

# Kultivace buněk v dynamickém prostředí

Karolína Pavlasová

---

Bakalářská práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Karolína Pavlasová**  
Osobní číslo: **T21127**  
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**  
Specializace: **Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Kultivace buněk v dynamickém prostředí**

## Zásady pro vypracování

### I. Teoretická část:

Zpracujte literární přehled zaměřený na možnosti dynamických kultur buněk.

Porovnejte dynamickou a statickou kultivaci. Zaměřte se na aplikační potenciál dynamických kultur v tkáňové inženýrství.

### II. Praktická část:

Seznamte se s prací v biologických laboratořích.

Naučte se manipulaci s buněčnými liniemi myších fibroblastů a myších embryonálních kmenových buněk.

Testujte vliv smykového napětí na chování buněk.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] POON C. "Measuring the density and viscosity of culture media for optimized computational fluid dynamics analysis of in vitro devices", *Bioengineering*, preprint, srp. 2020. doi: 10.1101/2020.08.25.266221.
- [2] WOLFE R.P. et al. "Applying Shear Stress to Pluripotent Stem Cells", in *Embryonic Stem Cell Protocols*, K. Turksen, Ed., in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1341. New York, NY: Springer New York, 2015, s. 377–389. doi: 10.1007/7651\_2015\_210.
- [3] ALBERTS B. et al. *Molecular Biology of the Cell* 5th ed. Garland Science.
- [4] LEI X. et al. "The effect of fluid shear stress on fibroblasts and stem cells on plane and groove topographies", *Cell Adhesion & Migration*, roč. 14, č. 1, s. 12–23, led. 2020, doi: 10.1080/19336918.2020.1713532.
- [5] BIRLA R. *Biomaterials for Tissue Engineering*. In *Introduction to Tissue Engineering: Applications and Challenges*, John Wiley & Sons: 2014, doi: 10.1002/9781118886410.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Kateřina Skopalová, Ph.D.**  
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2024**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.**  
ředitel ústavu

## PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studentky: Karolína Pavlasová

.....  
podpis studentky

## **ABSTRAKT**

V každém organismu působí na téměř všechny buňky smykové napětí. Třecí síla vzniká vlivem proudění krve, proto nejvíce působí na buňky cévního systému. Aby bylo možné průtok krve a tekutin v těle napodobit, je potřeba buňky kultivovat ve speciálním systému, bioreaktoru, za dynamických podmínek, kdy místo zmíněné krve cirkuluje kultivační médium. Vytváří se tak prostředí velmi podobné tomu *in vivo*. Možnosti dynamické kultivace jsou shrnuty v teoretické části. V praktické části je pak vyhodnocen vliv aplikovaného smykového napětí na morfologii buněk ve srovnání se strukturou buněk kultivovaných za běžných statických podmínek. Byla stanovena i dynamická viskozita kultivačního média pomocí rotačního reometru.

Klíčová slova: dynamická kultivace, smykové napětí, průtok, tkáňové inženýrství

## **ABSTRACT**

In any organism, shear stress affects almost all cells. However, the most frictional force is exerted on the cells of the vascular system when it is due to the flow of blood. In order to mimic the flow of blood and fluids in the body, cells need to be cultured in a special system, a bioreactor, under dynamic conditions where the culture medium circulates instead of the blood. This creates an environment very similar to that *in vivo*. The possibilities of dynamic cultivation are summarised in the theoretical part of thesis. In the practical part, the effect of applied shear stress on cell morphology is evaluated in comparison with the structure of cells cultured under normal static conditions. Furthermore, the dynamic viscosity of the culture medium was determined using a rotational rheometer.

Keywords: dynamic cultivation, shear stress, flow, tissue engineering

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Kateřině Skopalové, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení, ochotu, vstřícnou komunikaci a přístup po celou dobu tvorby této bakalářské práce. Rovněž mé poděkování patří Ing. Romanu Kolaříkovi, Ph.D. za pomoc při měření dynamické viskozity v praktické části práce.

Také bych ráda poděkovala celé své rodině za neustálou podporu během celého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

## OBSAH

ÚVOD.....	8
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>9</b>
<b>1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....</b>	<b>10</b>
1.1 VÝHLEDY DO BUDOUCNOSTI A VYUŽITÍ KMENOVÝCH BUNĚK V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ.....	11
<b>2 ZPŮSOBY BUNĚČNÉ KULTIVACE .....</b>	<b>15</b>
2.1 2D SYSTÉM.....	15
2.2 PSEUDO 3D SYSTÉM .....	16
2.3 3D SYSTÉM.....	16
<b>3 BIOREAKTORY.....</b>	<b>19</b>
3.1 „SPINNER FLASK“ BIOREAKTOR.....	20
3.2 ROTAČNÍ BIOREAKTOR .....	21
3.3 PRŮTOKOVÝ BIOREAKTOR.....	22
3.4 MECHANICKÝ BIOREAKTOR .....	23
<b>4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KULTIVACI BUNĚK V PRŮTOKU.....</b>	<b>26</b>
4.1 VSKOZITA .....	27
4.2 SMYKOVÉ NAPĚTÍ.....	29
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>31</b>
<b>5 CÍL PRÁCE .....</b>	<b>32</b>
<b>6 MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>33</b>
6.1 BUNĚČNÉ KULTURY A MÉDIUM .....	33
6.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	33
6.3 EXPERIMENT .....	33
6.3.1 Měření viskozity média.....	34
6.3.2 Kultivace ve statických <i>in vitro</i> podmínkách.....	34
6.3.3 Kultivace v dynamických podmínkách.....	35
<b>7 VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>43</b>
7.1 MĚŘENÍ VSKOZITY MÉDIA .....	43
7.2 KULTIVACE V PRŮTOKOVÝCH PODMÍNKÁCH.....	47
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>54</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>55</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>61</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>62</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>63</b>
<b>SEZNAM GRAFŮ .....</b>	<b>64</b>

## ÚVOD

Při provádění experimentů v laboratorních podmínkách se rozlišuje více modelů vhodných pro kultivaci buněk. Nejjednodušší a zároveň hojně používaný typ kultivace buněk je na (Petriho) miskách, tedy v 2D prostředí a za statických podmínek. Tento systém může být vhodný například pro sledování fyziologie buněk cévního endotelu, avšak neodráží fyziologické prostředí v těle, kde na tento typ buněk působí neustále proudící krev, tedy smykové napětí. Morfologie a fyziologie buněk, které jsou kultivovány za statických podmínek, se velmi odlišuje od buněk kultivovaných za podmínek dynamických, proto je 2D model spolu se statickou kultivací pro potřeby tkáňového inženýrství nedostatečný. Kvůli výše zmíněným faktům byly vytvořeny pokročilejší 3D systémy pro kultivaci buněk a jejich následné studium, které umožňují více se přiblížit přirozenému *in vivo* prostředí. Při práci s těmito pokročilejšími systémy (bioreaktory) se běžně sledují případné změny na buňkách vzniklé v důsledku působení daného faktoru, v tomto případě smykového napětí. Důležité je zmínit, že smykové napětí působí na téměř všechny buňky, které se nachází v živém organismu, ovšem v některých částech těla více a v jiných méně. Nicméně zavedením těchto tzv. mikrofluidních systémů se přispělo k pokroku ve výzkumu v oblasti biologie cév, buněčné biologie či biomedicínského inženýrství (Wong et al., 2012), (Edmondson et al., 2014), (Knight a Przyborski, 2015).

Jak již bylo nastíněno výše, v praktické části byl sledován vliv smykového napětí na morfologii a fyziologii buněk. Při experimentech byl využíván přístroj ibidi (ibidi Pump System) a pracovalo se jak s myšími embryonálními fibroblasty NIH/3T3, tak s myšími embryonálními kmenovými buňkami ESR1. Kultivace byla prováděna nejprve za běžných statických podmínek *in vitro* a poté i v dynamických podmínkách *in vitro*. Bylo provedeno několik experimentů a pokaždé se vyhodnotily případné morfologické změny na buněčných modelech vzniklé v důsledku působení smykového napětí. Za účelem přehledné vizualizace byly kultivované buňky na konci dvou experimentů nabarveny. Výsledky byly vyhodnoceny na základě pořízení mikrofotografií buněčných linií z mikroskopu. Součástí praktické části bylo také stanovení dynamické viskozity kultivačního média za využití rotačního reometru Physica MCR 502.



## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Tkáňové inženýrství patří mezi interdisciplinární obory. Konkrétně tato vědní oblast zahrnuje odborné znalosti z biologie, medicíny, biotechnologií i obecně fyzikálních či materiálových věd s cílem vyvinout funkční biologické náhrady, které mohou obnovit, vylepšit nebo udržovat funkci poškozené tkáně nebo celého orgánu (Langer a Vacanti, 1993). Jedná se o relativně nový obor, který byl zaveden v roce 1988 Národní vědeckou nadací (The National Science Foundation, NSF), nicméně myšlenky nahrazování tkání jinými tkáněmi se objevovaly už v 16. století. V některých případech bývá tkáňové inženýrství nesprávně označováno termínem regenerativní medicína. Ovšem faktem je, že tkáňové inženýrství je pouze součástí rozsáhlého oboru regenerativní medicíny<sup>1</sup>, a proto je důležité tyto pojmy rozlišovat (O'Brien, 2011).

Tkáňové inženýrství je založeno na principu spojování a interakci živých buněk s přirozenými či umělými scaffoldy (lešením) za účelem vytvořit trojrozměrné struktury, které jsou schopny nahradit poškozenou tkáň. V tkáňovém inženýrství existují dvě hlavní metody použití scaffoldů. První způsob je založen na tom, že scaffold plní funkci podpůrného zařízení, zajišťuje strukturální (mechanickou) oporu, na které se *in vitro* nasadí buňky, jež jsou následně schopné se na lešení přichytit, proliferovat a vytvořit tak základ tkáně pro transplantaci. Druhý přístup je založen na použití scaffoldů jako nosičů růstových faktorů nebo léčiv. Scaffold je tedy při použití kombinován s růstovými faktory, takže se buňky ihned po implantaci z těla shromažďují přímo do místa, kde je scaffold umístěn, a začnou postupně vytvářet novou tkáň. Obě tyto metody se vzájemně nevylučují, naopak je velmi výhodné a snadné je kombinovat. Nicméně je velmi důležité brát ohled na složení, topografii a architekturu scaffoldů, jelikož všechny tyto faktory mají relativně významný vliv na chování různých typů buněk (Howard *et al.*, 2008).

Pro potřeby tkáňového inženýrství je využíváno několik typů buněk z různých zdrojů. Při výrobě nové, umělé tkáně *in vitro* je nutné použít buňky, které budou schopné jak efektivního osídlení scaffoldů, tak i následné proliferace a tvorby nové tkáně. Z toho důvodu se ukázalo jako účinné používání primárních buněk odebraných přímo z tkáně pacienta v kombinaci s vhodným scaffoldem. Ovšem je pravda, že tato metoda má svá určitá omezení.

---

<sup>1</sup> Termín regenerativní medicína zavedl William Haseltine v roce 1999. Jedná se o lékařský obor zabývající se vývojem metod regenerace, opravy nebo náhrady poškozených či nemocných buněk, orgánů nebo tkání. Regenerativní medicína zahrnuje tvorbu a následné využití kmenových buněk, zároveň se opírá o technologie tkáňového inženýrství (Sampogna, Guraya and Forgione, 2015).

Rizikové je především samotné (invazivní) odebrání těchto buněk a také možnost, že se odebrané buňky budou nacházet v nemocném stavu. Proto se pozornost zaměřuje stále více na využívání kmenových buněk (Howard *et al.*, 2008). Jelikož se jedná o velmi nadějný způsob léčby mnoha chorob v budoucnosti, bude tomuto tématu věnována i následující kapitola.

## 1.1 Výhledy do budoucnosti a využití kmenových buněk v tkáňovém inženýrství

Od jednoho z nejvýznamnějších historických milníků v tkáňovém inženýrství, tedy úspěšné transplantace srdce v roce 1967, kterou vykonal chirurg Christiaan Barnard v jihoafrickém Kapském Městě, uplynulo již několik desítek let (Cooper, 2001). Během osmdesátých let 20. století bylo prováděno několik výzkumů v této vědní oblasti, vývoj šel velmi rychle kupředu. V posledním desetiletí dosáhla oblast tkáňového inženýrství významného pokroku a vývoj založený na nových studiích neustále pokračuje (Chandra, Soker a Atala, 2020).

Stále častěji bývá v dnešní době skloňováno personalizované tkáňové inženýrství, které se zabývá navrhováním účinných terapií zohledňujících individuální potřeby jednotlivých pacientů. Přepokládá se, že by se v budoucnu léčba mohla vyvíjet na míru, kdy by bioinženýrské produkty byly přizpůsobeny tak, aby odpovídaly potřebám pacientů, zlepšovaly výsledky léčby a zkracovaly dobu zotavování. Nyní již existují přístupy, které mají potenciál revolučně změnit léčbu řady onemocnění v následujících letech a výzvou je, aby tyto technologie mohly být aplikovány při rutinních klinických použitích. Jedním z nich je aplikace kmenových buněk (Neves *et al.*, 2016).

### 1.1.1 Kmenové buňky

Kmenové buňky (stem cell, SC) je možné definovat jako primární nediferencované buňky, které mohou na základě jejich determinace diferencovat na jeden či více typů specializovaných buněk (Polak a Bishop, 2006). Díky této schopnosti je jejich přítomnost v organismu velmi důležitá, jelikož se podílejí na obnově a regeneraci poškozených či opotřebovaných tkání a orgánů. Zároveň kmenové buňky mohou obnovovat i sebe samotné a nacházejí se v podstatě v každé tkáni organismu (Kolios a Moodley, 2013).

### 1.1.2 Klasifikace kmenových buněk

Kmenové buňky lze klasifikovat do několika různých skupin. Rozlišují se dvě základní dělení, a to z hlediska diferenciačního potenciálu a na základě jejich zdroje (Pimentel-Parra a Murcia-Ordoñez, 2017).

#### **Klasifikace kmenových buněk dle diferenciačního potenciálu:**

Existuje pět základních skupin kmenových buněk, které se liší podle toho, do jakých typů buněk jsou schopny diferencovat. Rozlišují se tedy kmenové buňky totipotentní, pluripotentní, multipotentní, oligopotentní a unipotentní. Totipotentní kmenové buňky se vyznačují univerzální schopností diferenciace, mohou z nich tedy vznikat všechny typy buněk; příkladem může být zygota, která vzniká po oplodnění vajíčka. Pluripotentní kmenové buňky mají potenciál diferencovat téměř na všechny typy buněk, a především dávají vzniknout buněčným liniím všech zárodečných listů, tedy ektodermu, mezodermu a entodermu; příkladem jsou embryonální kmenové buňky. Multipotentní a oligopotentní kmenové buňky mají schopnost diferenciace již omezenou. Poslední, unipotentní kmenové buňky mají již velmi omezenou schopnost diferenciace. To znamená, že mohou produkovat pouze buňky svého vlastního typu, nicméně potenciál sebeobnovy je zachován (Kalra a Tomar, 2014).

#### **Klasifikace kmenových buněk na základě jejich zdroje:**

Dle zdroje se rozlišují dvě skupiny kmenových buněk: embryonální kmenové buňky (embryonic stem cell, ESC) a adultní kmenové buňky (adult stem cell, ASC).

Jak již z názvu vyplývá, embryonální kmenové buňky se nacházejí v těch nejranějších fázích vývoje embrya a jsou schopny diferencovat v téměř jakoukoliv skupinu buněk v těle, jinými slovy se jedná o pluripotentní kmenové buňky. Mohou být izolovány z vnitřní buněčné hmoty časných savčích embryí a následně je lze kultivovat *in vitro*. Lidské embryonální kmenové buňky by mohly být získávány například z embryí při umělých oplodněních na specializovaných klinikách reprodukční medicíny, ovšem toto téma vyvolává obrovské etické i politické spory a obecně je velmi kontroverzní. Nakládání s lidskými kmenovými buňkami je proto jasně ošetřeno zákony (Pimentel-Parra a Murcia-Ordoñez, 2017).

Adultní (dospělé) kmenové buňky pocházejí z dospělého jedince a vyznačují se stejnými základními charakteristikami jako ostatní kmenové buňky, avšak s omezenou schopností diferenciace. Tyto kmenové buňky jsou multipotentní nebo unipotentní, jsou tedy

schopné sebeobnovy a diferenciaci pouze do specializovaných buněk (Pimentel-Parra a Murcia-Ordoñez, 2017). Nacházejí se v organismu téměř ve všech tkáních (kůže, kostní dřeň, mozek, srdce...), ovšem vždy ve velmi malém množství. Konkrétně tento typ kmenových buněk žije v mikroprostředí nazývaném niche, které vytváří a udržuje vhodné podmínky regulující růst a vývoj kmenových buněk (Gurusamy *et al.*, 2018). Jejich úlohou je udržovat, případně opravovat konkrétní tkáň, ve které se nacházejí (Pimentel-Parra a Murcia-Ordoñez, 2017). Existují různé druhy adultních kmenových buněk. První významnou skupinu tvoří mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cell, MSC), které mohou být získávány například z pupečnickové krve nebo z kostní dřene (Ding, Shyu a Lin, 2011). Dalším druhem jsou hematopoetické kmenové buňky (hematopoietic stem cell, HSC), které se také nachází v kostní dřeni a dále v pupečnickové krvi. Dávají vzniknout jiným typům krevních buněk, tedy červeným krvinkám, bílým krvinkám a krevním destičkám (Gunsilius, Gastl a Petzer, 2001). Tyto buňky (MSC a HSC) jsou snadno získávány z krve pupečnicku a placenty, což je velmi výhodné, protože po porodu jsou již tyto orgány jak pro matku, tak pro novorozeně nepotřebné. Odběr kmenových buněk proto nepředstavuje žádnou zátěž pro organismus (Čedíková *et al.*, 2012). Významnou skupinou jsou také nervové kmenové buňky (neural stem cell, NSC), které se nacházejí v každém dospělém mozku a jsou schopné diferencovat na neurony, astrocyty a oligodendrocyty, tedy různé buňky nervového systému (Kennea a Mehmet, 2002).

### 1.1.3 Klinické aplikace a využití kmenových buněk

Ze všech různých typů kmenových buněk bývají pro klinické aplikace nejvíce využívány ASC. Jednou z hlavních výhod jejich použití je možnost izolace přímo z daného pacienta, čímž se snižuje riziko případného následného odmítnutí organismem. Zároveň se při použití adultních kmenových buněk lze snadno vyhnout problematické izolaci z embryí a s tím spojenými etickými a právními otázkami, jednoduše řečeno – dospělé kmenové buňky jsou mnohem lépe tolerovány než ty embryonální (Pimentel-Parra a Murcia-Ordoñez, 2017).

Mezi první klinické aplikace kmenových buněk se řadí jednoznačně transplantace kostní dřene. Jak již bylo zmíněno výše, kostní dřeň obsahuje převážně hematopoetické kmenové buňky ve velmi malém poměru (0,01-0,1 %), které ovšem dávají vzniknout krevním elementům, jež organismus nezbytně potřebuje. HSC tedy hrají zásadní roli při léčbě krevních chorob, jelikož je lze relativně snadno získat a poté implantovat do pacienta za účelem obnovy a následného udržení správně funkčního hematopoetického systému.

Konkrétně se tedy HSC využívají jak při léčbách maligních onemocnění, jako jsou například lymfomy nebo leukémie, tak mohou pomoci v léčení benigních chorob (talasémie, srpkovitá anémie, aplastická anémie či vrozené metabolické poruchy) (Pimentel-Parra a Murcia-Ordoñez, 2017).

Buněčná terapie se dá velmi dobře aplikovat i na častá neurologická onemocnění jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova nemoc či Huntingtonova choroba. Tyto nemoci bývají léčeny léky, které ve většině případů končí nepříznivými výsledky. Z tohoto důvodu se terapie kmenovými buňkami jeví jako dobrá alternativa léčby. Nervový systém má obecně nízkou schopnost regenerace a obnovy, ovšem implementace kmenových buněk zvyšuje u pacientů možnou obnovu či vytváření nových nervových buněk. Zároveň je ale potřeba věnovat pozornost i případným komplikacím při použití tohoto typu léčby a pokračovat ve studiích (Pimentel-Parra a Murcia-Ordoñez, 2017).

Na závěr je vhodné zmínit, že buněčnou terapii je možné potenciálně využít při léčbě mnoha dalších onemocnění jako jsou například oční a srdeční poruchy, diabetes mellitus (cukrovka) a další. Je ale třeba uvažovat i nad riziky, správnou aplikací a uchycením transplantovaných buněk, aby léčba mohla být vůbec užitečná a efektivní (Gurusamy *et al.*, 2018).

## 2 ZPŮSOBY BUNĚČNÉ KULTIVACE

Kultivace buněčných linií se dá provádět v různých systémech s tím, že každá struktura vytváří jiné podmínky pro růst buněk. Primárně se dají rozlišovat 2D a 3D systémy pro kultivaci. Při dvourozměrné kultivaci buňky rostou v monovrstvě a prostředí neodpovídá přirozené anatomii a fyziologii tkáně. Naopak 3D systémy se snaží přiblížit přirozenému mikroprostředí buněk v živém systému a vyžadují tak multidisciplinární přístup a znalosti (Haycock, 2011).

### 2.1 2D systém

Základní a zároveň nejjednodušší metoda používaná pro *in vitro* kultivace bývá prováděna v 2D prostředí. Při použití této metody buňky rostou v jednovrstvé kultuře na plochem dně kultivační nádoby. Tato dvourozměrná kultivace je však relativně primitivní a neodráží fyziologické prostředí v těle, proto je pro potřeby tkáňového inženýrství nedostatečná. Hlavní nevýhodou tohoto způsobu kultivace je růst buněk v monovrstvě na rovném substrátu. Takové prostředí je pro buněčné linie nepřirozené, jelikož v živých organismech bývají obklopeny a v kontaktu ve třech dimenzích s ostatními buňkami a/nebo s mezibuněčnou hmotou (extracelulární matrix, ECM), kterou produkují sousední buňky (Edmondson *et al.*, 2014). Buňky, které jsou kultivované 2D způsobem vykazují relativně významné rozdíly v morfologii ve srovnání s buňkami nacházejícími se v živém organismu. Navíc jsou i interakce mezi buňkami značně omezené jen na periferii buněk, tedy v osách x a y (Knight a Przyborski, 2015). Na konci této kapitoly budou rozdíly mezi 2D a 3D kultivací přehledně shrnuty.



**Obrázek 1.** 2D statická kultivace buněčných linií v kultivačních nádobách T75 v prostředí inkubátoru. Zdroj: archiv autorky.

## 2.2 Pseudo 3D systém

Pseudo 3D systémy představují přechod mezi 2D a 3D kultivací. Při klasické 2D buněčné kultivaci dochází k přilnutí buněk na rovný povrch, nejčastěji na Petriho misku, která bývá ze skla nebo z polystyrenu. Rovina představuje mechanickou oporu pro buňky a růst v monovrstvách umožňuje přístup k podobnému množství živin, které obsahuje kultivační médium, což má za následek homogenní růst i proliferaci a nepřirozený tvar buněk. V pseudo 3D modelech se do kultivačních nádob přidávají různé struktury, jako jsou buněčné substráty s mikrovzorem. Příkladem mohou být adhezivní ostrůvky, mikrodotinky či mikrovlákna, které pak ovlivňují morfologii buněk. Tyto struktury tak dávají možnost o kousek se přiblížit přirozenému tvaru i funkci buněk, a zároveň se jedná o další level kultivace, který předchází nejpokročilejšímu systému *in vitro* kultivace, a to v 3D prostředí (Duval *et al.*, 2017).

## 2.3 3D systém

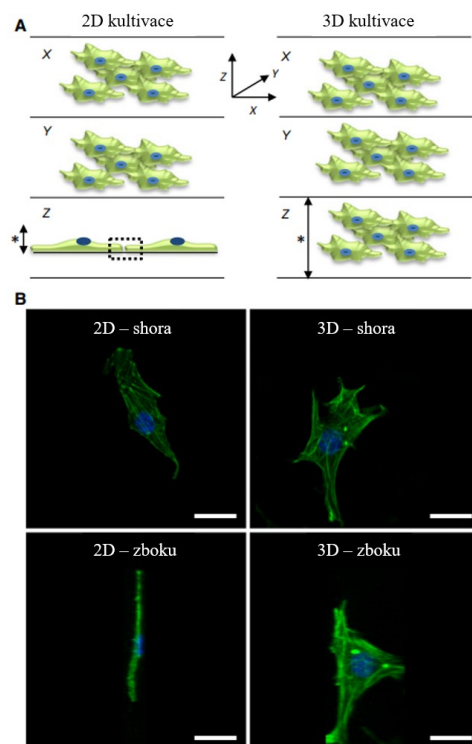
Kultivace buněčných linií v 3D systémech se rozhodně nejvíc přibližuje přirozenému prostředí v živém systému. Tato metoda je založena na vytvoření umělého prostředí, ve kterém mohou buňky růst a interagovat s okolím ve všech třech rozměrech, tedy osách x, y, z. Provedení tohoto způsobu kultivace je přece jen náročnější, protože je důležité, aby na buňky působily různé faktory (tlak, tření, smykové napětí, elektrické impulzy apod.),



kterým jsou vystavovány i přirozeně v organismu (*in vivo*). Proto byly vyvinuty tzv. uzavřené kultivační systémy, bioreaktory, poskytující buňkám vhodné prostředí, které se zároveň blíží tomu přirozenému. Bioreaktory jsou tedy jednou z klíčových součástí 3D kultivace, a proto jim bude věnována samostatná kapitola (Antoni *et al.*, 2015).

Obecně se dá říci, že lze pozorovat obrovské rozdíly v morfologii buněk, které byly kultivovány v 2D systému, a buňkami, které byly naopak pěstovány v 3D podmínkách. Při kultivaci ve dvourozměrném prostředí vytvářejí buňky monovrstvu, zaujímají nepřirozeně plochý tvar, jsou roztaženější a jejich interakce s okolními buňkami je značně omezená (viz Obrázek 2). Monovrstva se skládá převážně z proliferujících buněk, jelikož nekrotické buňky se obvykle oddělují a snadno se tak odstraňují při výměně kultivačního média. V důsledku těchto skutečností se pak buňky kultivované v 2D prostředí nemusí chovat tak, jak by se chovaly přirozeně v organismu, jelikož tento model nenapodobuje adekvátně prostředí *in vivo* (Edmondson *et al.*, 2014), (Antoni *et al.*, 2015).

Co se týče morfologie buněk kultivovaných ve 3D prostorovém uspořádání, mají relativně přirozenou strukturu, jinými slovy, vzhled buněk se blíží jejich obvyklému tvaru v těle. Zároveň toto prostředí umožňuje, že buňky mohou interagovat mezi sebou a s ECM. Vzájemné působení následně ovlivňuje řadu buněčných funkcí, jako je buněčná proliferace, diferenciacce, exprese genů i proteinů a buněčné odpovědi na vnější podněty. Je zachována i buněčná heterogenita, velmi podobná tkáním *in vivo*, jelikož buněčné linie se během kultivace v 3D prostředí skládají z buněk v různých stádiích např. proliferujících, klidových, nekrotických apod. (Edmondson *et al.*, 2014).



**Obrázek 2.** Rozdíly v morfologii buněk kultivovaných v 2D a 3D prostředí. Upraveno dle Knight a Przyborski, 2015.

### 3 BIOREAKTORY

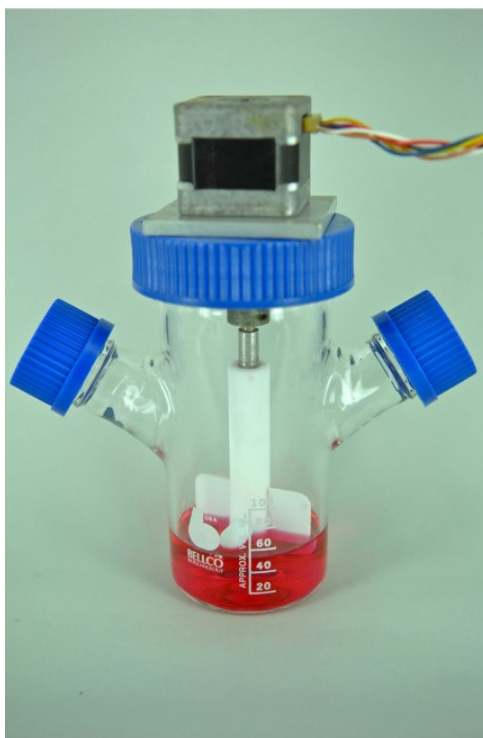
Bioreaktor je obecný pojem pro uzavřené kultivační prostředí, které umožňuje kontrolu nad kultivačním systémem a nad provozními podmínkami, jež mají vliv na biologické procesy. V průmyslových biotechnologiích se bioreaktory, též nazývány fermentory, využívají ke kultivaci prokaryotických nebo eukaryotických buněk (Chaudhuri, 2005).

Pro potřeby tkáňového inženýrství se bioreaktory používají k zajištění kontrolované a reprodukovatelné proliferace buněk a tkání. Mezi proměnné, které se dají regulovat při použití bioreaktorů, patří teplota, pH, koncentrace plynu, průtok kultivačního média, smykové napětí, hydrodynamika a mechanické síly (Chaudhuri, 2005). Bioreaktory umožňují dynamickou kultivaci buněk, která zajišťuje rovnoměrnou koncentraci živin, kyslíku i dalších potřebných látek, jakožto i odstranění vedlejších produktů a zachování stálé hladiny pH. Vše je umožněno díky kontinuálnímu proudění kultivačního média. Na rozdíl od dynamické kultivace v bioreaktoru, při statické kultivaci, která se provádí v kultivačních nádobách, je přívod živin i odstraňování odpadních látek řízeno pouze difuzí. Obecně bioreaktory poskytují prostředí, které podněcuje buňky k proliferaci, diferenciaci a celkově napodobují podmínky *in vivo*, s čímž souvisí i rozdílné chování buněk. Z toho vyplývá, že tento typ buněčné kultivace přináší fyziologicky relevantnější výsledky (Edmondson *et al.*, 2014). Z výše uvedeného plyne, že bioreaktory lze považovat za jakýsi mezistupeň mezi tradiční statickou kultivací buněk a přirozenou existencí buněk *in vivo*.

Existuje několik typů bioreaktorů používaných pro účely tkáňového inženýrství. Ovšem vždy je důležité brát v potaz, že každý typ bioreaktoru je vhodný ke kultivaci jiných typů buněk. Jelikož některé buňky kromě dostatku živin obsažených v kultivačním médiu vyžadují také různé fyzikální podněty, které závisí na funkci tkáně, v níž se přirozeně vyskytují. Například svalové, srdeční či nervové buňky jsou přirozeně závislé na elektrické stimulaci (Basser a Roth, 2000). Jiné buňky mohou být naopak závislé na mechanickém namáhání. Konkrétně chrupavka je v přirozeném stavu mechanicky stlačována, což vyvolává perfuzi spjatou se smykovým napětím tekutiny, které umožňuje lepší přísun živin. (Tran, Cooley a Elder, 2011). V následujících podkapitolách budou více přiblíženy „spinner flasks“ bioreaktory a dále bioreaktory mechanické, průtokové a rotační.

### 3.1 „Spinner flask“ bioreaktor

Jedná se o nejjednodušší, ale přesto stále hojně využívaný typ bioreaktoru. Skládá se z válcové skleněné baňky (nádoby), uvnitř které je umístěn rotující prvek, který zajišťuje rovnoměrné promíchávání kultivačního média, do kterého jsou následně umístěny scaffoldy (lešení) i s vpravenými buňkami. Nicméně je potřeba podotknout, že tento typ bioreaktoru má několik omezení. První z nich spočívá v tom, že se jedná o uzavřený systém a během kultivace nedochází k odvádění odpadních látek a přívodu nového média s potřebnými živinami. Navíc v důsledku míchání média dochází ke srážkám buněk s rotujícím prvkem a to způsobuje, že buňky rostou především na stěnách nádoby. Kvůli kontinuálnímu pohybu média také vzniká smykové napětí, a proto musí být stanovena horní hranice intenzity míchání (Chaudhuri, 2005). Nakonec je dobré zmínit, že tento typ bioreaktoru není vhodný pro všechny typy buněk, tedy hlavně ne pro ty, které potřebují růst na povrchu. Vyhovovat naopak bude těm, které běžně existují v suspenzi (Skopalová, 2023 – ústní sdělení). Celkově je potřeba optimalizovat rychlost míchání pro konkrétní typ buněk, aby bylo dosaženo jejich požadovaného chování (Gupta *et al.*, 2016).

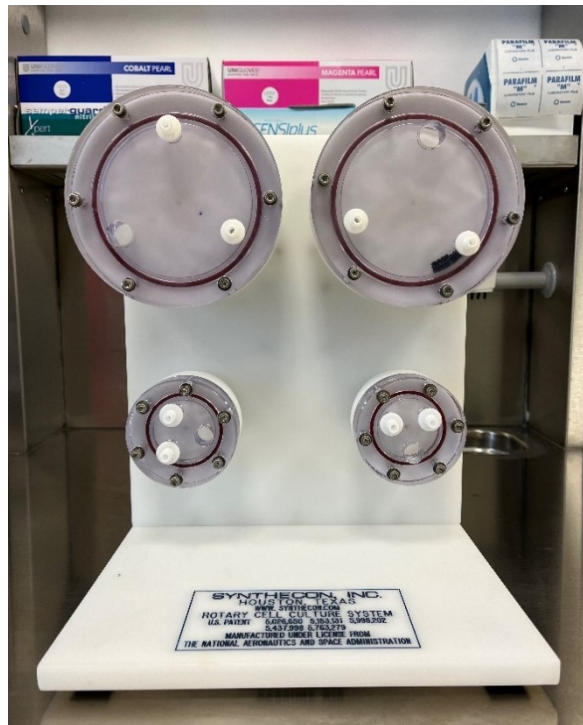


**Obrázek 3.** Spinner flask bioreaktor (Gupta *et al.*, 2016).

### 3.2 Rotační bioreaktor

V období rychlého rozvoje kosmického inženýrství stoupal zájem přírodovědců o výzkum realizovaný ve vesmírném prostředí. Toto bádání bylo mimo jiné podpořeno Národním úřadem pro letectví a vesmír (NASA), který se podílel na vývoji těchto bioreaktorů. Z výše uvedeného lze odvodit, že pomocí rotačních bioreaktorů je možné zkoumat především vliv mikrogravitace na morfologii buněk, ovšem dále lze testovat vliv těchto bioreaktorů na schopnosti regenerace tkání, pro kterou je zásadní možnost migrace buněk (Chaudhuri, 2005). Je potřeba mít na paměti, že simulovaná mikrogravitace přece jen není totožná se skutečnou (vesmírnou) gravitací a každý typ rotačního bioreaktoru má vlastní omezení a individuální kapacity. Ale i přes to, že bioreaktory nejsou schopny přesně napodobit skutečné prostředí mikrogravitace, jsou ve výzkumu hojně využívány, jelikož kosmické lety jsou poměrně vzácné a drahé na to, aby byl výzkum prováděn touto cestou (Russomano *et al.*, 2005).

Tento typ bioreaktoru funguje na principu rotující stěny. Navíc existuje více různých typů. Jsou vhodné pro kultivaci myších embryonálních kmenových buněk, jelikož umožňují a podporují tvorbu embryonálních tělísek, které následně mohou diferencovat na kardiomyocyty (Rungarunlert *et al.*, 2013). Během provádění experimentu koluje v bioreaktoru kultivační médium, které postupně obsahuje větší množství odpadních látek. Není zajištěn přívod nového média s živinami pro buňky, což lze považovat za nevýhodu tohoto bioreaktoru (Skopalová, 2023 – ústní sdělení).



**Obrázek 4.** Rotační bioreaktor (Synthecon Incorporated). Zdroj: archiv autorky.

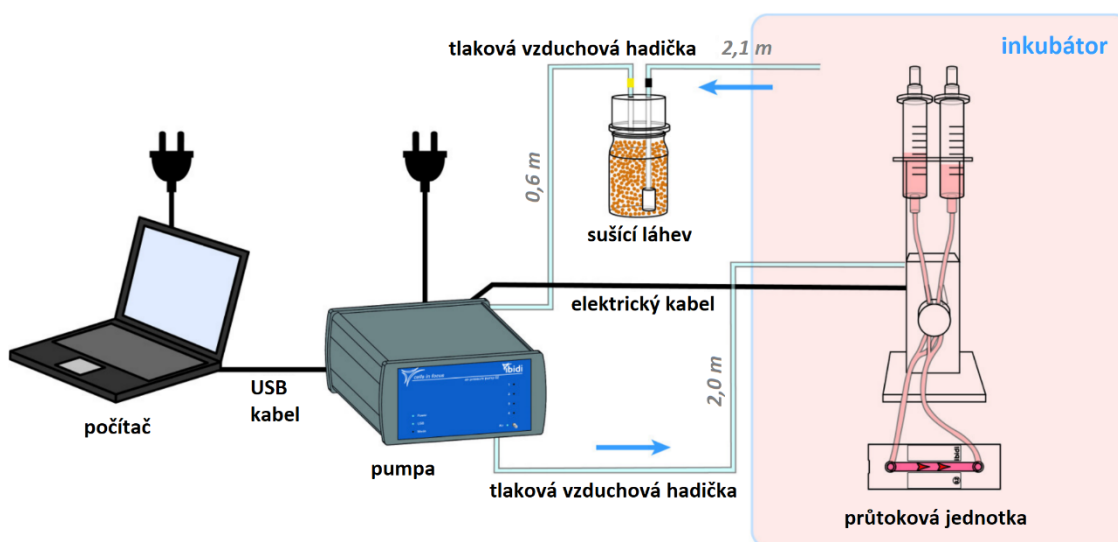
### 3.3 Průtokový bioreaktor

V přirozeném prostředí organismu běžně dochází k působení laminárního pohybu tekutin na různé typy buněk. Konkrétně se jedná například o epitelální buňky ledvin a plic nebo lymfatické či vaskulární endotelální buňky. Toto proudění kapaliny způsobuje vytváření mechanické síly, která je označována jako smykové napětí. Smykové napětí má výrazný vliv na fyziologické chování buněk, jejich morfologii i funkce. Na základě těchto skutečností byl průtokový systém (bioreaktor) vytvořen tak, že funguje na principu vytváření jednosměrného dlouhodobého proudění média ve skličku obsahující kanálek, což má za důsledek vznik již zmíněného smykového napětí působícího na buňky, které je úměrné rychlosti proudění tekutiny. Tyto podmínky kultivace *in vitro* pak umožňují více se přiblížit běžnému fyziologickému prostředí *in vivo*. Velikost smykového napětí se liší jak mezi danými tkáněmi, tak i v různých organismech. V praktické části této závěrečné práce byl pro provádění všech experimentů využíván ibidi perfuzní systém (ibidi Pump System) (Selden a Fuller, 2018), (Li, Haga a Chien, 2005), (Sugiura, Shin a Kanamori, 2023), (Instruction Manual ibidi Pump System).

Ibidi Pump System se skládá z pumpy, průtokové jednotky a také z jednorázových dílů jako jsou perfúzní sety a sklička. Pumpa ibidi je schopna vytvořit tlak vzduchu o velikosti až 100 mbar, nicméně při provádění experimentů je vhodné pracovat v rozmezí 5 až 95 mbar,

kvůli eliminaci chyb v měření a zároveň pro získání co nejpřesnějších výsledků. Navíc lze pomocí programu v počítači nastavit, jakým směrem bude pumpa generovat proudění vzduchu. Průtoková jednotka, která musí být po dobu provádění experimentu umístěna v inkubátoru pro zajištění optimálních kultivačních podmínek, představuje komponentu, která drží a spojuje zásobníky obsahující kultivační médium a hadičky. Jednotka zároveň zajišťuje regulaci a možnost přepínání jednotlivých operací, které vedou k vytvoření konstantního jednosměrného toku v průtokové komoře. Průtoková jednotka je pomocí dvou kabelů propojená s pumpou, což zajišťuje správnou funkci průtokové komory. Další nezbytnou součástí celého systému jsou jednorázové perfuzní sety, které obsahují vzduchové filtry, zásobníky pro kultivační médium a hadičky ústící do sklíčka (průtokové komory), ve kterém jsou vždy během experimentu nasazeny buňky. Systém ibidi obsahuje několik druhů sklíček s různými povrchovými úpravami a vlastnostmi. Jednotlivé typy sklíček si uživatel vybírá dle požadavků či potřeb při daném experimentu. Posledním prvkem celého systému je sušící lahev, jež chrání pumpu před případnou vlhkostí, která by pumpu mohla poškodit a způsobit tak její poruchu (Instruction Manual ibidi Pump System).

Obrázek 5 znázorňuje standardní zapojení všech komponent pro správnou funkci ibidi Pump System.



**Obrázek 5.** Schéma standardního zapojení Ibidi perfuzního systému. Upraveno dle Instruction Manual ibidi Pump System.

### 3.4 Mechanický bioreaktor

V přirozeném prostředí buňky reagují nejen na biologické faktory jako jsou například signalizační molekuly nebo růstové faktory, ale rovněž na fyzikální podněty (Wang a Chen,

2013). Z toho důvodu je často velmi žádané využívání pokročilejších typů bioreaktorů, mezi které lze zařadit i mechanický bioreaktor. Během kultivace v tomto bioreaktoru je zajištěn neustálý odvod média s odpadními látkami a zároveň přívod nového kultivačního média s potřebnými živinami pro buňky. Dalším benefitem mechanického bioreaktoru je možnost elektrické stimulace pomocí připojení elektrického proudu, což je zvláště výhodné u experimentů, které jsou prováděny s elektroaktivními tkáněmi, jelikož mnoho buněk v organismu funguje na základě elektroaktivních stimulů (svaly, mozek, nervy atd.) (Jin, Yang a Kim, 2015). Na druhou stranu problémem bývá aplikovat elektrický proud přímo na materiál, který je do bioreaktoru umístěn a se kterým buňky interagují. Důvodem je, že většinou jsou tyto materiály nevodivé, a proto může být proud veden pouze do média. Nicméně výsledný proud se poté velmi špatně definuje a je tedy určován hodně teoreticky, a to pomocí stanovení vstupního proudu na vzdálenost dvou elektrod (Skopalová, 2023 – ústní sdělení).

Co se týče materiálů využívaných pro tyto experimenty, zajímavé jsou vodivé polymery, které se často kombinují s jinými materiály jako je celulóza, keramika, chitosan atd., což je ve výsledku velmi výhodné pro samotné testování. Nicméně v praxi jsou spojeny s jistým negativem, a tím je jejich špatná biodegradabilita. Pokud má být biomateriál umístěn do organismu jen na určitou dobu a následně je žádoucí jeho degradace, tak tato vlastnost vodivým polymerům chybí (Jadoun, Riaz a Budhiraja, 2021).





**Obrázek 6.** Mechanický bioreaktor TC-3 (EBERS Medical Technology). Zdroj: archiv autorky.

## 4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KULTIVACI BUNĚK V PRŮTOKU

Jak již bylo nastíněno v předchozí kapitole, s prováděním experimentů za použití průtokového bioreaktoru se pojí jedna důležitá a často zmiňovaná veličina – smykové napětí. Nejedná se však o jediný faktor, který má vliv na kultivaci buněk v průtoku, je potřeba zmínit i významný podíl teploty a viskozity. Všechny tři veličiny spolu úzce souvisí a navzájem se ovlivňují, proto budou níže popsány detailněji.

Nicméně ještě před zaměřením se na tyto konkrétní veličiny je vhodné uvést toto téma do širšího kontextu. Zmíněné veličiny se váží k vědnímu oboru zvanému reologie, který se obecně zabývá tokem a deformacemi látek za působení síly. Samostatným vědním oborem se reologie stala již před několika desítkami let a její vznik souvisel s pozorováním abnormálního chování u několika známých materiálů. Jako příklad lze uvést chování barvy, což je tekutina, ale na rozdíl od většiny tekutin nestéká po svislé stěně, naopak se na ní drží. Druhým příkladem může být beton, který se jeví jako relativně pevná a tuhá látka, ovšem po vystavení vnější síle mění svůj tvar podobně jako kapalina. Dalo by se vyjmenovat několik dalších podobných příkladů, nicméně obecně se dá říci, že všechny tyto vlastnosti materiálů spojuje fakt, že v určitých případech běžně používané charakteristiky jako kapalný či pevný jednoduše nejsou dostačující a je třeba zavést novou, přesnější terminologii, která umožní konkrétnější popsání rysů chování a vlastností výše zmíněných a mnoha jiných materiálů. Dalším důležitým společným rysem těchto jevů je existence časových efektů, jinými slovy výsledky pozorování závisí na určitém časovém měřítku. Obecně tedy platí, že čas je odrazem všech změn ve struktuře materiálu, ke kterým dochází v průběhu provádění experimentu. Na závěr lze tedy shrnout, že reologie je oborem spadajícím do přírodních věd a uvažujícím o reálných materiálech s měnící se strukturou. Jejimi základními stavebními kameny jsou dva principy, a to teorie viskoelasticity a teorie velkých deformací (Malkin, 1994), (Wein, 1996).

V dnešní době bývá s oborem reologie spojována další věda – biomechanika. Biomechanika se dá považovat za relativně mladou vědní disciplínu, nicméně lidé se touto problematikou začali zabývat již velmi dávno. Biomechanika procházela v čase určitým vývojem. Nejprve spojovala pouze biologii a mechaniku, ale postupně se stala multidisciplinárním oborem a začala využívat informací a poznatků z mnoha vědních oborů jako je molekulární biologie, matematika, mikrobiologie i fyzika. Důvodem snažení o propojení biomechaniky a reologie je pochopení a vysvětlení otázky deformace tkáňových a orgánových struktur a rovněž objasnit, jak se tyto struktury mění v čase v reakci na vnější

mechanické zatížení. Proto lze s ohledem na jedinečnost zkoumané problematiky mluvit o existenci vědního oboru zvaného bioreologie. Získané výsledky z výzkumu v oblasti této vědní disciplíny mají velký potenciál praktického využití především v lékařství a fyziologii, neboť poznatky o reologických vlastnostech tkání umožňují předpovědět jejich reakci na mechanické zatížení a rovněž zlepšit či optimalizovat konstrukci nejrůznějších výrobků, jako jsou například pracovní pomůcky, obuv nebo náhrady končetin (protézy). Mimo jiné se bioreologie zabývá také vlastnostmi kapalin nacházejících se v těle (biokapaliny), jako jsou například sliny, krev či fyziologické tekutiny uvnitř kloubních dutin (synoviální tekutiny), nicméně všechny uvedené biokapaliny patří k reologicky nejsložitějším a pro vystižení jejich chování je spousta modelů sloužících k jejich popisu nedostatečných (Havránek, 2007), (Lopot, 2006).

#### 4.1 Viskozita

V reologii je základní veličinou, která charakterizuje tokové chování, viskozita. Tato veličina je využívána pro fyzikální popis látek a obecně určuje odpor vůči toku, jinými slovy se jedná o míru vnitřního odporu materiálu vůči vnějšímu zatížení. Občas se lze setkat s tím, že viskozita bývá nesprávně zaměňována či srovnávána s jinou veličinou – hustotou<sup>2</sup>. Nicméně každá z těchto dvou veličin určuje odlišnou vlastnost dané látky a ty spolu jednoduše nijak nesouvisejí (Janalík, 2010), (Schramm, 2000), (Wein, 1996).

Dle způsobu měření lze rozlišovat dva typy viskozity – dynamickou a kinematickou, jež jsou vzájemně závislé. Dynamická (smyková) viskozita  $\eta$  je veličina, která udává poměr mezi smykovým napětím  $\tau$  a rychlostí smykové deformace  $\gamma$  (rychlostním gradientem) v závislosti na vzdálenosti dvou rovnoběžných desek, přičemž jedna se vůči druhé pohybuje rovnoměrným přímočarým pohybem. S pojmem dynamická viskozita souvisí tekutost, což je určitá schopnost látky a konkrétně to znamená, že se částice tvořící danou kapalinu mohou vůči sobě pohybovat. Jednotkou dynamické viskozity je Pa·s. Z praktických důvodů byla z dynamické viskozity odvozena i kinematická viskozita  $\nu$ . Ta se dá jednoduše matematicky vyjádřit jako podíl dynamické viskozity a hustoty měřené kapaliny. Jednotkou kinematické viskozity je  $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (Malvern Instruments Limited, 2016), (Studijní materiály k předmětu Kontrolní a zkušební metody), (Wein, 1996).

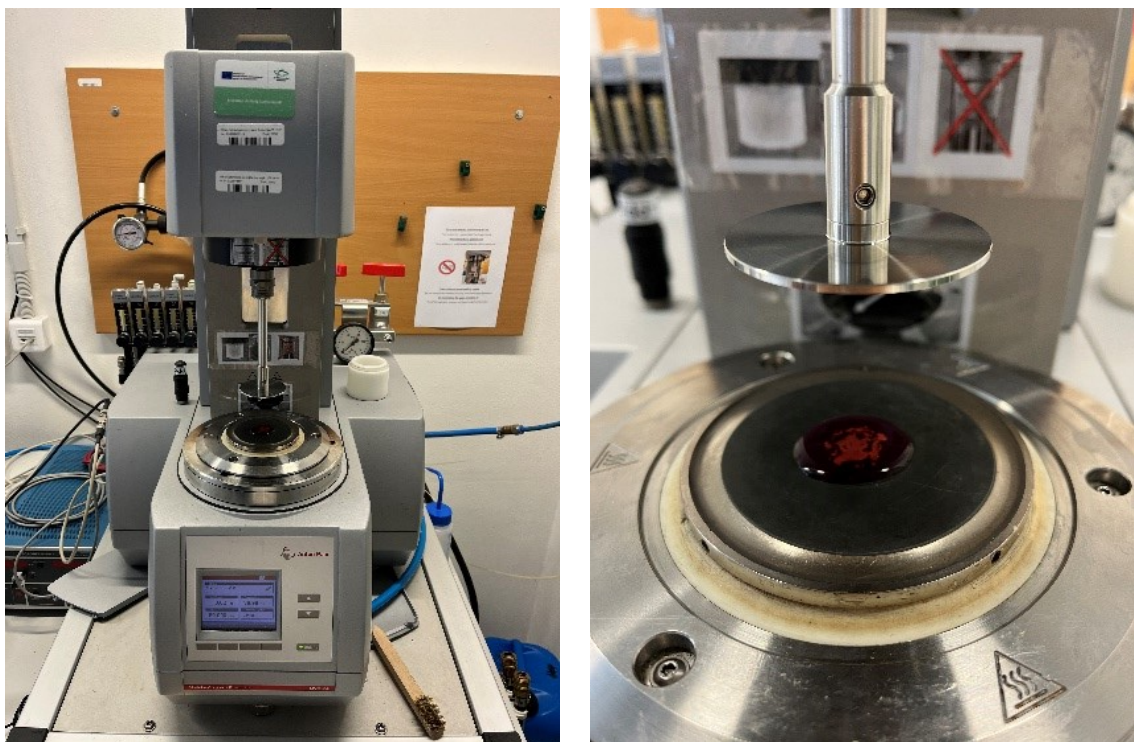
---

<sup>2</sup> Hustota látky je fyzikální veličinou, která bývá označována jako měrná hmotnost a vyjadřuje vztah mezi hmotností a objemem (Beneš, 2022).

Viskozita je závislá na několika parametrech. První veličinou mající vliv na viskozitu je tlak. Obecně pravděpodobně platí, že se zvyšujícím se tlakem se zvyšuje rovněž i hodnota viskozity. Nicméně obecně vliv tlaku na viskozitu ještě nebyl dostatečně prostudován a v některých případech bývá tedy vliv tlaku spíše zanedbáván. Velký vliv ovšem má při procesech probíhajících za velmi vysokých tlaků. Podobnou závislost lze pozorovat i v souvislosti s koncentrací. Opět tedy viskozita roste, nejprve lineárně a po dosažení tzv. kritické hodnoty už lze pozorovat exponenciální růst. Jistý vztah existuje i mezi molekulovou hmotností látky a viskozitou. Řetězce polymerních látek bývají v klidovém stavu většinou vzájemně zapletené a svinuté, ovšem po začátku působení určitého napětí na danou látku (látky je tedy deformována), se řetězce začnou rozplétat a tím i narovnávat. Platí, že viskozita roste přímo úměrně do tzv. kritické molekulové hmotnosti a za tímto bodem již začínají být řetězce látky dostatečně dlouhé a projevuje se tedy i vliv zaplétajících se řetězců. Proto nad touto zlomovou koncentrací začíná viskozita s molekulovou hmotností růst mnohem strměji (Janmey, Georges a Hvidt, 2007), (Studijní materiály k předmětu Fyzika polymerů). Předposlední a v rámci této práce nejdůležitější veličinou ovlivňující viskozitu je teplota. V tomto případě platí vztah říkající, že s rostoucí teplotou viskozita dané látky klesá. Dá-li se tento vztah do širšího kontextu, bude zřejmé, že viskozita je ovlivnitelná teplotou a tento faktor má následný vliv na smykové napětí, které má ovšem zase výrazný vliv na buňky. Všechny tyto veličiny jsou tedy velmi provázané a ovlivňují se navzájem. Závislost viskozity na teplotě bývá matematicky vyjadřována buď pomocí Arrheniovy nebo Williams-Landel-Ferry rovnice. Nakonec bych jen ráda zmínila, že u některých materiálů lze pozorovat změnu viskozity v závislosti na čase (Studijní materiály k předmětu Fyzika polymerů).

Co se týče způsobů měření viskozity, využívají se viskozimetry. Tato zařízení existují v několika různých konstrukcích. Mezi nejpoužívanější viskozimetry lze řadit pádové (tělískové), průtokové (kapilární) a rotační viskozimetry. Ovšem aby bylo měření úspěšné a správně provedené, je potřeba zajistit vždy v průběhu celého měření laminárnost proudění a použití vhodné geometrie. Měření viskozity pomocí kapilárních viskozimetrů vychází z Hagen-Poiseuilleova zákona, který platí pro laminární proudění tekutiny v trubici s kruhovým průřezem. Použití tělískových viskozimetrů pro měření viskozity funguje na principu měření rychlosti pádu daného (známého) tělesa, nejčastěji se jedná o hladkou kouli ve zkoumané kapalině, jejíž viskozita je zjišťována. Třetí skupinu tvoří rotační viskozimetry, kdy princip měření pomocí těchto zařízení je založen na aplikaci smyku

na vzorek, který je umístěn mezi dvěma definovanými rovnoběžnými plochami, které se navzájem otáčejí kolem své společné osy. Rotační viskozimetry existují ve více typech provedení a mezi nejčastěji používanými patří ty s geometrií dvou rotujících desek, dvou sousoucých válců, anebo kužel-deska (Janalík, 2010), (Wein, 1996).



**Obrázek 7.** Rotační reometr s geometrií paralelních desek při měření dynamické viskozity kultivačního média. Zdroj: archiv autorky.

## 4.2 Smykové napětí

Smykové napětí lze jednoduše definovat jako sílu účinkující na danou plochu. Tato síla může být interpretována jako třecí smyk na povrchu buněk, tlak, anebo vyrovnávací či tahové síly, které působí proti silám aplikovaným zvenčí. Základní jednotkou smykového napětí dle systému SI je pascal<sup>3</sup> (Pa) (Švihálková Šindlerová a Vašíček).

Během procesu vytváření této práce byla tato veličina snad nejčastěji opakovanou a hrála při všech experimentech zcela zásadní roli. Pro konkrétnější představu, vztáhnou-li se tyto informace k celému tématu bakalářské práce, buňky, které byly kultivovány v bioreaktoru za podmínek působícího průtoku, vnímaly třecí sílu (smykové napětí), jež byla

<sup>3</sup> Základní jednotkou mechanického napětí dle Mezinárodního systému jednotek je sice pascal, ovšem ve studiích týkajících se biologie se velmi často používá jednotka dyn·cm<sup>-2</sup>. Dyn je odvozená jednotka síly, která je definovaná jako „síla, která působením po dobu jedné sekundy vyvolá změnu rychlosti hmotnosti jednoho gramu o jeden centimetr za sekundu“ (Gyllenbok, 2018).

vytvářena na jejich povrchu za působení proudícího kultivačního média. Jak již bylo zmíněno v předešlé kapitole, pomocí této simulace byly napodobovány přirozené podmínky v organismu, kde běžně působí smykové napětí na povrch cévních stěn v důsledku cirkulace krve. Obecně ale může být působení třecí síly v těle velmi heterogenní, konkrétně v žilách a kapilárách lze pozorovat přerušovaný nebo pomalý tok krve, kdežto ve velkých a malých tepnách dochází k toku krve v pulzových vlnách. Obvyklé hodnoty smykového napětí v cévách se různě liší, ale pro představu, ve velkých arteriích bývá nižší smykové napětí okolo  $10\text{-}20 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$  a v kapilárách či arteriolách se hodnoty běžně pohybují okolo  $40\text{-}60 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Švihálková Šindlerová a Vašíček).

Na závěr této kapitoly by bylo vhodné ještě zmínit, že smykové napětí je také velmi významně ovlivnitelné geometrií cév (v prostředí *in vivo*) nebo kanálku (v prostředí *in vitro*). Jinými slovy, změnou výšky kanálku lze dosáhnout i dvakrát vyšších hodnot smykového napětí působícího na buňky kultivované v daném kanálku. Například při kultivaci ve stejných dynamických podmínkách v kanálku s výškou  $200 \mu\text{m}$  budou hodnoty smykového napětí mnohem vyšší než v případě kanálku s výškou  $800 \mu\text{m}$  (Švihálková Šindlerová a Vašíček).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍL PRÁCE

- Kultivace myších embryonálních fibroblastů a myších embryonálních kmenových buněk za běžných podmínek *in vitro*
- Kultivace myších embryonálních fibroblastů a myších embryonálních kmenových buněk v dynamických podmínkách *in vitro*
- Vyhodnocení morfologických změn na buněčných modelech v důsledku působení smykového napětí
- Stanovení viskozity tkáňového kultivačního média



## 6 MATERIÁL A METODIKA

### 6.1 Buněčné kultury a médium

Při provádění tohoto experimentu se pracovalo se dvěma typy buněčných linií:

Prvním typem byly **myší embryonální fibroblasty** NIH/3T3 (ATCC CRL-1658 NIH/3T3, USA). Pro jejich kultivaci bylo použito médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (PAA Laboratories GmbH, Rakousko), které obsahovalo telecí sérum (BioSera, Francie) o koncentraci 10 % a antibiotika Penicillin/Streptomycin (GE Healthcare HyClone, Velká Británie) s koncentrací  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Druhý typ buněčných linií, který byl použit během provádění experimentu, byly **myší embryonální kmenové buňky** ESR1 (10.1073/pnas.90.18.8424). Kultivace těchto buněk probíhala na miskách potažených želatinou, která sloužila pro snadnější naadherování buněk. Potažení nádoby želatinou bylo provedeno pomocí 0,1 % prasečí želatiny ve vodě. Pro kultivaci bylo použito médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium, které obsahovalo: 15 % fetálního telecího séra,  $100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$  penicilinu,  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  streptomycinu, 100 mM roztoku neesenciálních aminokyselin (vše od Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), 0,05 mM 2-merkptoethanolu (Sigma, St. Louis, MO, USA) a  $1000 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$  LIF (Gibco, MA, USA).

Kultivace obou buněčných linií probíhala v inkubátoru při stálé teplotě  $37^\circ\text{C}$ , ve vlhčeném vzduchu a za přítomnosti oxidu uhličitého o koncentraci 5 %.

### 6.2 Použité přístroje a pomůcky

Během provádění experimentu byl využíván biologický inkubátor Heracell 150i (Thermo Scientific, USA), Ibidi perfuzní systém (Ibidi, Německo), fluorescenční mikroskop Olympus IX 81, optický mikroskop (Olympus, Japonsko), centrifuga (Eppendorf, Německo), automatické pipety (Eppendorf, Německo).

### 6.3 Experiment

Níže budou popsány jednotlivé části experimentu, které byly provedeny, aby bylo možné stanovit a porovnat případné změny na buněčných liniích při kultivaci v běžných *in vitro* podmínkách a v dynamických podmínkách.

### 6.3.1 Měření viskozity média

Při provádění experimentu se pracovalo s již zmíněným přístrojem ibidi Pump System, který má i vlastní program (PumpControl Software), jež byl rovněž využíván pro provádění měření. V programu byla přednastavená průměrná dynamická viskozita kultivačního média a její hodnota odpovídá  $0,007 \text{ dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Ovšem aby byla měření co nejpřesnější a aby se eliminovaly případné chyby ve výsledcích experimentu, bylo provedeno měření dynamické viskozity i námi používaných kultivačních médií při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Pro měření dynamické viskozity byl zvolen rotační reometr Physica MCR 502 (Anton Paar, Rakousko). Reologické chování našich kultivačních médií bylo studováno v režimu řízené smykové rychlosti při rozsahu rychlostí smykové deformace  $10\text{-}100 \text{ s}^{-1}$ . Měření byla provedena v rotačním režimu. Dynamická viskozita byla zjišťována pro obě kultivační média, která byla během provádění experimentu využívána. Byly použity dva typy geometrií:

**Geometrie válec-válec** s průměrem válce  $14,45 \text{ mm}$  a aktivní délkou válce  $72,5 \text{ mm}$ . Rychlost smykové deformace se pohybovala mezi  $10\text{-}100 \text{ s}^{-1}$  a objem obou médií nutný pro provedení měření odpovídal objemu  $16 \text{ ml}$ .

Dále bylo měření provedeno i za použití **geometrie paralelních desek** (PP50/E/TI) s nastavenou mezerou  $0,9 \text{ mm}$  mezi paralelními deskami. Co se týče průměru desek, obecně se dá říci, že čím je jejich průměr větší, tím lépe, jelikož u desek s malým průměrem by kultivační médium při měření vytékalo. Námi použité desky měly průměr odpovídající  $50 \text{ mm}$ .

### 6.3.2 Kultivace ve statických *in vitro* podmínkách

Buňky myších fibroblastů pěstované v kultivační nádobě byly kontrolovány pomocí mikroskopu a jejich pasážování bylo prováděno, jakmile bylo dosaženo  $80\%$  konfluence. S naadherovanými buňkami na dně kultivační nádoby se pracovalo v laminárním boxu za sterilních podmínek. Nejprve bylo z kultivační nádoby opatrně odsáto kultivační médium tak, aby buňky nebyly poškozeny. Následně byl do nádoby přidán pufr (PBS) o koncentraci  $0,2 \text{ ml}\cdot\text{cm}^{-2}$  za účelem odstranění zbytků kultivačního média, pufr byl vzápětí odsát. Poté byl do kultivační nádoby přidán trypsin-EDTA v množství  $0,1 \text{ ml}\cdot\text{cm}^{-2}$  a nádoba byla vložena do inkubátoru. Přidaný trypsin způsobil, že se během  $10\text{-}15$  minut přerušily vazby jak mezi samotnými buňkami, tak i mezi buňkami a povrchem nádoby. Následně bylo nutné přidat  $7 \text{ ml}$  nového kultivačního média pro neutralizaci trypsinu a celý roztok byl pomocí

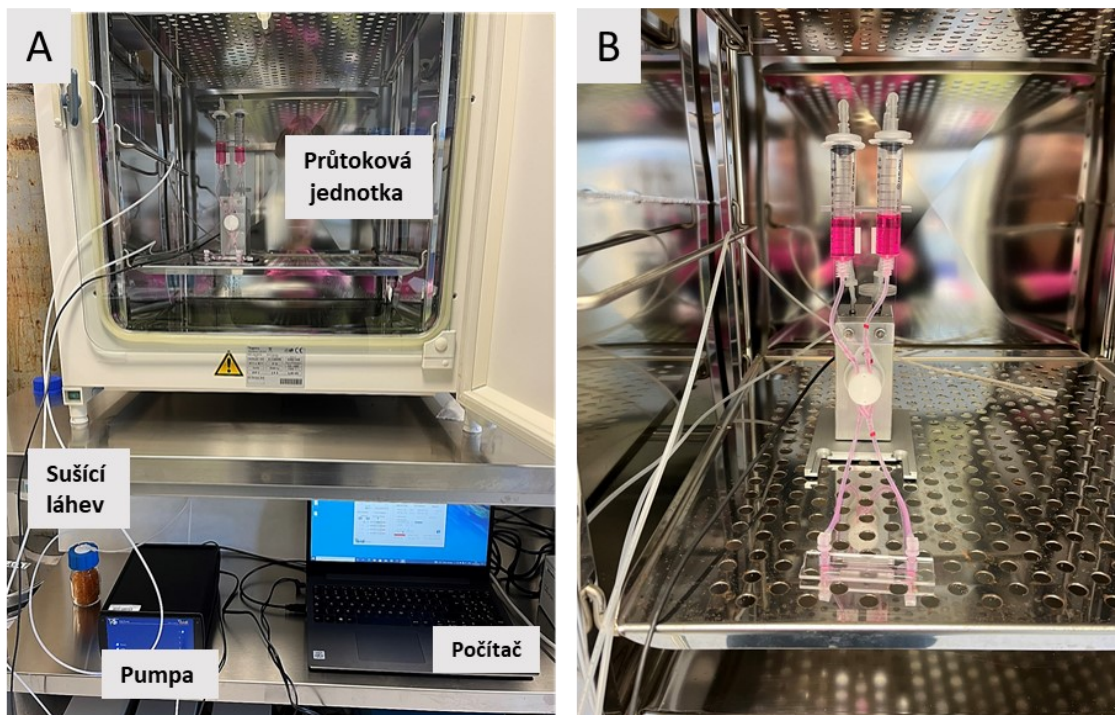
pipety převeden do zkumavky, která byla vložena do centrifugy předehřáté na 37 °C. Centrifugace trvala 3 minuty při otáčkách 1,1 rpm. Po dokončení centrifugace se všechny buňky nacházely na dně zkumavky, a tak bylo možné odsát tekutinu (médiu a trypsin). K buňkám usazeným vespod zkumavky byly vzápětí přidány 2 ml nového kultivačního média a ve vzniklém roztoku se nacházelo přibližně  $10^7$  buněk·ml<sup>-1</sup>. Na závěr se do nové kultivační nádoby napipetovalo 25 ml média, do kterého byla přidána i získaná buněčná suspenze, čímž byla vytvořena nová udržovací pasáž. Zároveň byla připravena buněčná suspenze o koncentraci  $10^5$  buněk·ml<sup>-1</sup>, která byla nasazena na Petriho misky, které se běžně používají pro kultivaci.

Myší embryonální kmenové buňky byly kultivovány za podobných podmínek jako tomu bylo v případě myších fibroblastů. ESCs se běžně kultivují na tkáňovém plastiku, který je potažený 0,1% prasečí želatinou. Buňky byly na Petriho misky nasazeny v koncentraci 50 000 buněk·cm<sup>-2</sup>.

### 6.3.3 Kultivace v dynamických podmínkách

Jak již bylo zmíněno výše, pro provádění všech experimentů byl používán průtokový bioreaktor ibidi (ibidi Pump System). Tento mikrofluidní systém je tvořen pumpou, která zajišťuje generování tlaku, dále průtokovou jednotkou sloužící k snadnému upevnění perfuzního setu a zajišťující přenos tlaku vzduchu, který vytváří připojená pumpa. Po spojení pumpy a fluidní jednotky je možné docílit vytvoření pulzujícího, oscilačního nebo jednosměrného toku média skrz připojený kanálek. Další nezbytnou součástí tohoto systému jsou již zmíněné perfuzní sety a sklíčka, jež jsou dostupné v několika variantách lišící se svými parametry (průměr a délka hadiček, geometrie kanálků ve sklíčku). Kombinacemi různých perfuzních setů a sklíček lze dosáhnout velmi širokého rozpětí hodnot aplikovaného smykového napětí. Detailnější popis používaného bioreaktoru je uveden v podkapitole 3.3. Průtokový bioreaktor (Instruction Manual ibidi Pump System).

Obrázek 8 znázorňuje přesné zapojení bioreaktoru během měření. Systém musel být po celou dobu měření umístěn v inkubátoru, který zajišťoval optimální podmínky pro kultivaci, tj. při teplotě 37 °C, za přítomnosti oxidu uhličitého a ve vlhčeném vzduchu.



**Obrázek 8.** A) Zapojení průtokového bioreaktoru ibidi během měření B) Průtoková jednotka během provádění experimentu. Zdroj: archiv autorky.

### 6.3.3.1 Možnosti optimalizace přístroje

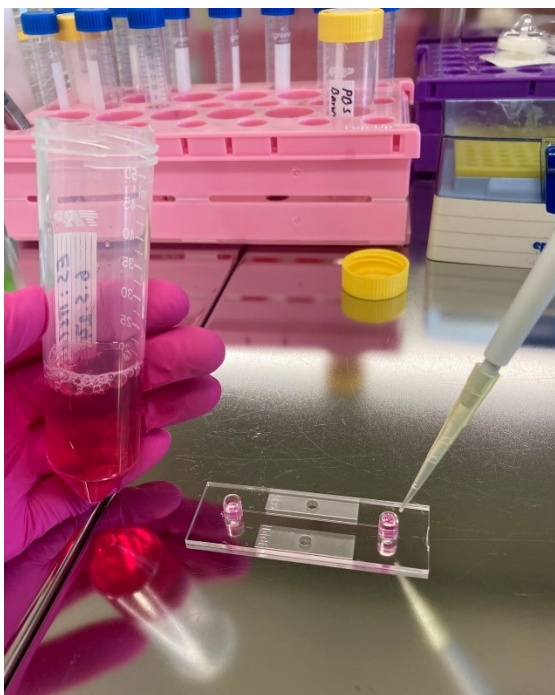
Přístroj ibidi nabízí mnoho druhů sklíčků (channel slide), které se liší svými vlastnostmi, je tedy důležité jednotlivé typy odlišovat a přizpůsobovat výběr sklíčka danému experimentu a požadované aplikaci. Sklíčka se liší například svojí geometrií, kde je odlišná hloubka průtokového kanálku, s tím související jiné množství objemu média a plocha oblasti růstu buněk. Zároveň je třeba dbát na kombinace sklíčka s adekvátním perfuzním setem, jelikož na základě vhodného sestavení se dá dosáhnout velmi širokého rozmezí hodnot smykového napětí. Perfuzní sety se pak liší vnitřním průměrem a délkou hadiček. Veškeré rozměry a parametry sklíčků i perfuzních setů jsou detailně popsány v manuálu ibidi.

Pro všechna měření, která byla provedena za účelem získání podkladů k následnému zpracování této práce, byly používány sklíčka s názvem  $\mu$ -slide I<sup>0,4</sup> Luer s výškou kanálku 0,4 mm a s plochou oblasti růstu buněk 2,5 cm<sup>2</sup>. Jedná se o více méně univerzální sklíčka, která se dají použít jak pro kultivaci buněk v dynamických podmínkách za využití spíše vyšších hodnot smykového napětí, tak jsou rovněž vhodná pro experimenty zaměřující se na krátkodobé statické kultivace. Povrch je hladký bez struktur, takže je sledován pouze vliv smykového napětí. Dále byl pro měření použit červený perfuzní set (Perfusion Set

RED), který má 1,6 mm vnitřní průměr hadičky a 15 cm délku hadičky. Kombinací  $\mu$ -slide I<sup>0,4</sup> Luer a Perfusion Set RED lze aplikovat smykové napětí v rozmezí 4-43 dyn·cm<sup>-2</sup>.

### 6.3.3.2 Kultivace myších embryonálních fibroblastů

Fibroblasty by se obecně daly označit za mnohem odolnější buňky, než jsou například buňky kmenové, jelikož se jedná o již diferencované buňky, které již plní svoji funkci. Z tohoto důvodu byla všechna počáteční měření prováděna právě na buněčných liniích myších embryonálních fibroblastů. Při každém provádění experimentu byly buňky nejprve spočítány a následně se vypočítaly příslušné objemy pro přípravu požadované buněčné suspenze. Sklíčko používané při daném experimentu bylo potřeba vždy nechat předeheat v inkubátoru, aby buňky později nebyly nasazeny do studeného kanálku, jelikož by to mohlo způsobit špatný průběh kultivace. Výslednou buněčnou suspenzi bylo potřeba pomocí automatické pipety aplikovat v objemu 150  $\mu$ l do kanálku ve sklíčku ( $\mu$ -slide I<sup>0,4</sup> Luer). Přesněji řečeno, špička pipety se zasunula do vstupu kanálku a po vypuštění obsahu špičky byl zaplněn celý obsah kanálku (viz Obrázek 9). Koncentrace buněk v suspenzi byla stejná jako při statické kultivaci, tedy 10<sup>5</sup> buněk·ml<sup>-1</sup>. Následně bylo potřeba nechat buňky několik hodin, aby mohly naadherovat (přichytit se) na dno kanálku, případně dorůst do 80% konfluence, aby měly oporu jedna v druhé.



**Obrázek 9.** Aplikace buněčné suspenze pomocí automatické pipety do kanálku. Zdroj: archiv autorky.

Později byly buňky zkontrolovány pod mikroskopem a oba vstupy do kanálku se doplnily kultivačním médiem v objemu 60  $\mu\text{l}$  pokud možno tak, aby se do kanálku nedostaly vzduchové bublinky. Zároveň bylo potřeba v této fázi již připravit, správně sestavit a propojit pumpu, fluidní jednotku a perfuzní set (viz Obrázek 8 A), B)). Každý z rezervoárů se naplnil 6 ml kultivačního média. Před připojením sklíčka s buňkami bylo nutné odstranit z hadiček případné vzduchové bubliny, proto se k systému nejprve připojil tzv. kalibrační slide a v programu byl spuštěna funkce sloužící právě k odstranění vzduchových bublin. Poté se již k celému systému připojilo sklíčko s buňkami a bylo možné kultivovat za průtokových podmínek.

### 6.3.3.3 *Kultivace myších embryonálních kmenových buněk*

Co se týče postupu přípravy kmenových buněk pro kultivaci v dynamických podmínkách, proces se příliš nelišil od výše popsaného postupu pro embryonální fibroblasty, ovšem bylo potřeba s kmenovými buňkami pracovat se zvýšenou opatrností (kmenové buňky jsou obecně více náchylné) a také během postupu udělat jeden krok navíc. Před aplikací požadované buněčné suspenze do kanálku bylo nutné do něj vpravit 150  $\mu\text{l}$  0,1% želatiny, která se nechala v kanálku alespoň 20 minut. Poté se želatina z kanálku odsála, celé sklíčko se nechalo předeřhát v inkubátoru a následně do kanálku bylo aplikováno 150  $\mu\text{l}$  připravené buněčné suspenze. Koncentrace buněk v suspenzi byla stejná jako při statické kultivaci, tedy 50 000 buněk  $\cdot\text{cm}^{-2}$ . Želatinu bylo nutné aplikovat, jelikož kmenové buňky se pak mnohem snadněji přichytí a zvýší se šance na úspěšné dokončení experimentu. Poté už experiment probíhal stejným způsobem jako v případě embryonálních fibroblastů.

### 6.3.4 **Barvení buněk**

Po provedení posledního experimentu s myšími embryonálními fibroblasty a myšími embryonálními kmenovými buňkami byly buňky za účelem přehledné vizualizace nabarveny. Fluorescenční mikroskopie se často využívá pro snadnější posouzení morfologie zkoumaných buněk, jelikož po aplikaci barev jsou velmi přehledně odlišena buněčná jádra od zbylého cytoskeletu.

Fluorescenční barviva byla aplikována jak na referenci, tak na buňky kultivované za průtoku v kanálku. Samotné barvení buněčných struktur bylo provedeno následovně: nejprve bylo potřeba buňky zafixovat a permeabilizovat pomocí formaldehydu a Tritonu X-100, proto se odsálo kultivační médium a vzápětí se přidal 4% formaldehyd,

který se nechal působit 15 minut. Po uplynulém čase byla tato látka odsáta a buňky se promyly pufrům (PBS). Následovala aplikace 0,5% Tritonu X-100 po dobu 5 minut. Buňky byly následně třikrát promyty pomocí PBS a nakonec se přidalo vypočítané množství tohoto pufru, ke kterému se zároveň přidalo  $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  barviva Hoechst 33258 a kapka barviva ActinRed™ 555. Přidané látky se nechaly působit po dobu 30 minut ve tmě. Nakonec bylo PBS i s barvivou odsáto, buňky se opět promyly PBS a nakonec se opět přidalo požadované množství pufru.

Pomocí barviva ActinRed™ 555 byla zvýrazněna stresová vlákna, která jsou součástí buněčného cytoskeletu, naopak barvivo Hoechst 33258 posloužilo ke zvýraznění buněčných jader.

### 6.3.5 Použité průtokové parametry

Do následujících tabulek byly vypsány průtokové parametry použité při jednotlivých měřeních. Jak již bylo zmíněno výše, během prvních tří experimentů se pracovalo s myšími embryonálními fibroblasty a poté byly při zbylých měřeních testovány myší embryonální kmenové buňky. Z každé tabulky vyjadřující aplikované průtokové parametry vždy příslušného experimentu, lze vyčíst dobu působení průtoku, aplikovaný tlak, průtokovou rychlost, smykové napětí a smykovou rychlost.

#### Myší embryonální fibroblasty (NIH/3T3)

##### 1. Měření

*Tabulka 1. Průtokové parametry pro první experiment prováděný s myšími embryonálními fibroblasty NIH/3T3. Tabulku podle dat z programu PumpControl Software sestavila autorka.*

Průtokové parametry				
Doba průtoku [hod]	Tlak [mbar]	Průtoková rychlost [ $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	Smykové napětí [ $\text{dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]	Smyková rychlost [ $\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
6	5,9	4,76	2	286
15	40,9	28,52	12	1714

## 2. Měření

*Tabulka 2. Průtokové parametry pro druhý experiment prováděný s myšimi embryonálními fibroblasty NIH/3T3. Tabulku podle dat z programu PumpControl Software sestavila autorka.*

Průtokové parametry				
Doba průtoku [hod]	Tlak [mbar]	Průtoková rychlost [ml·min <sup>-1</sup> ]	Smykové napětí [dyn·cm <sup>-2</sup> ]	Smyková rychlost [1·s <sup>-1</sup> ]
15	9,0	7,14	3	429
5	33,1	23,78	10	1429
2	77,9	47,54	20	2857

## 3. Měření

*Tabulka 3. Průtokové parametry pro třetí experiment prováděný s myšimi embryonálními fibroblasty NIH/3T3. Tabulku podle dat z programu PumpControl Software sestavila autorka.*

Průtokové parametry				
Doba průtoku [hod]	Tlak [mbar]	Průtoková rychlost [ml·min <sup>-1</sup> ]	Smykové napětí [dyn·cm <sup>-2</sup> ]	Smyková rychlost [1·s <sup>-1</sup> ]
2	9,0	7,14	3	429
2	22,2	16,64	7	1000
18	49,3	33,28	14	2000
53	77,9	47,54	20	2857



**Myší embryonální kmenové buňky (ESR1)****1. Měření**

*Tabulka 4. Průtokové parametry pro první experiment prováděný s myšími embryonálními kmenovými buňkami ESR1. Tabulku podle dat z programu PumpControl Software sestavila autorka.*

<b>Průtokové parametry</b>				
<b>Doba průtoku [hod]</b>	<b>Tlak [mbar]</b>	<b>Průtoková rychlost [ml·min<sup>-1</sup>]</b>	<b>Smykové napětí [dyn·cm<sup>-2</sup>]</b>	<b>Smyková rychlost [l·s<sup>-1</sup>]</b>
4	5,9	4,76	2	286
18	40,9	28,52	12	1714

**2. Měření**

*Tabulka 5. Průtokové parametry pro druhý experiment prováděný s myšími embryonálními kmenovými buňkami ESR1. Tabulku podle dat z programu PumpControl Software sestavila autorka.*

<b>Průtokové parametry</b>				
<b>Doba průtoku [hod]</b>	<b>Tlak [mbar]</b>	<b>Průtoková rychlost [ml·min<sup>-1</sup>]</b>	<b>Smykové napětí [dyn·cm<sup>-2</sup>]</b>	<b>Smyková rychlost [l·s<sup>-1</sup>]</b>
2	22,2	16,64	7	1000
3	23,1	16,28	15	2143
19	7,2	5,42	5	714
58	33,1	23,78	10	1429

### 3. Měření

*Tabulka 6. Průtokové parametry pro třetí experiment prováděný s myšími embryonálními kmenovými buňkami ESR1. Tabulku podle dat z programu PumpControl Software sestavila autorka.*

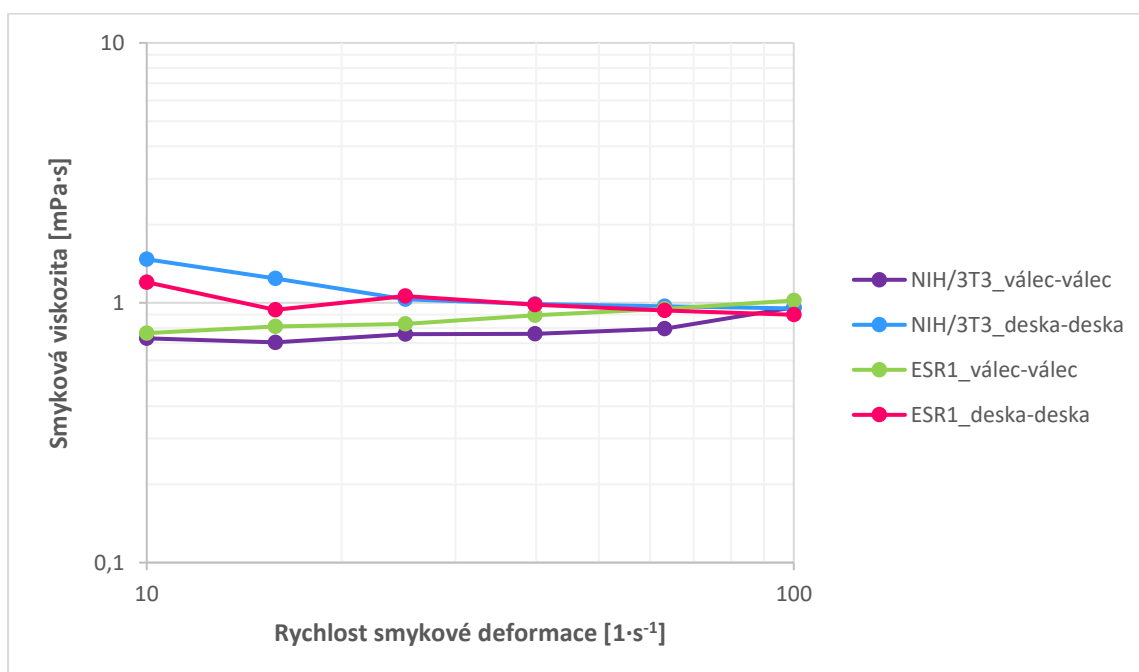
<b>Průtokové parametry</b>				
<b>Doba průtoku [hod]</b>	<b>Tlak [mbar]</b>	<b>Průtoková rychlost [ml·min<sup>-1</sup>]</b>	<b>Smykové napětí [dyn·cm<sup>-2</sup>]</b>	<b>Smyková rychlost [1·s<sup>-1</sup>]</b>
72	5,7	4,34	4	571
4	40,9	28,52	12	1714
20	77,9	47,54	20	2857

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 7.1 Měření viskozity média

Viskozita média byla měřena pomocí rotačního reometru Physica MCR 502 za použití dvou typů geometrií: válec-válec a deska-deska. Rozsah rychlostí smykové deformace byl zvolen od 10 do 100 s<sup>-1</sup>. Kdyby byly zvoleny nižší rychlosti smykové deformace (<10 s<sup>-1</sup>), tak by to vedlo k přiblížení se k mezní hodnotě citlivosti přístroje, jelikož se jedná o oblast viskozity pod 1 mPa·s. Stejně tak pro tento typ kapaliny a pro použité typy geometrie nejsou vhodné vyšší hodnoty rychlosti smykové deformace (>100 s<sup>-1</sup>).

V Grafu 1 je uvedena závislost naměřených hodnot smykové viskozity na rychlosti smykové deformace. Jelikož je kultivační médium Newtonovská kapalina, lze v grafu pozorovat, že měřená viskozita není závislá na rychlosti smykového napětí, platí to pro všechna měření. Jednotlivé hodnoty naměřených viskozit při různých smykových deformacích jsou uvedeny v Tabulce 7 pro médium myších fibroblastů NIH/3T3 a v Tabulce 8 pro médium kmenových buněk ESR1. Ze získaných hodnot viskozit byla navíc vytvořena průměrná hodnota.



**Graf 1.** Závislost naměřených hodnot smykové viskozity na rychlosti smykové deformace pro oba typy kultivačních médií za použití rotačního reometru s dvěma typy geometrií – deska-deska a válec-válec. Graf dle vlastních naměřených dat sestavila autorka.

*Tabulka 7. Naměřené hodnoty dynamických viskozit při různých smykových deformacích pro kultivační médium používané ke kultivaci myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3 a výsledné průměrné hodnoty dynamických viskozit pro oba typy geometrií. Zdroj dat: naměřené autorkou.*

<b>Médium pro myší embryonální fibroblasty NIH/3T3</b>		
	Viskozita [mPa·s]	
Rychlost smykové deformace [s <sup>-1</sup> ]	Geometrie válec-válec	Geometrie deska-deska
10	0,73	1,47
15,8	0,70	1,24
25,1	0,76	1,03
39,8	0,76	0,99
63,1	0,80	0,97
100	0,96	0,95
<b>Průměr</b>	<b>0,78</b>	<b>1,11</b>

**Tabulka 8.** Naměřené hodnoty dynamických viskozit při různých smykových deformacích pro kultivační médium používané ke kultivaci myších embryonálních kmenových buněk ESR1 a výsledné průměrné hodnoty dynamických viskozit pro oba typy geometrií. Zdroj dat: naměřené autorkou.

<b>Médium pro myší embryonální kmenové buňky ESR1</b>		
	Viskozita [mPa·s]	
Rychlost smykové deformace [s <sup>-1</sup> ]	Geometrie deska-deska	Geometrie válec-válec
10	0,76	1,20
15,8	0,81	0,94
25,1	0,83	1,06
39,8	0,90	0,98
63,1	0,95	0,94
100	1,02	0,90
<b>Průměr</b>	<b>0,88</b>	<b>1,00</b>

Výsledná dynamická viskozita pro médium používané při kultivaci myších embryonálních fibroblastů odpovídala hodnotě 0,78 mPa·s (geometrie válec-válec) a 1,11 mPa·s (geometrie deska-deska). Médium využívané při kultivaci myších embryonálních fibroblastů mělo dynamickou viskozitu 0,88 mPa·s (geometrie válec-válec) a 1,00 mPa·s (geometrie deska-deska). Aby mohly být naměřené hodnoty porovnány s hodnotou udávanou v programu PumpControl Software (0,007 dyn·s·cm<sup>-2</sup>), musí být viskozita převedena do jednotek dyn·s·cm<sup>-2</sup>. Udává se že:

$$1 \text{ mPa}\cdot\text{s} = 0,01 \text{ dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$$

Hodnoty přepočtené dynamické viskozity jsou uvedeny v Tabulce 9.

**Tabulka 9.** Výsledné hodnoty dynamických viskozit pro obě kultivační média přepočtené na  $\text{dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Zdroj dat: naměřené autorkou.

	Viskozita [ $\text{mPa}\cdot\text{s}$ ]	Viskozita [ $\text{dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]
Médium pro NIH/3T3 geometrie válec-válec	0,78	0,0078
Médium pro NIH/3T3 geometrie deska-deska	1,11	0,0111
Médium pro ESR1 geometrie válec-válec	0,88	0,0088
Médium pro ESR1 geometrie deska-deska	1,00	0,0100

Porovnáme-li námi naměřené hodnoty viskozit s uváděnou průměrnou hodnotou v programu PumpControl Software  $0,007 \text{ dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$ , vidíme, že naměřené hodnoty jsou vyšší. Nicméně při zvolené geometrii válec-válec nám viskozita média vyšla  $0,0078 \text{ dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$  pro médium myších fibroblastů a  $0,0088 \text{ dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$  pro médium kmenových buněk. Tyto hodnoty jsou téměř srovnatelné s hodnotou udávanou v programu. Při použití geometrie deska-deska byla naměřena hodnota vyšší, okolo  $0,01 \text{ dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$  pro obě kultivační média.

Pro komplexnější možnost zhodnocení výsledků lze uvést hodnotu dynamické viskozity pro kultivační médium vhodné ke kultivaci myších embryonálních fibroblastů publikovanou ve vědeckém článku. Ve studii, kterou prováděla doktorka Poon, se pro měření rovněž používala geometrie deska-deska a výsledná hodnota média odpovídala  $0,0093 \text{ dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$ , což je o něco nižší hodnota v porovnání s námi naměřenou a zároveň se o něco více přibližuje té přednastavené v programu PumpControl Software (Poon, 2020).

Nicméně geometrie deska-deska nebyla shledána tou nejvhodnější pro tento typ měření, jelikož médium může vytékat z geometrie ven a měření je proto nepřesné. Za relevantnější jsou považovány výsledky dosažené při měření s geometrií válec-válec a je zde vidět, že se naměřené hodnoty téměř shodují s těmi teoretickými. Odchyly v hodnotách viskozit mohly být způsobeny manipulací během měření, nebo také složením kultivačního média.

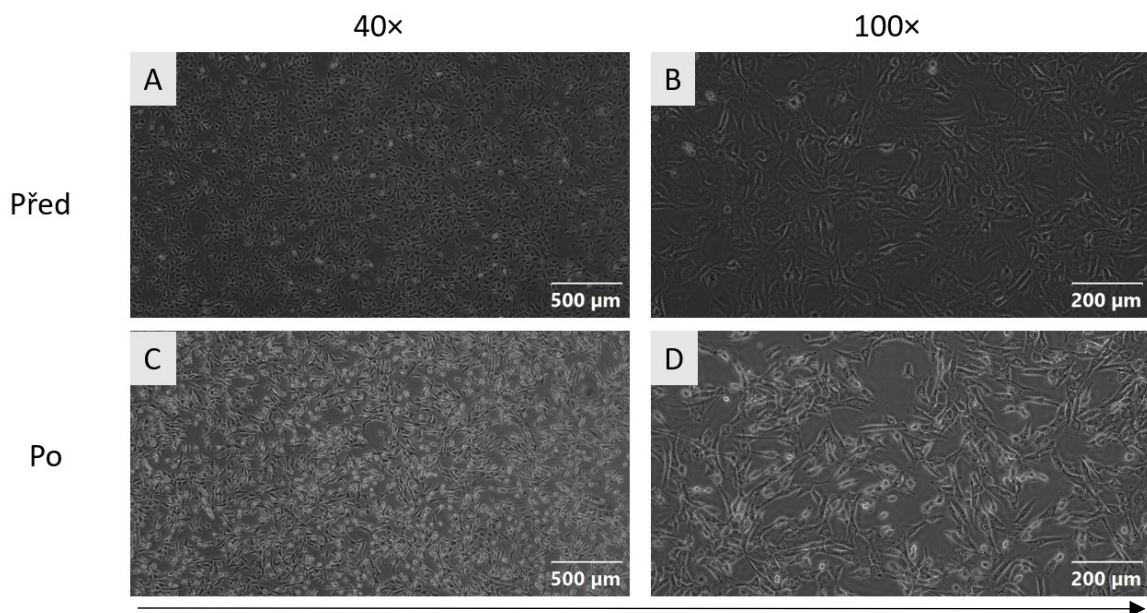
## 7.2 Kultivace v průtokových podmínkách

Celkově bylo provedeno šest různých měření s dvěma typy buněčných linií. Z každého měření byly pořízeny fotografie, díky kterým se mohlo provést vyhodnocení experimentů. U všech získaných obrázků (Obrázek 10-15) byl šipkou vyznačen směr průtoku.

### Myší embryonální fibroblasty (NIH/3T3)

#### 1. Měření

Při prvním prováděném experimentu byla ověřována správná funkce celého systému a sledovalo se, jestli buňky budou během aplikovaného smykového napětí vůbec schopny proliferovat. Nejprve bylo aplikováno velmi nízké smykové napětí a po několika hodinách bylo o něco zvýšeno (podrobné průtokové parametry pro všechny experimenty jsou podkapitole 6.3.3 Kultivace v dynamických podmínkách). Buňky experiment přežily, ale žádné změny v morfologii se neprojeví pravděpodobně proto, že aplikované smykové napětí bylo relativně nízké (zpočátku pouze  $2 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ , po 6 hodinách zvýšeno na  $15 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) a fibroblasty jsou obecně velmi odolné buňky. Na Obrázku 10 jsou zobrazeny buňky před a po průtoku ve dvou zvětšeních.

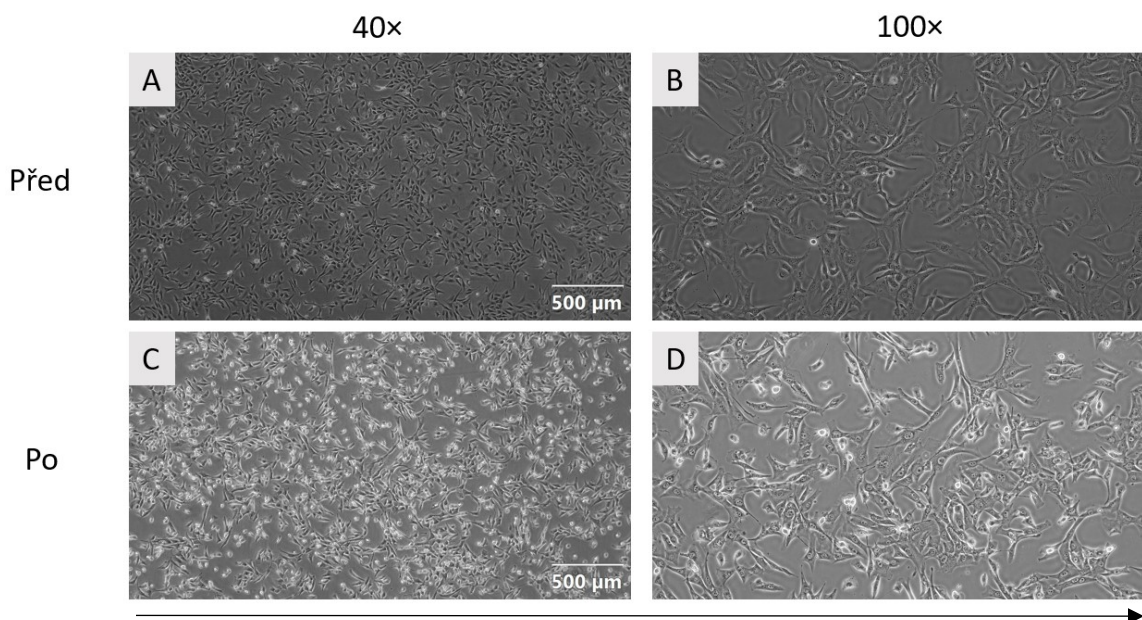


**Obrázek 10.** 1. měření: Buněčná linie NIH/3T3 A) před průtokem při zvětšení 40×, B) před průtokem při zvětšení 100×, C) po průtoku při zvětšení 40× D) po průtoku při zvětšení 100×. Zdroj: archiv autorky.

#### 2. Měření

Během druhého experimentu bylo rovněž postupně zvyšováno aplikované smykové napětí a poslední hodnota byla vyšší než v případě prvního experimentu ( $20 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Opět

se očekávané změny v morfologii neprojevíly, nicméně pravděpodobně se mírně zpomalila proliferace buněk. Na Obrázku 11 jsou získané fotografie z tohoto experimentu. U fotografií při zvětšení 100× není uvedeno měřítko z důvodu nesprávného nastavení softwaru pro focení a následného uložení fotografie, nicméně je stejné jako u ostatních fotek při tomto zvětšení.



**Obrázek 11.** 2. měření: Buněčná linie NIH/3T3 A) před průtokem při zvětšení 40× B) před průtokem při zvětšení 100× C) po průtoku při zvětšení 40× D) po průtoku při zvětšení 100×. Zdroj: archiv autorky.

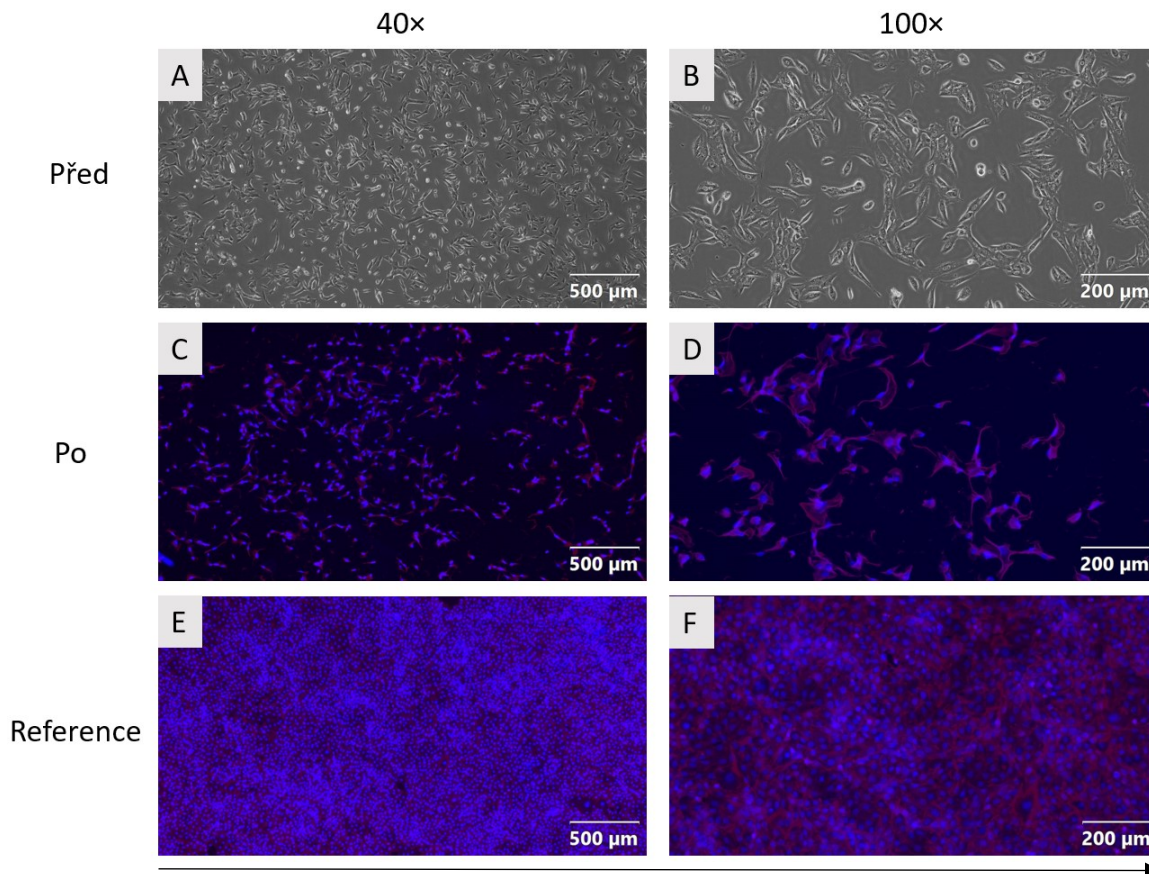
Zajímavé by bylo sledovat například i vliv smykového na migraci buněk. Toto pozorování ovšem bylo nad rámec předložené práce. Nicméně je zde mnoho možností, jak v tomto výzkumu pokračovat a dosáhnout dalších pozoruhodnějších výsledků. Ve studii Urbich *et al.* aplikovali smykové napětí o velikosti 5, 15 a 45  $\text{dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$  na endotelové buňky z lidské pupečnickové žíly a lidské srdeční mikrovaskulární endotelové buňky. Bylo zjištěno, že migrace byla výrazně zvýšena při aplikaci smykového napětí 45  $\text{dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$  po dobu 24 hodin u obou typů buněk (Urbich *et al.*, 2002).

### 3. Měření

Poslední prováděné měření s myšími embryonálními fibroblasty bylo z hlediska získaných výsledků nejpovedenější. Postupně zvyšující se intenzita aplikovaného průtoku působila na buňky celkově 75 hodin (od 3 do 20  $\text{dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Mírná změna v morfologii se projevila, konkrétně cytoskelet buněk se přizpůsoboval směru působícího průtoku. Buňky byly za účelem přehledné vizualizace nabarveny a byla vyfocena i reference, ovšem buňky už byly velmi přerostlé. Nicméně srovnáme-li množství buněk na referenci a v průtokové



komoře po ukončení experimentu, vidíme že proliferace byla opravdu působením smykového napětí výrazně zpomalena a potvrdilo se nám tak tvrzení z 2. měření. Výsledky z tohoto měření byly zpracovány v Obrázku 12.

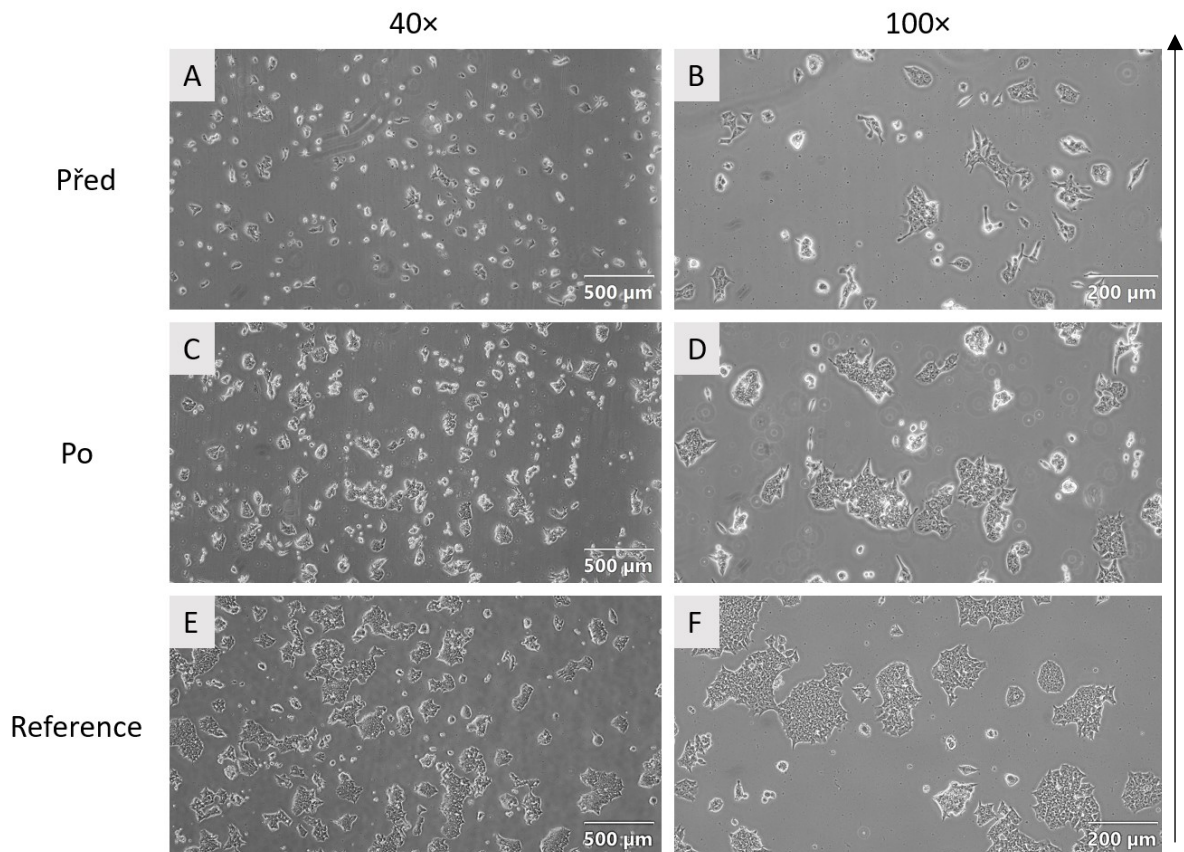


**Obrázek 12.** 3. měření: Buněčná linie NIH/3T3 A) před průtokem při zvětšení 40× B) před průtokem při zvětšení 100× C) nabarvená po průtoku při zvětšení 40× D) nabarvená po průtoku při zvětšení 100× E) nabarvená reference při zvětšení 40× F) nabarvená reference při zvětšení 100×. Zdroj: archiv autorky.

### Myší embryonální kmenové buňky (ESR1)

#### 1. Měření

První experiment s myšími embryonálními kmenovými buňkami trval poměrně krátkou dobu (bylo aplikováno smykové napětí o velikosti  $2 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$  po dobu 2 hodin a  $12 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$  po dobu 18 hodin), jednalo se opět o první zkoušku a zkoumalo se, jak kmenové buňky na průtok budou reagovat. Kmenové buňky podmínky aplikovaného smykového napětí přežily, nicméně žádné změny v morfologii zpozorovány nebyly. Fotografie z tohoto měření byly zpracovány do Obrázku 13.



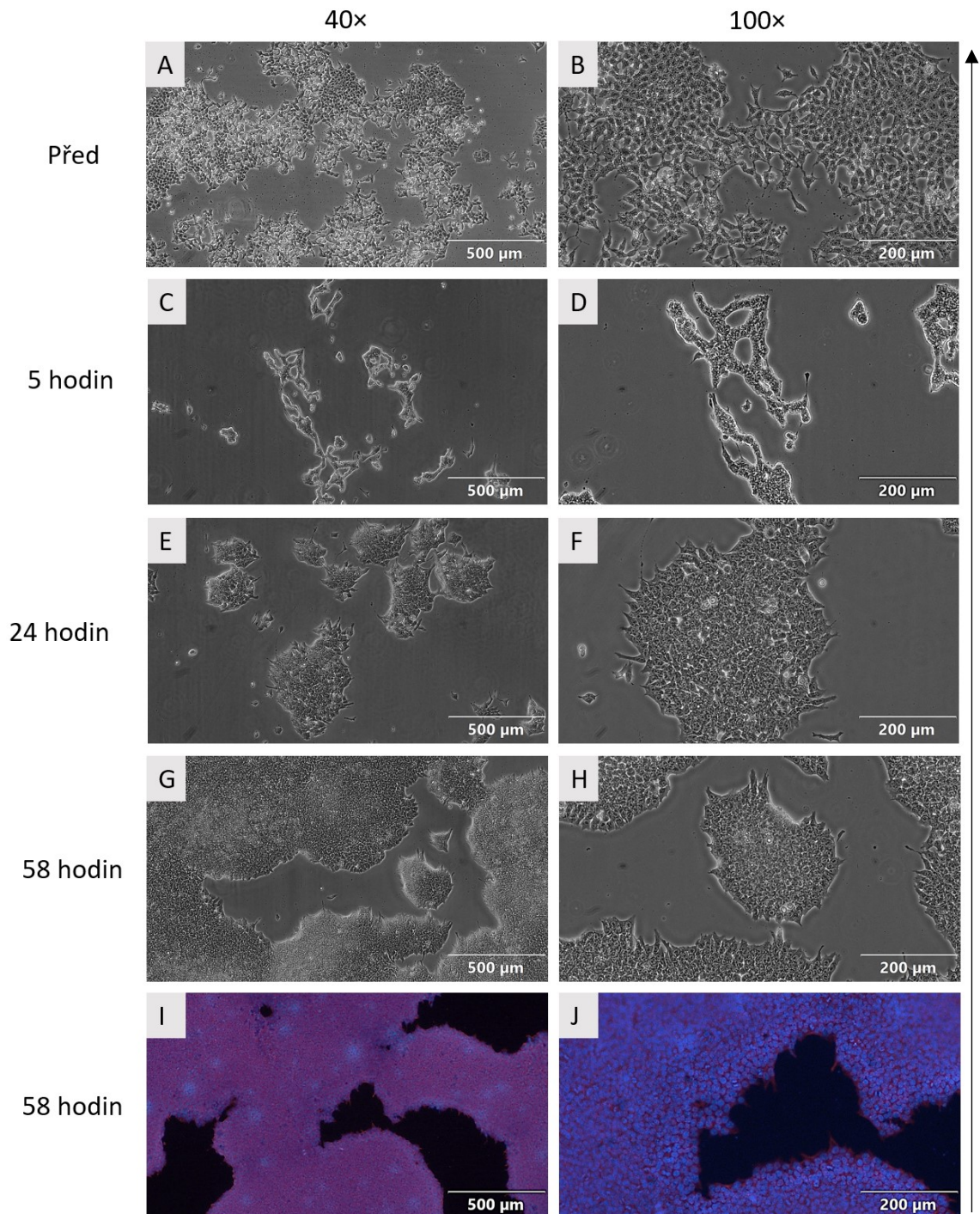
**Obrázek 13.** 1. měření: Buněčná linie ESRI A) před průtokem při zvětšení 40× B) před průtokem při zvětšení 100× C) po průtoku při zvětšení 40× D) po průtoku při zvětšení 100× E) reference při zvětšení 40× F) reference při zvětšení 100×. Zdroj: archiv autorky.

## 2. Měření

Při druhém měření s myšími embryonálními kmenovými buňkami bylo hned z počátku aplikováno vyšší smykové napětí ( $7 \text{ dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$  první 2 hodiny a  $15 \text{ dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$  další 3 hodiny) a buňky neměly dostatek času si na něj zvyknout, proto po 5 hodinách v průtoku vypadaly velmi špatně, část buněk se uvolnila od povrchu a jejich počet byl celkově snížen (Obrázek 14, C) a D)). Po této vizuální kontrole musela být výše smykového napětí ihned snížena. Po 19 hodinách v podmínkách mírnějšího průtoku ( $5 \text{ dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) bylo smykové napětí opět zvýšeno ( $10 \text{ dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) a po 58 hodinách byly zaznamenány poslední fotografie.

Z Obrázku 14 je patrné, že buňky rostly ve směru působícího průtoku, takže se jejich morfologie přizpůsobila směru proudícího média. Buňky byly i nabarveny, ale v tomto případě nešla dobře pozorovat jejich morfologie, jelikož kmenové buňky nemají prostorově bohatý buněčný cytoskelet a byla vidět spíše jen jádra.

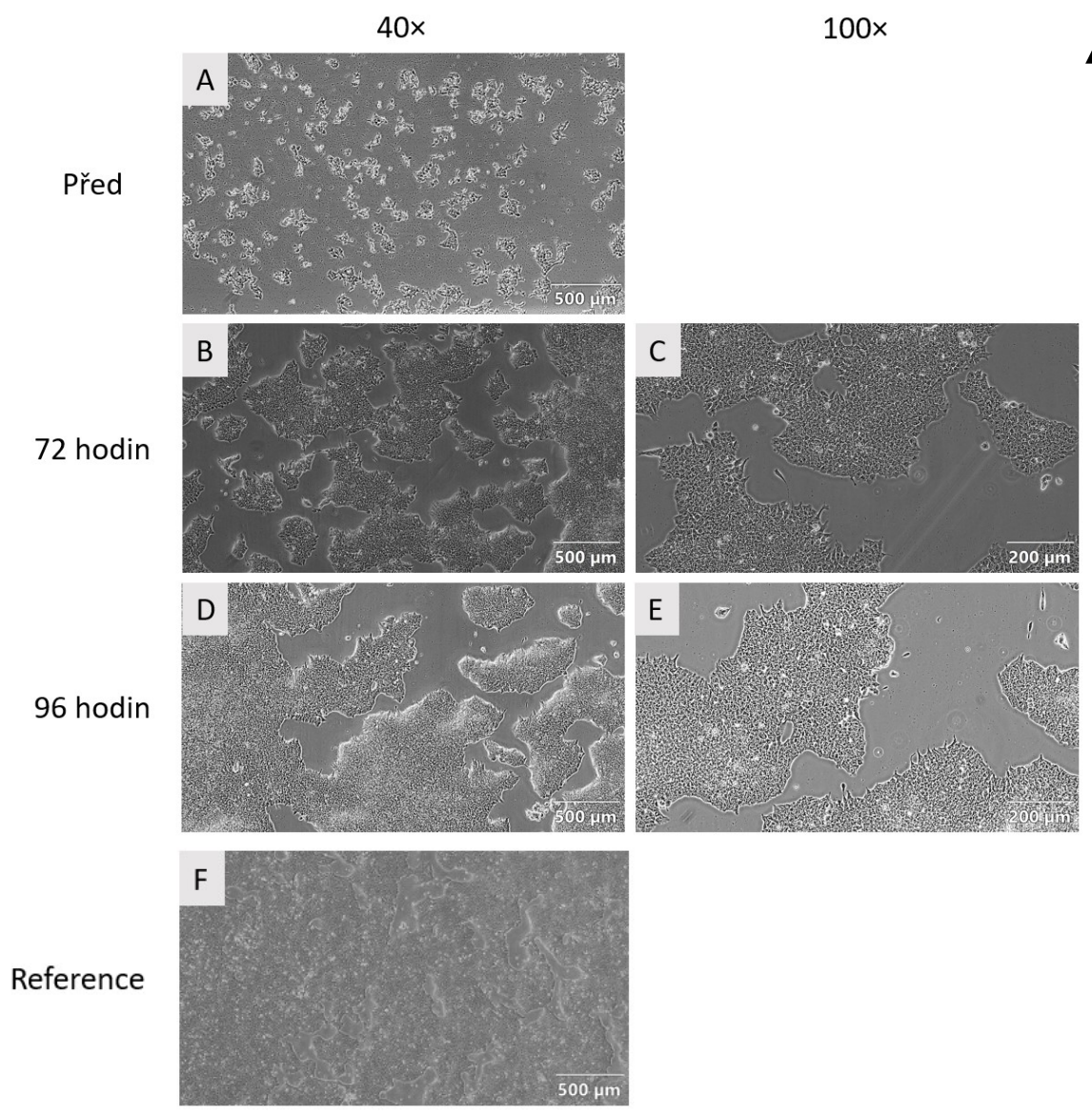




**Obrázek 14. 2. měření:** Buněčná linie ESRI A) před průtokem při zvětšení 40× B) před průtokem při zvětšení 100× C) po 5 hodinách v průtoku při zvětšení 40× D) po 5 hodinách v průtoku při zvětšení 100× E) po 24 hodinách v průtoku při zvětšení 40× F) po 24 hodinách v průtoku při zvětšení 100× G) po 58 hodinách v průtoku při zvětšení 40× H) po 58 hodinách v průtoku při zvětšení 100× I) nabarvená po 58 hodinách v průtoku při zvětšení 40× J) nabarvená po 58 hodinách v průtoku při zvětšení 100×. Zdroj: archiv autorky.

### 3. Měření

Při posledním prováděném měření bylo aplikováno nejvyšší smykové napětí (až  $20 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) a buňky i přes silnější působení průtoku konstantně rostly. Opět jejich cytoskelet přizpůsobil svůj tvar dle směru průtoku. Reference byla v tomto případě vyfocena ještě před spuštěním průtokové komory, jelikož embryonální kmenové buňky rostly za statických podmínek velmi rychle. Smykové napětí tedy i v tomto případě snížilo schopnost proliferace buněk stejně jako tomu bylo v případě myších fibroblastů.



**Obrázek 15.** 3. měření: Buněčná linie ESRI A) před průtokem při zvětšení  $40\times$  B) po 72 hodinách v průtoku při zvětšení  $40\times$  C) po 72 hodinách v průtoku při zvětšení  $100\times$  D) po 96 hodinách v průtoku při zvětšení  $40\times$  E) po 96 hodinách v průtoku při zvětšení  $100\times$  F) reference při zvětšení  $40\times$ . Zdroj: archiv autorky.

Pro využití kmenových buněk v tkáňovém inženýrství je důležité znát a řídit jejich proces diferenciaci. Často je soustředění v tomto kontextu zaměřeno na biochemické a biomolekulární procesy. Avšak je potřeba myslet i na mechanické podněty, mezi které řadíme právě smykové napětí. Mechanické podněty neboli deformace způsobené fyzikálními silami, mohou být převedeny na biologické signály, které regulují chování a funkci buněk. Například ve studii Wolfe et al. aplikovali smykové napětí média na buňky v bioreaktoru s paralelní deskou a zpozorovali, že smykové napětí podporuje diferenciaci myších ESC směrem ke specifickým zárodečným liniím. Pro svůj experiment využili smykové napětí v rozmezí 1,5-15 dyn·cm<sup>-2</sup> aplikované po dobu až 4 dnů. Výše smykového napětí je tedy téměř shodná jako v experimentální části této předložené práce. Nicméně zásadní rozdíl ve studii Wolfe et al. je, že buňky byly v průtoku kultivovány již bez přítomnosti LIF faktoru, což zapříčinilo jejich diferenciaci. Smykové napětí zvýšilo v buňkách expresi genů spojenou s tvorbou zárodečných listů (Wolfe *et al.*, 2012). V budoucím měření proto bude vhodné zaměřit se na pozorování nejen morfologických změn kmenových buněk, ale také na jejich fenotyp a sledování exprese jednotlivých genů, aby bylo možno vyhodnotit, zda a případně kterým směrem dané buňky diferencují.

Jak již bylo nastíněno v teoretické části, smykové napětí je nezbytné pro normální fyziologii buněk. Fyziologické procesy jako je proudění krve, částic ve střevě či kontakt mezi migrujícími buňkami a substrátem generují přirozeně smykové napětí. Smykové napětí se uplatňuje v biomedicínských procesech jako je rakovina, hojení ran, či fibróza vyvolaná měkkými implantáty. Proto je velmi důležité se vlivem smykového napětí na buňky zabývat a porozumět tomu, jak na něj buňky reagují (Espina *et al.*, 2023).

## ZÁVĚR

V živých organismech běžně dochází k působení smykového napětí na buňky. Zvláště pak v cévním systému je na buňky cévního endotelu vlivem průtoku krve vytvářeno relativně vysoké smykové napětí. Aby bylo možné se v laboratorních podmínkách více přiblížit prostředí a prostředí *in vivo*, byl vytvořen průtokový systém (bioreaktor), ve kterém je možné kultivovat buněčné linie v dynamických podmínkách za aplikace smykového napětí. Tento způsob kultivace přispěl k významnému pokroku v oblasti výzkumu buněčné biologie, biologie cév a celkově biomedicínského inženýrství. Proto se teoretická část práce věnovala jednak obecnému úvodu v oblasti tkáňového inženýrství, ale následně již konkrétněji systémům vhodných pro kultivaci buněk, bioreaktorům a poslední kapitola byla věnována reologii.

Cílem praktické části byla jednak kultivace buněčných linií za statických podmínek a následně také kultivace buněk v dynamických podmínkách. Poté byly zkoumány případné změny v morfologii buněk v důsledku působení různé výše aplikovaného smykového napětí. Experimenty byly prováděny jak s myšimi embryonálními fibroblasty (NIH/3T3), tak s myšimi embryonálními kmenovými buňkami (ESR1). Očekávaná změna v buněčných strukturách se potvrdila pouze v některých povedených měřeních, což ovšem mohlo být způsobeno i tím, že během prvních měření s oběma typy buněk, byly aplikovány spíše menší hodnoty smykového napětí po krátkou dobu. Buněčné linie tedy obecně rostly ve směru toku, to znamená, že jejich cytoskelet byl značně protáhlý.

Pro zakončení této bakalářské práce posledními řádky pouze zmíním možné praktické využití mikrofluidních systémů a experimentů s nimi spojených v budoucnu. V případě, že by prostřednictvím těchto systémů bylo vytvořeno dostatečně komplexní mikroprostředí, velmi se podobající tomu fyziologickému, mohl by vzniknout model, který by měl značný potenciál nahradit jak klasické modely kultivace buněk, tak i zvířecí modely. Takový pokrok by velmi pravděpodobně posílil výzkum v oblasti buněčné biologie a přispěl by k snadnějšímu studiu nemocí spojených převážně s cévním systémem, například aterosklerózy (Švihálková Šindlerová a Vašíček).



**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

1. Antoni, D. *et al.* (2015) ‘Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo’, *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), pp. 5517–5527. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>.
2. Basser, P.J. a Roth, B.J. (2000) ‘New Currents in Electrical Stimulation of Excitable Tissues’, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2(1), pp. 377–397. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.2.1.377>.
3. Beneš, J. (2022) *Základy lékařské fyziky* 5. vydání. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum. ISBN: 978-80-246-5398-3.
4. Cooper, D.K.C. (2001) ‘Christiaan Barnard and his contributions to heart transplantation’, *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 20(6), pp. 599–610. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1053-2498\(00\)00245-X](https://doi.org/10.1016/S1053-2498(00)00245-X).
5. Čedíková, M. *et al.* (2012). *On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenciacních postupů*. Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze.
6. Ding, D.-C., Shyu, W.-C. a Lin, S.-Z. (2011) ‘Mesenchymal Stem Cells’, *Cell Transplantation*, 20(1), pp. 5–14. Dostupné z: <https://doi.org/10.3727/096368910X>.
7. Duval, K. *et al.* (2017) ‘Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture’, *Physiology*, 32(4), pp. 266–277. Dostupné z: <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>.
8. Edmondson, R. *et al.* (2014) ‘Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors’, *ASSAY and Drug Development Technologies*, 12(4), pp. 207–218. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>.
9. Espina, J.A. *et al.* (2023) ‘Response of cells and tissues to shear stress’, *Journal of Cell Science*, 136(18), p. jcs260985. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/jcs.260985>.
10. Gunsilius, E., Gastl, G. a Petzer, A.L. (2001) ‘Hematopoietic stem cells’, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 55(4), pp. 186–194. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(01\)00051-8](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(01)00051-8)

11. Gupta, P. *et al.* (2016) ‘Optimization of agitation speed in spinner flask for microcarrier structural integrity and expansion of induced pluripotent stem cells’, *Cytotechnology*, 68(1), pp. 45–59. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9750-z>.
12. Gurusamy, N. *et al.* (2018) ‘Adult Stem Cells for Regenerative Therapy’, in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier, pp. 1–22. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.07.009>.
13. Gyllenbok, J. (2018) *Encyclopaedia of historical metrology, weights, and measures*. Cham: Birkhäuser (Science networks historical studies, Volume 56-58).
14. Havránek, A. (2007) *Úvod do bioreologie*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1445-8.
15. Haycock, J.W. (2011) ‘3D Cell Culture: A Review of Current Approaches and Techniques’, in J.W. Haycock (ed.) *3D Cell Culture*. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in Molecular Biology), pp. 1–15. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_1).
16. Howard, D. *et al.* (2008) ‘Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds’, *Journal of Anatomy*, 213(1), pp. 66–72. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x>.
17. Chara, P.K., Soker, S. a Atala, A. (2020) ‘Tissue engineering: current status and future perspectives’, in *Principles of Tissue Engineering*. Elsevier, pp. 1–35. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818422-6.00004-6>.
18. Chaudhuri, J. (ed.) (2005) *Bioreactors for tissue engineering: principles, design and operation*. Dordrecht: Springer.
19. ibidi GmbH. *ibidi Pump system and Accessories Version 2.6*. Instruction Manual ibidi Pump System [online]. Dostupné z: <http://ibidi.com/>
20. Jadoun, S., Riaz, U. a Budhiraja, V. (2021) ‘Biodegradable conducting polymeric materials for biomedical applications: a review’, *MEDICAL DEVICES & SENSORS*, 4(1), p. e10141. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mds3.10141>.



21. Janalík, J. (2010) *Viskozita tekutin a její měření*. Ostrava: Vysoká škola Báňská, Technická univerzita Ostrava.
22. Janmey, P.A., Georges, P.C. and Hvidt, S. (2007) 'Basic Rheology for Biologists', in *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp. 1–27. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)83001-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)83001-9).
23. Jin, G., Yang, G.-H. a Kim, G. (2015) 'Tissue engineering bioreactor systems for applying physical and electrical stimulations to cells: BIOREACTOR SYSTEMS FOR TISSUE ENGINEERING', *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 103(4), pp. 935–948. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33268>.
24. Kalra, K., a Tomar, P.C. (2014). *Stem Cell: Basics, Classification and Applications*. American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics, 2, 919-930. ISSN: 2321-2748.
25. Kennea, N.L. a Mehmet, H. (2002) 'Neural stem cells', *The Journal of Pathology*, 197(4), pp. 536–550. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/path.1189>.
26. Knight, E. a Przyborski, S. (2015) 'Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created *in vitro*', *Journal of Anatomy*, 227(6), pp. 746–756. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/joa.12257>.
27. Kolios, G. a Moodley, Y. (2013) 'Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine', *Respiration*, 85(1), pp. 3–10. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000345615>.
28. Langer, R. a Vacanti, J.P. (1993) 'Tissue Engineering', *Science*, 260(5110), pp. 920–926. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.8493529>.
29. Li, Y.-S.J., Haga, J.H. a Chien, S. (2005) 'Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells', *Journal of Biomechanics*, 38(10), pp. 1949–1971. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.09.030>.

30. Lopot, F. (2006). *Reologie a biomechanika*, výukový text pro FTVS UK (Biomechanika a reologie), FTVS UK, 2006. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/fsp/jaro2016/bp1854/um/Reologie\\_a\\_biomechanika.pdf](https://is.muni.cz/el/fsp/jaro2016/bp1854/um/Reologie_a_biomechanika.pdf)
31. Malkin, A.J. (1994) *Rheology fundamentals*. Toronto, Ontario: ChemTec Publ (Fundamental topics in rheology).
32. Malvern Instruments Limited (2016). *Basic Introduction to Rheology*. Dostupné z: <https://cdn.technologynetworks.com/TN/Resources/PDF/WP160620BasicIntroRheology.pdf>
33. Neves, L.S. *et al.* (2016) ‘Current approaches and future perspectives on strategies for the development of personalized tissue engineering therapies’, *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development*, 1(1), pp. 93–108. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/23808993.2016.1140004>.
34. O’Brien, F.J. (2011) ‘Biomaterials & scaffolds for tissue engineering’, *Materials Today*, 14(3), pp. 88–95. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X).
35. Pimentel-Parra, G.A. a Murcia-Ordoñez, B. (2017) ‘Células madre, una nueva alternativa médica’, *Perinatología y Reproducción Humana*, 31(1), pp. 28–33. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.rprh.2017.10.013>.
36. Polak, J.M. a Bishop, A.E. (2006) ‘Stem Cells and Tissue Engineering: Past, Present, and Future’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068(1), pp. 352–366. Dostupné z: <https://doi.org/10.1196/annals.1346.001>.
37. Poon, C. (2020) ‘Measuring the density and viscosity of culture media for optimized computational fluid dynamics analysis of *in vitro* devices’. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/2020.08.25.266221>.
38. Rungarunlert, S. *et al.* (2013) ‘Slow Turning Lateral Vessel Bioreactor Improves Embryoid Body Formation and Cardiogenic Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells’, *Cellular Reprogramming*, 15(5), pp. 443–458. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/cell.2012.0082>.

39. Russomano, T. *et al.* (2005) ‘Development and Validation of a 3D Clinostat for the Study of Cells during Microgravity Simulation’, in *2005 IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference. 2005 IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference*, Shanghai, China: IEEE, pp. 564–566. Dostupné z: <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2005.1616474>.
40. Sampogna, G., Guraya, S.Y. a Forgione, A. (2015) ‘Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine’, *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 3(3), pp. 101–107. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2015.05.002>.
41. Selden, C. a Fuller, B. (2018) ‘Role of Bioreactor Technology in Tissue Engineering for Clinical Use and Therapeutic Target Design’, *Bioengineering*, 5(2), p. 32. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bioengineering5020032>.
42. Schramm, G. (2000) *A practical approach to rheology and rheometry*: 2nd Ed [online]. Germany: Thermo Haake Rheology. Dostupné z: <http://www.asi-team.com/asi%20team/haake/haake%20data/A%20practical%20approach%20to%20rheology%20and%20rheometry.pdf>
43. Skopalová, K. (2023). Vyučující předmětu Laboratoř buněčné biologie a genetiky na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně, ústní sdělení. Zlín 23. 11. 2023
44. *Studijní materiály k předmětu Fyzika polymerů: 3. Závislost viskozity na procesních a molekulárních parametrech*. Ústav fyziky a materiálového inženýrství, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Dostupné z: [https://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika\\_pol/FP\\_03.pdf](https://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika_pol/FP_03.pdf)
45. *Studijní materiály k předmětu Kontrolní a zkušební metody: 3.Reologie*. Ústav fyziky a materiálového inženýrství, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Dostupné z: [https://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM\\_03.pdf](https://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_03.pdf)
46. Sugiura, S., Shin, K. a Kanamori, T. (2023) ‘Perfusion culture of endothelial cells under shear stress on microporous membrane in a pressure-driven microphysiological system’, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 135(1), pp. 79–85. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.09.005>.
47. Švihálková Šindlerová, L. a Vašíček, O., *Skriptum metodických materiálů: Mikrofluidní systémy pro kultivaci buněk v podmínkách proudového stresu*. Projekt:

- OrganoNET (CZ.1.07/2.4.00/31.0245). Dostupné z: [https://organonet.med.muni.cz/media/62768/vy\\_10.pdf](https://organonet.med.muni.cz/media/62768/vy_10.pdf)
48. Tran, S.C., Cooley, A.J. a Elder, S.H. (2011) 'Effect of a mechanical stimulation bioreactor on tissue engineered, scaffold-free cartilage', *Biotechnology and Bioengineering*, 108(6), pp. 1421–1429. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bit.23061>.
49. Urbich, C. *et al.* (2002) 'Shear Stress–Induced Endothelial Cell Migration Involves Integrin Signaling Via the Fibronectin Receptor Subunits  $\alpha_5$  and  $\beta_1$ ', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(1), pp. 69–75. Dostupné z: <https://doi.org/10.1161/hq0102.101518>.
50. Wang, Y. a Chen, C.S. (2013) 'Cell adhesion and mechanical stimulation in the regulation of mesenchymal stem cell differentiation', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(7), pp. 823–832. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jcmm.12061>.
51. Wein, O. (1996) *Úvod do reologie*. Brno: Malé centrum. ISBN: 80-238-0928-8.
52. Wolfe, R.P. *et al.* (2012) 'Effects of shear stress on germ lineage specification of embryonic stem cells', *Integrative Biology*, 4(10), pp. 1263–1273. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/c2ib20040f>.
53. Wong, K.H.K. *et al.* (2012) 'Microfluidic Models of Vascular Functions', *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14(1), pp. 205–230. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150052>.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

ASC	Adultní kmenové buňky
ECM	Extracelulární matrix
ESC	Embryonální kmenové buňky
ESR1	Buněčná linie myších embryonálních kmenových buněk
HSC	Hematopoetické kmenové buňky
MSC	Mezenchymální kmenové buňky
NIH/3T3	Buněčná linie myších embryonálních fibroblastů
NSC	Nervové kmenové buňky
PBS	Fosfátový pufr
SC	Kmenové buňky

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1.</b> 2D statická kultivace buněčných linií v kultivačních nádobách T75 v prostředí inkubátoru. Zdroj: archiv autorky. ....	16
<b>Obrázek 2.</b> Rozdíly v morfologii buněk kultivovaných v 2D a 3D prostředí. Upraveno dle Knight a Przyborski, 2015. ....	18
<b>Obrázek 3.</b> Spinner flask bioreaktor (Gupta et al., 2016). ....	20
<b>Obrázek 4.</b> Rotační bioreaktor (Synthecon Incorporated). Zdroj: archiv autorky. ....	22
<b>Obrázek 5.</b> Schéma standardního zapojení Ibidi perfuzního systému. Upraveno dle Instruction Manual ibidi Pump System. ....	23
<b>Obrázek 6.</b> Mechanický bioreaktor TC-3 (EBERS Medical Technology). Zdroj: archiv autorky. ....	25
<b>Obrázek 7.</b> Rotační reometr s geometrií paralelních desek při měření dynamické viskozity kultivačního média. Zdroj: archiv autorky. ....	29
<b>Obrázek 8.</b> A) Zapojení průtokového bioreaktoru ibidi během měření B) Průtoková jednotka během provádění experimentu. Zdroj: archiv autorky. ....	36
<b>Obrázek 9.</b> Aplikace buněčné suspenze pomocí automatické pipety do kanálku. Zdroj: archiv autorky. ....	37
<b>Obrázek 10.</b> 1. měření: Buněčná linie NIH/3T3 A) před průtokem při zvětšení 40×, B) před průtokem při zvětšení 100×, C) po průtoku při zvětšení 40× D) po průtoku při zvětšení 100×. Zdroj: archiv autorky. ....	47
<b>Obrázek 11.</b> 2. měření: Buněčná linie NIH/3T3 A) před průtokem při zvětšení 40× B) před průtokem při zvětšení 100× C) po průtoku při zvětšení 40× D) po průtoku při zvětšení 100×. Zdroj: archiv autorky. ....	48
<b>Obrázek 12.</b> 3. měření: Buněčná linie NIH/3T3 A) před průtokem při zvětšení 40× B) před průtokem při zvětšení 100× C) nabarvená po průtoku při zvětšení 40× D) nabarvená po průtoku při zvětšení 100× E) nabarvená reference při zvětšení 40× F) nabarvená reference při zvětšení 100×. Zdroj: archiv autorky. ....	49
<b>Obrázek 13.</b> 1. měření: Buněčná linie ESR1 A) před průtokem při zvětšení 40× B) před průtokem při zvětšení 100× C) po průtoku při zvětšení 40× D) po průtoku při zvětšení 100× E) reference při zvětšení 40× F) reference při zvětšení 100×. Zdroj: archiv autorky. ....	50
<b>Obrázek 14.</b> 2. měření: Buněčná linie ESR1 A) před průtokem při zvětšení 40× B) před průtokem při zvětšení 100× C) po 5 hodinách v průtoku při zvětšení 40× D) po 5 hodinách v průtoku při zvětšení 100× E) po 24 hodinách v průtoku při zvětšení 40× F) po 24 hodinách v průtoku při zvětšení 100× G) po 58 hodinách v průtoku při zvětšení 40× H) po 58 hodinách v průtoku při zvětšení 100× I) nabarvená po 58 hodinách v průtoku při zvětšení 40× J) nabarvená po 58 hodinách v průtoku při zvětšení 100×. Zdroj: archiv autorky. ....	51
<b>Obrázek 15.</b> 3. měření: Buněčná linie ESR1 A) před průtokem při zvětšení 40× B) po 72 hodinách v průtoku při zvětšení 40× C) po 72 hodinách v průtoku při zvětšení 100× D) po 96 hodinách v průtoku při zvětšení 40× E) po 96 hodinách v průtoku při zvětšení 100× F) reference při zvětšení 40×. Zdroj: archiv autorky. ....	52

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tabulka 1. Průtokové parametry pro první experiment prováděný s myšimi embryonálními fibroblasty NIH/3T3. Tabulku podle dat z programu PumpControl Software sestavila autorka. ....</i>	39
<i>Tabulka 2. Průtokové parametry pro druhý experiment prováděný s myšimi embryonálními fibroblasty NIH/3T3. Tabulku podle dat z programu PumpControl Software sestavila autorka. ....</i>	40
<i>Tabulka 3. Průtokové parametry pro třetí experiment prováděný s myšimi embryonálními fibroblasty NIH/3T3. Tabulku podle dat z programu PumpControl Software sestavila autorka. ....</i>	40
<i>Tabulka 4. Průtokové parametry pro první experiment prováděný s myšimi embryonálními kmenovými buňkami ESR1. Tabulku podle dat z programu PumpControl Software sestavila autorka. ....</i>	41
<i>Tabulka 5. Průtokové parametry pro druhý experiment prováděný s myšimi embryonálními kmenovými buňkami ESR1. Tabulku podle dat z programu PumpControl Software sestavila autorka. ....</i>	41
<i>Tabulka 6. Průtokové parametry pro třetí experiment prováděný s myšimi embryonálními kmenovými buňkami ESR1. Tabulku podle dat z programu PumpControl Software sestavila autorka. ....</i>	42
<i>Tabulka 7. Naměřené hodnoty dynamických viskozit při různých smykových deformacích pro kultivační médium používané ke kultivaci myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3 a výsledné průměrné hodnoty dynamických viskozit pro oba typy geometrií. Zdroj dat: naměřené autorkou. ....</i>	44
<i>Tabulka 8. Naměřené hodnoty dynamických viskozit při různých smykových deformacích pro kultivační médium používané ke kultivaci myších embryonálních kmenových buněk ESR1 a výsledné průměrné hodnoty dynamických viskozit pro oba typy geometrií. Zdroj dat: naměřené autorkou. ....</i>	45
<i>Tabulka 9. Výsledné hodnoty dynamických viskozit pro obě kultivační média přepočtené na <math>\text{dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}</math>. Zdroj dat: naměřené autorkou. ....</i>	46

**SEZNAM GRAFŮ**

**Graf 1.** *Závislost naměřených hodnot smykové viskozity na rychlosti smykové deformace pro oba typy kultivačních médií za použití rotačního reometru s dvěma typy geometrií – deska-deska a válec-válec. Graf dle vlastních naměřených dat sestavila autorka. ....43*