

**M A S A R Y K O V A
U N I V E R Z I T A**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

3D kultivace kmenových buněk v mikrofluidních systémech

Bakalářská práce

VOJTĚCH HRADIL

Vedoucí práce: Ing. Josef Jaroš, Ph.D.

Ústav experimentální biologie

Brno 2019

Bibliografický záznam

Autor:	Vojtěch Hradil Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie
Název práce:	3D kultivace kmenových buněk v mikrofluidních systémech
Studijní program:	Experimentální biologie
Studijní obor:	Molekulární biologie a genetika
Vedoucí práce:	Ing. Josef Jaroš, Ph.D.
Akademický rok:	2018/2019
Počet stran:	61
Klíčová slova:	3D kultivace; mikrofluidika; mikrofluidní systémy; kmenové buňky; proliferace; diferenciacce; organs-on-a-chip

Bibliographic Entry

Author: Vojtěch Hradil
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: 3D stem cell culture in microfluidic systems

Degree programme: Experimental Biology

Field of Study: Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Ing. Josef Jaroš, Ph.D.

Academic Year: 2018/2019

Number of Pages: 61

Keywords: 3D cultivation; microfluidics; microfluidic systems; stem cells; proliferation; differentiation; organs-on-a-chip

Abstrakt

Mikrofluidika je věda zabývající se tokem kapalin malých objemů. Mikrofluidní systémy jsou zařízení skládající se z mikrokanálků, v nichž je tok kapalin studován. V těchto systémech mohou být kontrolovány jednotlivé parametry jako je tok média, tlak uvnitř mikrokanálků či nejrůznější gradienty. Z těchto důvodů se mikrofluidní systémy začaly používat i pro kultivaci buněk. Optimalizací jednotlivých podmínek můžeme studovat mezibuněčnou komunikaci, proliferaci či diferenciaci. V mikrofluidních systémech mohou být simulovány také celé orgány a tyto systémy mohou také sloužit ke studiu nejrůznějších onemocnění nebo účinků léčiv. V této práci bude pozornost zaměřena na 3D kultivaci a diferenciaci kmenových buněk v těchto systémech.

Abstract

Microfluidics is a science that deals with small volumes of liquids. Microfluidic systems are devices composed of microchannels in which flow of liquids is studied. In these systems, individual parameters such as medium flow, pressure inside microchannels or various gradients can be controlled. For these reasons, microfluidic systems have found applications in cell cultivation. Optimization of individual parameters enables us to study intercellular communication, proliferation and differentiation. In microfluidic systems, whole organs can be simulated and the systems can as well be utilized for studying various diseases or drug effects. This Bachelor Thesis is focused on 3D cultivation and differentiation of stem cells in these systems.



MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Akademický rok: 2018/2019

Ústav: Ústav experimentální biologie
Student: Vojtěch Hradil
Program: Experimentální biologie
Obor: Molekulární biologie a genetika

Ředitel Ústavu experimentální biologie PTF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s názvem:

Název práce: 3D kultivace kmenových buněk v mikrofluidních systémech

Název práce anglicky: 3D stem cell culture in microfluidic systems

Oficiální zadání:

Mikrofluidní systémy jsou v současnosti účinným nástrojem ke studiu chování kmenových buněk, jejich expanze a diferenciaci do specifické buněčné linie a typu tkáně. Řízením parametrů mikroprostředí (např. prostorové uspořádání komůrek, proudění, složení kultivačních medií, gradient molekul) lze kmenové buňky prostorově ovlivňovat a řídit jejich odezvu. Cílem bakalářské práce bude provést literární rešerši vybraných mikrofluidních systémů určených ke 3D kultivaci a diferenciaci lidských kmenových buněk. Dále pak definovat klíčové parametry mikrofluidních systémů a srovnání se standardní planární kultivací.

Jazyk závěrečné práce: čeština

Vedoucí práce: Ing. Josef Jaroš, Ph.D.

Datum zadání práce: 8. 10. 2018

V Brně dne: 6. 11. 2018

Souhlasím se zadáním (podpis, datum):

.....
Vojtěch Hradil
student

.....
Ing. Josef Jaroš, Ph.D.
vedoucí práce

.....
prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.
ředitel Ústavu experimentální
biologie

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat Ing. Josefu Jarošovi, Ph.D. za nabídnutí inspirativního tématu a poskytnuté rady během jeho zpracovávání. Současně bych rád poděkoval trojici Mgr. Haně Hradilové, Petru Maníkovi a Kateřině Slánské za jejich drobné, avšak věcné připomínky.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracoval samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány. Text práce jsem vypracoval podle pravidel a zodpovídám za jeho jazykovou správnost.

Brno, 9. května 2019

.....
Vojtěch Hradil

OBSAH

1. Úvod.....	11
2. Mikrofluidní systémy a jejich klíčové parametry.....	12
2.1. Srovnání mikrofluidních systémů se standardní planární kultivací.....	12
2.2. Koncentrační gradient.....	13
2.3. Vliv proudění média	15
2.4. Tlak uvnitř mikrokanálků	16
3. Výroba mikrofluidních chipů.....	17
4. Kmenové buňky a jejich diferenciaci.....	18
5. Členění mikrofluidních systémů.....	21
5.1. Systémy pro studium mezibuněčné komunikace.....	22
5.2. Systémy pro tkáňově specifickou buněčnou diferenciaci.....	25
5.2.1. Epitelová tkáň.....	27
5.2.2. Pojivová tkáň.....	28
5.2.3. Svalová tkáň	30
5.2.4. Nervová tkáň	32
5.3. Systémy pro formování 3D buněčných kultur.....	33
5.4. Organs-on-a-chip	37
5.4.1. Lung-on-a-chip	38
5.4.2. Liver-on-a-chip.....	40
5.4.3. Kidney-on-a-chip.....	41
5.4.4. Heart-on-a-chip.....	41
5.4.5. Human-on-a-chip.....	43
5.4.6. Disease-on-a-chip	43
6. Závěr.....	45
7. Literatura.....	47

Seznam použitých zkratk

2D	Dvourozměrné
3D	Trojrozměrné
Ac-LDL	Acetylovaný nízkodenzitní lipoprotein
ALP	Alkalická fosfatáza
ALS	Amyotrofická laterální skleróza
ASC	Adultní kmenové buňky
DP	Diferenciační potenciál
EC	Endoteliální buňky
ECIS	Metoda měření elektrického odporu na rozhraní buňka-substrát
ECM	Extracelulární matrix
EGF	Epidermální růstový faktor
EpC	Epiteliální buňky
ESC	Embryonální kmenové buňky
ETRIC	Zařízení s rovnostranným trojúhelníkovým kanálkem
FGF	Fibroblastový růstový faktor
GF	Růstové faktory
hASC	Lidské kmenové buňky derivované z tukové tkáně
HCl	Kyselina chlorovodíková
hESC	Lidské embryonální kmenové buňky
HF	Kyselina fluorovodíková
hPSC	Lidské pluripotentní kmenové buňky
μ CCA	Mikroanalog buněčné kultury
mEF	Myší embryonální fibroblasty
mESC	Myší embryonální kmenové buňky

MSC	Mezenchymální kmenové buňky
MTF	Muscular thin film (= kultivace svalových buněk na membráně v jediné vrstvě)
NSC	Neurální kmenové buňky
NPC	Neurální progenitorové buňky
OC	Oligodendrocyty
Oct4	Oktamer vázající transkripční faktor 4
PEG	Polyethylenglykol
PDMS	Polydimethylsiloxan
PK-PD	Farmakokinetické-farmakodynamické
PCR	Polymerázová řetězová reakce
SC	Kmenové buňky
UV	Ultrafialové

1. Úvod

Mikrofluidika je věda zabývající se tokem kapalin malých objemů. Jedná se o relativně nový vědní obor, jehož popularita je v posledních letech na vzestupu. Mikrofluidní systémy jsou zařízení skládající se z mikrokanálek a mikrokomůrek, v nichž je tok kapalin studován. Jednou z hlavních výhod těchto systémů je možnost přesné kontroly nejrůznějších parametrů v čele s kontrolou toku média, tlaku uvnitř mikrokanálek a nejrůznějších gradientů. Vhodnou optimalizací jednotlivých podmínek můžeme studovat mezibuněčnou komunikaci, proliferaci či diferenciaci. Rostoucí obliba těchto systémů je úzce spjatá s jejich širokým uplatněním. Mikrofluidní systémy jsou využívány jednak pro základní výzkum, ale také postupně nacházejí široké uplatnění v oblastech aplikovaného výzkumu, což ještě zvyšuje jejich popularitu.

Následující práce si klade za cíl v teoretické rovině komplexně zmapovat tuto problematiku. V první části budou nejprve charakterizovány nejdůležitější parametry těchto systémů a vysvětleny jejich výhody oproti standardním kultivacím. V další části budou představeny jednotlivé systémy se zaměřením na 3D kultivaci a diferenciaci kmenových buněk, jejich výhody i limitace. V poslední části budou představeny základní modely organs-on-a-chip sloužící k simulaci lidských orgánů, které nacházejí uplatnění zejména v oblasti studia chování léčiv a pro simulace nejrůznějších onemocnění.

2. Mikrofluidní systémy a jejich klíčové parametry

Mikrofluidní systémy jsou oblíbeným a stále se rozvíjejícím nástrojem majícím široké multidisciplinární uplatnění, a to nejen v oblasti biologie, ale také chemie nebo fyziky. Jejich oblíbenost spočívá zejména v možnosti přesné kontroly a řízení jednotlivých parametrů, díky nimž nachází tyto systémy tak široké uplatnění. Po představení odlišností prostorových kultivací v mikrofluidních systémech od standardních planárních kultivací si ve stručnosti představíme také jejich klíčové parametry.

2.1. Srovnání mikrofluidních systémů se standardní planární kultivací

Buněčné kultury mohou být *in vitro* realizovány dvěma hlavními způsoby, a sice planární 2D kultivací nebo prostorovou 3D kultivací. Standardní planární kultivace jsou již po dlouhou dobu využívány ke studiu jak jednotlivých typů buněk, tak i pro komplexnější metody zahrnující testování léčiv. Princip spočívá v kultivaci buněk na plochem povrchu (který představuje například Petriho miska) s vhodným vyživujícím médiem pro buňky (Haycock, 2011). Přestože se jedná o velice jednoduchý způsob, bylo s jeho pomocí objeveno mnoho důležitých poznatků (Haskill and Moore, 1970).

Nicméně vzhledem tomu, že buňky se *in vivo* nacházejí v prostorovém uspořádání, pak planární kultivace logicky nejsou úplně nejvhodnějším nástrojem pro jejich studium, jelikož nejsou schopny dostatečně věrně reflektovat komplexitu buněčných interakcí, ani prostředí, v němž se buňky *in vivo* nacházejí (Ravi et al., 2015). Bylo ukázáno, že výsledky z planárních experimentů by mohly poskytovat nerealistická a nekompletní data, která by mohla vést k dezinterpretaci a následné chybné aplikaci *in vivo* (Kim et al., 2014).

Z tohoto pohledu by se mohlo jevit jako ideální provádět výzkum přímo *in vivo*, kde je komplexita všech komponent zajištěna. Nicméně takové studie často naráží na problémy bioetické. Kromě toho by takový výzkum byl nesmírně obtížný, neboť v organismu *in vivo* na sebe působí mnohem více faktorů, než kolik jsme schopni současně sledovat. Z důvodu tak velké komplexity by naměřená data mohla, ale současně nemusela být relevantní, a tedy vést k nesprávným závěrům, či přímo znemožňovat jejich dosažení (Kim et al., 2014).

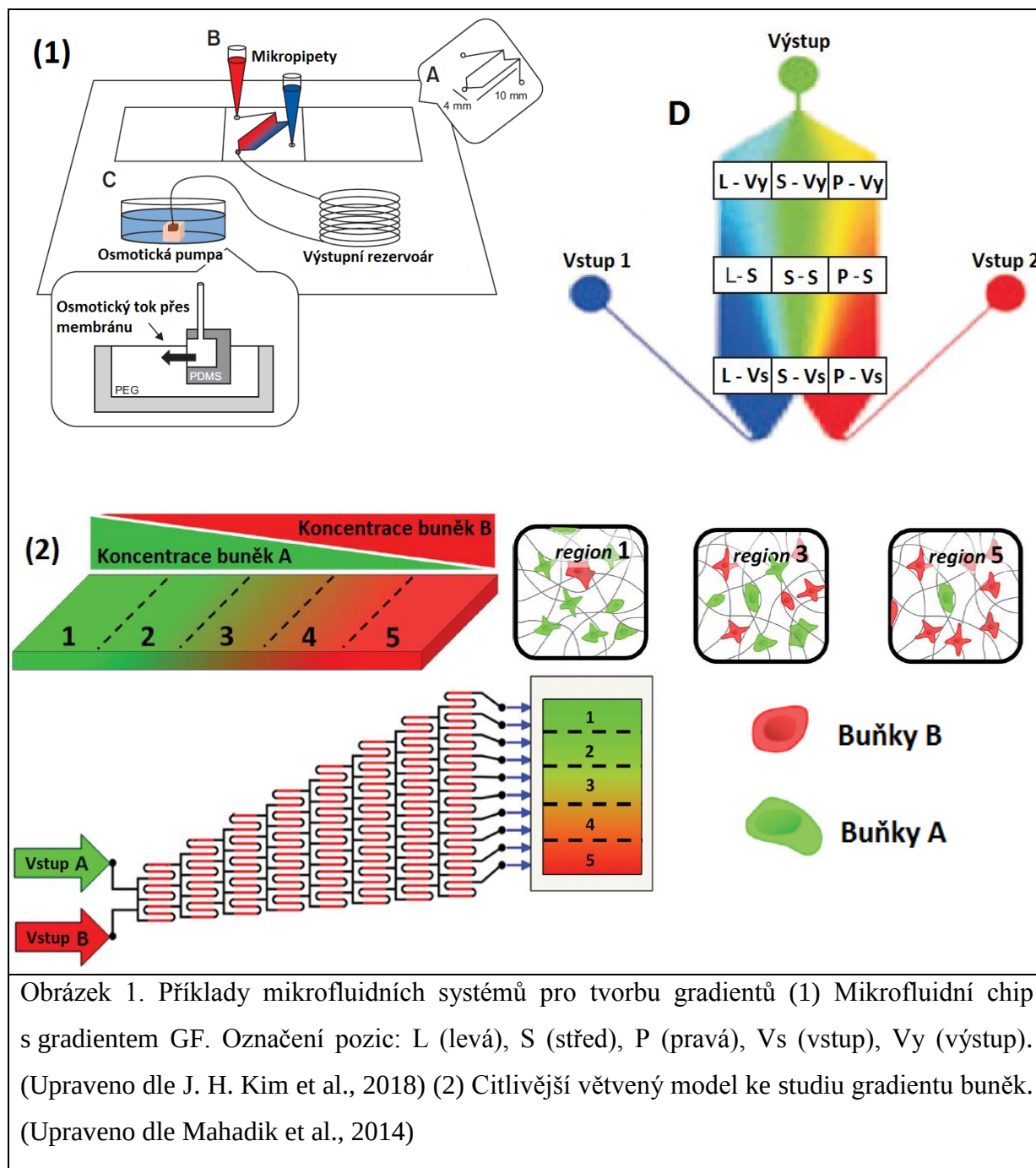
Z těchto důvodů se vědci v posledních dekádách věnují 3D kultivaci *in vitro*, neboť ta (na rozdíl od 2D kultivací) lépe reflektuje morfologii i fyziologii podmínek *in vivo* a umožňuje zaměřit se na konkrétní faktory našeho zájmu (Kim et al., 2014). Ve 3D kultivačních systémech mohou být též začleněny nejrůznější mikrokomponenty jako jsou pumpy, chlopně, elektrody, membrány a mnoho dalších, což opět pomáhá lepšímu napodobení podmínek *in vivo* (Huh et al., 2011). Dalšími podstatnými výhodami je možnost ko-kultivace různých buněčných typů v jediném zařízení (Chen et al., 2013; Osaki et al., 2018), snazší kontrola parametrů jako jsou teplota, gradienty, pH, atd. (Chen et al., 2016; Fok and Zandstra, 2005) a zejména možnost kultivace za přítomnosti toku média, která se ukázala jako klíčová a to nejen pro výživu jednotlivých buněčných kultur, ale také pro simulace celých orgánů (více v kapitole 5.4.) (Huh et al., 2010; Park et al., 2018). Výše zmíněné lze zajistit pomocí mikrofluidních systémů.

3D kultivace však mají i svá negativa. Zejména se potýkají s technickými nedostatky jako je nedostatek analytických metod, které se na ně dají aplikovat. V porovnání s 2D kulturami je také mnohem obtížnější interpretace získaných dat (Eglen and Randle, 2015). Přestože byly dlouhá léta používány zejména jednovrstvé kultury pro svou jednoduchost a finanční dostupnost, v poslední době stoupá poptávka po 3D kultivačních systémech, které jsou kromě výše zmíněných pozitiv vhodné také pro vysoce výkonné screeniny nezbytné k testování léčiv. Výhody 3D kultivací oproti 2D kultivacím jsou zaznamenávány i v současné době, jejich oblíbenost tedy stále roste (Mei et al., 2019). V této práci bude proto věnována pozornost 3D kultivačním mikrofluidním systémům.

2.2. Koncentrační gradient

Jedním z nejdůležitějších parametrů kontrolované buněčné proliferace, migrace i diferenciace je koncentrace rozpustných faktorů, respektive jejich gradient. Buněčná diferenciace je přímo závislá na gradientu těchto faktorů, zejména růstových - epidermální růstový faktor (EGF) a fibroblastový růstový faktor (FGF). Na Obrázku 1 je příklad zařízení, které umožnilo sledovat vliv růstových faktorů (GF) na diferenciaci neurálních kmenových buněk (NSC). Červená mikropipeta obsahovala médium s EGF a FGF, modrá mikropipeta obsahovala médium bez GF (B). Z obou mikropipet bylo za pomoci externí osmotické pumpy (C) médium vytlačováno a kontinuálně procházelo chipem (A), v němž byly připraveny NSC. Difuzí docházelo k mísení obou médií a k vytvoření gradientu GF. Následně byly NSC

analyzovány v devíti pozicích, v nichž se lišil gradient GF (D). Zajímavým zjištěním bylo, že NSC vykazovaly nejvyšší procento diferenciaci v prostřední části chipu, tedy v oblasti, kde koncentrace GF byla relativně nízká, avšak stále přítomná (J. H. Kim et al., 2018). Obdobné zařízení je možné použít i pro studium jiných buněčných typů.



Obrázek 1. Příklady mikrofluidních systémů pro tvorbu gradientů (1) Mikrofluidní chip s gradientem GF. Označení pozic: L (levá), S (střed), P (pravá), Vs (vstup), Vy (výstup). (Upraveno dle J. H. Kim et al., 2018) (2) Citlivější větvený model ke studiu gradientu buněk. (Upraveno dle Mahadik et al., 2014)

Koncentrační gradient lze v mikrofluidních systémech připravit i jinými způsoby. Důležitou roli hraje tvar kanálků, které k těmto účelům mohou nabývat jednoduchého tvaru

písmene Y či být složitěji větvené. Další možností je vytvoření gradientu řízeného tlakem. Přehled možností k vytvoření koncentračního gradientu je názorně zpracován v následujícím review (Xiang Wang et al., 2017). Nezbytnou součástí gradient generujících zařízení nemusí být ani přítomnost toku média (Abhyankar et al., 2006). Krom gradientu koncentračního mohou hrát důležitou roli i jiné gradienty, například teplotní (Xinran Wang et al., 2017) nebo gradient rychlosti toku média (Kim et al., 2016).

Gradientem lze ovlivňovat velkou řadu klíčových parametrů, jakými jsou například buněčná proliferace a diferenciací (J. H. Kim et al., 2018), adsorpce proteinů (Zhou et al., 2019), chemotaxe (K. and Jadhav, 2018), buněčná adheze (van Weerd et al., 2016), účinnost farmak (Chi et al., 2016) a mnoho dalších. V jediném mikrofluidním zařízení je možné paralelně pracovat i s velkým množstvím různých gradientů a sledovat jejich vliv na přítomné buňky (Frank and Tay, 2013). Toho se využívá mimo jiné ke studiu účinku léčiv, respektive závislosti jejich gradientu na výsledný efekt vyvolaný u buněk (Chi et al., 2016). V současné době se studium rozšířilo i do oblasti *in silico*, kde jsou simulace časově i finančně méně náročné (Cóndor et al., 2018).

2.3. Vliv proudění média

Dalším klíčovým parametrem mikrofluidních systémů je tok média, obecně jeho proudění. Laminární proudění, které vzhledem k malým rozměrům mikrofluidních systémů v kanálcích převažuje, umožňuje kontrolu nad smykovým třením (shear stress) (Lu et al., 2004). Toho se využívá zejména u tkání, které jsou *in vivo* v prostředí vysoce ovlivněném prouděním jako například ledviny nebo játra (Griffith and Swartz, 2006; Powers et al., 2002). Obecně lze říci, že vysoká úroveň stresu způsobeného třením je pro buňky zpravidla škodlivá. Omezit jeho velikost lze několika způsoby jako je snížení rychlosti proudící tekutiny (Kim et al., 2006) nebo vytvořením protektivní vrstvy pomocí tzv. mikrostěn (Khademhosseini et al., 2005). Přijatelná úroveň tření je pro různé typy buněk individuální (Fok and Zandstra, 2005; Li et al., 2005). Proudění hraje klíčovou roli v mnoha ohledech. Nejvýznamnější z nich jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Vliv proudění na parametry v mikrofluidním systému

Vlivy proudění:	Literatura:
proliferace a diferenciaci buněk	(Fok and Zandstra, 2005; Kapur et al., 2003)
adheze buněk	(Christophis et al., 2010)
pohyblivost buněk	(Decave, 2003; Fache, 2005)
separace určitých typů buněk	(Sun et al., 2019)
vychytávání jednotlivých buněk	(Zhou et al., 2016)
stimulace mezibuněčné komunikace	(Middleton et al., 2017)

Problematika je dále podrobněji probrána v pracích Deborah Huber, Lily Kim a Davida Wibowo (Huber et al., 2018; Kim et al., 2007; Wibowo et al., 2019).

2.4. Tlak uvnitř mikrokanálků

Důležitým parametrem mikrofluidních systémů je také tlak vyvolaný uvnitř mikrokanálků často úzce související s prouděním uvnitř mikrokanálků (Raj et al., 2018), případně i s gradientem molekul (Wu et al., 2018). Tlak uvnitř mikrokanálků je využíván k řízenému generování buněčných dropletů (Ke et al., 2015), analýze genové exprese přítomných buněk (King et al., 2007) nebo pomáhá s testováním cytotoxicity léčiv (Sugiura et al., 2008). Dále může ovlivňovat velikost proudění a s ním spojeného smykového tření (Rotenberg et al., 2012) či přímo indukovat buněčnou diferenciaci, například osteogenezi (Sim et al., 2007). Důležitá je i jeho konkrétní velikost, neboť ta může být závislá na jeho účinku (Kowsari-Esfahan et al., 2018). Tlak může být využit také pro simulaci některých modelů organs-on-a-chip, například lung-on-a-chip, kde bylo k simulaci plicního dýchání využito postranních mikrokanálků, do nichž bylo vpouštěno vakuum (podrobněji v kapitole 5.4.1.) (Huh et al., 2010).