů je mnohem vyšší diferenciačního média než u proliferačního média. Též je zde možné pozorovat, že došlo k jednotné orientaci fibrinových vláken. Dále bylo provedeno porovnání výše uvedených kultivačních médií na úrovni aktinového skeletu (obrázek 3.14). U buněčné kultury kultivované za pomoci diferenciačního média směrem k SMC lze pozorovat stavbu aktinových filament, produkci zralého calponinu a morfologickou orientaci. Na základě dostupných dat lze tvrdit, že produkce extracelulárních proteinů a dalších látek jako jsou aktinová filamenta je výraznější u kultivačního média podporujícího diferenciaci ASC směrem k SMC. V souvislosti s daty poskytnutými fotodiodou lze tvrdit, že vyšší produkce extracelulárních proteinů je spjata s vyšší hodnotou směrnice polynomů 1.stupně.

5 Závěr

V rámci diplomové práce byla řešena problematika stanovení metabolického stavu kmenových buněk v bioreaktoru v reálném čase.

V teoretické části byly čtenáři osvětleny základní pojmy spojované s kmenovými buňkami jako je např. totipotentnost. Dále byly nastíněny základní děje probíhající v buněčných kulturách, bylo popsáno, jakým způsobem probíhá kultivace buněk in vitro, byla detailně popsána růstová křivka buněčné kultury, podmínky kultivace, co jsou to ASC. V poslední kapitole teoretické části byl čtenář seznámen s testy, které lze v současné chvíli použít pro vyhodnocení metabolického stavu kmenových buněk.

V konstrukční části byla pozornost prvně zaměřena na spektrální odezvu kultivačních médií, čímž byla potvrzena myšlenka, že metabolismus kmenových buněk by bylo možné vyhodnocovat na základě transmisního jevu. Součástí konstrukční části byl i návrh a realizace hardwaru, který by umožňoval jednokanálové snímání metabolického stavu. Funkčnost hardwaru byla ověřena na různých kultivačních médiích. Posléze byla pozornost soustředěna na návrh a realizaci hardwaru pro vícekanálové hodnocení metabolického stavu kmenových buněk. Tato činnost spočívala v úpravě stávající kultivační komory, úpravě a návrhu desek plošných spojů obsahujících LED diody a fotodiody, v návrhu nástavců pro budiče a snímače, v kompletaci soustavy a minimalizaci konstrukčních vad. Současně byly navrženy jednoduché programové kódy a aplikace umožňující kontakt se zařízením.

Při buněčných experimentech byla pozornost zaměřena na porovnání dat poskytovaných testy životaschopnosti (MTT testy) a dat poskytovaných fotodiodou (elektrické napětí U) v 55 a 118 hodině od počátku kultivace. Experimentům byly podrobeny ASC s různými kultivačními médii (DMEM + 10% FS, DMEM + FGF, DMEM OSTEO a DMEM SMC). Na základě poskytnutých dat byl aparát umožňující snímání metabolického stavu kmenových buněk označen za funkční. Pro jeho běžné používání v laboratorním zázemí by však bylo vhodné provést rozsáhlejší formu experimentu. Provedením imunofluorescenčního hodnocení bylo zjištěno, že produkce extracelulárních proteinů je vyšší u kultivačního média podporujícího diferenciaci ASC směrem k SMC. U tohoto média byla zároveň zjištěna vyšší hodnota směrnice polynomu 1.stupně.

6 Seznam použité literatury

[1] DYLEVSKÝ, Ivan. *Obecná kineziologie* [online]. Grada Publishing a. s., 2007 [cit. 2018-06-24]. ISBN 9788024767673. Dostupné z: https://books.google.cz/books/about/Obecn%C3%A1_kineziologie.html?id=kH9aAgAAQBAJ&redir_esc=y

[2] NOVOTNÁ, Božena a Jaroslav MAREŠ. *Vývojová biologie pro mediky*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1023-x.

[3] MASOPUST, J. a R. PRŮŠA. *Patobiochemie buňky* [online]. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2003 [cit. 2018-06-24]. ISBN 80-239-1011-0. Dostupné z: http://dotdiag.cz/img/prednasky/bunka.pdf

[4] BACAKOVA, Lucie, Jana ZARUBOVA, Martina TRAVNICKOVA et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. *Biotechnology Advances* [online]. 2018, **36**(4), 1111-1126 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.011. ISSN 07349750. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975018300624

[5] SCHUMACHER, M., F. UHL, R. DETSCH, U. DEISINGER a G. ZIEGLER. Static and dynamic cultivation of bone marrow stromal cells on biphasic calcium phosphate scaffolds derived from an indirect rapid prototyping technique. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2010, **21**(11), 3039-3048 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.1007/s10856-010-4153-y. ISSN 0957-4530. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s10856-010-4153-y

[6] LANZA, R. P., Robert S. LANGER a Joseph VACANTI. *Principles of tissue engineering*. 3rd ed. Boston: Elsevier / Academic Press, 2007. ISBN 978-0-12-370615-7.

[7] SAINI, Savita a Najmul HASAN. Stem Cell Therapeutics: A Review. *International Journal of Health Sciences and Research* [online]. 2014, **4**(10), 277-287 [cit. 2018-06-24]. ISSN 2249-9571. Dostupné z: http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.651.3194&rep=rep1&type=pdf

[8] SANDERS, Oh. *Reprogramming Pluripotent Stem Cell Towards Totipotency*. Evanston, Illinois, 2017. Disertační práce. Northwestern University.

[9] MITALIPOV, Shoukhrat a Don WOLF. Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. MARTIN, Ulrich, ed. *Engineering of Stem Cells* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, s. 185-199 [cit. 2018-11-05]. DOI: 10.1007/10_2008_45. ISBN 978-3-540-88805-5. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/10_2008_45

[10] O'DONOGHUE, Keelin a Nicholas M. FISK. Fetal stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* [online]. 2004, **18**(6), 853-875 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2004.06.010. ISSN 15216934. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521693404001208

[11] CHAMBERLAIN, Giselle, Jmaes FOX, Brian ASHTON a Jim MIDDLETON. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells* [online]. United Kingdom, 2007, **25**, 2739-2749 [cit. 2018-06-24]. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0197. Dostupné z: https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1634/stemcells.2007-0197

[12] BIANCO, Paolo, Mara RIMINUCCI, Stan GRONTHOS a Pamela GEHRON ROBEY. Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *Stem Cells* [online]. 2001, (19), 180-192 [cit. 2018-06-24]. DOI: 10.1634/stemcells.19-3-180. Dostupné z: https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1634/stemcells.19-3-180

[13] ANIRUDH JAGANNADH, C., M. SRAVANI a M. D. DHANARAJU. MESENCHYMAL STEM CELL'S IN THERAPY- A REVIEW. *International Journal Of Pharmacy & Technology* [online]. 2013, **5**(2), 2675-2681 [cit. 2018-06-24]. ISSN 0975-766X. Dostupné z: http://www.ijptonline.com/wp-content/uploads/2013/08/2675-2681.pdf

[14] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, 1998. ISBN 80-902906-0-4.

[15] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Ilustroval Ivan HELEKAL, ilustroval Jan KACVINSKÝ, ilustroval Stanislav MACHÁČEK. Praha: Grada, 2011-2016. ISBN 978-80-247-3817-8.

[16] JELÍNEK, R., M. DOSTÁL, Z. LIKOVSKÝ et al. *Histologie, embryologie* [online]. 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, b.r. [cit. 2018-06-25]. Dostupné z: http://histologie.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf

[17] KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky : vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006. ISBN isbn80-246-1069-8.

[18] VEJRAŽKA, Martin. *Buněčné kultury* [online]. 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 2007 [cit. 2018-11-05]. Dostupné z: http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf

[19] STRAUBE, Tamara a Claudia MÜLLER. How to do a Proper Cell Culture Quick Check. *Leica microsystems* [online]. 2016 [cit. 2018-11-05]. Dostupné z: : https://www.leica-microsystems.com/science-lab/how-to-do-a-proper-cell-culture-quick-check/

[20] *Handbook: Cell culture basics* [online]. b.r. [cit. 2018-06-26]. Dostupné z: https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf

[21] BACAKOVA, Lucie, Martina TRAVNICKOVA, Elena FILOVA, Roman MATEJKA, Jana STEPANOVSKA, Jana MUSILKOVA, Jana ZARUBOVA a Martin MOLITOR. Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs) in Blood Vessel Tissue Engineering: The Use of Differentiated Cells or Stem Cells as VSMC Precursors. SAKUMA, Kunihiro, ed. *Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field* [online]. InTech, 2018 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.5772/intechopen.77108. ISBN 978-1-78984-005-6. Dostupné z: http://www.intechopen.com/books/muscle-cell-and-tissue-current-status-of-research-field/vascular-smooth-muscle-cells-vsmcs-in-blood-vessel-tissue-engineering-the-use-of-differentiated-cell

[22] 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 [cit. 2019-05-01]. 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

[23] EGGER, Dominik, Carla TRIPISCIANO, Viktoria WEBER, Massimo DOMINICI a Cornelia KASPER. Dynamic Cultivation of Mesenchymal Stem Cell Aggregates. *Bioengineering* [online]. 2018, **5**(2), 1-15 [cit. 2019-05-12]. DOI: 10.3390/bioengineering5020048. ISSN 2306-5354. Dostupné z: http://www.mdpi.com/2306-5354/5/2/48

[24] FRESE, Laura, Petra E. DIJKMAN a Simon P. HOERSTRUP. Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* [online]. 2016, **43**(4), 268-274 [cit. 2019-05-12]. DOI: 10.1159/000448180. ISSN 1660-3796. Dostupné z: https://www.karger.com/Article/FullText/448180

[25] BRŮČKOVÁ, Lenka. *Stanovení cytotoxicity léčiv in vitro (XTT assay)* [online]. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra biologických a biochemických věd, b.r. [cit. 2018-06-26]. Dostupné z: https://www.upce.cz/sites/default/binary_www_old/fcht/uechi/crp-msmt-2015/cytotoxocita.pdf

[26] ELKE, Peeters, Hans J. NELIS a Tom COENYE. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2008, **72**(2), 157-165 [cit. 2019-03-13]. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.11.010. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701207003909?via%3 Dihub

[27] ANOOPKUMAR-DUKIE, S., J. B. CAREY, T. CONERE, E. O'SULLIVAN, F. N. VAN PELT a A. ALLSHIRE. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *The British Journal of Radiology* [online]. 2005, **78**(934) [cit. 2019-03-13]. DOI: 10.1259/bjr/54004230. Dostupné z: https://www.birpublications.org/doi/10.1259/bjr/54004230

[28] Measurements of Protein Content. WROLSTAD, Ronald E., Terry E. ACREE, Eric A. DECKER et al. *Handbook of Food Analytical Chemistry* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2004, s. 73-121 [cit. 2019-03-13]. DOI: 10.1002/0471709085.ch3. ISBN 9780471709084. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/0471709085.ch3

[29] BCA Protein Assay Kit. *Thermo Fischer Scientific* [online]. b.r. [cit. 2018-06-26]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225

[30] ÚLEHLOVÁ, Nina. *Metody stanovení proteinů a nukleových kyselin v řasách*. Zlín, 2011. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

[31] Vlnové vlastnosti různých barev světla. *Fyzikální kabonet* [online]. 2012 [cit. 2018-06-24]. Dostupné z: http://kabinet.fyzika.net/studium/tabulky/barvy-svetla.php

[32] Optoelectronics: Photodiode/Phototransistor Application Circuit. *SHARP Electronics* [online]. 1999 [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: http://educypedia.karadimov.info/library/Sharp%20photodevices.pdf

[33] MCP1525/41. *Microchip* [online]. b.r. [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: http://ww1.microchip.com/downloads/en/DeviceDoc/21653C.pdf

[34] TS7800 series: 3-Terminal Fixed Positive Voltage Regulator. *TSC* [online]. 2003 [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: http://biakom.com/pdf/TS7800_TSC.pdf

[35] TLC271, TLC271A, TLC271B: CMOS PROGRAMMABLE LOW POWER OPERATIONAL AMPLIFIERS. *DIODES INCORPORATED* [online]. 2014 [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: https://www.diodes.com/assets/Datasheets/TLC271.pdf

[36] SM05PD1A: Large Area Mounted Silicon Photodiode. *THORLABS* [online]. 2003 [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: https://www.thorlabs.com/thorProduct.cfm?partNumber=SM05PD1A

[37] L-53HD: KINGBRIGHT ELECTRONIC. *TME: Electronic Components* [online]. b.r. [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: https://www.tme.eu/cz/details/l-53hd/led-diody-tht-5mm/kingbright-electronic/

[38] L-53GD: KINGBRIGHT ELECTRONIC. *TME: Electronic Components* [online]. b.r. [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: https://www.tme.eu/cz/details/l-53gd/led-diody-tht-5mm/kingbright-electronic/

[39] BPV10. *TME* [online]. b.r. [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: https://www.tme.eu/cz/details/bpv10/fotodiody/vishay/

[40] BC546/547/548/549/550. *FAIRCHILD SEMICONDUCTOR* [online]. b.r. [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: https://www.sparkfun.com/datasheets/Components/BC546.pdf

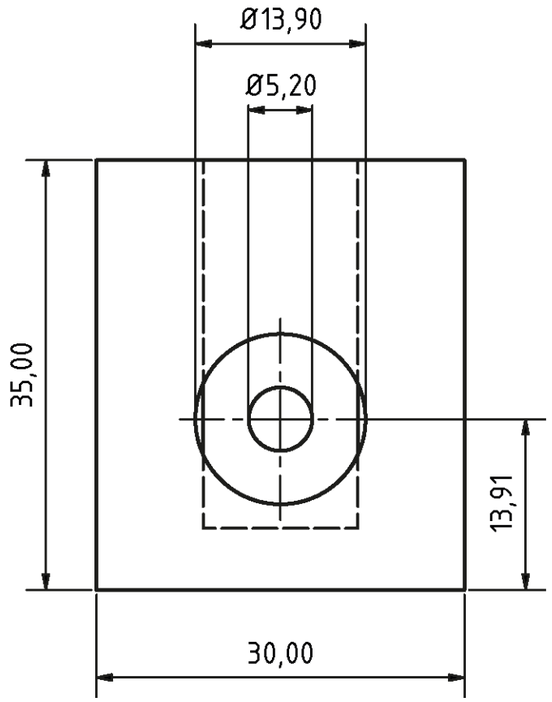
[41] Arduino Micro. *Farnell* [online]. b.r. [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: http://www.farnell.com/datasheets/1685581.pdf

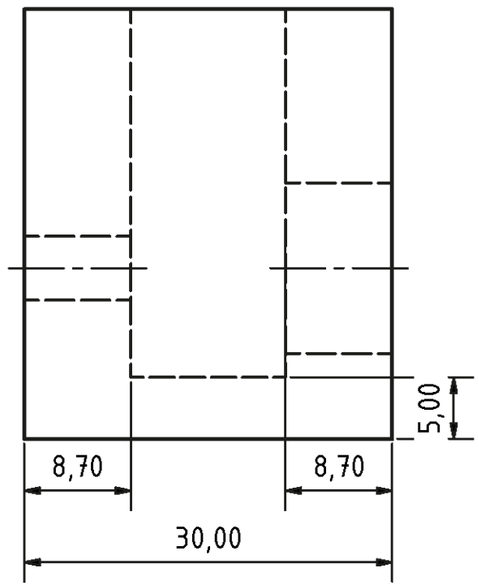
[42] NI USB 6001/6002/6003 OEM. *NATIONAL NSTRUMENTS* [online]. b.r. [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: http://www.ni.com/pdf/manuals/374261a.pdf

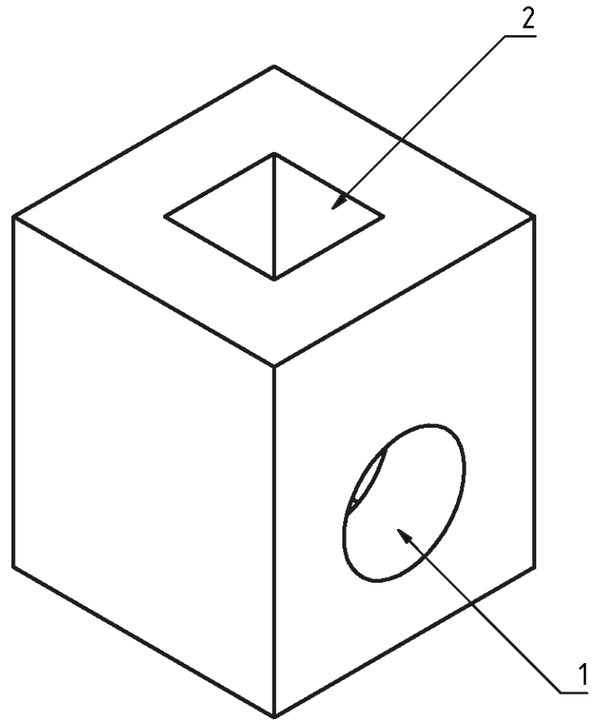
Příloha A: Technické výkresy

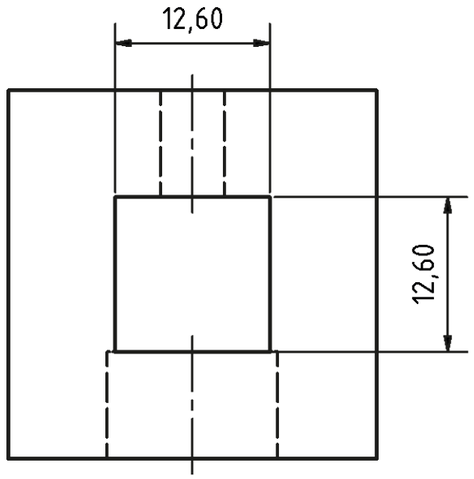
V této kapitole lze nalézt veškeré technické výkresy, na něž je v textu diplomové práce odkazováno. Lze zde nalézt následující výkresy:

- Stojánek pro spektrofotometrickou kyvetu
- Nástavec pro LED diody verzi 1
- Nástavec pro fotodiody verzi 1
- Nástavec pro LED diody verzi 2
- Nástavec pro fotodiody verzi 2

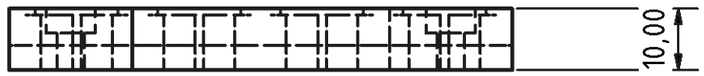


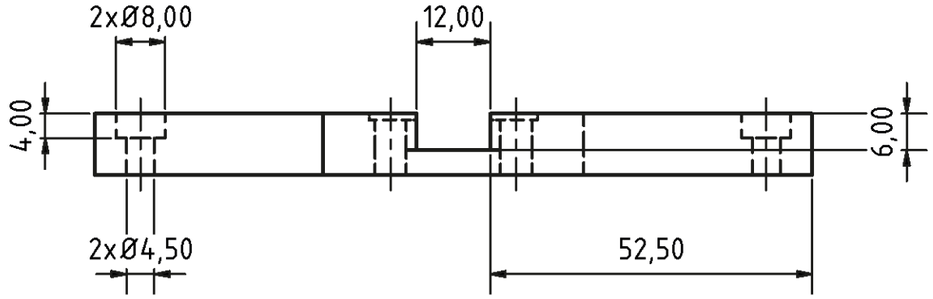


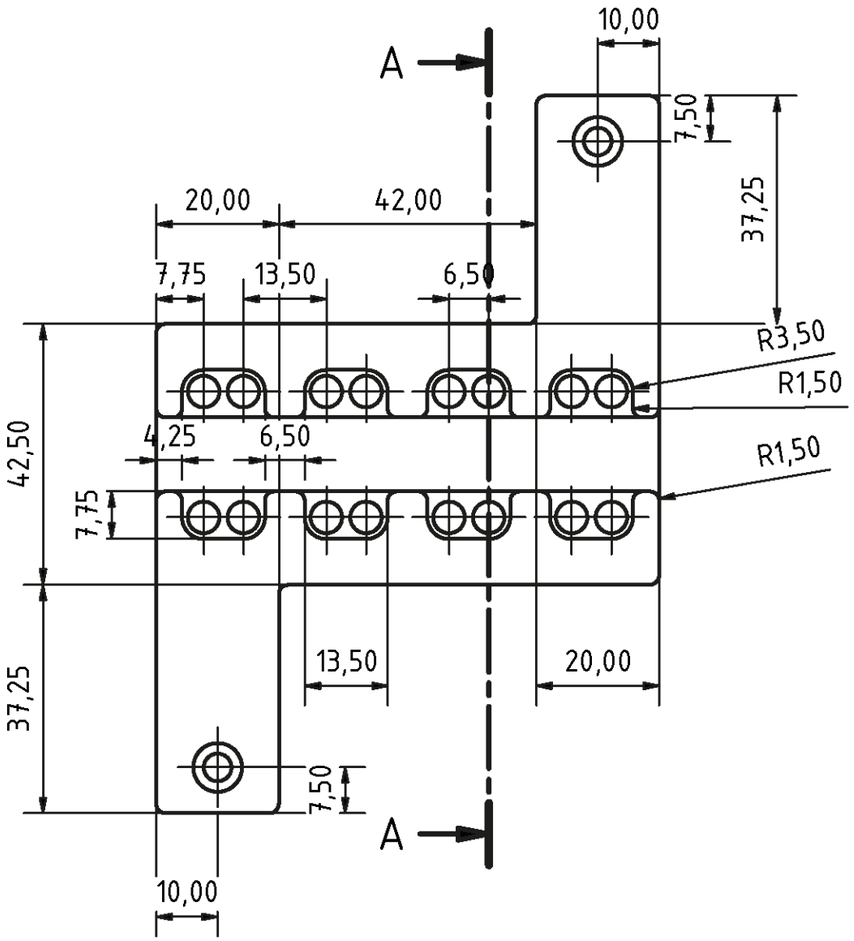




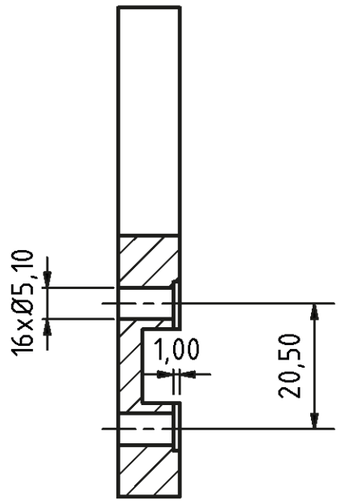
2	Otvor pro spektrofotometrickou kyvetu						
1	Otvor pro fotodiodu SM05PD1A						
						Materiál	Extrudovaný ABS
					Datum	Jméno	
				Nakreslen	16.04.2019	Černovská	České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství
				Kontr.			
				Norma			
				Měřítko 2:1		Stojánek pro spektrofotometrickou kyvetu	1/5 A3
Stav	Změny	Datum	Jméno				

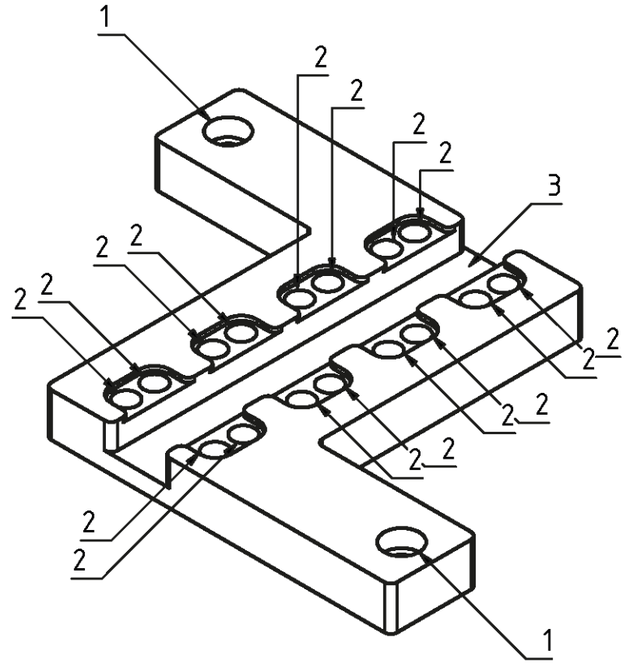






A-A (1 : 1)





3	Drážka pro umístění kabelů		
2	Otvory pro LED diody		16 Ks
1	Díry pro šrouby s hlavou s vnitřním vybráním DIN219 M4x60		2 Ks
		Materiál	Polykarbonát

	Datum	Jméno
Nakreslen	19.04.2019	Černovská
Kontr.		
Norma		

České vysoké učení technické v Praze,
Fakulta biomedicínského inženýrství

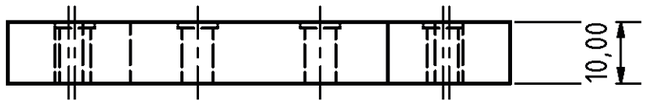
Měřítko 1:1

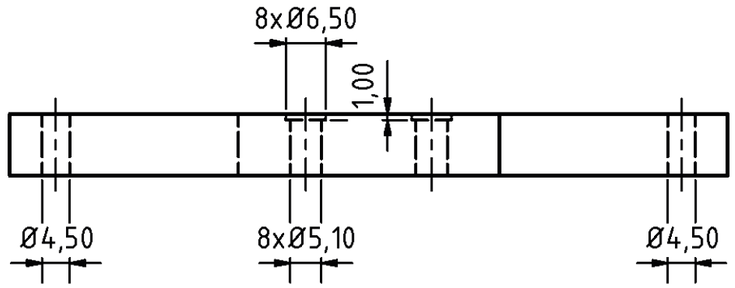
Nástavec pro LED diody verze 1

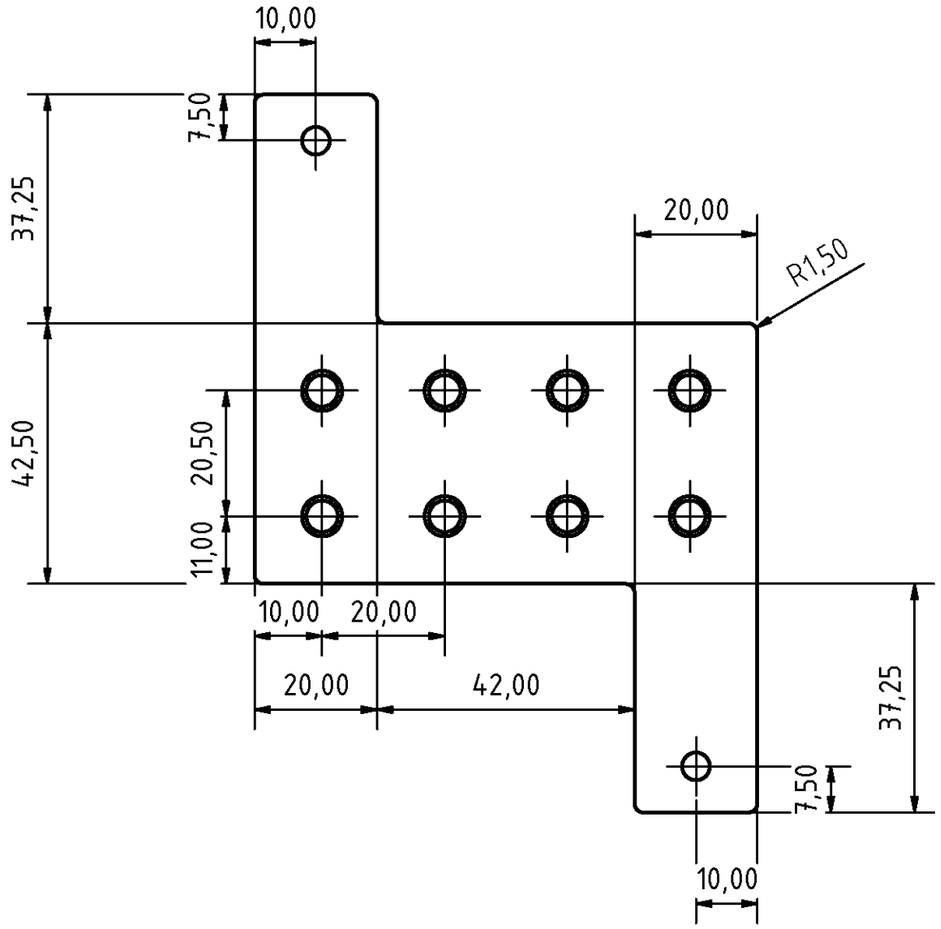
2/5

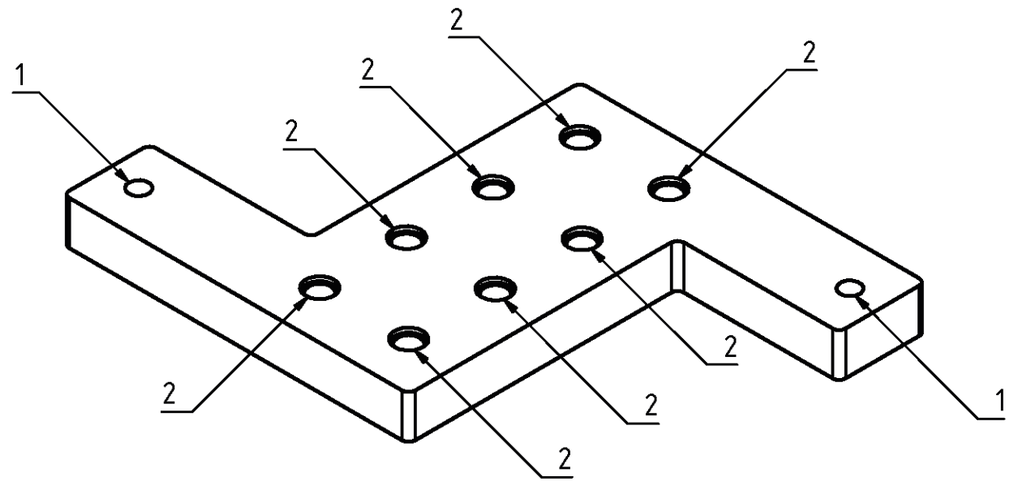
A3

Stav	Změny	Datum	Jméno









2	Otvory pro fotodiody BPV10		8 Ks
1	Díry pro šrouby s hlavou s vnitřním vybráním DIN912 M4x60		2 Ks
		Materiál	Polykarbonát

	Datum	Jméno
Nakreslen	19.04.2019	Černovská
Kontr.		
Norma		

České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství

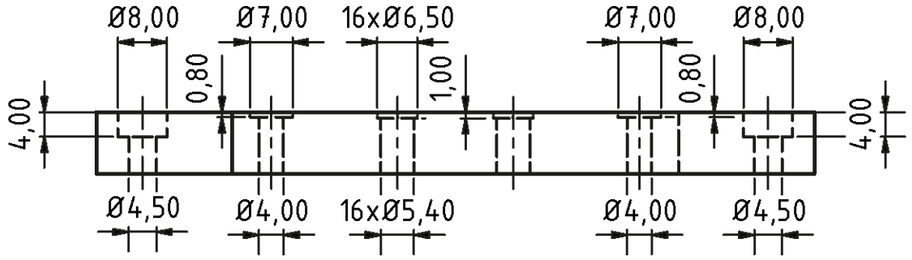
Měřítko 1:1

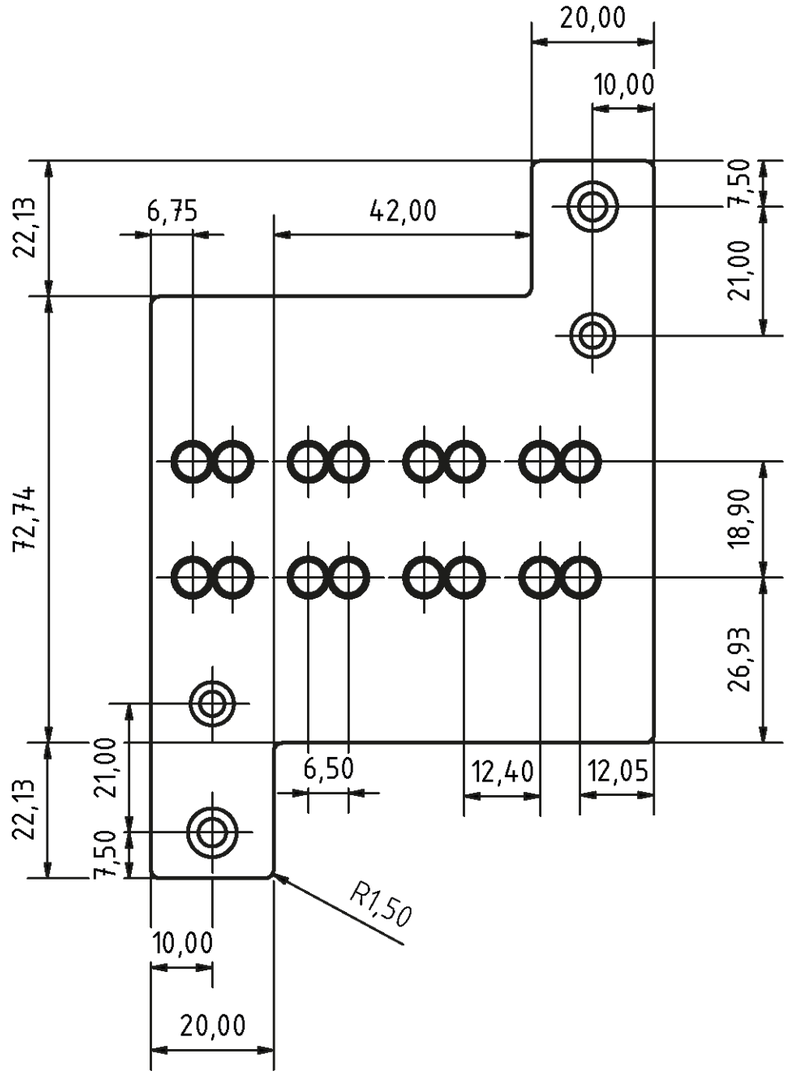
Nástavec pro fotodiody verze 1

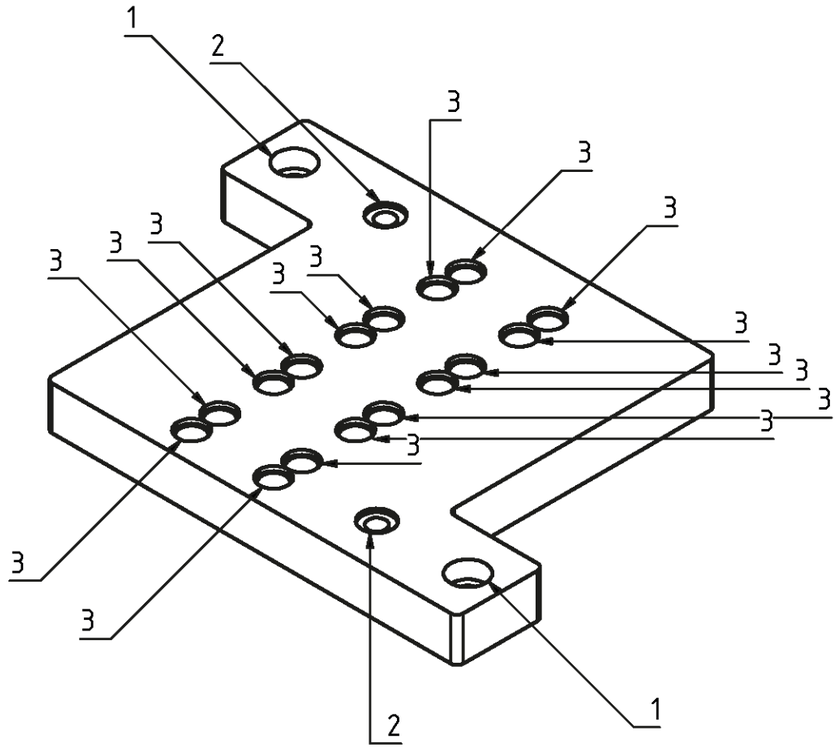
3/5

A3

Stav	Změny	Datum	Jméno



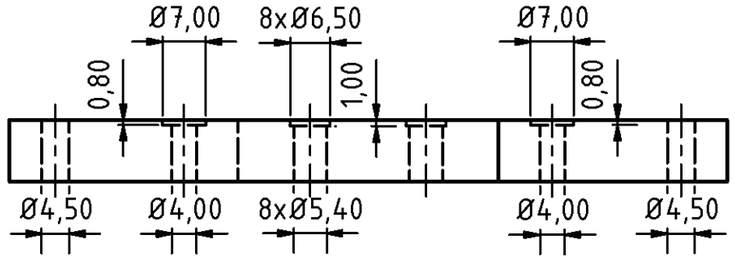


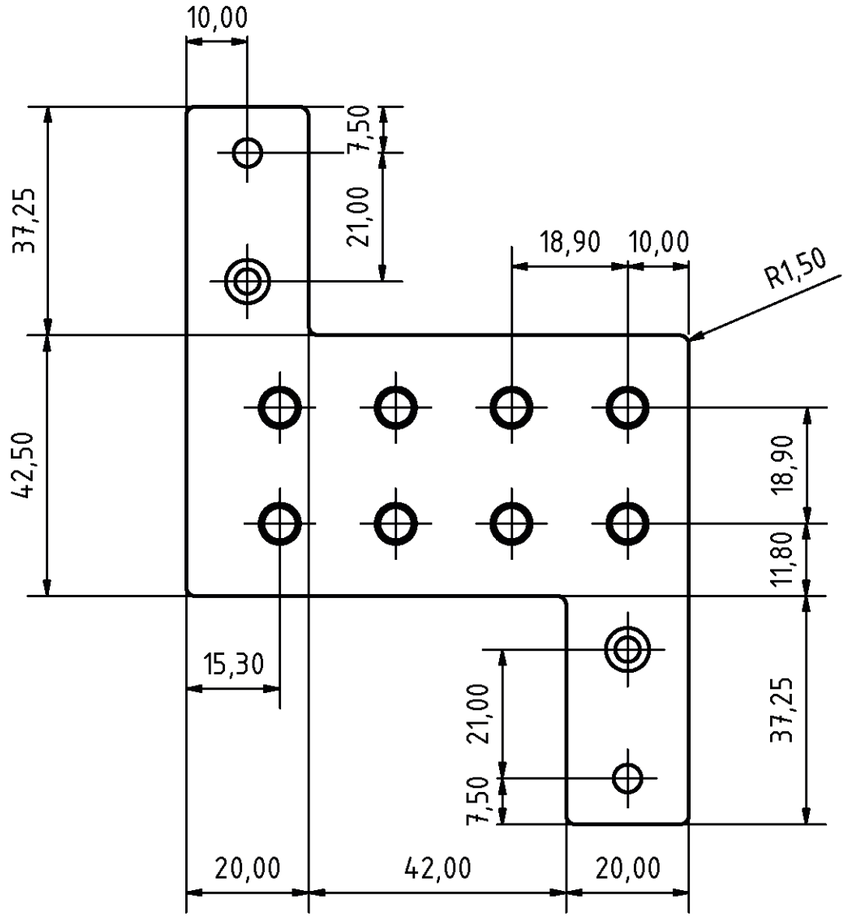


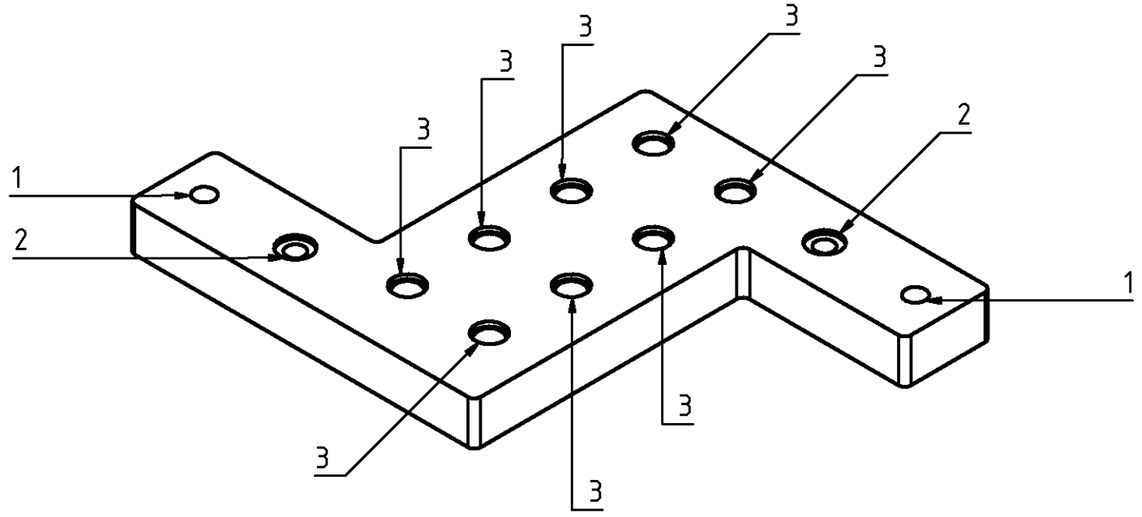
3	Otvory pro LED diody	16 Ks
2	Díra pro závitovou vložku Simaf Serplast C040H080	2 Ks
1	Díra pro šroub s hlavou s vnitřním vybráním DIN219 M4x60	2 Ks

		Materiál	Polykarbonát
	Datum	Jméno	
Nakreslen	19.04.2019	Černovská	České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství
Kontr.			
Norma			
Měřítko 1:1			Nástavec pro LED diody verze 2 — 4/5 — A3

Stav | Změny | Datum | Jméno







3	Otvory pro fotodiody BPV10	8 Ks
2	Díra pro závitovou vložku Simaf Serplast C040H080	2 Ks
1	Díra pro šrouby s hlavou s vnitřním vybráním M4x60	2 Ks

						Materiál	Polykarbonát
					Datum	Jméno	
				Nakreslen	19.04.2019	Černovská	České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství
				Kontr.			
				Norma			
				Měřítko 1:1			Nástavec pro fotodiody verze 2 — 5/5 — A3
Stav	Změny	Datum	Jméno				

Příloha B: Obsah přiloženého CD

Datový nosič obsahuje následující soubory:

- Klíčová slova v českém a anglickém jazyce
- Abstrakt v českém jazyce
- Abstrakt v anglickém jazyce
- Zadání diplomové práce
- Kompletní diplomovou práci
- Návrhy součástek v prostředí Autodesk Inventor Professional 2018
- Technické výkresy navržených součástek
- Návrhy desek plošných spojů v aplikaci Eagle
- Jednoduché programové kódy umožňující komunikaci se zařízením