



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

MĚŘENÍ TRAKČNÍ SÍLY GENEROVANÉ BUŇKAMI

MEASUREMENT OF FORCE GENERATED BY LIVING CELLS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Veronika Lukášová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Zdenka Fohlerová, Ph.D.

BRNO 2023

Diplomová práce

magisterský navazující studijní program **Bioinženýrství**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Bc. Veronika Lukášová

ID: 233455

Ročník: 2

Akademický rok: 2022/23

NÁZEV TÉMATU:

Měření trakční síly generované buňkami

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši v oblasti měření trakční síly generované buňkami. 2) Nastudujte a zaměřte se na výrobu polymerních mikro – a nanosloupek a možnosti odhadu a výpočtu buněčné síly. 3) Seznamte se s kultivací buněk jednak obecně a následně na polymerních sloupcích. 4) Proveďte záznamy ohybu sloupek, pomocí mikroskopických technik, vlivem trakční síly buněk. Experimenty proveďte bez přítomnosti a v přítomnosti stimulující látky. 5) Proveďte analýzu obrazu, s cílem změřit velikost ohybu jednotlivých sloupek a vypočtete sílu generovanou buňkami. Zaměřte se na vyhodnocení síly z hlediska dynamického procesu. 6) Výsledky vhodným způsobem prezentujte a diskutujte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

1. Mukund Gupta, Leyla Kocgozlu, Bibhu Ranjan Sarangix , Felix Margadant, Mohammed Ashraf, Benoit Ladoux. Micropillar substrates: A tool for studying cell mechanobiology. Methods in Cell Biology, Volume 125, ISSN 0091-679X, <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2014.10.00>
2. Michael T Yang, Jianping Fu , Yang-Kao Wang, Ravi A Desai, Christopher S Chen. Assaying stem cell mechanobiology on microfabricated elastomeric substrates with geometrically modulated rigidity. Nature protocols, vol.6 (2), 2011. doi:10.1038/nprot.2010.189.
3. Ingmar Schoen, Wei Hu, Enrico Klotzsch, and Viola Vogel. Probing Cellular Traction Forces by Micropillar Arrays: Contribution of Substrate Warping to Pillar Deflection. Nano Lett. 2010, 10, 1823–1830. DOI: 10.1021/nl100533c

Termín zadání: 6.2.2023

Termín odevzdání: 22.5.2023

Vedoucí práce: doc. Mgr. Zdenka Fohlerová, Ph.D.

Konzultant: Larisa Chmelíková, Ph.D.

doc. Ing. Radim Kolář, Ph.D.
předseda rady studijního programu

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Tato práce se zabývá studiem měření trakčních sil buněk. Aby bylo možné síly zkoumat a měřit, je důležité chápat proces mechanotransdukce. Ten je společně s vysvětlením schopnosti adheze buněk popisován v teoretické části práce. Dále jsou v práci představeny metody používané na sledování trakčních sil: kontrakce kolagenu, tkáňové pilíře, mikroskopie trakčních sil ve 2D a 3D a měření na mikro- a nano-sloupcích. Praktická část práce je zaměřena na určení velikosti trakčních sil, které lze vypočítat ze znalosti velikosti ohybu sloupku a konstanty pružnosti materiálu. Součástí praktické části je zpracování snímků ze světelného mikroskopu a výsledný postup pro výpočet velikosti trakčních sil.

Klíčová slova

Mechanotransdukce, trakční síla, mikro-sloupky, buněčná síla, PDMS, Parylen-C.

Abstract

This thesis deals with methods used to measure cell traction forces. In order to study and measure the forces it is important to understand the mechanotransduction process. This is described in the theoretical part of the thesis along with an explanation of the adhesive capacity of cells. Next are presented the methods used to monitor traction forces: collagen contraction, tissue pillars, traction force microscopy in 2D and 3D, and measurements on micro- and nano-pillars. The practical part of the thesis is focused on determining the magnitude of the traction forces, which can be calculated from the knowledge of the pillar deflection and the spring constant of the material. The practical part includes the processing of the light microscope images and the resulting procedure for calculating the magnitude of the traction forces.

Keywords

Mechanotransduction, traction force, micropillars, cell force, PDMS, Parylen-C.

Bibliografická citace

LUKÁŠOVÁ, Veronika. Měření trakční síly generované buňkami [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-04-21]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/150878>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce Zdenka Fohlerová.

Prohlášení autora o původnosti díla

Jméno a příjmení studenta:	<i>Veronika Lukášová</i>
VUT ID studenta:	233455
Typ práce:	<i>Diplomová práce</i>
Akademický rok:	2022/23
Téma závěrečné práce:	<i>Měření trakční síly generované buňkami</i>

Prohlašuji, že svou závěrečnou práci jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucí/ho závěrečné práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené závěrečné práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této závěrečné práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne: 22. května 2023

podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucí diplomové práce doc. Mgr. Zdeňce Fohlerové, Ph.D. a konzultantce Larise Chmelíkové, Ph.D. za cenné rady, připomínky a ochotu při zpracování diplomové práce. Poděkování patří i Ing. Peterovi Fecko za výrobu pole mikro-sloupků a Ing. Josefu Skácelovi za simulaci k určení konstanty pružnosti mikro-sloupků, provedené na institutu CEITEC.

V Brně dne: 22. května 2023

podpis autora

Obsah

SEZNAM OBRÁZKŮ	9
SEZNAM TABULEK.....	10
ÚVOD	11
1. MECHANOTRANSDUKCE.....	12
1.1 EXTRACELULÁRNÍ MATRIX	12
1.2 CYTOSKELET.....	12
1.3 FOKÁLNÍ ADHEZE	13
1.4 TRAKČNÍ SÍLA BUNĚK.....	13
2. METODY MĚŘENÍ TRAKČNÍ SÍLY BUNĚK	15
2.1 KONTRAKCE KOLAGENU	16
2.2 TKÁŇOVÉ PILÍŘE	17
2.3 MIKROSKOPIE TRAKČNÍCH SIL VE 2D	17
2.4 MIKROSKOPIE TRAKČNÍCH SIL VE 3D.....	19
2.5 MIKRO- A NANO-SLOUPKY	20
3. VÝROBA POLYMERNÍCH MIKRO- A NANO-SLOUPKŮ	22
3.1 TECHNIKY VÝROBY MIKRO- A NANO-SLOUPKŮ	22
3.2 PDMS SLOUPKY.....	23
4. VÝPOČET BUNĚČNÉ SÍLY NA MIKRO-SLOUPCÍCH.....	25
4.1 VÝPOČET OHYBU.....	25
4.2 ANALÝZA ZPRACOVÁNÍ OBRAZU	28
5. PRAKTICKÁ ČÁST.....	30
5.1 VÝROBA SLOUPKŮ Z PARYLENU-C.....	30
5.2 KULTIVACE BUNĚK	31
5.2.1 <i>Podmínky kultivace</i>	31
5.2.2 <i>Postup kultivace</i>	32
5.2.3 <i>Životaschopnost buněk na poli mikro-sloupků</i>	32
5.3 MĚŘENÍ TRAKČNÍ SÍLY BUNĚK.....	32
5.3.1 <i>Měření ohybu mikro-sloupků</i>	32
5.3.2 <i>Měření ohybu s využitím fluorescenčního barvení buněk a sloupků</i>	32
6. ZPRACOVÁNÍ DAT	34
6.1 URČENÍ OHYBU SLOUPKŮ	34
6.2 VÝPOČET TRAKČNÍCH SIL	36
7. VÝSLEDKY A DISKUZE	38
7.1 CHARAKTERIZACE SLOUPKŮ Z PARYLENU – C ELEKTRONOVÝM MIKROSKOPEM	38
7.2 VYHODNOCENÍ ŽIVOTASCHOPNOSTI BUNĚK NA POLI MIKRO-SLOUPKŮ	39
7.3 VYHODNOCENÍ TRAKČNÍCH SIL	40
7.3.1 <i>Měření 1</i>	41
7.3.2 <i>Měření 2</i>	42

7.3.3	<i>Měření 3</i>	44
7.3.4	<i>Měření 4</i>	46
7.3.5	<i>Měření 5</i>	47
7.3.6	<i>Měření 6</i>	48
7.3.7	<i>Souhrn trakčních sil ze všech buněk</i>	50
8.	ZÁVĚR	53
	LITERATURA	55
	SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	59

SEZNAM OBRÁZKŮ

1.1	Ilustrace trakčních sil adheované buňky, které působí na substrát skrz FA tvořené integriny. Převzato z [12]	14
2.1	Pohyblivý rybí keratocyt na zvrásněném silikonovém substrátu. Šipka ukazuje směr migrace [15]	15
2.2	Metody měření buněčných sil. Převzato z [5].....	16
2.3	Schéma buněčné kultivace na substrátu s usazenými fluorescenčními kuličkami. Převzato z [20] ..	18
2.4	Znázornění posunu kuliček před působením trakční síly (zelená) a při působení síly (červená), šipka ukazuje směr posunu [17].....	19
2.5	A) Schématické zobrazení vychýlení sloupků B) Vychýlení sloupků zobrazené elektronovým mikroskopem [24]	20
3.1	Postup výroby sloupků z PDMS s využitím DRIE metody A) výroba masky sloupků B) zalití masky PDMS. Převzato z [26].....	24
4.1	Ilustrace ohybu sloupku [42]	26
4.2	Ilustrace ohybu sloupku a substrátu s popsány parametry. Převzato z [41].....	28
5.1	Postup výroby sloupků z Parylenu-C, A) wafer pokrytý vrstvou SiO ₂ a fotorezistu B) fotolitografie a leptání SiO ₂ C) leptání Si D) odstranění SiO ₂ a fotorezistu E) depozice Parylenu-C F) leptání formy Si G) vzniklý sloupek [46].....	31
6.1	A) Znázornění nalezených středů sloupků v binárním obraze B) Obraz obsahující mřížku a nalezené středy sloupků	35
6.2	A) Obrazy z 1. a 30. minuty před slícováním B) Obrazy z 1. a 30. minuty po slícováním.....	35
6.3	Zobrazení posunu středů sloupků pro různé časové úseky (zelené hvězdy označují nevychýlené polohy sloupků).....	36
7.1	Snímky pořízené elektronovým mikroskopem. A) Díry vzniklé DRIE metodou B) Vyrobené sloupky C) Zobrazení dutosti sloupků D) Komůrka pole mikro-sloupků [40].....	38
7.2	A) Tloušťkový profil stěny sloupku B) Deformace sloupku při působení síly 1-10 μ N [40].....	39
7.3	Adheované buňky na poli mikro-sloupků zobrazené elektronovým mikroskopem [47]	39
7.4	Zobrazení obarvených sloupků a buněk pomocí konfokálního mikroskopu	40
7.5	Měření 1: Zobrazení posunu sloupků v čase. A) Kontrolní záznam B) Cytochalin D 1 μ M C) Cytochalin D 5 μ M	41
7.6	Měření 1: Krabicové grafy trakčních sil v průběhu 30 minut	42
7.7	Měření 2: Zobrazení posunu sloupků v čase. A) Kontrolní záznam B) Cytochalin D 1 μ M C) Cytochalin D 5 μ M	43
7.8	Měření 2: Krabicové grafy trakčních sil v průběhu 30 minut	44
7.9	Měření 3: Zobrazení posunu sloupků v čase. A) Kontrolní záznam B) Cytochalin D 1 μ M C) Cytochalin D 5 μ M	45
7.10	Měření 3: Krabicové grafy trakčních sil v průběhu 30 minut	45
7.11	Měření 4: Zobrazení posunu sloupků v čase. A) Kontrolní záznam B) Cytochalin D 1 μ M C) Cytochalin D 5 μ M	46
7.12	Měření 4: krabicové grafy trakčních sil v průběhu 30 minut	47
7.13	Měření 5: zobrazení posunu sloupků v čase. A) Kontrolní záznam B) Cytochalin D 1 μ M C) Cytochalin D 5 μ M	48
7.14	Měření 5: krabicové grafy trakčních sil v průběhu 30 minut	48
7.15	Měření 2: Zobrazení posunu sloupků v čase. A) Kontrolní záznam B) Cytochalin D 1 μ M C) Cytochalin D 5 μ M	49
7.16	Měření 6: krabicové grafy trakčních sil v průběhu 30 minut	50
7.17	Skupina 1: sloupcový graf průměrných hodnot	51
7.18	Skupina 2: sloupcový graf průměrných hodnot	52

SEZNAM TABULEK

3.1	V této tabulce jsou vypsány rozměry sloupků a trakční síla, která na nich byla naměřena (pokud není informace dostupná, je použita konstanta pružnosti).....	22
7.1	Souhrn mediánů trakčních sil z měření v různých časových úsecích.....	50

ÚVOD

Mechanické vlastnosti buněk hrají důležitou roli v buněčných funkcích a aktivitách jako jsou růst buněk, buněčné dělení, pohyb a adheze buněk. Tyto vlastnosti jsou následně aplikovány ve výzkumu např. při diagnostikování nemocí nebo analýzu imunitního stavu. Mezi mechanické vlastnosti buněk patří např. rezistence nebo míra deformace buňky při působení mechanických sil. [1]

Trakční síly jsou tvořeny kontraktilní aktomyosinovou sítí a mohou měnit buněčné chování prostřednictvím řady mechanismů. Tyto mechanismy jsou souhrnně označovány jako mechanotransdukce. Trakční síly se vztahují k síle na jednotku plochy. [2]

V první kapitole této práce je blíže popsán pojem mechanotransdukce. Součástí této kapitoly jsou i další pojmy, které s mechanotransdukci úzce souvisí. Během let bylo vyvinuto množství metod sloužících ke sledování a výpočtu trakčních sil. Proto je druhá kapitola zaměřena na popis těchto metod. Ve třetí kapitole jsou zmíněny materiály, které se používají k výrobě mikro-sloupků s detailnějším popisem výroby sloupků z materiálu PDMS. Aby bylo možné trakční síly buněk vypočítat, je důležité určit tvar, rozměry a velikost deformace sloupku. To je popsáno v kapitole čtyři.

Následující kapitola obsahuje praktickou část práce. Na začátku je popis výroby mikro-sloupků z Parylenu C, která byla provedena na institutu CEITEC. Dále je v kapitole popsána kultivace buněk, životaschopnost buněk na mikro-sloupcích a zobrazení buněk optickým a konfokálním mikroskopem. Získané snímky z mikroskopu jsou zpracovány pomocí programovacího prostředí Matlab R2022b. Popis zpracování je obsahem šesté kapitoly. Cílem je zjištění velikosti deformace (ohybu) sloupku a následně výpočet velikosti trakčních sil.

Součástí poslední kapitoly je charakterizace vyrobených sloupků z Parylenu – C a ověření životaschopnosti buněk na mikro-sloupcích pomocí elektronového mikroskopu. Následují výsledky jednotlivých měření, jejich shrnutí a zhodnocení.

1. MECHANOTRANSDUKCE

Mechanotransdukce je proces, při kterém je přirozené buněčné prostředí ovlivněno mechanickou silou. Ta se projeví intracelulárně i extracelulárně. Následně je síla převedena na biochemické a elektrické signály, což způsobí odpovídající buněčnou reakci. [3]

Buňky vnímají mechanické vlivy, které vyvíjí extracelulární matrix a okolní buňky. Mechanické síly se projevují v celé buňce prostřednictvím spojené struktury cytoskelet – fokální adheze – ECM. Mezi mechanické vlastnosti buněk řadíme: napětí, kompresi, smykové napětí, hydrostatický tlak, tuhost, elasticitu a viskoelasticitu. Deformace buňky závisí na oblasti, na kterou síla působí. [4-6]

1.1 Extracelulární matrix

Jakmile je buňkami vytvořena, poskytuje extracelulární matrix buňkám důležité biomechanické a biochemické podněty, které řídí jejich chování. Buněčná adheze, tvar i migrace buněk jsou ovlivněny extracelulární matrix (ECM). Mezibuněčná hmota neboli ECM, je strukturovaná makromolekulární síť, která vytváří podklad pro interakci buněk. Má podpůrnou funkci a zajišťuje jejich umístění v prostoru. Je tvořena proteiny (kolagen), glykosaminoglykany a proteoglykany. [7]

Mechanické vlastnosti ECM stanovují poměr mezi silou a deformací. U lineárních materiálů je měřená deformace přímo úměrná působenému tlaku na materiál. Na nelineárních materiálech je vztah deformace a tlaku exponenciální. [4, 7]

Součástí mezibuněčné hmoty je fibronectin. Ten patří mezi adhezní proteiny, které zajišťují spojení buněk s povrchem. Ovlivňuje diferenciaci a adhezi buněk. [8]

1.2 Cytoskelet

Pohybovou, strukturní a opěrnou funkci v buňkách zastává cytoskelet. Pomocí cytoskeletu je buňka schopná se přichytit k povrchu. Je tvořen sítí proteinových vláken: mikrotubulů, intermediálních (středních) filament a mikrofilament. Na buněčné membráně se tato vlákna ukotvují do shluků proteinů, které zahrnují fokální adheze (FA), jež spojují cytoskelet s ECM. Změna tvaru buňky je způsobena přeskupením vnitřních struktur. [6, 8, 9]

Mikrofilamenta jsou tenká, ale zároveň velmi pevná vlákna, která vyztužují buňku a zajišťují buněčný pohyb. Intermediální filamenta patří mezi nejodolnější a nejpevnější strukturální proteiny, které chrání buňky před mechanickým namáháním. Spojují jádro

s endoplazmatickým retikulem, mitochondriemi a Golgiho aparátem a tím zajišťují buněčnou strukturu. Mikrotubuly jsou válcovité struktury, které ovlivňují tvar buňky. [3, 6, 8]

Vnitřní struktury cytoskeletu je možné narušit chemickými sloučeninami. Látky, které působí na mikrofilamenta, ovlivňují buněčný pohyb. Mezi tyto látky se řadí např. Latrunculin A a B nebo Cytochalasin D. Buňky ošetřené Cytochalasinem D by měly vykazovat sníženou schopnost migrace a změnu jejich tvaru (více zakulacené). To by mělo vést k zvětšení hodnot trakčních sil směrem dovnitř buňky. [10, 11]

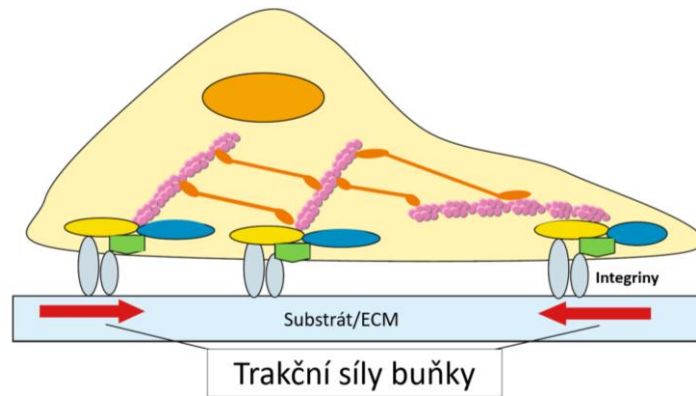
1.3 Fokální adheze

Kontaktní body mezi buňkou a ECM se nazývají fokální adheze. Ty jsou hlavními místy, kde se přenáší trakční síly z ECM do buněk a naopak. „Klasické“ fokální adheze (cFA) jsou podlouhlé, pruhovité struktury, které spojují vlákna na jejich koncích. Tyto fokální adheze se mohou vyvinout do „super-zralých“ fokálních adhezí (suFA), což jsou protažené válcové sestavy. Díky tomu jsou buňky schopné komunikovat s okolním extracelulárním prostředím. Takto jsou řízeny různé buněčné procesy, jako např. migrace a diferenciací buněk. Hlavní složky fokální adheze jsou integriny, které řídí interakce mezi buňkou a ECM (nebo rozraní buňka – buňka). [12-14]

1.4 Trakční síla buněk

Pro přežití a růst buněk je podstatné přichycení k substrátu. Po přichycení generují tyto buňky vnitřní tahové síly prostřednictvím aktomyosinových interakcí a působí trakcí na podkladový substrát nebo extracelulární matrix. Buněčné síly působící na okolí, jsou označovány jako trakční síly, znázorněny na obrázku 1.1. Tato trakční síla je důležitá např. k migraci buněk, udržení tvaru buněk a generování mechanických signálů. Proto hraje důležitou roli v různých biologických procesech, jako je hojení ran, embryogeneze, metastáze atd. [5, 12]

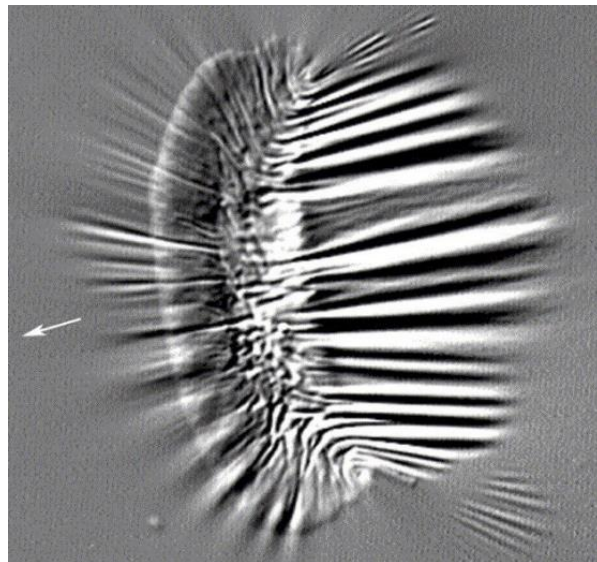
Buňky vykazují vyšší trakci na tuhých površích. Pokud narazí na rozhraní mezi materiály různé tuhosti, migrují přednostně na povrch tužší. [7]



Obrázek 1.1 Ilustrace trakčních sil adherované buňky, které působí na substrát skrz FA tvořené integriny. Převzato z [12]

2. METODY MĚŘENÍ TRAKČNÍ SÍLY BUNĚK

Trakční síly generované buňkami jsou velmi malé (v rámci pN – nN) a vyskytují se na krátkých vzdálenostech (nm – μm). Proto je jejich přímé měření složité. Měření probíhá pomocí deformovatelných materiálů, na kterých je možné pozorovat změny tvaru. Poprvé byly trakční síly buněk prokázány při kultivaci na silikonovém substrátu. Následkem adherování buněk vznikaly na substrátu vrásky, jak lze vidět na obrázku 2.1. Ty byly sice snadno viditelné, ale bylo obtížné získat kvantitativní informace o buněčných silách, jelikož vrásky byly nelineární a nepravidelné. Později byly velikosti buněčných sil na silikonových substrátech měřeny pomocí pružných mikrojuhel, které působily na substrát známou silou a vracely vrásku na substrátu, způsobenou buněčnou silou, do původního stavu. Ale z důvodu nedostatečné citlivosti substrátu při určení velmi malých sil (20nN), vznikly další metody pro měření buněčné trakce. [5, 16, 17]

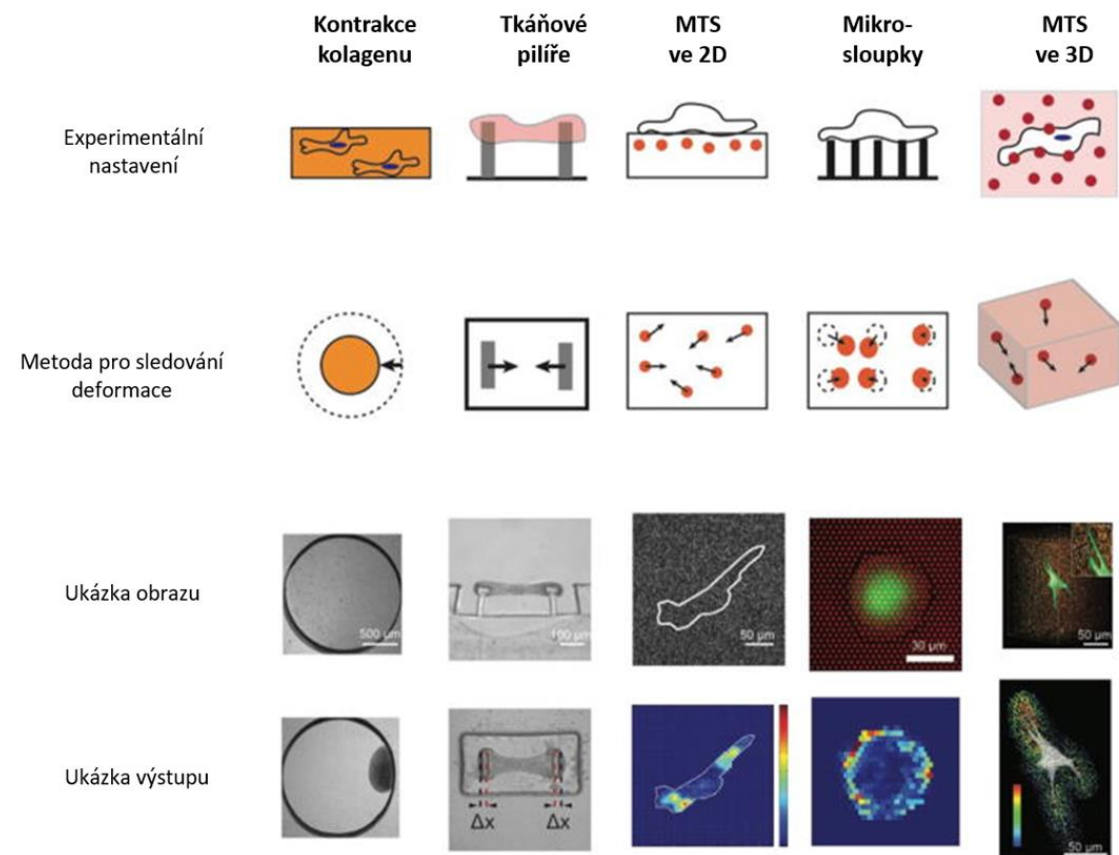


Obrázek 2.1 Pohyblivý rybí keratocyt na zvrásněném silikonovém substrátu. Šipka ukazuje směr migrace [15]

Jakoukoliv trakční sílu generovanou buňkami lze rozložit na sílu, která působí rovnoběžně s povrchem substrátu a na sílu, která působí kolmo k povrchu substrátu. Trakční komponenty rovnoběžné s povrchem substrátu vyvolávají deformaci v rovině optického pohledu a lze je změřit běžnou širokoúhlou mikroskopií. Většina metod měření trakční síly se zaměřuje na měření sil pouze v rovině rovnoběžné s povrchem substrátu. Mikroskopické techniky s 3D rozlišením (např. konfokální mikroskopie) umožňují měření deformace i v rovině kolmé k povrchu substrátu. U metod se převážně předpokládá, že materiál je lineárně elastický, izotropní (vlastnosti materiálu jsou stejné

ve všech směrech) a nekonečně velký v poměru k velikosti buněk. Tím pádem deformace způsobená trakcí buněk nezávisí na geometrii substrátu. [5]

Mezi metody měření trakční síly buněk patří kontrakce kolagenu, tkáňové pilíře, mikroskopie trakčních sil (MTS) ve 2D a 3D a měření na mikro- a nano-sloupcích. Znárodnění metod a jejich výstupů lze vidět na obrázku 2.2. [5]



Obrázek 2.2 Metody měření buněčných sil. Převzato z [5]

2.1 Kontrakce kolagenu

Nejjednodušší metoda, k určení přítomnosti buněčných sil, zahrnuje měření deformace buněk, substrátu nebo tkáně, ale bez určení skutečné síly.

Výhoda této metody je založena na tom, že není nutná předchozí znalost mechanických vlastností materiálu, který se deformuje, nebo složitých výpočtů k převedení deformace na sílu. Naopak hlavní nevýhoda spočívá v předpokladu, že větší kompaktnost nebo retrakce (stažení) materiálu znamená i větší buněčnou sílu. [5, 15]

Principem metody je přimíchání buněk ke kolagenovému gelu (typicky bovinní kolagen typu I). Polymerizací se získá gelový disk. Buňky generují trakční síly, které smrští gel, což vede ke zmenšení průměru gelového disku. Následně mohou být trakční síly určeny díky změně velikosti průměru disku. Takto ale není možné změřit trakční sílu jednotlivých buněk. Výsledkem je pouze míra kontrakce gelu, která byla způsobena trakčními silami všech buněk. Měřením průměru disku v závislosti na čase bylo zjištěno, že rychlost a míra kontrakce kolagenu klesá nebo roste v závislosti na koncentraci buněk. Větší množství buněk má za následek zlepšení interakcí mezi buňkami, což podpoří kontrakci kolagenu a tím pádem se zvýší i trakční síla. [12, 18, 19]

2.2 Tkáňové pilíře

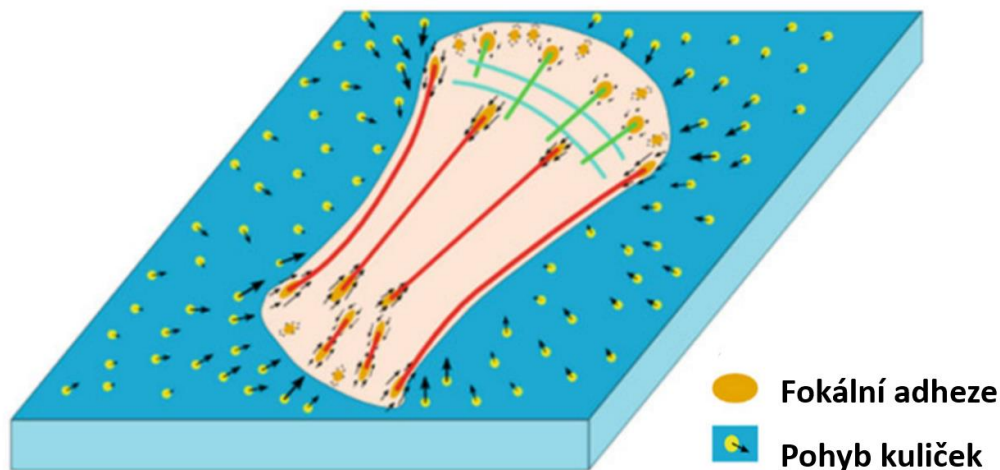
Další z metod používá k měření trakční síly pilíře o známe tuhosti. Se smrštěním tkáně se pilíře ohýbají. Takto ohnuté konce pilířů se zobrazí pomocí optické mikroskopie, kdy se ze zobrazených ohybů vypočítávají kontrakční síly tkáně. Výhoda této metody spočívá v možnosti výpočtu deformací více pilířů současně. Takto lze určit trakci pouze v jednom směru, avšak už nelze určit trakční síly ve všech směrech v rámci oblasti šíření buněk. [5, 12]

2.3 Mikroskopie trakčních sil ve 2D

Tato metoda (a její variace) je nejpoužívanější technikou na měření trakčních sil buněk. Zahrnuje sledování deformací syntetického, elastického substrátu z polymeru, které vznikají v důsledku působení buněčných sil. Tato měření umožnila charakterizovat dynamiku síly, jež je zapojená do různých biologických procesů např. zrání adheze, migrace, diferenciací a maligní transformace. [5]

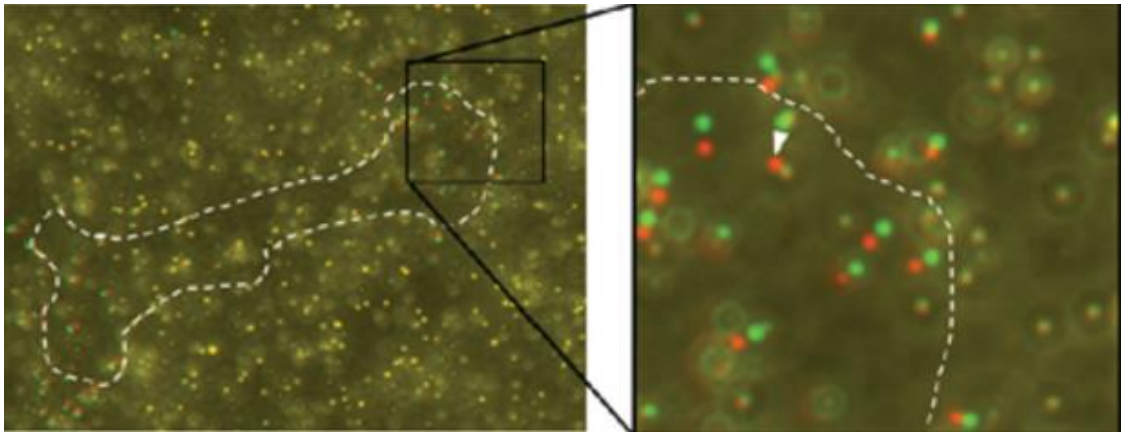
Buňky jsou nanášeny na substrát, který je synteticky vyroben a je schopný deformace. Tento substrát je odolný vůči degradaci, takže deformace, které vznikají následkem působení sil, jsou rozeznatelné ode změn způsobených biochemickými faktory (uvolněnými z buněk). Malé fluorescenční kuličky ($\leq 1\mu\text{m}$) jsou vmíchány do silikonového nebo polyakrylamidového (PA) substrátu, kde slouží jako ukazatele posunu a mohou být sledovány v prostoru a v čase pomocí mikroskopu (ilustrace posunutí kuliček je vidět na obrázku 2.3). Je zapotřebí dvou nebo více snímků substrátu. Jeden snímek zachycuje nedeformovaný referenční stav, kdy nepůsobí žádné trakční síly. Další snímky zachycují deformovaný stav (v jednom nebo více časových bodech), kdy usazené buňky působí trakčními silami a způsobují posunutí značek z jejich referenčních poloh.

Tyto obrazy projdou výpočetními algoritmy, které určí posunutí kuliček způsobené buňkami a síly potřebné k danému posunu. Znárodnění posunu kuliček zobrazuje obrázek 2.4. [5, 20]



Obrázek 2.3 Schéma buněčné kultivace na substrátu s usazenými fluorescenčními kuličkami. Převzato z [20]

Využívání silikonu nebo PA jako substrátu je z důvodu jejich mechanických vlastností. Při deformacích se chovají jako lineární elastická tělesa. Nejsou degradovány proteázami, takže se na rozdíl od ECM v průběhu měření jejich mechanické vlastnosti nemění. PA substráty jsou pružné a deformují se přímo úměrně působící síle. Po odstranění této síly se PA substrát okamžitě vrátí do podoby před působením sil. Aby se zvýšila buněčná adheze, jsou silikonové a PA substráty spojené s ECM. Podmínky, kterých lze touto metodou dosáhnout, neodpovídají přirozenému ECM, proto není zcela jisté, jak trakce, naměřené na syntetických materiálech, koreluje s trakcemi generovanými in vivo. [5, 17]



Obrázek 2.4 Znáznornění posunu kuliček před působením trakční síly (zelená) a při působení síly (červená), šipka ukazuje směr posunu [17]

2.4 Mikroskopie trakčních sil ve 3D

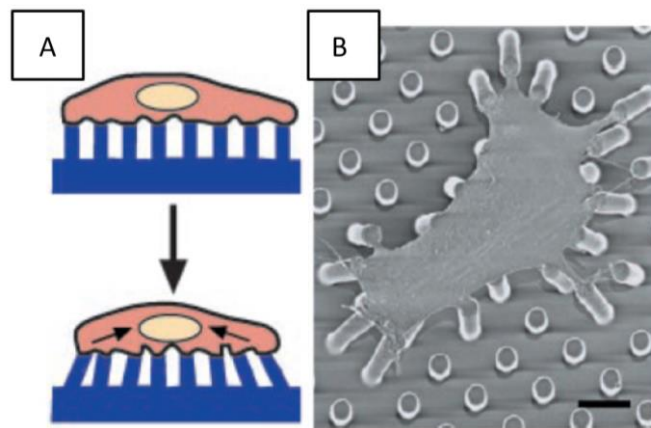
Pozorování deformací ve 2D plně necharakterizuje trakční pole, proto byla metoda modifikována do 3D a s využitím konfokální mikroskopie. Tato metoda se více přiblíží chování buněk *in vivo* v prostředí ECM. Jako substrát se nejčastěji používá hydrogel (kolagen typu I), který má nelineární charakter. Mezi další materiály, které se využívají jako substrát, patří např. fibrin a kolagen. [20, 21]

Buňky kultivované v 3D prostředí mají jiné adhezní a migrační vlastnosti oproti buňkám kultivovaným ve 2D. Tato metoda umožňuje buněčnou interakci při fyziologicky relevantnějších podmínkách. Následně lze pozorovat orientaci trakčních sil a jejich velikost. Bylo prokázáno, že buňky nanesené na substrát, mohou působit trojrozměrnými silami, které způsobují deformace hydrogelového substrátu i mimo rovinu (2D). Proto vznikla metoda i pro 3D prostředí. [20, 21]

Samotný princip metody je velmi podobný 2D trakční mikroskopii. Zaznamenávají se polohy fluorescenčních kuliček, při působení trakční síly a probíhá výpočet 3D trakčního pole. Polohy kuliček se zaznamenávají před působením trakčních sil a znovu po jejich působení. Je důležité, aby počet kuliček byl dostatečný k zachycení prostorové změny posunutí (k zachycení změn s vysokým rozlišením), a zároveň aby značky byly dostatečně malé a jejich počet byl dostatečně nízký, takže přítomnost značek výrazně nezmění chování systému. Následně se k určení velikosti trakčních sil využívají výpočetní algoritmy. [20-22]

2.5 Mikro- a nano-sloupky

Inovativní přístup měření trakčních sil spočívá v použití mikro obráběných sloupků. Buňky přilnou a následně působí silou na plochy mikrometrových rozměrů (vrchol ohebného sloupku), což má za následek vychýlení sloupku z původní pozice, viditelné na obrázku 2.5A. Každý sloupek slouží k individuálnímu měření trakční síly všemi směry (ohyb jednotlivých sloupků není ovlivněn ostatními sloupky). Trakční síla se na sloupcích projeví jejich ohybem viditelném na mikroskopu (obrázek 2.5B). Vrcholy sloupků slouží jako substrát a buňka překrývá vždy množství sloupků naráz. Aby byly buňky schopné přilnout, rozprostřít se a vyvinout trakční síly, které vychylují sloupky, jsou vrcholy pokryty ECM proteiny. Pokud se proteiny na vrcholy sloupků nenanesou, způsobuje to rozprostření buněk po celé délce sloupku, a ne pouze na vrchol. Ohyb sloupků by následně neodpovídal velikosti působících sil. [5, 12, 15, 23]



Obrázek 2.5 A) Schématické zobrazení vychýlení sloupků B) Vychýlení sloupků zobrazené elektronovým mikroskopem [24]

Na sloupcích s velikostí menší než jedna fokální adheze ($0,5 \mu\text{m}$) lze zkoumat vztah mezi silou a růstem fokální adheze (v rámci jednotlivé adheze). Úpravou výšky a průměru jednotlivých sloupků je ovlivňována jejich tuhost. Důležitými parametry jsou vzdálenost mezi středy a průměr sloupků. Tyto dva parametry jsou vzájemně závislé a měly by být optimalizovány pro typy buněk, které chceme měřit. Po vyrobení sloupků se změní jejich Youngův modul pružnosti např. pomocí elastometru, čímž se získá referenční hodnota pro měření trakční síly, která na sloupky působí. Pro různé buňky se volí různé moduly pružnosti substrátu tak, aby co nejvíce imitovaly in vivo podmínky. [9, 14, 25]

Omezení adheze buněk pouze na povrch vrcholu sloupků výrazně zjednodušuje výpočet trakce, ale zároveň to představuje jedinečnou povrchovou topografii, která

ovlivňuje strukturu adheze buněk, a to může vést k ovlivnění velikosti i rozložení trakčních sil. Také je prostorové rozlišení limitováno množstvím sloupků a detekce sil je omezena jen na jeden rozměr – kolmo na osu sloupku. [5, 15]

Technika, pracující se sloupky, je využívána nejen na měření sil generovaných buňkami. Lze ji využít i k analýze vztahu mezi tuhostí substrátu a buněčnou odpovědí. Mezi výhody měření trakční síly pomocí sloupků je možnost použít různé typy buněk, např. endoteliální buňky, leukocyty a embryonální kmenové buňky. [9, 26]

3. VÝROBA POLYMERNÍCH MIKRO- A NANO-SLOUPKŮ

Nano- a mikro-sloupky je možné vyrobit z řady materiálů, ale polymery jsou obzvláště vhodné díky levným a univerzálním metodám výroby. Mezi další výhody polymerů patří jejich vlastnost optické průhlednosti, ohebnost a nízká hodnota Youngova modulu. Tato vlastnost následně usnadňuje analýzu buněk na polymerních sloupcích. Pro výrobu se využívají polymery jako jsou např. polydimethylsiloxan (PDMS), polylaktid (PLA), kopolymer kyseliny mléčné (PLGA), polymethylmethakrylát (PMMA), polykarbonát (PC), polystyrene (PS) a poly-(chloro-p-xylen) (Parylen C). Každý z polymerů vykazuje odlišné optické, mechanické a tepelné vlastnosti. PDMS je velmi často používaný materiál díky jeho kombinaci vhodných vlastností. K nim patří vysoká mechanická pevnost a pružnost, průhlednost, nízká cena a snadná výroba. [27-30]

3.1 Techniky výroby mikro- a nano-sloupek

Mezi techniky, které se využívají k výrobě sloupek, se řadí DRIE (z angl. „deep reactive ion etching“ - hluboké reaktivní iontové leptání), litografické techniky a laserová ablace. Z důvodu nákladnosti těchto technik, se pro hromadnou výrobu využívají molding technologie jako např. vstřikování plastů (injection molding), tepelné lisování (hot embossing) a UV potisk (UV imprinting). Výběr materiálu a techniky výroby se projeví ve vlastnostech sloupek jako např. poměr výšky a průměru sloupek. Při výrobě polí je velmi důležité určit správný průměr sloupek a velikost rozestupu jednotlivých sloupek. [31, 32]

Tabulka 3.1 obsahuje ukázkou rozměrů sloupek, které je možné vyrobit z různých materiálů.

Tabulka 3.1 V této tabulce jsou vypsány rozměry sloupek a trakční síla, která na nich byla naměřena (pokud není informace dostupná, je použita konstanta pružnosti)

Materiál	Výška	Průměr	Vzdálenost středů	Trakční síla (konstanta pružnosti)	Reference
PDMS	2–7 μm	1–2 μm	2 μm	12-23 nN	[33]
PDMS	5 μm	2 μm	3 μm	-	[34]
PDMS	11 μm	3 μm	6 μm	32 nN/ μm	[23]

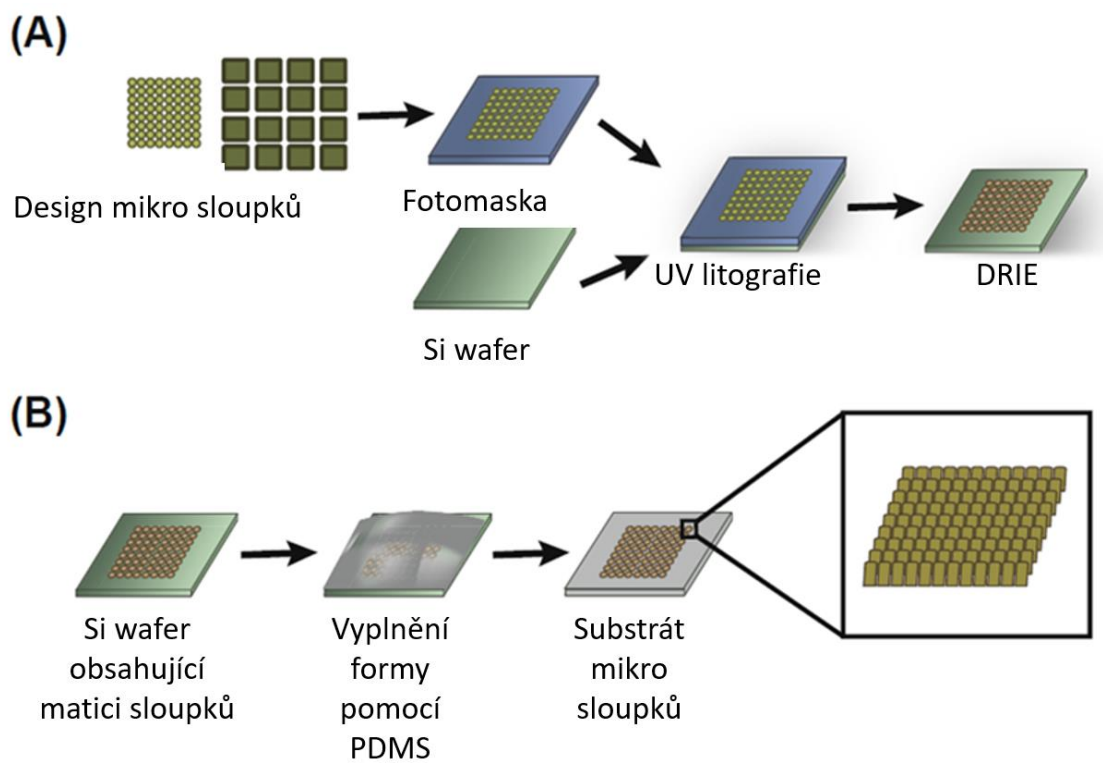
PDMS	20 μm	5 μm	4–12 μm	60 nN	[35]
PDMS	300 μm	30–72 μm	5–30 μm	13 nN/ μm	[25]
PDMS	0,97 μm	1,83 μm	4 μm	1,556 nN/ μm	[9]
PDMS	6,5 μm	1 μm	-	2 nN	[36]
PDMS	2,8 – 7 μm	2 μm	-	0.08-10.9 nN [37]	[37]
Parylen-C	9 μm	1,6 μm	4 μm	-	[38]
PLGA	2–10 μm	1,5 μm	8–10 μm	-	[29]

Nejčastěji používané techniky pro výrobu sloupků tvořených PDMS patří fotolitografie a DRIE metoda. CVD technika je využívána k vytvoření sloupků z Parylenu-C. [26]

3.2 PDMS sloupky

První z metod používaná k výrobě PDMS sloupků byla fotolitografie. K výrobě sloupků se využívají křemíkové (Si) wafery jako formy. Na wafer se nanese tenká vrstva fotorezistu, která se následně vystaví UV světlu procházejícím fotomaskou. Tato fotomaska je replikou modelu sloupků, která selektivně propouští UV světlo na fotorezist. Zalitím získaného waferu PDMS je získáno výsledné pole se sloupky. Z důvodu difrakce světla na fotomasce nemusí být ale výsledný model sloupků ideální. [26, 39]

Nedostatky fotolitografické metody překonává technika DRIE. Na křemíkovém waferu se vytvoří dočasná leptací maska pomocí standartní fotolitografie. Následně maskou nezakryté části křemíku jsou naleptány do požadované hloubky. Názorný postup výroby je vyobrazen na obrázku 3.1. Iterativním leptáním a pasivací lze pomocí DRIE získat sloupky s vysokým poměrem výšky a průměru sloupků. [26]



Obrázek 3.1 Postup výroby sloupků z PDMS s využitím DRIE metody
 A) výroba masky sloupků B) zalití masky PDMS. Převzato z [26]

4. VÝPOČET BUNĚČNÉ SÍLY NA MIKRO-SLOUPCÍCH

Pro výpočet trakční síly buněk na mikro-sloupcích je podstatné znát pružnost sloupků. Konstantu pružnosti je možné zjistit několika způsoby. Jeden ze způsobů je výpočtem z jejich výšky a jejich průměru. Změnou výšky nebo průměru je možné vytvořit sloupky o různé tuhosti. Přílišné zmenšení průměru sloupku může způsobit problémy s citlivostí měření. Možnosti velikosti a tvaru sloupku závisí na použitém materiálu a také na použité technice výroby. Mezi důležité parametry pro výpočet se řadí i tvar sloupku (cylindrický x kónický). Konstantu pružnosti je možné získat také pomocí simulace. [40]

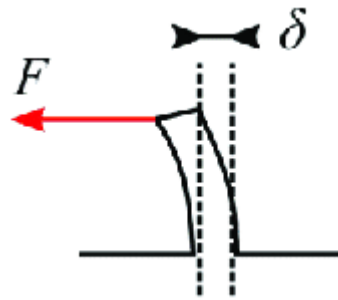
Dalším ze způsobů, jak změřit konstantu pružnosti sloupků, je použití mikromanipulátoru. Hrot skleněné mikropipety, který je kalibrován, je tlačěn proti vrcholu sloupku. Protože konstanta pružnosti hrotu mikropipety je známá a lze změřit výchylky hrotu mikropipety a sloupku, je možné vypočítat konstantu pružnosti sloupku. [9]

4.1 Výpočet ohybu

Malé deformace, které vznikají na sloupcích následkem trakčních sil buněk lze vypočítat pomocí Hookova zákona, jelikož se předpokládá, že síla je úměrná deformaci:

$$F = k_{\text{bend}} \cdot \delta = \frac{3\pi E D^4}{64L^3} \delta, \quad (4.1)$$

kde F označuje sílu, k_{bend} je konstanta pružnosti materiálu a δ reprezentuje deformaci sloupku. Působení síly na sloupek je znázorněno na obrázku 4.1. Konstanta pružnosti sloupku je určena kombinací Youngova modulu (E) materiálu a absolutních rozměrů sloupku (výška L , vnější průměr D). Pro sloupky vytvořené z PDMS obvykle vychází síla v rozmezí 1 až 200 nN/ μm . [41]



Obrázek 4.1 Ilustrace ohybu sloupku [42]

Pro výpočet ohybu na cylindrickém sloupku, je rovnice upravena na tvar

$$F = \frac{3\pi E r^4}{4L^3} \delta, \quad (4.2)$$

kde r označuje poloměr sloupku. [43]

Modul pružnosti (neboli Youngův modul) E je vlastnost materiálu, která popisuje jeho pevnost. Hodnota modulu pružnosti je vždy kladná a konstantní pro daný materiál a jeho teplotu. Lze jej vypočítat podle Hookova zákona pro jednoosou napjatost

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}, \quad (4.3)$$

kde σ označuje napětí a ε je relativní prodloužení. To získáme poměrem změny délky materiálu Δl ku původní délce l

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l}. \quad (4.4)$$

Výsledná hodnota relativního prodloužení je bezrozměrná, ale někdy se uvádí v procentech. [36, 44]

Pokud jsou sloupky tvořené měkkými polymery (např. PDMS), tak se při působení větších sil na sloupky, vychyluje i substrát. To, jestli se bude vychylovat pouze sloupek, nebo i substrát, závisí také na poměru výšky sloupku a jeho poloměru. Z důvodu

nelineárního chování substrátu je nutné k určení výsledné síly přistupovat jinak. Deformace substrátu pod jednotlivými sloupky způsobuje vychýlení osy sloupků a podstatně přispívá k jejich celkovému vychýlení (ohybu). Materiál je charakterizován Youngovým modulem a Poissonovým číslem (ν). To lze vypočítat jako poměrnou deformaci materiálu v příčném směru (kolmém na směr namáhání – ε_y) ku poměrné deformaci v podélném směru (směr namáhání – ε_x)

$$\nu = -\frac{\varepsilon_y}{\varepsilon_x}. \quad (4.5)$$

Poissonovo číslo je bezrozměrné. [40]

Vliv pružného podkladu na výchylku vrcholu sloupku je aditivní (vyobrazeno na obrázku 4.2), takže celkovou deformaci sloupku lze vypočítat jako

$$\delta_{celk} = \delta_{sloupek} + \delta_{substrát} = \delta_{ohyb} + \delta_{posun} + \delta_{náklon} + \delta_{dislokace}, \quad (4.6)$$

kdy $\delta_{dislokace}$ označuje boční posun základny sloupku, který se obvykle experimentálně odečítá, takže celkový posun je následující

$$\delta_{celk}^* = \delta_{celk} - \delta_{dislokace}, \quad (4.7)$$

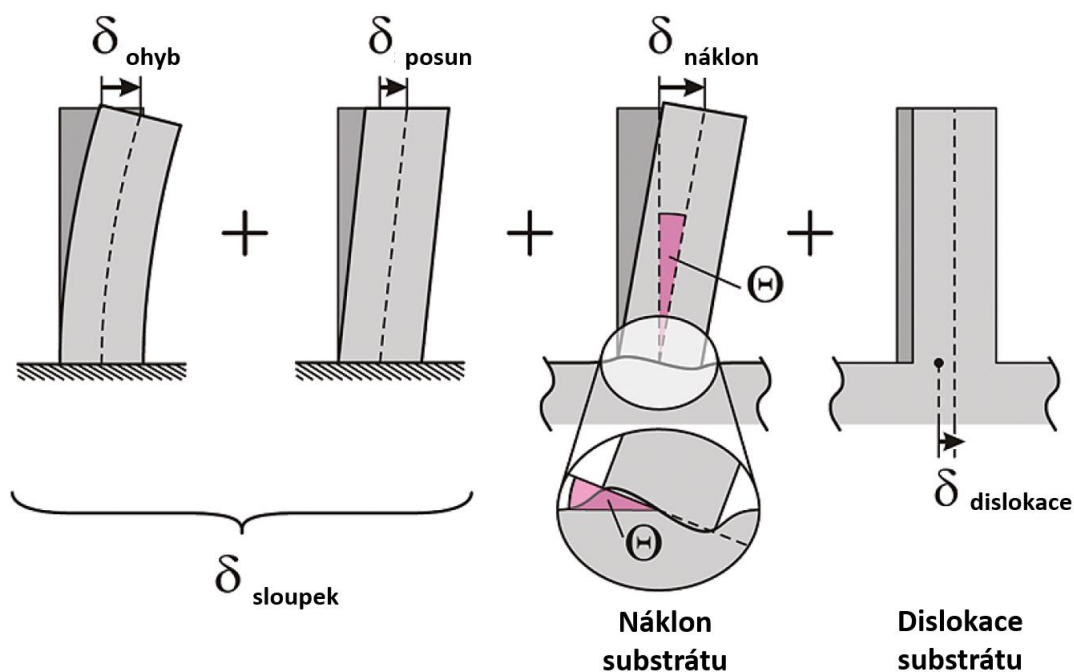
tím pádem výsledná rovnice na výpočet deformace má tvar

$$\begin{aligned} \delta_{celk}^* &= \delta_{ohyb} + \delta_{posun} + \delta_{náklon} \\ &= \left(\frac{16}{3} \left(\frac{L}{D} \right)^3 + \frac{7 + 6\nu L}{3D} + 8T_{náklon}(\nu) \left(\frac{L}{D} \right)^2 \right) \frac{4}{\pi} \frac{F}{ED}, \end{aligned} \quad (4.8)$$

kde $T_{náklon}$ je koeficient náklonu substrátu, který závisí na tvaru deformace substrátu a tím pádem i na Poissonově čísle

$$T_{náklon}(\nu) = a \frac{(1 + \nu)}{2\pi} \left\{ 2(1 - \nu) + \left(1 - \frac{1}{4(1 - \nu)} \right) \right\}, \quad (4.9)$$

multiplikativní konstanta a vznikla zprůměrováním deformačního profilu a lze ji interpretovat jako a standardizovaný sklon. [41]



Obrázek 4.2 Ilustrace ohybu sloupku a substrátu s popsanými parametry. Převzato z [41]

4.2 Analýza zpracování obrazu

K určení velikosti trakční síly pomocí zpracování obrazů lze použít např. program Image J nebo programové prostředí Matlab. Aby bylo možné odchylku pozorovat, používá se videozáznam o určené časové délce.

První krok k získání pole výchylek s využitím Image J je odstranění driftu x-y ze snímků živých buněk. Poté se na snímcích určí středy sloupků a pozorují se v čase. Původní pozici (nevychýlenou) sloupků lze odhadnout interpolací jejich pozic na mřížce o známých rozměrech a zarovnáním se získanými snímky. Výsledný ohyb je vypočítán ze získaného vychýlení vrcholů sloupků vynásobeného konstantou pružnosti daného materiálu. [26]

Při využití prostředí Matlab se k určení poloh využívá Gaussova funkce. Díky světelné mikroskopii je rozdíl kontrastu mezi vrcholy sloupků a pozadím dostatečný, aby bylo možné polohy vrcholů určit. Je možné použít i fluorescenční mikroskopii, pokud je fibronectin na vrcholech sloupků fluorescenčně označen. Pixely v místech vrcholů sloupků jsou světlejší než pozadí. Na snímcích, kde jsou sloupky v původních pozicích, se manuálně vytvoří mřížka. Každý sloupek je poté označen odpovídající polohou na mřížce. Následně se vezme celý soubor snímků a určí se vychýlené pozice sloupků ve

srovnání s původní pozicí. Ohyb je vypočítán použitím vychýlení sloupků a jejich konstantou pružnosti. [36-38]

5. PRAKTICKÁ ČÁST

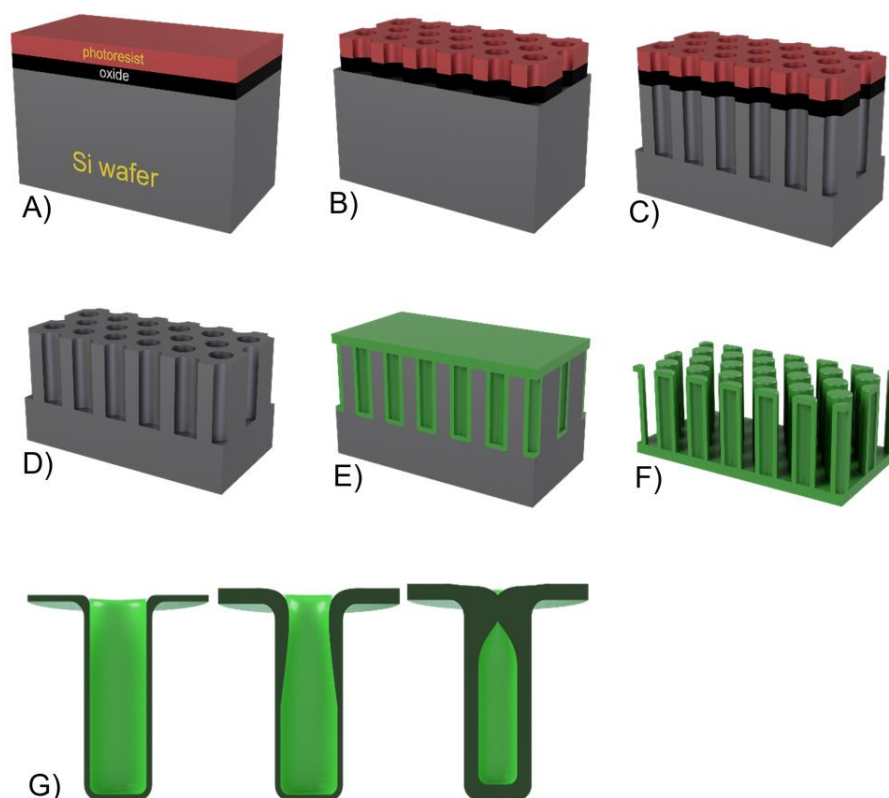
Cílem praktické části diplomové práce je výpočet trakčních sil buněk. Součástí kapitoly je výroba sloupků z Parylenu-C, podmínky, které musí být v rámci přípravy kultivace splněné a také samotný postup kultivace. Poté následovalo zobrazení buněk na mikrosloupcích pomocí světelného a konfokálního mikroskopu.

5.1 Výroba sloupků z Parylenu-C

Výroba sloupků proběhla na institutu CEITEC a nebyla součástí diplomové práce.

Sloupky z Parylenu-C se vyrábí metodou CVD neboli chemické napařování (z angl. chemical vapor deposition). Při této metodě se deponuje pevná látka, která byla získaná reakcí v plynné fázi, na vyhřívaný substrát. [45]

Při výrobě sloupků se vezme připravený vzor a pomocí bezkontaktní litografie se přenesou na křemíkový (Si) wafer pokrytý vrstvou termálního oxidu křemičitého (SiO_2) a fotorezistu. Fotorezist je vytvrzen po dobu jedné minuty. Pomocí DRIE metody jsou do oxidu křemičitého vyleptány kulaté díry (obrázek 7.1A), čímž vznikne forma hexagonálně uspořádaných děr. Zbytek fotorezistu se odstraní použitím kyslíkové plazmy a oxid je odstraněn pomocí 49% kyseliny fluorovodíkové (HF). Následně takto vzniklý model slouží jako forma pro depozice Parylenu-C s využitím CVD metody. Nakonec se křemíková forma leptá fluoridem xenonovým (XeF_2), aby se získala křemíková komora s odkrytou membránou sloupků. Takto vyrobené sloupky z Parylenu-C jsou duté, jak lze vidět na obrázku 7.1C. Zobrazení postupu výroby je na obrázku 5.1. Oproti sloupkům z PDMS je možné vyrobit sloupky z Parylenu – C s vyšším poměrem výšky a průměru sloupků. Toho je možné dosáhnout právě díky deponování. Výsledné parametry sloupků, jako je výška, tloušťka stěny, vnější a vnitřní průměr sloupku, jsou měřené pomocí elektronového mikroskopu. Před měřením se sloupky potahují tenkou vrstvou zlata, pro lepší zobrazení kontrastu. [38, 40]



Obrázek 5.1 Postup výroby sloupek z Parylenu-C, A) wafer pokrytý vrstvou SiO_2 a fotorezistu B) fotolitografie a leptání SiO_2 C) leptání Si D) odstranění SiO_2 a fotorezistu E) depozice Parylenu-C F) leptání formy Si G) vzniklý sloupek [46]

5.2 Kultivace buněk

5.2.1 Podmínky kultivace

Před samotnou kultivací je důležité zajistit správné podmínky. Místnost, ve které kultivace bude probíhat musí být sterilní a při manipulaci s buňkami se využívají laminární boxy, aby nedošlo ke kontaminaci.

Ke kultivaci byla využita kultivační lahvička vyrobená z opticky čirého materiálu s hydrofilním povrchem. Hydrofilita povrchu je zajištěna speciální povrchovou úpravou k zajištění adheze a proliferace buněk. Aby bylo možné buňky kultivovat, je nutné zvolit správné kultivační médium. Médium je voleno individuálně podle typu buněk. Pro správné podmínky při kultivaci je využíván inkubátor. V inkubátoru je zajištěná teplota 37°C , koncentrace CO_2 je nastavená na 5 % a hodnota vlhkosti v inkubátoru je v rozmezí 85-95 %.

5.2.2 Postup kultivace

Fibroblastové buňky NIH 3T3 byly kultivovány v DMEM médiu, které obsahuje 10 % fetálního bovinního séra a 1 % Penicilin-streptomycinu. Toto médium bylo měněno dvakrát do týdne. Buňky byly subkultivovány při 80 % konfluenci pomocí 0.25% Trypsin-EDTA roztoku. Při mikroskopických experimentech byla zachována teplota 37 °C a koncentrace CO₂ na 5 % s využitím mikroskopického inkubátoru. [47]

5.2.3 Životaschopnost buněk na poli mikro-sloupků

Pomocí elektronové mikroskopie (SEM) byla sledována životaschopnost buněk na poli mikro-sloupků. Pole mikro-sloupků tvořeno Parylenem-C bylo nejdříve sterilizováno po dobu 10 minut UV zářením. Následně byly sloupky potaženy adhezivním proteinem fibronectinem (5 μg/ml v PBS) po dobu 30 min. Buňky byly nanášeny na substrát v koncentraci 10³ buněk/ml a kultivovány po dobu 24 hodin. Fixace buněk byla provedena pomocí 4% paraformaldehydu v PBS po dobu 1 hodiny a následně byly třikrát opláchnuty PBS puřem. Dehydratace se provedla proplachováním vzorků odstupňovanou směsí etanolu a vody v poměrech 50 %, 70 %, 80 %, 90 % a nakonec 100 %. Každý stupeň proplachování byl prováděn po dobu 10 min při 4 °C. Proplachování 100% etanolem se opakovalo dvakrát po sobě. Takto dehydratované buňky se pro SEM mikroskopii dále potahovaly 5 nm tenkou vrstvou zlata. [36, 48]

5.3 Měření trakční síly buněk

5.3.1 Měření ohybu mikro-sloupků

Pole mikro-sloupků bylo fixováno na kultivační miskou. Před nasazením buněk, byly sloupky vystaveny působení UV záření na 10 minut a následně potaženy vrstvou fibronectinu po dobu 20 min. Poté byly buňky nasazeny na sloupky a inkubovány po dobu 48 hodin. K zaznamenání ohybu mikro-sloupků by použitý světelný mikroskop s 40× objektivem. Ohyb byl zaznamenán každou minutu v časovém intervalu 30 minut. Následně bylo měření opakováno s využitím stimulační látky Cytochalasin D. Nejdříve byla použita koncentrace Cytochalasinu D 1 μM a následně 5 μM. Obě měření znovu probíhala po dobu 30 minut se zaznamenáním ohybu každou minutu. Snímky z mikroskopu byly snímány s rozlišením 1920 × 1440 pixelů v různých „z“ rovinách, aby bylo zajištěno zaostření na spodek sloupků, vrcholy sloupků i na buňky. Při tomto rozlišení 1 pixel odpovídá 0,162 μm.

5.3.2 Měření ohybu s využitím fluorescenčního barvení buněk a sloupků

Aby bylo možné na snímcích precizněji zaznamenat polohu sloupků bylo využito fluorescenčních barev. Pole mikro-sloupků bylo před obarvením propláchnuto PBS puřem a poté vloženo pod UV záření po dobu 10 minut. K barvení sloupků bylo využito červené barvivo CellTracker™ Red CMTPX. Na sloupky bylo nanášeno 50 μl média

(Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) smíchaného s 0,2 μ l CMTPX barviva po dobu 2 hodin. Poté byly sloupky propláchnuty PBS pufrem a potažené fibronectinem.

Pro obarvení buněk bylo využito zelené barvivo CellTracker™ Green CMFDA. K buňkám bylo přidáno 600 μ l média (DMEM) s 0,6 μ l CMFDA barviva. Takto obarvené buňky byly po 3 hodinách spasážované a nasazené na mikro-sloupky. Po 3 hodinách v inkubátoru bylo do kultivační misky přidáno médium. Poté byly buňky inkubovány po dobu 48 hodin. K zobrazení obarvených buněk byl použit konfokální mikroskop s 40 \times objektivem.

6. ZPRACOVÁNÍ DAT

Cílem zpracování obrazů získaných ze světelného mikroskopu bylo zjištění velikosti ohybu mikro-sloupků, na kterých jsou nasazené buňky. Následně lze z velikosti ohybu sloupků vypočítat i trakční sílu, kterou buňka na sloupky vyvinula.

Buňky nasazené na mikro-sloupcích byly nejdříve snímány bez jakékoliv stimulující látky, následně se stimulující látkou Cytochalasin D v koncentraci 1 μM a poté v koncentraci 5 μM , jak bylo již v předešlé kapitole zmíněno. Měření probíhalo vždy 30 minut. Snímek byl pořízen každou minutu.

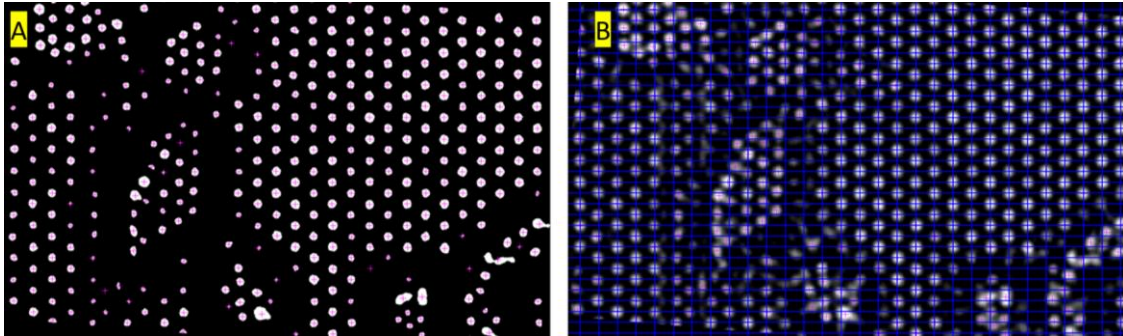
K zobrazení snímků pořízených světelným mikroskopem Leica Dmi8 byl použit software LAS X. Ze snímků byly vybrány buňky vhodné k měření trakční síly, tzn. buňky u kterých byl vidět pohyb sloupků a s rozeznatelnými okraji buňky. U takto zvolených buněk bylo poté potřeba vybrat ještě roviny „z“ tak, aby byl mikroskop zaostřený nejprve na spodek a vrchol sloupků a následně na buňku samotnou.

Data byla zpracovávána v programovém prostředí Matlab R2022b.

6.1 Určení ohybu sloupků

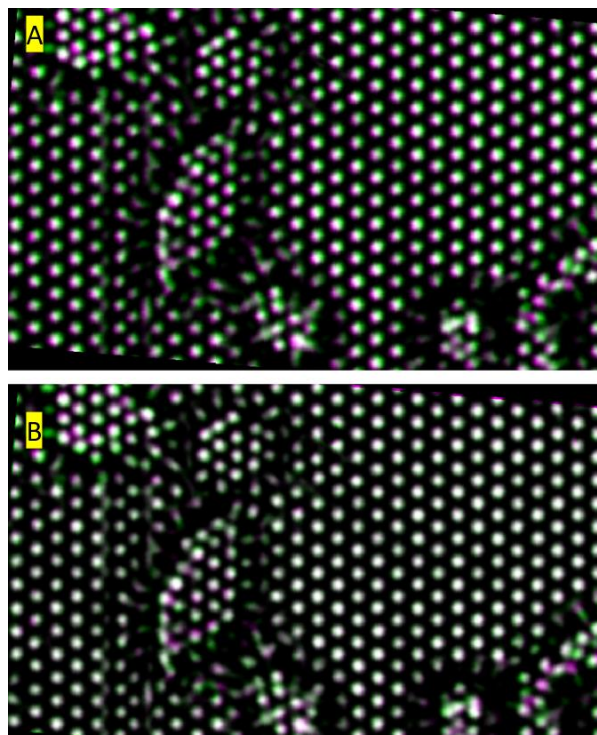
Pro určení velikosti vychýlení sloupku byl vybrán ze souboru snímků pouze každý desátý snímek (tzn. časový rozestup mezi vybranými snímky byl 10 minut). Zkoumány byly především sloupky v krajních částech buňky, jelikož sloupky, které ležely uprostřed buňky se nevychylují nebo jenom minimálně. Poloha buňky byla určena ze „z“ rovin, na nichž byla zaostřená buňka. Prvním krokem bylo načtení vybraných snímků a jejich následná filtrace Gaussovým filtrem pomocí funkce *imgaussfilt*.

Vrcholy sloupků se na snímcích zobrazují světlejší, zatímco pozadí je tmavé. Díky tomu bylo možné vytvořit pomocí prahování binární masku, kdy sloupky byly označeny jako 1 a zbytek snímku jako 0. V takto vytvořeném binárním obraze bylo možné na každém sloupku nalézt a vyznačit jeho střed, jak lze vidět na obrázku 6.1A. Nalezený střed vychýleného sloupku lze porovnat se středem sloupku v původní pozici a tím určit i velikost jeho vychýlení (obrázek 6.3). Nevychýlená pozice sloupku byla získána ze snímků zaostřených na spodek sloupků.



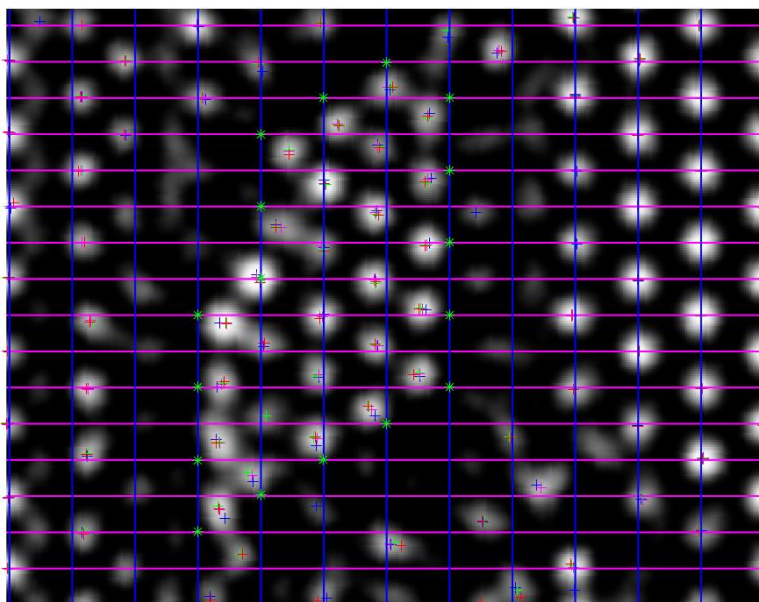
Obrázek 6.1 A) Znáznornění nalezených středů sloupků v binárním obraze
B) Obraz obsahující mřížku a nalezené středy sloupků

Při porovnávání poloh sloupků snímaných po dobu 30 minut, bylo zjištěno, že ani sloupky, které nebyly vychýlené, nelicovaly, jak lze vidět na obrázku 6.2A. To bylo způsobené drobnými posuny (driftem) mikroskopu během měření. Tento posun během měření postupně narůstal. Proto byly slícované jak snímky, které jsou zaostřené na vrcholky sloupků (zobrazené na obrázku 6.2B), tak i snímky zaostřené na jejich spodek. K lícování byla využita funkce *imregconfig*.



Obrázek 6.2 A) Obrazy z 1. a 30. minuty před slícováním B) Obrazy z 1. a 30. minuty po slícováním

Pro určení původní, nevychýlené pozice sloupku, byla vytvořena mřížka podle části snímku, kde se nenacházela žádná buňka. Jelikož nalezené středy sloupeků nebyly přesně v jedné rovině, byla mřížka vytvořena manuálně. Tato nepřesnost mohla zanechat chybu i do výsledného určování velikosti sil. K vytvoření mřížky podle středů sloupeků, bylo nejprve nutné snímek rotovat tak, aby byly sloupky rovnoběžné s hranou snímku. K tomu byla použita funkce *imrotate*. Na takto rotovaný snímek byla manuálně vytvořena mřížka, díky které lze určit vychýlení sloupku oproti původní pozici (zobrazeno na obrázku 6.1B). K určení velikosti vychýlení sloupku, pro každou pozici sloupku v čase, bylo využito minimálních vzdáleností. Následně byl vypočítán rozdíl těchto vzdáleností.



Obrázek 6.3 Zobrazení posunu středů sloupeků pro různé časové úseky (zelené hvězdy označují nevychýlené polohy sloupeků)

6.2 Výpočet trakčních sil

Aby bylo možné vypočítat sílu, kterou buňka na sloupek vyvinula, je nutné nejdříve vypočítat konstantu pružnosti samotného sloupku. K tomu se běžně využívá část rovnice (4.1). Z důvodu dutosti sloupeků nemohla být tato rovnice použita, jelikož dutost neuvažuje. Proto k určení konstanty pružnosti sloupeků byla na institutu CEITEC vytvořena simulace.

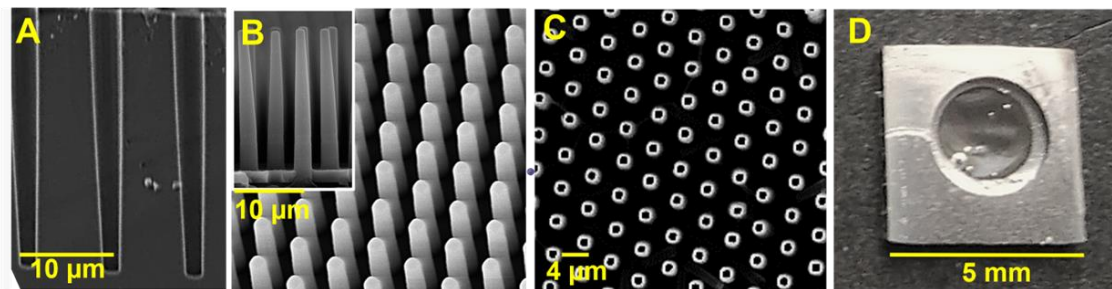
Následně k výpočtu trakční síly byl využitý Hookův zákon. Velikost deformace musela být nejprve převedena z pixelů na mikrometry, kdy $1 \text{ px} = 0,162 \text{ } \mu\text{m}$. Podle

rovnice (4.1) byla deformace poté násobena konstantou pružnosti, ze které byla získána velikost trakční síly, kterou buňka působila na jeden sloupek. Takto byly postupně vypočteny velikosti působených sil pro všechny určené sloupky. Velikost trakčních sil se následně přepočítá na plochu vrcholu sloupku, jako poměr síly (F) ku ploše vrcholu (A) tzn. F/A . [40]

7. VÝSLEDKY A DISKUZE

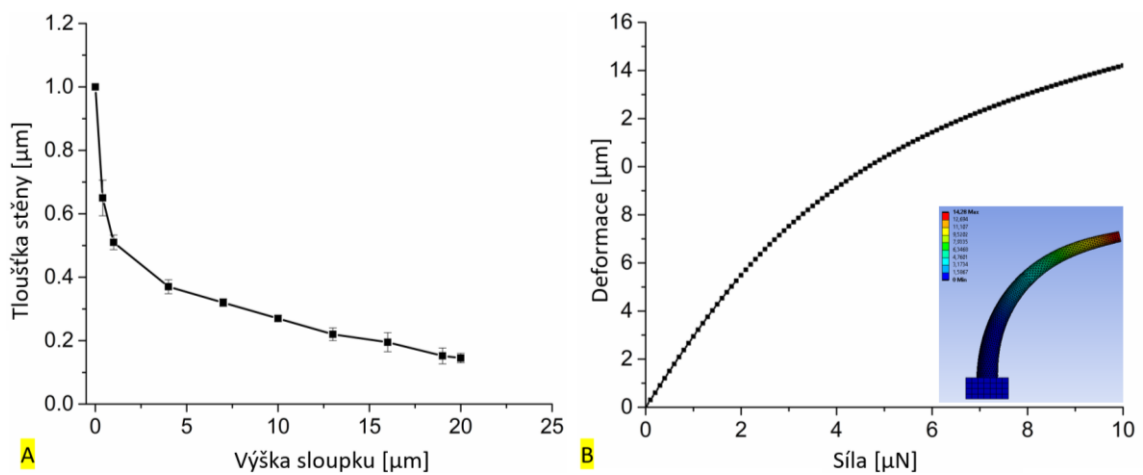
7.1 Charakterizace sloupků z Parylenu – C elektronovým mikroskopem

Forma na výrobu mikro-sloupků byla vyrobena metodou DRIE. Díry byly vyrobené o průměru $\approx 2 \mu\text{m}$, délce $\approx 20 \mu\text{m}$ s rozstupem $\approx 4 \mu\text{m}$, zobrazené na obrázku 7.1A. Následně byly sloupky vyrobeny technikou CVD, kdy byl do vytvořených děr deponován Parylen-C. Takto vzniklé sloupky měly kónický tvar (vrchol sloupku měl průměr $\approx 1 \mu\text{m}$, spodní část sloupku měla průměr $\approx 2 \mu\text{m}$) a byly duté, viditelné na obrázku 7.1B, C. Na obrázku 7.1D je zobrazena křemičitá komůrka s odkrytou kruhovou plochou mikro-sloupků.[40]



Obrázek 7.1 Snímky pořízené elektronovým mikroskopem. A) Díry vzniklé DRIE metodou B) Vyrobené sloupky C) Zobrazení dutosti sloupků D) Komůrka pole mikro-sloupků [40]

Jak bylo již zmíněno, kvůli dutosti vytvořených sloupků nemohla být vypočtena konstanta pružnosti pomocí rovnice (4.1). Tloušťka stěny se mění podle výšky sloupku (obrázek 7.2A). Parylen-C se při větším zatížení nechová podle Hookova zákona, proto byl vytvořen ne-Hookovský model k simulaci a predikci nelineárního chování materiálu. Modul pružnosti Parylenu-C: $E \approx 3,2 \text{ GPA}$. Bylo zjištěno, že od síly $1,5 \mu\text{N}$ se nechová sloupek lineárně (obrázek 7.2B). Odhadovaná konstanta pružnosti z lineárního rozsahu vyšla $k \approx 0,349 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$. [40]

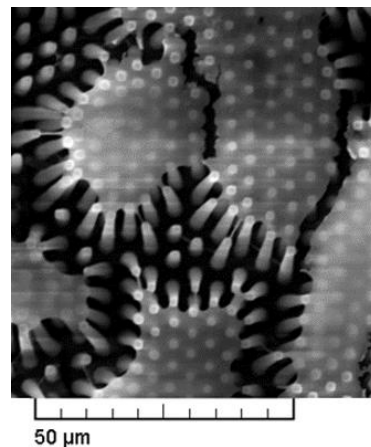


Obrázek 7.2 A) Tloušťkový profil stěny sloupku B) Deformace sloupku při působení síly 1-10 μN [40]

7.2 Vyhodnocení životaschopnosti buněk na poli mikro-sloupků

Při správně zvolených rozměrech sloupků, jako je výška a rozestup, je buňka schopná na mikro-sloupcích adherovat, dělit se a migrovat stejně dobře, jako na plochem povrchu. Aby byla buňka lépe schopna adheze, je na povrch mikro-sloupků nanesen fibronektin.

Pomocí elektronového mikroskopu je možné pozorovat, že buňky byly schopné adheze na sloupcích, jak lze vidět na obrázku 7.3.

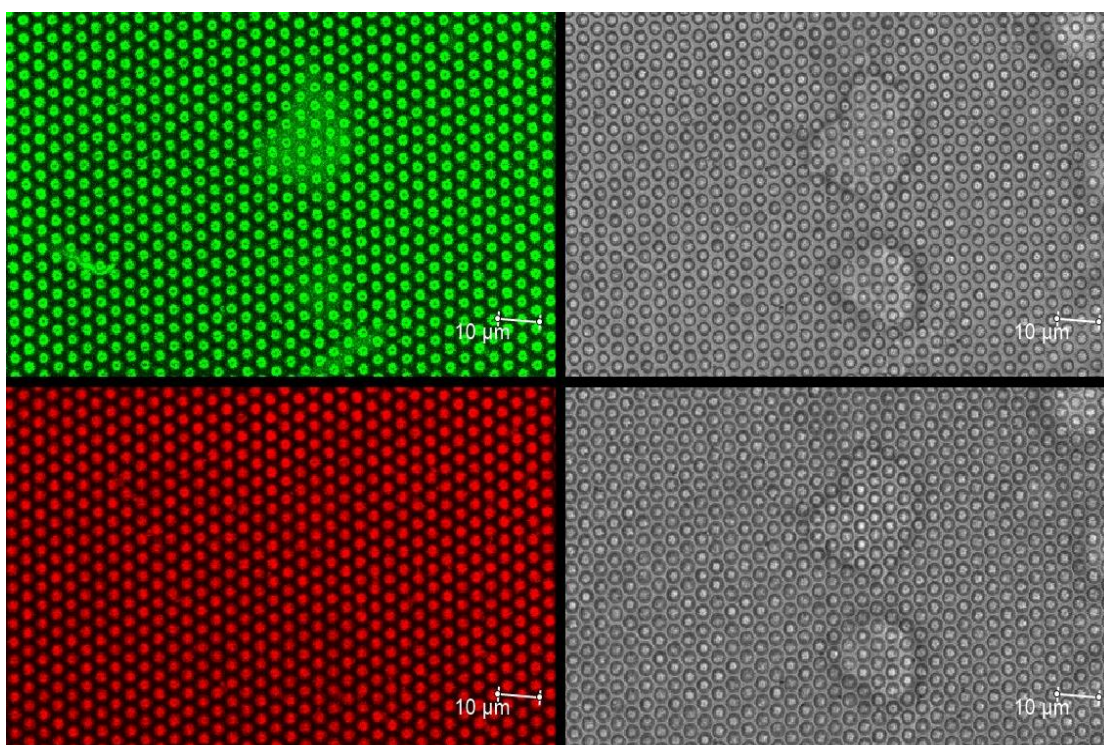


Obrázek 7.3 Adherované buňky na poli mikro-sloupků zobrazené elektronovým mikroskopem [47]

7.3 Vyhodnocení trakčních sil

Trakční síla buněk působící na plochu sloupků byla určována u 6 různých buněk. Buňky byly vybrány ze dvou měření. Jedno z kritérií při výběru buněk bylo, aby nebyla buňka velmi ovlivněna okolními buňkami (tzn. buňka se nenacházela ve velkém shluku buněk). Další omezení volby byla viditelnost ohybu sloupků, jelikož u některých buněk ohyb nebyl viditelný. Selektce závisela také na tvaru buňky. Byly vybírány takové, které nebyly pravidelného, kulatého tvaru, jelikož u takto tvarovaných buněk nelze s určitostí říci, jestli jsou zdravé. Poslední kritérium spočívalo v chování buňky v průběhu kontrolního měření a měření dvou koncentrací Cytochalasinu D, jelikož některé z buněk v průběhu měření zanikly, nebo se separovaly od vrcholů sloupků.

Při použití konfokálního mikroskopu nebyl na snímcích viditelný ohyb sloupků, jak lze pozorovat na obrázku 7.4. To bylo pravděpodobně způsobené nedostatečným zvětšením mikroskopu, které způsobilo nezaostření na vrcholy sloupků. Proto byl k zobrazení využit znovu světelný mikroskop. Měření kontrolního záznamu probíhalo po dobu 30 minut, kdy snímky byly pořízeny každou minutu a následně byl využit Cytochalasin D v koncentracích 1 μM a 5 μM . Měření s přidáním stimulační látky probíhalo také 30 minut. Rozlišení pořízených snímků bylo opět 1920×1440 pixelů.

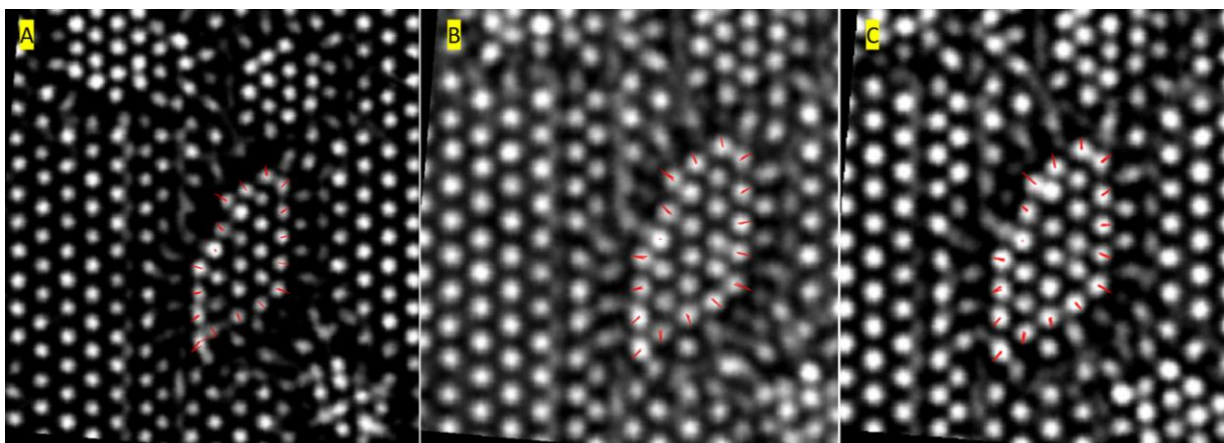


Obrázek 7.4 Zobrazení obarvených sloupků a buněk pomocí konfokálního mikroskopu

Určení trakčních sil probíhalo vždy ve 4 časových úsecích po 10 minutách, tzn. 1. minuta, 10. minuta, 20. minuta a 30. minuta měření. Pokud byly přítomny velmi odlehlé hodnoty nebo hodnoty nad $1,5 \mu\text{N}$, nebyly do výsledného výpočtu zahrnuty.

7.3.1 Měření 1

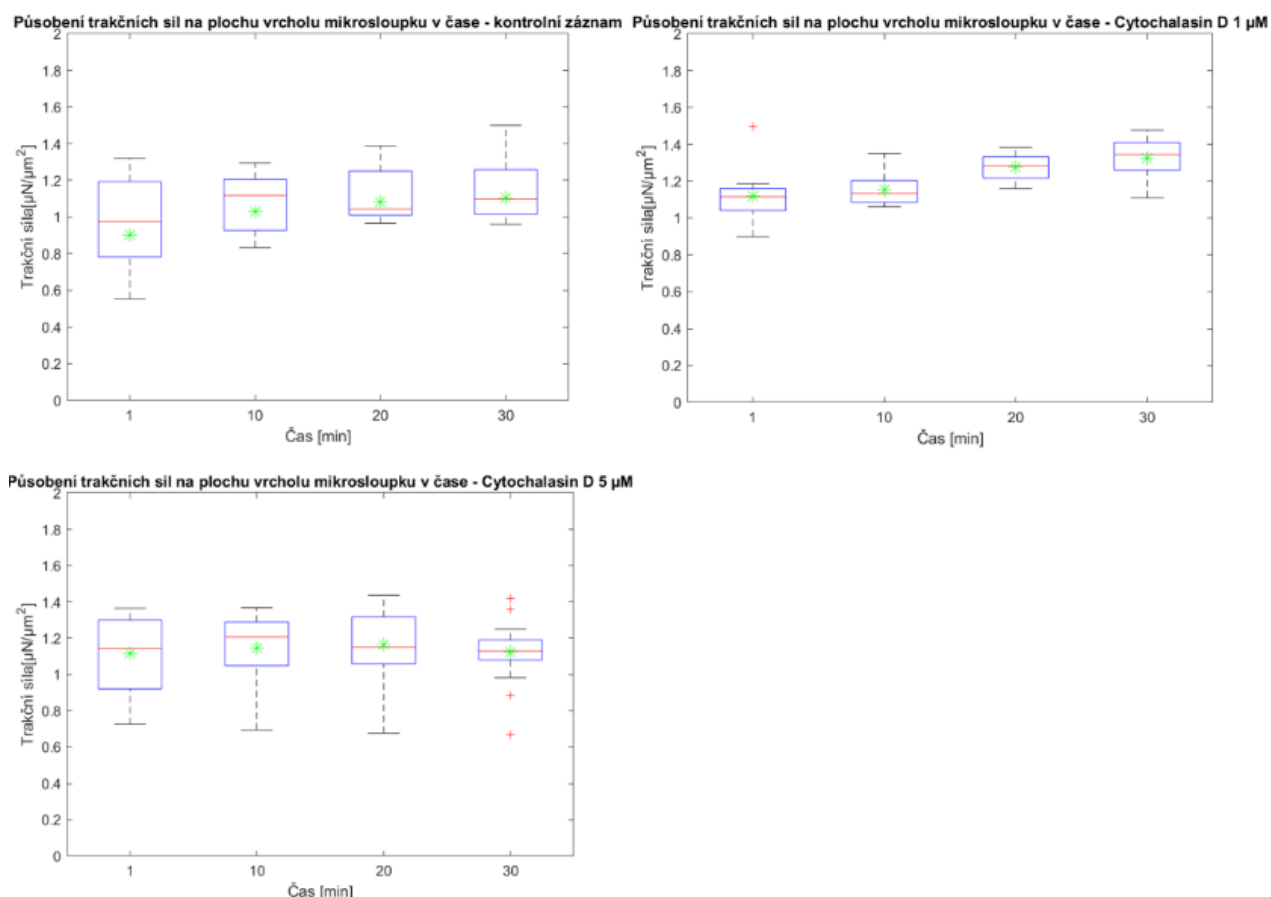
Jak již bylo dříve zmíněno, velikost trakčních sil se měřila pouze ze sloupků, které se nacházely především na okrajích buňky. Tvar buňky byl určen pomocí „z“ roviny zaostřené na buňku a následně byly vybrány krajní sloupky. Výběr sloupků byl omezen jejich viditelností. Některé sloupky na snímcích nebyly dostatečně dobře viditelné, a proto musely být zvolené sloupky, které ležely nejbližší okraji buňky a zároveň s dostatečnou viditelností v každém z měření (kontrolní měření, měření za použití Cytochalasinu D v koncentracích 1 a $5 \mu\text{M}$). Na obrázcích 7.5 je červenými přímkami znázorněný posun sloupku z původní nevychýlené polohy do polohy ovlivněné trakční silou buňky pro každý časový úsek. Tento posun, jak bylo předpokládáno, byl směrem do středu buňky.



Obrázek 7.5 Měření 1: Zobrazení posunu sloupků v čase. A) Kontrolní záznam B) Cytochalasin D $1 \mu\text{M}$ C) Cytochalasin D $5 \mu\text{M}$

Trakční síla, která byla vypočtena z velikosti deformace sloupků, byla zanesena do grafu pro každé měření zvlášť, jak lze vidět na obrázku 7.6. Na ose x jsou znázorněny rozdílné snímky z jednotlivých časových úseků. Červená příčka uprostřed boxu značí medián hodnot, vrchní a spodní část boxu označují třetí a první kvartil. Černé linie vycházející z boxu zobrazují maximální a minimální hodnotu. Odlehlé hodnoty jsou v grafech znázorněny červenými křížky a zelená hvězda označuje průměrné hodnoty. Pro kontrolní záznam a pro záznam s Cytochalasinem D $5 \mu\text{M}$ bylo měření provedeno pro 15

sloupeků a pro záznam s použitím Cytochalasinu D 1 μM bylo z důvodu velmi odlehklých hodnot měření provedeno pro 12 sloupeků.

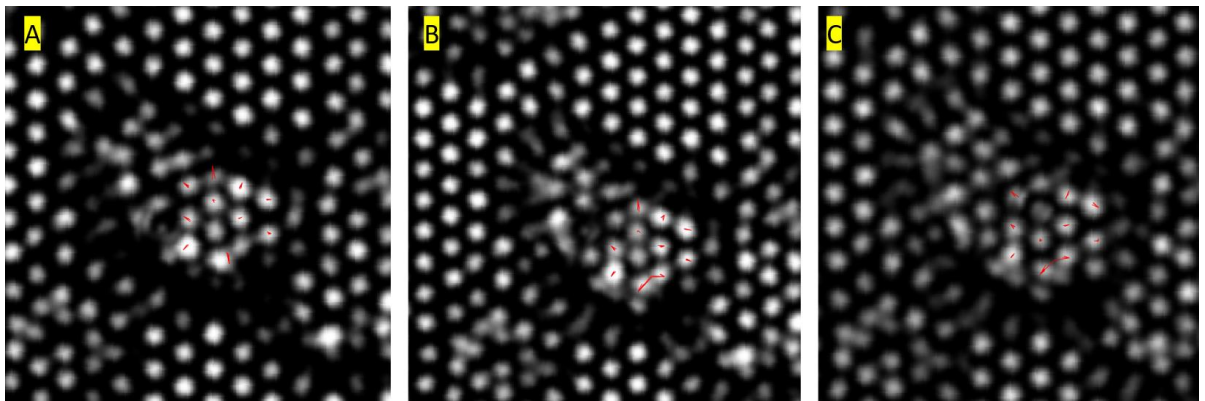


Obrázek 7.6 Měření 1: Krabicové grafy trakčních sil v průběhu 30 minut

Teoretický předpoklad byl, že hodnota trakčních sil, bude s přidáním stimulující látky narůstat. Přidání Cytochalasinu D v koncentraci 1 μM způsobilo nárůst trakčních sil, jak se předpokládalo. V případě přidání Cytochalasinu v koncentraci 5 μM , se napříč předpokladům trakční síly zmenšily oproti hodnotám v případě přidání 1 μM . Je možné, že koncentrace 5 μM byla na buňky příliš vysoká. Nejvyšší průměrné hodnoty trakčních sil, z celého časového úseku měření, jsou u kontrolního měření bez stimulující látky.

7.3.2 Měření 2

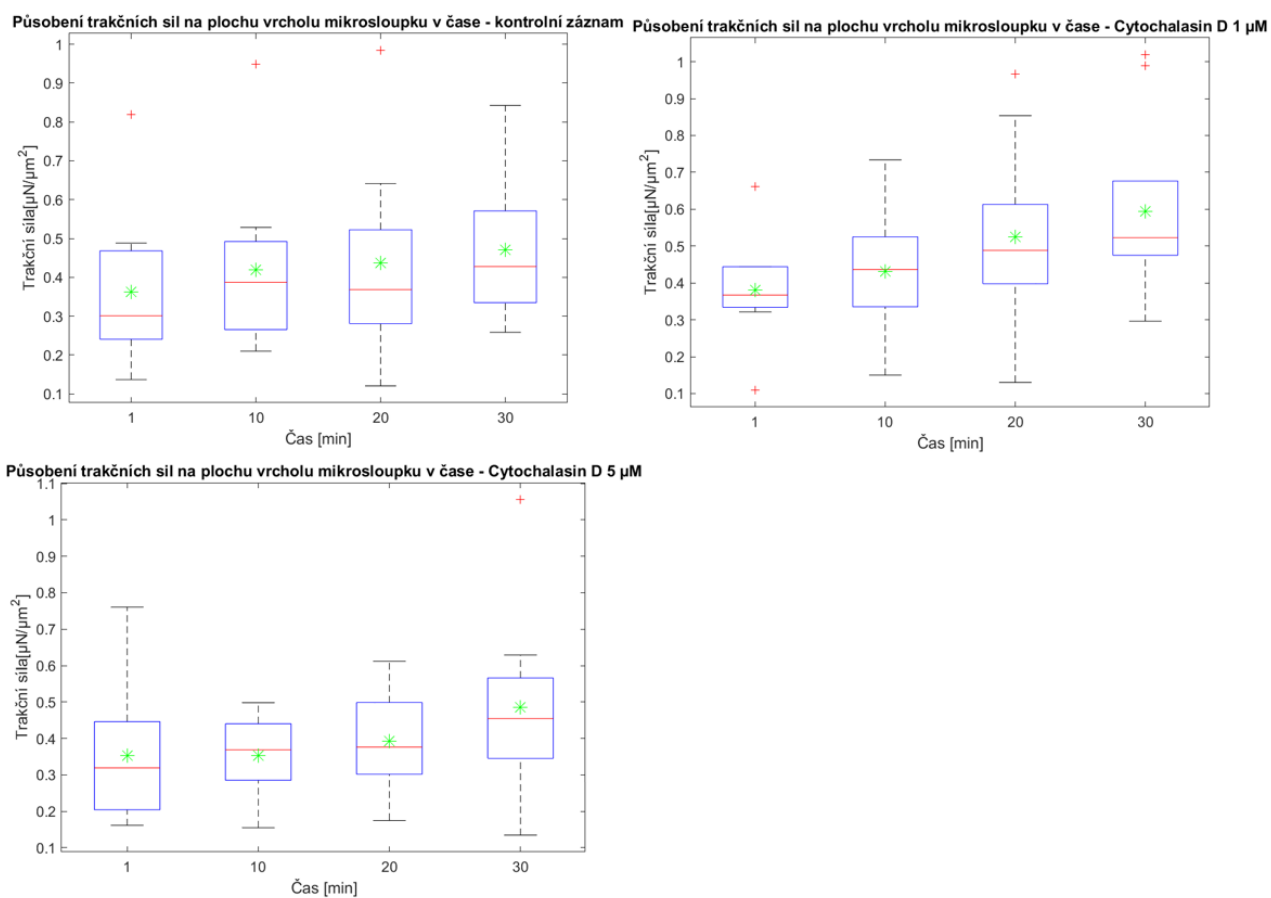
Pro druhé měření byla vybrána buňka, u které se v blízkosti nacházely další dvě buňky. To mohlo ovlivnit i výslednou velikost generovaných trakčních sil. Jelikož vybraná buňka byla menších rozměrů oproti dalším zkoumaným buňkám, byly pro určení působící síly brány i sloupky, nacházející se ve střední části buňky.



Obrázek 7.7 Měření 2: Zobrazení posunu sloupků v čase. A) Kontrolní záznam B) Cytochalasin D 1 μM C) Cytochalasin D 5 μM

Červenými přímkami jsou v obrázcích 7.7A až C znázorněny posuny poloh sloupků. V rámci zpracování dat nebylo u některých sloupků možné určit přesnou vzdálenost ohybu sloupků, jak lze vidět na obrázku 7.7B a C. Takto špatně určená vzdálenost byla ve výsledném výpočtu trakční síly zobrazena jako odlehlá hodnota. Pokud se jednalo o velmi odlehlou hodnotu, byla tato hodnota, před výpočtem velikosti trakčních sil, odstraněna. Při působení sil nad 1,5 μN se Parylen-C chová nelineárně, tím pádem by výsledné velikosti sil nebylo možné vypočítat pomocí Hookova zákona. Síly z kontrolního záznamu byly vypočteny z 10 sloupků a pro Cytochalasin D 1 μM a 5 μM byly vypočteny z 9 sloupků.

Stejně jako v předešlém měření, i zde způsobilo přidání Cytochalasinu D v koncentraci 1 μM nárůst trakčních sil oproti kontrolnímu záznamu. Proti předpokladům vyšlo měření s koncentrací Cytochalasinu 5 μM . Průměrné hodnoty výsledných trakčních sil při přidání Cytochalasinu D v koncentraci 5 μM vycházely nižší než v případě měření kontrolního záznamu. Výsledné hodnoty sil působících na plochu vrcholu mikro-sloupků je možné pozorovat na obrázku 7.8.



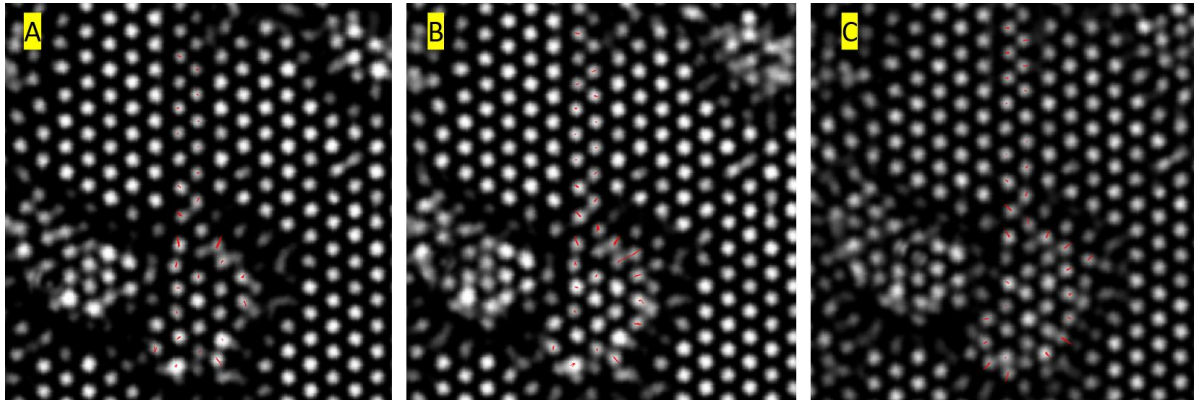
Obrázek 7.8 Měření 2: Krabicové grafy trakčních sil v průběhu 30 minut

7.3.3 Měření 3

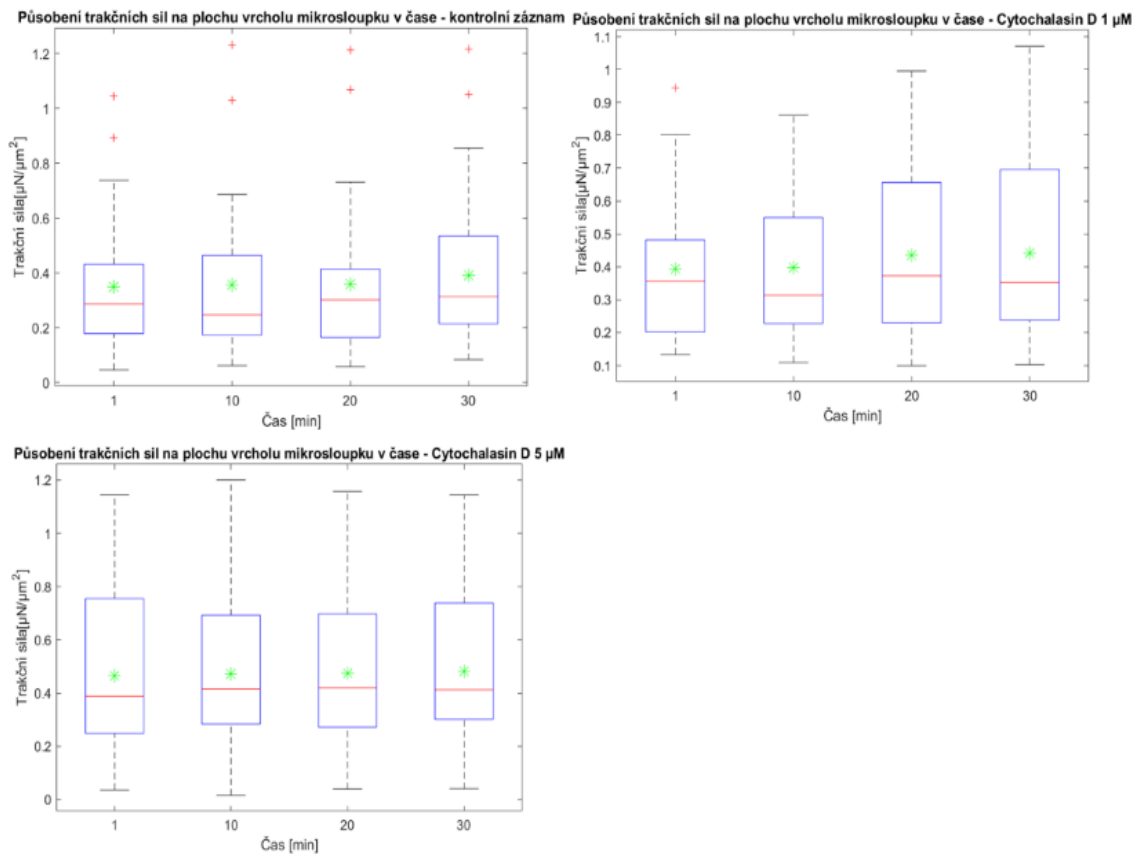
Buňka, vybraná pro měření 3 se nacházela vedle buňky, z předešlého měření (měření 2). Jelikož buňka byla nepravidelného tvaru s výběžkem, překrývala velké množství sloupků (kontrolní záznam 24 sloupků, Cytochalasin D 1 μM 28 sloupků a Cytochalasin D 5 μM 30 sloupků), oproti zbytku měřených buněk. Výběžek vedoucí směrem nahoru od buňky, lze vidět na obrázcích 7.9A až C, kde je znázorněný i posun sloupků. Sloupky se pod výběžkem velmi nevychylovaly, takže z obrázku není dobře viditelný jejich posun.

Výsledné hodnoty působících trakčních sil, vycházely podle prvotních předpokladů. V kontrolním záznamu vycházely průměrné hodnoty sil v jednotlivých časových úsecích nižší než při použití Cytochalasinu D, viditelné na obrázku 7.10. Rozdíl průměrné trakční síly při koncentraci Cytochalasinu D 1 μM a kontrolního záznamu je relativně malý. To je nejspíše způsobeno větším počtem odlehlých hodnot v kontrolním záznamu. Výsledné

hodnoty sil po přidání Cytochalasinu D v koncentraci 5 μM jsou v průměru větší než při použití koncentrace 1 μM .



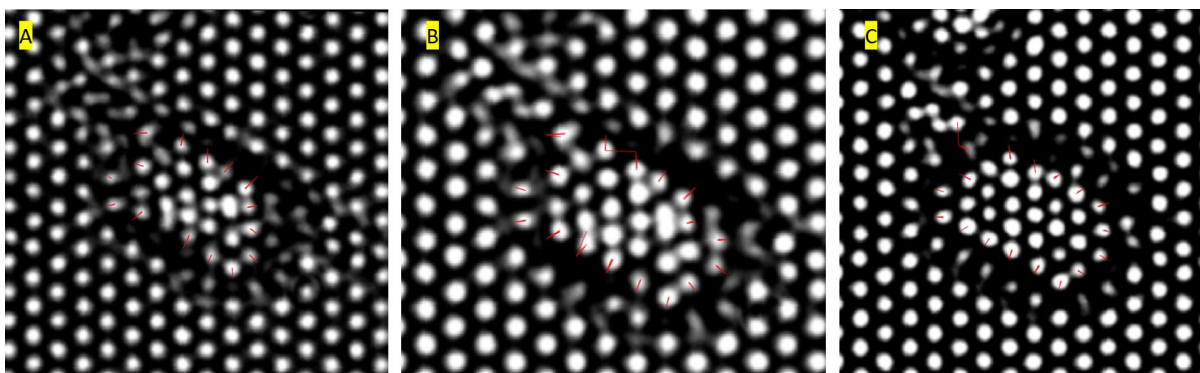
Obrázek 7.9 Měření 3: Zobrazení posunu sloupků v čase. A) Kontrolní záznam B) Cytochalasin D 1 μM C) Cytochalasin D 5 μM



Obrázek 7.10 Měření 3: Krabicové grafy trakčních sil v průběhu 30 minut

7.3.4 Měření 4

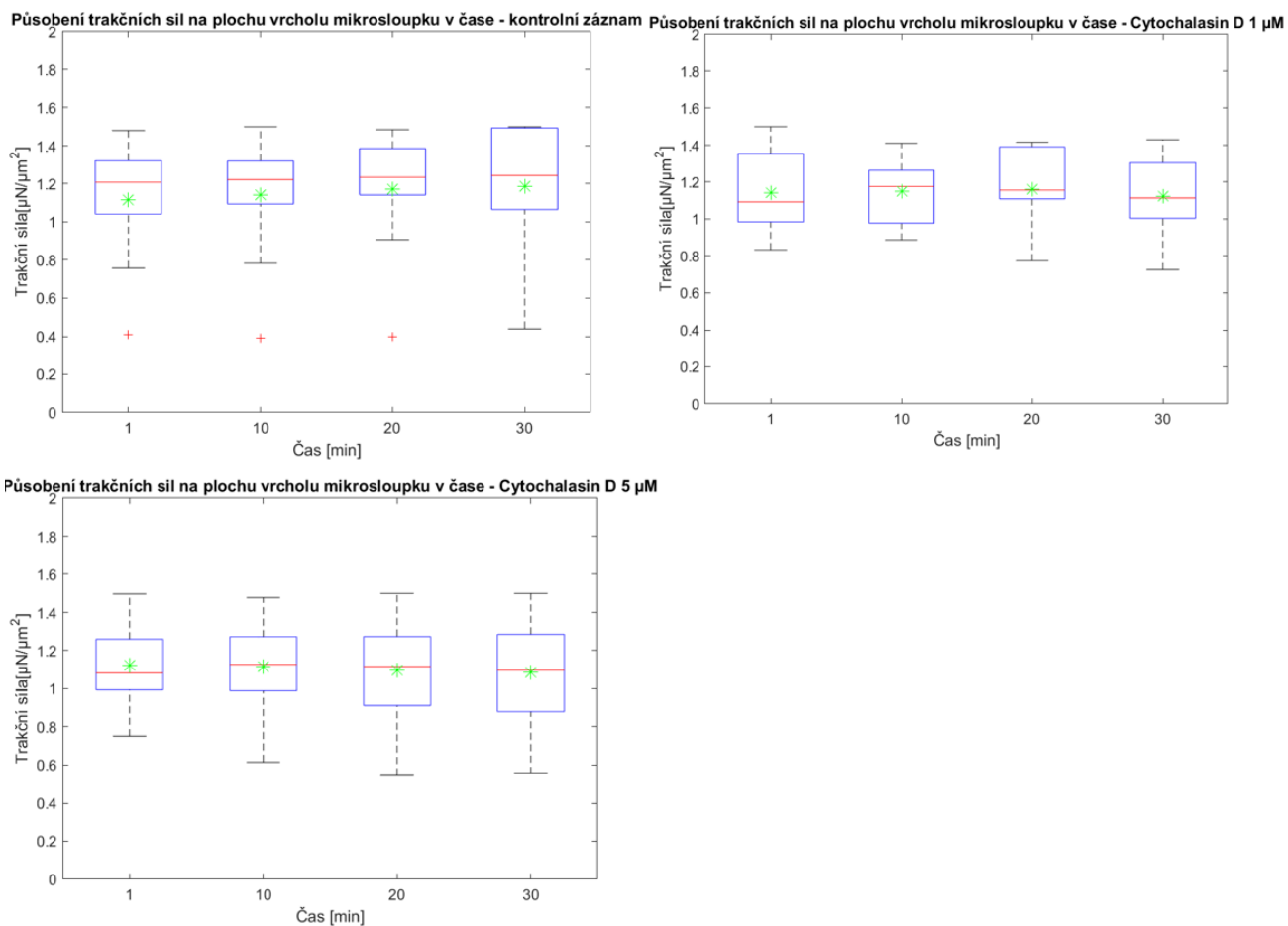
Čtvrtá z buněk byla vybrána z měření, kde byla použita fluorescenční barviva. Z důvodu nezobrazování ohybu takto obarvených sloupků na konfokálním mikroskopu, byl použit světelný mikroskop, jak bylo již dříve zmíněno. U kontrolního měření nebyly sloupky na okraji buňky ideálně zobrazovány, proto byly některé vynechány, jak lze vidět na obrázku 7.11A.



Obrázek 7.11 Měření 4: Zobrazení posunu sloupků v čase. A) Kontrolní záznam B) Cytochalasin D 1 μM C) Cytochalasin D 5 μM

Stejně jako v předešlých měření, zobrazují červené přímky v obrázcích 7.11 posun sloupku z nevychýlené polohy. Správně určený ohyb směřuje do středu buňky. Výpočet sil v kontrolním záznamu a při použití Cytochalasinu D 1 μM byl proveden z 10 sloupků a pro Cytochalasin 5 μM ze 13 sloupků.

Při výpočtu trakčních sil vycházely výsledné hodnoty proti předpokladům, jak lze vidět na obrázku 7.12. Hodnota průměrů trakčních sil v celém časovém úseku, při použití Cytochalasinu D v koncentraci 1 μM se velmi neliší od kontrolního záznamu. Při přidání Cytochalasinu D k buňkám, vyšla tato hodnota dokonce menší než bez použití stimulační látky. Zdá se, že buňka buď nebyla dobře adherována na sloupky, nebo odumírala.

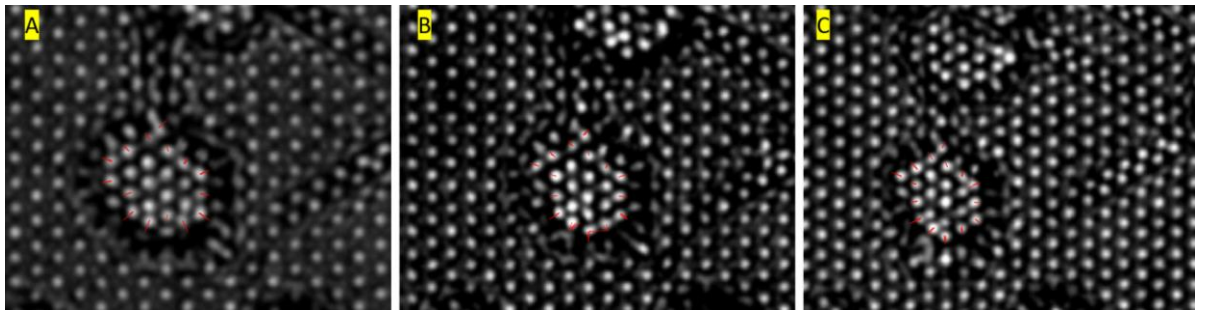


Obrázek 7.12 Měření 4: krabicové grafy trakčních sil v průběhu 30 minut

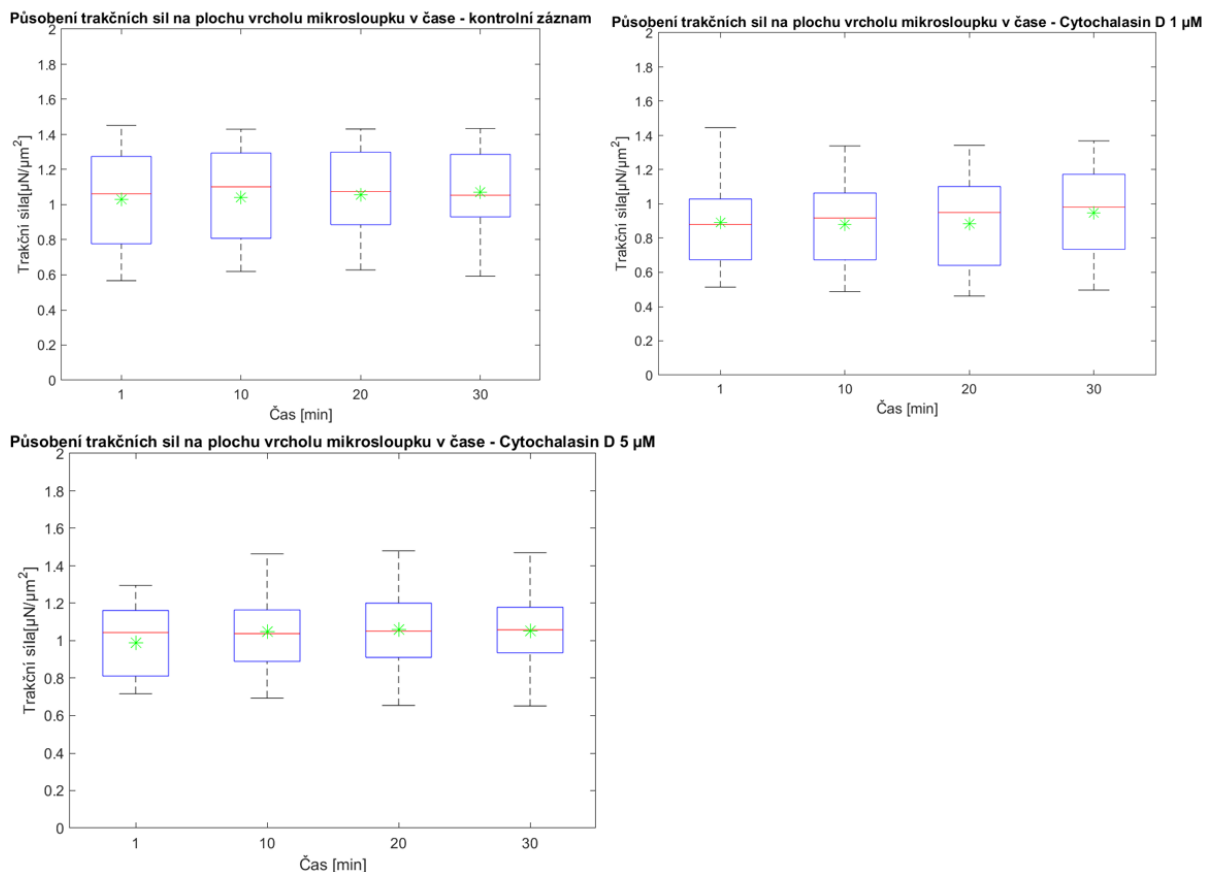
7.3.5 Měření 5

Buňka pro měření 5 byla vybrána ze stejného záznamu buněk jako u předešlého měření 4. I zde byla kvůli špatné viditelnosti některých sloupků způsobena chyba měření vzdálenosti, viditelné na obrázku 7.13A a B. Proto pro výsledný výpočet byly chybné hodnoty odstraněny. Pro kontrolní záznam bylo bráno 15 sloupků, pro Cytochalasin D 1 μM 13 sloupků a pro Cytochalasin D 5 μM 11 sloupků.

Už z obrázku 7.13A je pouhým okem patrné, že buňka působí větší trakční silou u kontrolního záznamu, než po přidání Cytochalasinu D 1 μM. To se potvrzuje i po přepočtu vzdálenosti na trakční sílu, viditelné na grafech obrázku 7.14. U tohoto měření vychází podle výchozích předpokladů větší trakční síla působící při použití Cytochalasinu D v koncentraci 5 μM oproti koncentraci 1 μM. Výsledek je nejspíše ovlivněn stejnými faktory, jako u měření 2, jelikož se jedná o buňku ze stejného záznamu.



Obrázek 7.13 Měření 5: zobrazení posunu sloupek v čase. A) Kontrolní záznam B) Cytochalasin D 1 μM C) Cytochalasin D 5 μM

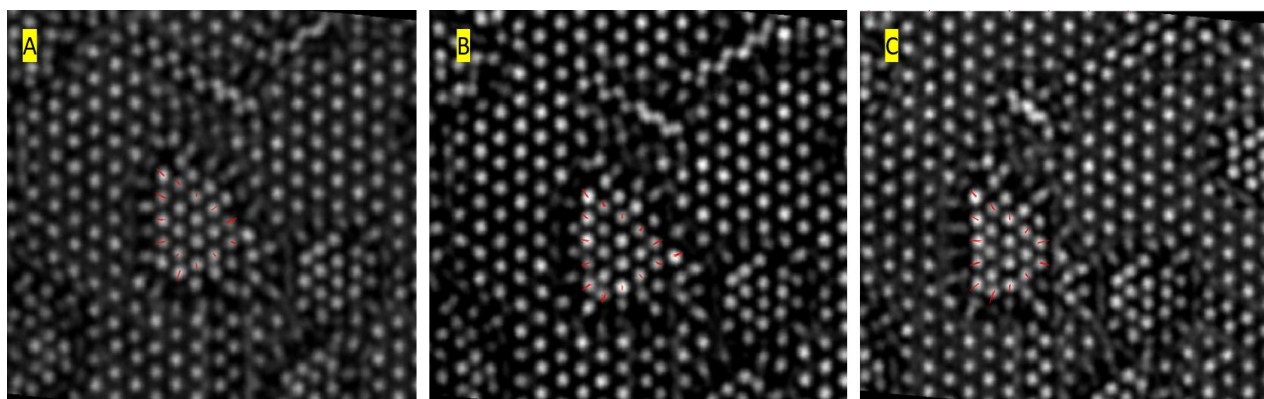


Obrázek 7.14 Měření 5: krabicové grafy trakčních sil v průběhu 30 minut

7.3.6 Měření 6

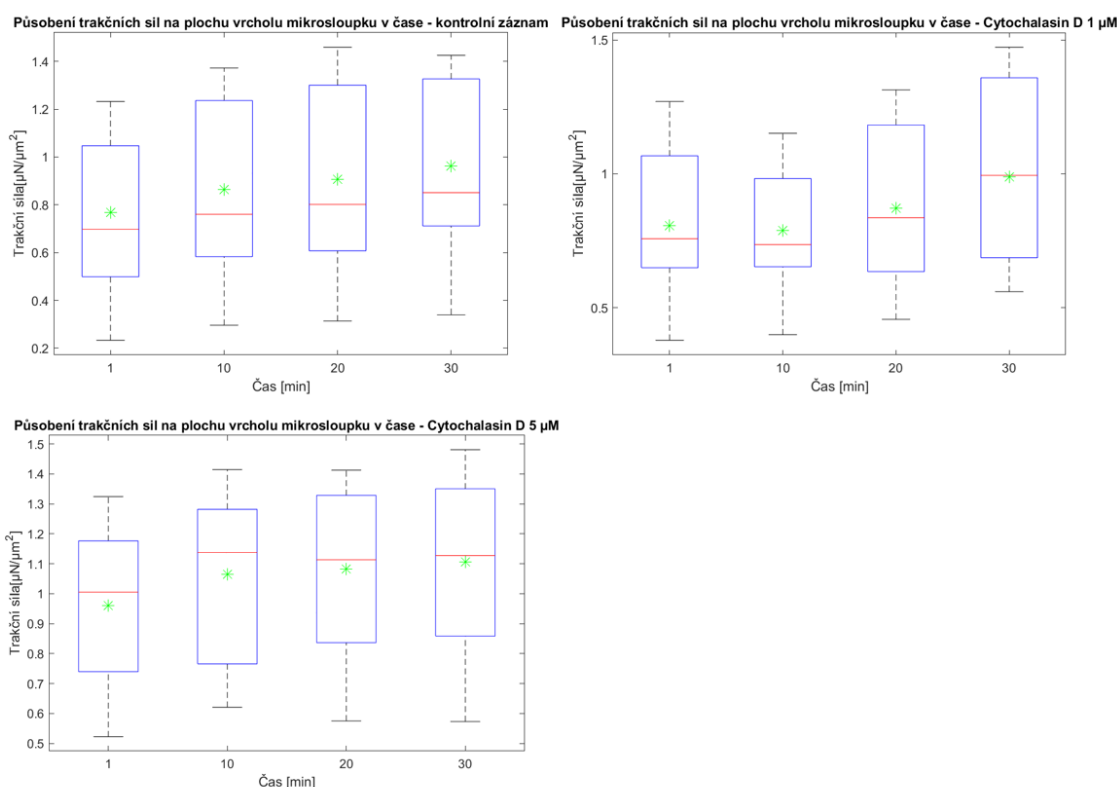
Pro měření 6 byla zvolena buňka, která pochází ze stejného záznamu jako buňky v měření

1-3. Z buňky byly zvoleny sloupky, které se nacházely na jejím okraji. Pro kontrolní záznam bylo do výsledného výpočtu velikosti trakčních sil generovaných buňkou vybráno 13 sloupků, pro koncentraci Cytochalasinu D 1 μM a 5 μM bylo vybráno sloupků 14. Znázornění ohybu sloupků pro různá měření je zobrazeno na obrázku 7.15A-C. Ohyb je znázorněný červenými přímkami a směřoval do středu buňky.



Obrázek 7.15 Měření 2: Zobrazení posunu sloupků v čase. A) Kontrolní záznam B) Cytochalasin D 1 μM C) Cytochalasin D 5 μM

Výsledné síly pro koncentraci Cytochalasinu D 5 μM byly podle výchozích předpokladů největší. Proti předpokladům vycházely síry pro měření použitím Cytochalasinu v koncentraci 1 μM . Průměrné hodnoty sil pro toto měření byly oproti kontrolnímu záznamu vyšší pouze v 1. a 30. minutě. Z grafu pro Cytochalasin 1 μM na obrázku 7.16, lze pozorovat, že v 10. minutě měření byla výsledná síla nejmenší. Celkově ze všech měření vyšla nejmenší průměrná síla pro kontrolní záznam v 1. minutě, což odpovídá výchozím předpokladům.



Obrázek 7.16 Měření 6: krabicové grafy trakčních sil v průběhu 30 minut

7.3.7 Souhrn trakčních sil ze všech buněk

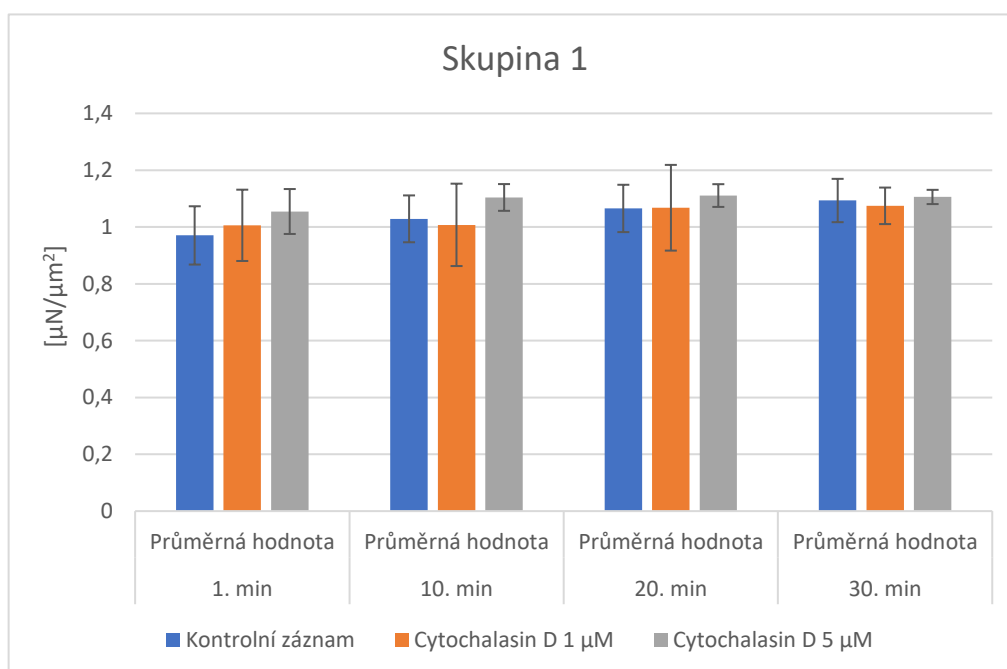
V tabulce 7.1 jsou vypsané průměrné hodnoty trakčních sil působících na plochu vrcholu mikro-sloupků z měření 1-6 v časových úsecích.

Tabulka 7.1 Souhrn mediánů trakčních sil z měření v různých časových úsecích

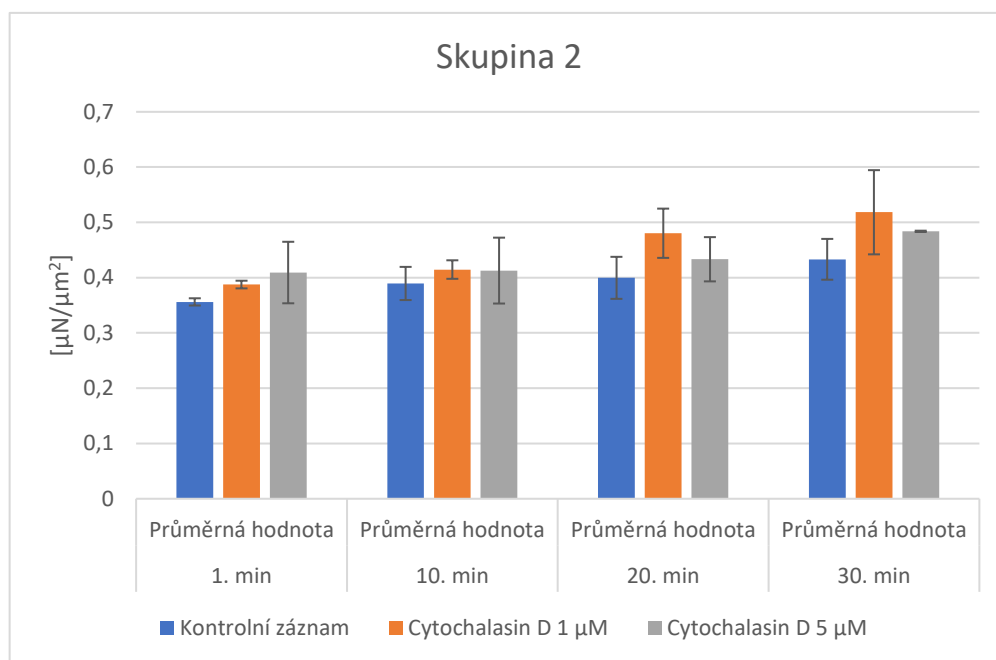
		Průměr 1. min [$\mu\text{N}/\mu\text{m}^2$]	Průměr 10. min [$\mu\text{N}/\mu\text{m}^2$]	Průměr 20. min [$\mu\text{N}/\mu\text{m}^2$]	Průměr 30. min [$\mu\text{N}/\mu\text{m}^2$]
1	Kontrolní záznam	0,9683 ± 0,2563	1,0703 ± 0,1619	1,1246 ± 0,1392	1,1527 ± 0,1579
	Cytochalasin D 1 μM	1,1210 ± 0,1433	1,1547 ± 0,0867	1,2756 ± 0,0735	1,3255 ± 0,1062
	Cytochalasin D 5 μM	1,1160 ± 0,2012	1,1476 ± 0,1724	1,1636 ± 0,1932	1,1241 ± 0,1818
2	Kontrolní záznam	0,3627 ± 0,1972	0,4195 ± 0,2138	0,4377 ± 0,2433	0,4701 ± 0,1757
	Cytochalasin D 1 μM	0,3806 ± 0,1444	0,4314 ± 0,1640	0,5249 ± 0,2507	0,5945 ± 0,2470
	Cytochalasin D 5 μM	0,3536 ± 0,1927	0,3532 ± 0,1127	0,3933 ± 0,1494	0,4850 ± 0,2631
3	Kontrolní záznam	0,3496 ± 0,2521	0,3595 ± 0,2985	0,3617 ± 0,2925	0,3963 ± 0,2928

	Cytochalasin D 1 μM	0,3945 \pm 0,2141	0,3979 \pm 0,2276	0,4358 \pm 0,2641	0,4422 \pm 0,2749
	Cytochalasin D 5 μM	0,4649 \pm 0,2943	0,4724 \pm 0,2871	0,4733 \pm 0,2865	0,4826 \pm 0,2952
4	Kontrolní záznam	1,1168 \pm 0,3223	1,1403 \pm 0,3340	1,1729 \pm 0,3248	1,1864 \pm 0,3279
	Cytochalasin D 1 μM	1,1419 \pm 0,2208	1,1504 \pm 0,1890	1,1617 \pm 0,2172	1,1250 \pm 0,2163
	Cytochalasin D 5 μM	1,1513 \pm 0,2105	1,1547 \pm 0,2051	1,1380 \pm 0,2263	1,1264 \pm 0,2407
5	Kontrolní záznam	1,0292 \pm 0,2877	1,0408 \pm 0,2644	1,0563 \pm 0,2574	1,0712 \pm 0,2569
	Cytochalasin D 1 μM	0,9353 \pm 0,2781	0,9304 \pm 0,2233	0,9383 \pm 0,2589	0,9984 \pm 0,2420
	Cytochalasin D 5 μM	0,9899 \pm 0,2033	1,0486 \pm 0,2289	1,0581 \pm 0,2258	1,0518 \pm 0,2127
6	Kontrolní záznam	0,7674 \pm 0,3118	0,8639 \pm 0,3875	0,9080 \pm 0,3989	0,9629 \pm 0,3935
	Cytochalasin D 1 μM	0,8256 \pm 0,3072	0,7948 \pm 0,2391	0,8956 \pm 0,3151	1,0222 \pm 0,3507
	Cytochalasin D 5 μM	0,9613 \pm 0,2646	1,0653 \pm 0,2802	1,0835 \pm 0,2792	1,1058 \pm 0,2874

Dle podobnosti hodnot průměrů trakčních sil byla měření rozdělena na dvě skupiny. Pro obě skupiny byly následně hodnoty zprůměrovány podle typu měření (kontrolní záznam, Cytochalasin D 1 μM , Cytochalasin D 5 μM) a časového bodu. Pro každý průměr byla vypočtena i odchylka. Tyto hodnoty byly zaneseny do grafů. Skupinu 1 tvoří měření 1, 4, 5 a 6 (obrázek 7.17) a skupinu 2 tvoří měření 2 a 3 (obrázek 7.18).



Obrázek 7.17 Skupina 1: sloupcový graf průměrných hodnot



Obrázek 7.18 Skupina 2: sloupcový graf průměrných hodnot

Menší hodnoty trakčních sil ve skupině 2, zobrazené na obrázku 7.18, jsou nejspíše způsobeny vzájemným vlivem buněk na sebe, jelikož se buňky nacházely přímo vedle sebe, což mohlo ovlivnit ohyb sloupků. Také u skupiny 2 byly brány sloupky, které se nacházely i ve středu buňky, což má na velikost trakční síly také vliv. Na obrázku 7.18 můžeme pozorovat mírné zvětšení trakčních sil po přidání Cytochalasinu D v koncentraci 1 µM oproti kontrolnímu záznamu. Při koncentraci 5 µM také síla narůstá oproti kontrolnímu záznamu, ale je nižší oproti koncentraci 1 µM.

Cytochalasin D by měl způsobit nárůst trakčních sil. Tento předpoklad se v práci nepotvrdil, jelikož jsou výsledky znehodnoceny poměrně velkými chybami u všech měření a nejsou statisticky významné. Jediná statisticky významná hodnota na hladině 0,05 vyšla v případě porovnání kontrolních hodnot z 1. a 30. minuty. Aby bylo možné z výsledků vyvodit významný trend, bylo by nutné zanalyzovat více buněk. Ze dvou provedených měření, kvůli kritériím výběru buněk, nebylo možné zpracovat větší množství buněk, aby bylo chování buněk dostatečně zhodnoceno.

8. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat rešerši na téma měření trakčních sil generovaných buňkami se zaměřením na mikro- a nano-sloupky a jejich výrobu, seznámit se s kultivací buněk (obecně i na mikro-sloupcích) a dále pomocí mikroskopických technik zaznamenat ohyby sloupků, které byly způsobené vlivy trakčních sil buněk. Následně provést analýzu obrazů za účelem změření velikosti ohybů jednotlivých sloupků, ze kterých byla poté vypočítána trakční síla generovaná buňkami působící na plochu vrcholu mikro-sloupku.

Rešerše je obsažena v prvních čtyřech kapitolách. Nejdříve je práce zaměřena na přiblížení pojmů souvisejících s mechanotransdukcí, jako je extracelulární matrix, fokální adheze, cytoskelet a trakční síla buněk. V druhé kapitole jsou představeny různé metody, kterými lze trakční síly určit a změřit. Součástí této kapitoly je i měření trakčních sil pomocí mikro- a nano-sloupků, na které je tato práce zaměřena. V další kapitole je rozebrána výroba sloupků z různých materiálů se zaměřením na výrobu z PDMS. Sloupky z Parylenu – C byly speciálně vyrobeny pro měření ohybu sloupků a následně k výpočtu trakčních sil generovaných buňkami, proto byla jejich výroba zahrnuta do praktické části práce. Poslední část rešerše je zaměřena na určení velikosti ohybu a následného výpočtu trakční síly. Pokud hodnoty trakčních sil jsou malé (do $1,5 \mu\text{N}$) využívá se k jejich výpočtu Hookův zákon. Při přesáhnutí této hodnoty je z důvodu nelineárního chování substrátu nutné k určení výsledné síly přistupovat jinak, jelikož se vychyluje i substrát. V případě menších deformací, a tím pádem i působením menších sil (do $1,5 \mu\text{N}$), lze působící trakční síly vypočítat jako součin konstanty pružnosti materiálu sloupků a velikosti deformace sloupku.

Pátá kapitola obsahuje praktickou část této práce. Obsahem této kapitoly je již zmíněná výroba sloupků z Parylenu-C, seznámení se s podmínkami kultivace buněk a následně i samotná kultivace na mikro-sloupcích. Buňky byly zobrazeny pomocí elektronového mikroskopu. Ze snímků bylo patrné, že sloupky mají vhodné parametry na určování velikosti trakčních sil, jelikož buňka byla schopná sloupky vychýlit z původních pozic. Dále byla také potvrzena životaschopnost buněk na sloupcích. Proto mohlo být přistoupeno k zobrazování buněk optickým mikroskopem, pomocí kterého byly získány snímky ke zpracování a následnému určování velikosti ohybu sloupků.

Zpracováním získaných snímků z optického mikroskopu se zabývá kapitola šestá. Hlavním cílem při zpracování obrazů bylo získání míry vychýlení sloupku z původní

pozice. Vychýlení bylo zkoumáno převážně u sloupků, které se nacházely pod vnějším okrajem buňky, jelikož sloupky blíže středu jsou vychylovány pouze minimálně anebo vůbec. Ke zpracování snímků z mikroskopu bylo použito programovací prostředí Matlab R2022b. Součástí skriptů je nastavení správného prahu pro vytvoření binárních map. Sloupky v obrazech byly světlejší než pozadí. Díky tomu bylo možné pomocí prahování určit vychýlenou i nevychýlenou pozici sloupků. Jasová hodnota některých sloupků nebyla dostatečná, proto byly brány jen sloupky, které bylo možné na obrazech rozlišit, a to ve všech třech částech jednoho měření (kontrolní záznam, použití Cytochalasinu D v koncentraci $1\mu\text{M}$ a v koncentraci $5\mu\text{M}$).

Poslední kapitola prezentuje výsledky jednotlivých měření. Celkově byla trakční síla měřena pro 6 různých buněk. Pro každou buňku byly provedeny tři záznamy ohybu sloupků: kontrolní záznam, použití stimulační látky Cytochalasin D v koncentraci $1\mu\text{M}$ a následně v koncentraci $5\mu\text{M}$. Velikost ohybu sloupků byla měřena pro čtyři časové úseky: 1. minuta, 10. minuta, 20. minuta a 30. minuta měření.

Provedením těchto měření bylo prokázáno, že buňky jsou schopny života na mikro-sloupcích a jsou schopné vyvinout dostatečně velké trakční síly k ohybu těchto sloupků. Dále bylo ověřeno, že buňka působí trakčními silami především v okrajových částech. Aby mohl být z měření vyvozen významný trend, bylo by nejspíše nutné buněk zpracovat mnohem více. K ověření schopnosti buňky vyvinout trakční síly a změřit jejich velikost je možné využít řadu různých metod. Využití mikro a nano-sloupků zajistí možnost zkoumání těchto sil u konkrétních buněk a ne jen jako jejich celku. Studium trakčních sil bude možné lépe pochopit mechanické vlastnosti buněk a tyto znalosti následně uplatnit např. ve výzkumu při diagnostikování nemocí.

LITERATURA

- [1] Y. Hao, S. Cheng, Y. Tanaka, Y. Hosokawa, Y. Yalikun, and M. Li, "Mechanical properties of single cells: Measurement methods and applications," *Biotechnology Advances*, vol. vol. 45, 2020, doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107648.
- [2] B. A. Nerger, M. J. Siedlik, and C. M. Nelson, "Microfabricated tissues for investigating traction forces involved in cell migration and tissue morphogenesis," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. vol. 74, no. issue 10, pp. 1819-1834, 2017.
- [3] N. Raman, S. A. M. Imran, K. B. Ahmad Amin Noordin, W. S. W. K. Zaman, and F. Nordin, "Mechanotransduction in Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Differentiation: A Review," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. vol. 23, no. issue 9, 2022.
- [4] C. Argentati *et al.*, "Insight into Mechanobiology: How Stem Cells Feel Mechanical Forces and Orchestrate Biological Functions," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. vol. 20, no. issue 21, 2019.
- [5] W. J. Polacheck and C. S. Chen, "Measuring cell-generated forces: a guide to the available tools," *Nature Methods*, vol. vol. 13, no. issue 5, pp. 415-423, 2016.
- [6] J. EYCKMANS, Thomas BOUDOU, Xiang YU a Christopher S. CHEN, "A Hitchhiker's Guide to Mechanobiology," *Developmental Cell [online]*, vol. 21, no. 1, pp. 35-47doi: 10.1016/j.devcel.2011.06.015.
- [7] J. D. Humphrey, E. R. Dufresne, and M. A. Schwartz, "Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. vol. 15, no. issue 12, pp. 802-812, 2014.
- [8] B. ALBERTS, *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, 1998.
- [9] M. T. Yang, J. Fu, Y.-K. Wang, R. A. Desai, and C. S. Chen, "Assaying stem cell mechanobiology on microfabricated elastomeric substrates with geometrically modulated rigidity," *Nature Protocols*, vol. vol. 6, no. issue 2, pp. 187-213, 2011.
- [10] E. ANTMEN, Utkan DEMIRCI a Vasif HASIRCI. , "Micropatterned Surfaces Expose the Coupling between Actin Cytoskeleton-Lamin/Nesprin and Nuclear Deformability of Breast Cancer Cells with Different Malignancies.," *Advanced Biology [online]*, vol. 5, no. 1, doi: 10.1002/adbi.202000048.
- [11] B. S. Tetsuro Wakatsuki, Nathan C. Thompson and Elliot L. Elson, " Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells," *Journal of Cell Science*, vol. 114, no. 5, pp. 1025-1036doi: 10.1242/jcs.114.5.1025.
- [12] J. H.-C. Wang and J.-S. Lin, "Cell traction force and measurement methods," *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, vol. vol. 6, no. issue 6, pp. 361-371, 2007.
- [13] E. Zamir, B. Geiger, and J. E. Schaffer, "Cell-Cell Interaction | Focal Adhesions and Related Integrin Contacts," in *Encyclopedia of Biological Chemistry III*: Elsevier, 2021, pp. 716-721.
- [14] K. NAGAYAMA, Akifumi ADACHI a Takeo MATSUMOTO, "Heterogeneous response of traction force at focal adhesions of vascular smooth muscle cells subjected to macroscopic stretch on a micropillar substrate," *Journal of*

- Biomechanics [online]*, vol. 44, no. 15, pp. 2699-2705doi: 10.1016/j.jbiomech.2011.07.023.
- [15] K. A. a. Y.-L. W. BENINGO, "Flexible substrata for the detection of cellular traction forces," *Trends in Cell Biology [online]*, vol. 12(2), pp. 79-84doi: 10.1016/S0962-8924(01)02205-X.
- [16] A. K. HARRIS, Patricia WILD a David STOPAK, "Silicone Rubber Substrata: A New Wrinkle in the Study of Cell Locomotion," *Science [online]*, vol. 208, no. 4440, pp. 177-179doi: 10.1126/science.6987736.
- [17] C. M. KRANING-RUSH, Shawn P. CAREY, Joseph P. CALIFANO a Cynthia A. REINHART-KING, "Quantifying Traction Stresses in Adherent Cells," *Computational Methods in Cell Biology [online]*: Elsevier, 2012, pp. 139-178.
- [18] Z. FENG, Y. WAGATSUMA, S. KOBAYASHI, T. KOSAWADA, D. SATO, T. NAKAMURA, T. KITAJIMA a M. UMEZU, "Analysis of the contraction of fibroblast-collagen gels and the traction force of individual cells by a novel elementary structural model.," *2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC) [online]*, pp. 6232-6235, 2013, doi: 10.1109/EMBC.2013.6610977.
- [19] R. T. TRANQUILLO, Mohammed A. DURRANI a Alice G. MOON, "Tissue engineering science: Consequences of cell traction force," *Cytotechnology [online]*, vol. 10(3), pp. 225-250doi: 10.1007/BF00146673.
- [20] J. A. MULLIGAN, François BORDELEAU, Cynthia A. REINHART-KING a Steven G. ADIE "Traction Force Microscopy for Noninvasive Imaging of Cell Forces.," *Biomechanics in Oncology [online]*. C. DONG, Nastaran ZAHIR a Konstantinos KONSTANTOPOULOS, ed., Ed., Cham: Springer International Publishing, 2018, pp. 319-349.
- [21] M. Lekka, K. Gnanachandran, A. Kubiak, T. Zieliński, and J. Zemła, "Traction force microscopy – Measuring the forces exerted by cells," *Micron*, vol. vol. 150, 2021.
- [22] S. Even-Ram and K. M. Yamada, "Cell migration in 3D matrix," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. vol. 17, no. issue 5, pp. 524-532, 2005.
- [23] J. L. TAN, Joe TIEN, Dana M. PIRONE, Darren S. GRAY, Kiran BHADRIRAJU a Christopher S. CHEN, "Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force," *Proceedings of the National Academy of Sciences [online]*, vol. 100, no. 4, pp. 1484-1489doi: 10.1073/pnas.0235407100.
- [24] S. S. HUR, Ji Hoon JEONG, Myung Jin BAN, Jae Hong PARK, Jeong Kyo YOON a Yongsung HWANG., "Traction Force Microscopy for Understanding Cellular Mechanotransduction," *BMB Reports [online]*. vol. 53, no. 2, pp. 74-81doi: 10.5483/BMBRep.2020.53.2.308.
- [25] L. AOUN, Pierre WEISS, Adrian LABORDE, Bernard DUCOMMUN, Valérie LOBJOIS a Christophe VIEU., "Microdevice arrays of high aspect ratio poly(dimethylsiloxane) pillars for the investigation of multicellular tumour spheroid mechanical properties," *Lab Chip [online]*, vol. 14, no. 13, pp. 2344-2353doi: ISSN 1473-0197. Dostupné z: doi:10.1039/C4LC00197D.
- [26] M. Gupta, L. Kocgozlu, B. R. Sarangi, F. Margadant, M. Ashraf, and B. Ladoux, "Micropillar substrates: A tool for studying cell mechanobiology," in *Biophysical Methods in Cell Biology*: Elsevier, 2015, pp. 289-308.
- [27] N. BUCH-MÄNSON, Arnaud SPANGENBERG, Laura Piedad Chia GOMEZ, Jean-Pierre MALVAL, Olivier SOPPERA a Karen L. MARTINEZ, "Rapid

- Prototyping of Polymeric Nanopillars by 3D Direct Laser Writing for Controlling Cell Behavior," *Scientific Reports*, doi: 10.1038/s41598-017-09208-y.
- [28] X. TU, Jin WEI, Bin WANG, Yadong TANG, Jian SHI a Yong CHEN., "Patterned parylene C for cell adhesion, spreading and alignment studies," *Microelectronic Engineering [online]*, vol. 175, pp. 56-60doi: 10.1016/j.mee.2017.01.013.
- [29] J. HU, Yan-Jun LIU, Jian SHI, Li WANG, Matthieu PIEL a Yong CHEN, "Effect of oblique polymer pillars on spreading and elongation of rat mesenchymal stem cells.," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces [online]*, vol. 183, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110485.
- [30] J. T. BORENSTEIN, "Tissue Engineering," *Comprehensive Microsystems [online]*: Elsevier, 2008, pp. 541-583.
- [31] H. SHINOHARA, Hiroshi GOTO, Takashi KASAHARA a Jun MIZUNO., "Fabrication of a Polymer High-Aspect-Ratio Pillar Array Using UV Imprinting," *Micromachines [online]*, pp. 157-167doi: 10.3390/mi4020157.
- [32] B. GUAN, Jing-Hong PAI, Mark CHERRILL, Billy MICHALATOS a Craig PRIEST, "Injection moulding of micropillar arrays: a comparison of poly(methyl methacrylate) and cyclic olefin copolymer.," *Microsystem Technologies [online]*, pp. 2083-2091doi: 10.1007/s00542-022-05350-4.
- [33] A. SAEZ, E ANON, M GHIBAUDO, et al. , "Traction forces exerted by epithelial cell sheets," *Journal of Physics: Condensed Matter [online]*, vol. 22, no. 19, doi: ISSN 0953-8984. Dostupné z: doi:10.1088/0953-8984/22/19/194119.
- [34] Q. LI, Ekta MAKHIJA, F.M. HAMEED a G.V. SHIVASHANKAR., "Micropillar displacements by cell traction forces are mechanically correlated with nuclear dynamics," *Biochemical and Biophysical Research Communications [online]*, vol. 461, no. 2, pp. 372-377doi: ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2015.04.041.
- [35] M. GHIBAUDO, Jean-Marc DI MEGLIO, Pascal HERSEN a Benoit LADOUX., "Mechanics of cell spreading within 3D-micropatterned environments," vol. 11, no. 5, pp. 805-812doi: ISSN 1473-0197. Dostupné z: doi:10.1039/C0LC00221F.
- [36] O. DU ROURE, Peter WOIAS, Ian PAPAUTSKY, et al., "Microfabricated arrays of elastomeric posts to study cellular mechanics," *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering [online]*, doi: 10.1117/12.530688.
- [37] M. GHIBAUDO, Alexandre SAEZ, Léa TRICHET, Alain XAYAPHOUMMINE, Julien BROWAEYS, Pascal SILBERZAN, Axel BUGUIN a Benoît LADOUX., "Traction forces and rigidity sensing regulate cell functions," *Soft Matter [online]*, vol. 4, no. 9, doi: ISSN 1744-683X. Dostupné z: doi:10.1039/b804103b.
- [38] Z. FOHLEROVA, Peter FECKO, Imrich GABLECH a Zuzana KOSELOVA., "High aspect ratio Parylene C micropillars formed by molding and ION-BEAM etching method," presented at the 13th International Conference on Nanomaterials - Research & Application, Brno, Czech Republic, 2021.
- [39] A. Ghanbari, V. Nock, S. Johari, R. Blaikie, X. Chen, and W. Wang, "A micropillar-based on-chip system for continuous force measurement of *C. elegans*," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. vol. 22, no. issue 9, 2012.
- [40] L. CHMELIKOVA, Peter FECKO, Jiri CHMELIK, Josef SKACEL, Alexandr OTAHAL a Zdenka FOHLEROVA " Demolded hollow high aspect-ratio

- parylene-C micropillars for real-time mechanosensing applications," *Applied Materials Today* vol. 31, doi: 10.1016/j.apmt.2023.101736.
- [41] I. Schoen, W. Hu, E. Klotzsch, and V. Vogel, "Probing Cellular Traction Forces by Micropillar Arrays: Contribution of Substrate Warping to Pillar Deflection," *Nano Letters*, vol. vol. 10, no. issue 5, pp. 1823-1830, 2010.
- [42] P. PAPADOPOULOS, Bat-El PINCHASIK, Martin TRESS, Doris VOLLMER, Michael KAPPL a Hans-Jürgen BUTT., "Wetting of soft superhydrophobic micropillar arrays.," *Soft Matter [online]*, vol. 14, no. 36, pp. 7429-7434doi: 10.1039/C8SM01333K.
- [43] S. GHASSEMI, N. BIAIS, K. MANIURA, S. J. WIND, M. P. SHEETZ a J. HONE., "Fabrication of elastomer pillar arrays with modulated stiffness for cellular force measurements," *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures [online]*, vol. 26, no. 6, pp. 2549-2553doi: Dostupné z: doi:10.1116/1.3013424.
- [44] E. J. HEARN, "SIMPLE STRESS AND STRAIN," *Mechanics of Materials 1 [online]*, 1997, pp. 1-26.
- [45] J.-O. Carlsson and P. M. Martin, "Chemical Vapor Deposition," in *Handbook of Deposition Technologies for Films and Coatings*: Elsevier, 2010, pp. 314-363.
- [46] X. LIU, Peter FECKO, Zdenka FOHLEROVÁ, Tomáš KARÁSEK, Jan PEKÁREK a Pavel NEUŽIL., " Parylene micropillars coated with thermally grown SiO₂," *Journal of Vacuum Science & Technology B [online]*, vol. 38, no. 6, doi: Dostupné z: doi:10.1116/6.0000558.
- [47] Z. F. Fohlerová, P.; Gablech, I.; Košelová, Z. , "High aspect ratio Parylene C micropillars formed by molding and ION-BEAM etching method," in *In NANOCON Conference Proceedings - International Conference on Nanomaterials.* , Tanger, 2022, pp. 1-4.
- [48] A. MEHDIZADEH KASHI, Kobra TAHEMANESH, Shahla CHAICHIAN, et al., "How to Prepare Biological Samples and Live Tissues for Scanning Electron Microscopy (SEM)," *Galen Medical Journal [online]*, vol. 3, no. 2, pp. 63-80doi: 10.31661/gmj.v3i2.267.

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

Zkratky:

cFA	klasická fokální adheze
CVD	chemické napařování
DRIE	hluboké reaktivní iontové leptání
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FA	fokální adheze
MTS	mikroskopie trakčních sil
PA	polyakrylamid
PBS	fosfátový pufr
PC	polykarbonát
PDMS	polydimethylsiloxan
PLA	polylaktid
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné
PMMA	polymethylmethakrylát
pN	pikonewton
PS	polystyrene
SEM	skenovací elektronový mikroskop
suFA	super-zralá fokální adheze
UV	ultrafialový

Symboly:

F	síla	(μN)
k_{bend}	konstanta pružnosti materiálu	(N/m)
δ	deformace	(μm)
E	Youngův modul	(Pa)
L	výška	(μm)
D	průměr	(μm)
r	poloměr	(μm)
σ	napětí	(Pa)
ε	relativní prodloužení	(-, %)

Δl	prodloužení materiálu	(μm)
l	původní délka	(μm)
ν	Poissonovo číslo	(-)
ε_y	poměrná deformace materiálu v příčném směru	(-)
ε_x	poměrná deformace v podélném směru	(-)
$T_{\text{náklon}}$	koefficient náklonu substrátu	(-)
a	multiplikační konstanta	(-)
δ_{celk}	celková deformace sloupku a substrátu	(nm)
δ_{sloupek}	deformace sloupku	(nm)
$\delta_{\text{substrát}}$	deformace substrátu	(nm)
δ_{ohyb}	ohyb sloupku	(nm)
δ_{posun}	posun sloupku	(nm)
$\delta_{\text{náklon}}$	náklon sloupku	(nm)
$\delta_{\text{dislokace}}$	boční posun základny sloupku	(nm)
δ_{celk}^*	celková deformace sloupku a substrátu bez bočního posunu	(nm)